

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO

VERANO DE LA CIENCIA MEMORIA 2021



SOMOSUAQ
SERVIR CONSTRUIR TRANSFORMAR





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO

Créditos

Editores

Dra. Ma. Guadalupe Loarca Piña
Directora de investigación, innovación y posgrado

Dra. Azucena de la Concepción Ochoa Cervantes
Coordinadora Académica de Investigación



Comité Organizador

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Rectora

Dr. Javier Ávila Morales
Secretario Académico

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Dra. Azucena de la Concepción Ochoa Cervantes
Coordinadora Académica de Investigación

M. en GIC. Karina Villarauz Camargo
Coordinadora de Difusión y Enlace, Dirección de Investigación y Posgrado

Apoyo logístico

MATI. Maura Jarubi Chávez López
Auxiliar en Coordinación

C. Luz María Santillán Guardiola
Auxiliar en Coordinación

INTRODUCCIÓN

Una de las funciones sustantivas de la universidad es la investigación, tarea a través de la cual la Universidad Autónoma de Querétaro asume el compromiso de social de dar respuesta a algunas necesidades en diversos ámbitos. Aunado a lo anterior, la investigación, al estar vinculada con la docencia y en la mayoría de los casos con la vinculación permite proporcionar a las y los estudiantes una formación integral, es por lo anterior que en los distintos programas educativos de esta casa de estudios se forma en investigación.

Desde la Secretaría de Investigación, Innovación y Posgrado, a través de la Dirección de Investigación se propone la realización de acciones que contribuyan a la formación en investigación de nuestro estudiantado, es por lo anterior que año con año se organizan los **Veranos de la Ciencia**. Esta actividad, consiste en una estancia de cinco semanas en donde las y los estudiantes colaboran dentro de un proyecto de investigación tutelado por una de las investigadoras o investigadores de nuestra universidad, con el objetivo de acercarlos a la ciencia, formarlos en investigación y despertar el interés por cursar un posgrado.

Los veranos de la ciencia se realizan en dos modalidades: el **Verano de la Ciencia UAQ**, dirigido a estudiantes que cursan del quinto semestre en adelante y el **Verano de Introducción a la Investigación** dirigido a estudiantes que cursan del primero al cuarto semestres. Estos programas, en comparación con otros similares, es que en los realizados por nuestra institución pueden participar estudiantes de cualquier semestre y profesores de cualquier facultad, lo cual amplía la oportunidad de formación tanto para estudiantes como para investigadores. Y en esta edición nos congratulamos de abrir la convocatoria también para estudiantes de nuestra escuela de bachilleres para favorecer con esto las vocaciones científicas.

Es así que, este año celebramos la edición número **20°** del Verano de la Ciencia UAQ y el número **15°** del Verano de Introducción a la Investigación, en los que han participado **17** y **40** estudiantes respectivamente, así como 3 estudiantes de la escuela de bachilleres.

En la presente compilación presentamos el producto final de cada uno de los participantes, el cual consiste en un informe de actividades de la estancia con formato de artículo científico. Los trabajos presentados, además de que ejercitan a las y los estudiantes en la escritura con fines de comunicación académica, muestra el trabajo realizado y los aprendizajes adquiridos.

Agradecemos a las y los estudiantes, a los investigadores e investigadoras por su participación e interés.

Deseamos que lo aprendido trascienda en la formación personal y científica de las y los participantes.

Atentamente

“Educo en la Verdad y en el Honor”

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Directora de Investigación, Innovación y Posgrado

Dra. Azucena de la Concepción Ochoa Cervantes

Coordinadora Académica de Investigación

Verano de la Ciencia UAQ

Índice

Facultad de Ciencias Naturales

[Miranda Ibarra Susana](#)

[Rocha Solache Mariana](#)

Facultad de Contaduría y Administración

[Hernández Mendoza Paulina](#)

[Olvera Olvera Luis Alejandro](#)

Facultad de Informática

[Chávez Gómez Joaquín Alexander](#)

[Cruz Lozano Roberto](#)

Facultad de Ingeniería

[Fuentes Molina David](#)

[González Emmert Javier](#)

[Mandujano Gómez Hugo Alberto](#)

[Martínez Barras Alexis](#)

[Méndez Guerrero Ailed Cecilia](#)

[Quillo Hernández Juan Carlos](#)

[Sánchez Ruíz Brenda Aracely](#)

[Serratos Miguel Ángel](#)

Facultad de Lenguas y Letras

[Ledesma Juárez Luz del Carmen](#)

Facultad de Química

[Borges García Inti Atzayacatl](#)

[Hernández Santillán José Miguel](#)

[Monroy Valadez Mónica José Mayela](#)

[Sánchez Hernández Valeria](#)

Perfil fenólico y efecto citotóxico de dos extractos acuoso de hoja de *Cnidoscolus Aconitifolius* y de *Aloe Barbadensis* en cáncer de colon *in vitro*

Kuri García Aarón, Vargas Madriz Ángel Félix, Miranda Ibarra Susana.

Resumen

El cáncer de colon es el segundo tipo de cáncer más común. En México, en el 2002 se registraron un total de 3,791 nuevos casos de cáncer de colon, situación que motivó que esta neoplasia se ubique de las primeras 10 causas de morbilidad por neoplasias malignas en México. Uno de los tratamientos para la prevención del cáncer es el consumo de antioxidantes, ya que se ha observado que el daño causado por los radicales. Se ha encontrado en las hojas de chaya y en la aloe vera propiedades antioxidantes. Es por ello que en el presente estudio se buscó analizar los compuestos fenólicos totales y los flavonoides totales de la *Cnidoscolus Aconitifolius* y *Aloe Barbadensis Miller* y se buscó determinar el efecto citotóxico en células de cáncer de colon. Para la determinación de compuestos fenólicos totales, se llevó a cabo con el método de Folin-Ciocalteu por triplicado, y para la determinación de flavonoides totales se utilizó el método colorimétrico de cloruro de aluminio triplicado. Como resultados se observó que en el caso de *Cnidoscolus Aconitifolius* se observó que presentó mayor cantidad de CFT en comparación de *Aloe Barbadensis* con una diferencia estadística significativa. Por el otro lado, no se observó una diferencia estadística significativa en los FT entre los dos extractos. En conclusión ambos extractos tienen efectos citotóxicos similares en la línea celular HT-29 a 24 horas de la exposición al tratamiento. Se requiere más investigación para continuar con el proceso de búsqueda de compuestos bioactivos de los alimentos nativos mexicanos.

Palabras clave: *Cnidoscolus Aconitifolius*, chaya, *Aloe Barbadensis*, flor de aloe vera, cáncer de colon, fenoles.

Summary

Colon cancer is the second most common type of cancer. In Mexico, in 2002, a total of 3,791 new cases of colon cancer were registered, a situation that made this neoplasm one of the first 10 causes of morbidity due to malignant neoplasms in Mexico. One of the treatments for cancer prevention is the consumption of antioxidants, since it has been observed that the damage caused by radicals. Antioxidant properties have been found in chaya leaves and aloe vera. That is why in the present study we sought to analyze the total phenolic compounds and total flavonoids of *Cnidoscolus Aconitifolius* and *Aloe Barbadensis Miller* and to determine the cytotoxic effect on colon cancer cells. For the determination of total phenolic compounds, the Folin-Ciocalteu method was used in triplicate, and for the determination of total flavonoids, the aluminum chloride colorimetric method was used in triplicate. As results it was observed that in the case of *Cnidoscolus Aconitifolius* it was observed that it presented a greater amount of CFT compared to *Aloe Barbadensis* with a significant statistical difference. On the other hand, no significant statistical difference was observed in the TF between the two extracts. In conclusion both extracts have similar cytotoxic effects on HT-29 cell line at 24 hours of treatment exposure. Further research is required to continue the process of searching for bioactive compounds from native Mexican foods.

Key words: *Cnidoscolus Aconitifolius*, chaya, *Aloe Barbadensis*, aloe vera flower, colon cancer, phenols.

Introducción

El cáncer de colon es una enfermedad en donde se forman células transformadas malignas. El cáncer de colon se origina en crecimientos benignos llamados pólipos los cuales, tienen el potencial de transformarse en malignos, pero aquellos que tienen tal capacidad se denominan adenomas. En la mayoría de los casos, a un adenoma le lleva más de 10 años convertirse en cáncer. En general, el cáncer colorrectal es el segundo tipo de cáncer mortífero más común, y la tercera causa más común de muertes relacionadas al cáncer en los Estados Unidos, tanto en hombres como en mujeres. (Tirado & Mohar, 2008)

En México, se carece de información sobre la tasa de incidencia del cáncer colorrectal ya que no existen registros poblacionales que permitan el cálculo de la misma, sin embargo, se tiene el número de casos nuevos notificados por los patólogos y médicos oncólogos incorporados al Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM). En el 2002, se registraron un total de 108,064 casos nuevos con diagnóstico histopatológico de cáncer; del total de casos nuevos, 3,791 (3.5%) correspondieron a cáncer de colon (2.3%) y cáncer de recto (1.2%), situación que motivó que esta neoplasia se ubique de las primeras 10 causas de morbilidad por neoplasias malignas en México, específicamente en el tercer lugar. Se puede afirmar, que la alta incidencia de colorrectal en el mundo occidental es debida tanto a factores ambientales como a una dieta fundamentalmente rica en grasa y proteínas, y pobre en fibra y vegetales, así como al progresivo envejecimiento de la población. (Tirado & Mohar, 2008)

Uno de los tratamientos para la prevención del cáncer es el consumo de antioxidantes. Ya que el cáncer es *per se* una enfermedad inductora de estrés oxidativo. Las células neoplásicas producen de forma intrínseca una cantidad de especies reactivas del oxígeno (ERO), y en concentraciones elevadas de éstas, interaccionan con macromoléculas como los lípidos de membrana, las proteínas y el ADN, ocasionando daño oxidativo irreversible y alterando las funciones vitales de la célula. (Viñas et al., 2012)

Y el daño oxidativo del ADN no reparado puede conducir a la acumulación de mutaciones que promueven el cáncer. (Irrazabal et al., 2021)

La investigación realizada de esta manera ha observado que el daño causado por los radicales libres puede mitigarse suplementando uno o más antioxidantes. Por lo tanto, se han encontrado en plantas varios compuestos con diferentes propiedades antioxidantes, y se considera que estas plantas tienen un alto potencial biológico para prevenir y tratar el daño causado por los radicales libres. (A. et al., 2017)

Las medicinas tradicionales y las plantas medicinales se utilizan ampliamente en la mayoría de los países en desarrollo y se consideran agentes terapéuticos para mantener una buena salud. Durante décadas, la gente ha realizado varios estudios sobre plantas medicinales y sus componentes. Uno de ellos se centra en la composición de unos compuestos, principalmente

compuestos fenólicos, porque tienen múltiples beneficios en la lucha contra las enfermedades crónicas, como las cardiovasculares, la neurodegeneración y el cáncer. (A. et al., 2017)

Chaya se refiere a cualquier grupo de plantas del género *Cnidoscolus*, que forma parte de la familia Euphorbiaceae. El género está compuesto por 50 especies, 20 de las cuales son endémicas de México. *Cnidoscolus aconitifolius* tiene cinco pétalos con lóbulos y bordes dentados, pecíolos largos, sin pubescencia, base sagital, glándulas y flores blancas. La chaya se ha utilizado como alimento desde antes de la era de Colón y actualmente se consume con frecuencia en ciertas poblaciones. Además, se ha descubierto que las hojas de té son una fuente importante de proteínas, β -caroteno, vitaminas, ácido ascórbico, calcio, potasio y hierro. Según los informes, las hojas de té se utilizan en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades, tiene propiedades antidiabéticas, antioxidantes, hepatoprotectoras y está relacionada con las hormonas del eje pituitario-gonadal. (A. et al., 2017)

De igual manera, el aloe vera se ha utilizado durante mucho en productos de alimentos saludables, para fines médicos y cosméticos. Los informes atribuyen al Aloe propiedades antitumorales y antidiabéticas, además de su eficacia en el tratamiento de las úlceras gástricas. Las actividades antiinflamatorias de componentes de las especies Aloe también se han investigado. En un estudio de Davis et al. demostraron las propiedades de cicatrización de heridas de *A. Barbadens* y de cicatrización de heridas de *A. Barbadenis*. (Lee et al., 2000)

El Aloe es una suculenta tropical resistente a la sequía. En botánica se conoce como Aloe vera (L.) Webb. (*Aloe barbadensis* Mill.) de la familia Liliaceae. El aloe vera es la variedad de aloe más común. Es originaria de la región mediterránea, la península arábiga, la India, China y el este de África. Las hojas están llenas de un jugo lechoso de color marrón o amarillito que contiene la mayoría de los compuestos bioactivos. (Heş et al., 2019)

El aloe vera (*Aloe barbadensis* Mill./*Aloe vera* Linn), es la variedad de aloe más común. Es una planta perenne de tallo corto, que crece hasta una altura de 60-100 cm. Las plantas de aloe tienen hojas gruesas, verdes o grises y hojas carnosas de color verde en forma de espada. Los bordes de las hojas tienen espinas triangulares. El brote floral, que crece en

verano, está formado por numerosas flores de color rosa y naranja en forma de campana. (Heş et al., 2019)

Es por ello que en el presente estudio se buscó analizar los compuestos fenólicos totales y los flavonoides totales de la *Cnidioscolus Aconitifolius* y *Aloe Barbadensis Miller* y se buscó determinar el efecto citotóxico en células de cáncer de colon.

Materiales y métodos

Obtención de los extractos

Para obtener la muestra de chaya y la flor de aloe vera, se cosecharon y se secaron en un horno de aire forzado (Shel lab Fx 1375, North Carolina, USA) a 40°C aproximadamente 48 horas, hasta obtener un peso constante obteniendo una materia seca. Posteriormente, se molió la materia seca en un molino eléctrico con un diámetro de criba de 0.5mm (Thomas Wiley Model 4 Scientific, New Jersey, USA). El polvo molido se colectó en bolsas oscuras para protegerlas de la luz y temperatura en un ultracongelador (REVCO last II, Ohio, USA) a -80°C para su análisis.

Se pesaron 200 mg de materia seca y molida, se extrajeron con 10 ml de agua durante 30 min con ayuda de un ultrasonificador (modelo BRANSON 5510) a 42 kHz +/- 6% a temperatura ambiente en ausencia de luz. Posteriormente el extracto se filtró a través de papel Whatman (0.20 µm), el sobrenadante obtenido se almacenó en frascos color ámbar a -80°C hasta su análisis.

Determinación de los compuestos fenólicos totales

Para la determinación de los compuestos fenólicos, éstos se determinaron espectrofotométricamente de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu por triplicado. Se realizó la curva de calibración para fenoles totales utilizando ácido gálico como estándar en las concentraciones (peso/volumen) de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 µl. Se tomó una alícuota del extracto (12.5 µl) y se llevó a un volumen de 50 µl de agua destilada. Posteriormente se mezcló con 32 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N), se le agregaron 156 µl de Na₂CO₃ al 20% y se dejó reposar en ausencia de luz durante 2 horas a temperatura ambiente. El control se reparó de manera similar reemplazando la cantidad de muestra con agua destilada. Después de 2 horas se midió la absorbancia de cada una de las muestras en un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 750 nm y los resultados

fueron expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por 100g de materia seca (mg EAG/100 g MS)

Determinación de los flavonoides totales

Para la determinación de flavonoides totales, se utilizó el método colorimétrico de cloruro de aluminio triplicado. Se realizó la curva de calibración utilizando catequina como estándar en las concentraciones (peso/volumen) de 100, 200, 300, 500, 700, 900, 1000 µl. Se tomó una alícuota del extracto (31.25 µl) y se añadieron 156 µl de agua destilada, después se añadieron 9.4 µl de NaNO₂ al 5% y se dejó reposar durante 6 min, posteriormente se agregó AlCl₃ al 10% y se dejó reposar por 5 min, después se añadió 63 µl de NaOH (1M); Finalmente se agregó 35 µl de agua destilada. El control se preparó de manera similar reemplazando la cantidad de muestra con agua destilada. La curva y la muestra se leyeron a 510 nm y los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de catequina por 100 g de materia seca (mg EC/100 g MS).

Determinación del efecto citotóxico

Se utilizaron cultivos celulares de cáncer de colon (HT29). A partir de estos cultivos celulares confluentes al 80%, se hicieron suspensiones de 5x10³ células por 500 µL de medio de crecimiento, se sembrarán en 14 pozos de una placa de 24 (Nunclon Δ Thermo Fisher Scientific®, Sigma-Aldrich® No. Cat. D7039-1CS) para luego ser incubadas. Transcurridas 48 h, se realizó un cambio de condiciones para sincronizar los cultivos mediante el reemplazo del medio de crecimiento (DMEM suplementado con 2% de SFB + 1% de anti-anti). Luego de una incubación de 24 h se realizó el conteo de control inicial, incorporando 500 µL de tripsina + 0.02% de EDTA a dos de los pozos e incubando durante 5 min a 37° C. Se inactivó la enzima con 500 µL de medio de crecimiento, las suspensiones celulares se trasladaron a tubos Eppendorf® de 1.5 mL (Sigma-Aldrich® No. Cat. T9661) y se centrifugarán (Eppendorf® 5415C) a 1200 rpm por 5 min. Luego de retirar 900 µL de sobrenadante, los pellets serán cuidadosamente resuspendidos y 20 µL de las suspensiones celulares concentradas serán introducidas en cada una de las dos cámaras de un contador celular de Neubauer (BLAUBRAND®, Sigma-Aldrich® No. Cat. BR717805-1EA). Se sincronizará cada par de pozos, con DMEM suplementado con 2% de anti-anti + 0.5% albúmina sérica bovina (ASB, GIBCO® Sigma-

Aldrich® No. Cat. 9048-46-8) y concentraciones (0.1, 1.0, 10, 100, 1000 µg/ml EL), o vehículo (ASB) al 0.5% (v/v). Transcurridas 24 h de exposición, los cultivos fueron tripsinizados y se procedió al recuento celular como ha sido descrito. El porcentaje de sobrevivencia será calculado en base a la media de los conteos de control inicial y el porcentaje de proliferación, a partir de la media de los conteos de control negativo (vehículo). Se realizaron regresiones simples de cada tratamiento, utilizando las medias de 4 experimentos independientes desarrollados con células de distintas transferencias, para determinar en cada caso las concentraciones inhibitorias media (CI50) y letal media (CL50).

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se muestra de igual forma como (Otros-Autores, 2021) mostraron un aumento similar, pero en células de cáncer de cérvix... por ejemplo. resultado y la discusión de cada punto de la tabla.

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de los dos extractos en el cual se desglosan los compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT) y concentraciones medias inhibitorias (CI50) y letales (CL50).

En el caso de *Cnidoscopus Aconitifolius* se observó que presentó mayor cantidad de CFT en comparación de *Aloe Barbadensis* con una diferencia estadística significativa. Por el otro lado, no se observó una diferencia estadística significativa en los FT entre los dos extractos.

Hablando acerca del efecto biológico, se obtuvo una CI50 de 916.2 para *Cnidoscopus* y 1248.2 para *Aloe*, lo cual nos indica que se necesita aproximadamente un 36 % más de extracto de *Aloe* para poder lograr la inhibición media. Dicho esto, se observa que *Cnidoscopus* presenta una mayor actividad para inhibir la proliferación celular contra este tipo de línea celular.

De igual manera se observó que *Cnidoscopus* presentó una menor concentración letal media, con una diferencia aproximadamente del 20 %, lo cual también nos indica su gran actividad de muerte celular en comparación con *Aloe*.

Tabla 1. Comparación de la caracterización del perfil fenólico (CFT y FT) y del efecto biológico en la línea celular HT-20 (CI50 y CL50) de los dos extractos.

	<i>Cnidoscopus Aconitifolius</i>	<i>Aloe Barbadensis</i>	<i>p</i>
CFT	5932.6 ± 6	197.3 ± 4	0.0278*
FT	2682.4 ± 67.6	2374.8 ± 69.4	0.0641
CI50	916.2 ± 45.4	1248.2 ± 41.5	0.0471*
CL50	2614.1 ± 98.4	3165.2 ± 58.6	0.0184*

CFT: Compuestos fenólicos totales, FT: flavonoides totales, CI50: Concentración inhibitoria media, CL50: Concentración letal media. Los resultados se muestran como la media ± desviación estándar (n = 3). CFT se muestran en mg Equivalentes de ácido gálico / g de extracto liofilizado y FT se muestran en mg Equivalentes de catequina / g de extracto liofilizado. Se muestra en µg/ml de extracto liofilizado para las concentraciones inhibitorias y letales medias. * Prueba *t* de student con una diferencia significativa (*p* < 0.05) entre ambos extractos.

En el 2019, Oikpejam y colaboradores reportaron los resultados de su trabajo realizado sobre el efecto de extractos de diferentes partes de *Cnidoscopus Aconitifolius* en las líneas celulares MCF-7 y NCI-H460.

A una concentración de 50 µg/mL el extracto tuvo un porcentaje de inhibición de 63.08±3.63%. Se encontró que la CI50 fue del 26.67±3.33 y una CL mayor de 250 µg/mL para la línea celular MCF-7. Para el caso de la línea celular NCL-H460, se reportó una CI50 de 59.67±0.75 y CL50 mayor de 250 µg/mL (Oikpejam et al., 2019).

Basak y colaboradores (2017) observaron el efecto del extracto de *Aloe Barbadensis* en la línea celular MCF-7 correspondiente a cáncer de mama así como en la línea celular PBMC. En el extracto se encontró la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, azúcares reductores y alcaloides pero no de taninos. Se observó que la concentración de 100 µg/mL presentó un porcentaje de mortalidad del 92.687 % así como un 100% de células vivas de PBMC.

Tanto menores como mayores concentraciones de extracto presentaron un incremento en el porcentaje de células vivas de MCF-7, lo que indica que la concentración de 100 µg/mL presenta los mejores resultados (Balak et al., 2017). Esto nos indica la selectividad anticancerígena y su no toxicidad hacia PBMC.

De igual manera, Majumder y colaboradores (2019) observaron el efecto del extracto de *Aloe Barbadensis* en la línea celular MCF-7. Reportaron que su extracto contenía grandes cantidades de ácidos fenólicos (385.662 µg/mL) y flavonoides (160.402 µg/mL). Encontraron que la CI50 fue de 23 µg/mL y para células no cancerígenas fue mucho mayor (332 µg/mL) (Majumder et al., 2019).

Conclusiones

El extracto de CA tiene más compuestos fenólicos que la AB, y de igual forma se observó una CI50 y CL50 menor, por lo que su efecto en la línea celular HT-29 es mayor. Es importante mencionar que AB al mismo tiempo mostró efectos en la línea celular, pero siendo menores que CA. Por lo que ambos extractos tienen efectos citotóxicos similares en la línea celular HT-29 a 24 horas de la exposición al tratamiento. Se requiere más investigación para continuar con el proceso de búsqueda de compuestos bioactivos de los alimentos nativos mexicanos.

Agradecimientos

A Joss y Andy, técnicos del laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Referencias

Basak, P., Paul, S., & Majumder, R. (2017). In vitro cytotoxic study of aloe vera whole leaf extract on PBMC and breast cancer cell line. 2017 2nd International Conference for Convergence in Technology (I2CT). doi:10.1109/i2ct.2017.8226106

Majumder, R., Parida, P., Paul, S., & Basak, P. (2019). In vitro and in silico study of Aloe vera leaf extract against human breast cancer. *Natural Product Research*, 1-4. doi:10.1080/14786419.2018.1534848

A., K.-G., J., L. C.-S., & S., H. G.-M. (2017). Phenolic profile and antioxidant capacity of *Cnidioscolus chayamansa* and *Cnidioscolus aconitifolius*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(45), 713-727. <https://doi.org/10.5897/jmpr2017.6512>

Heś, M., Dziedzic, K., Górecka, D., Jędrusek-Golińska, A., & Gujska, E. (2019). Aloe vera (L.) Webb.: Natural Sources of Antioxidants – A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(3), 255-265. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00747-5>

Irrazabal, T., Thakur, B. K., Croitoru, K., & Martin, A. (2021). Preventing Colitis-Associated Colon Cancer With Antioxidants: A Systematic Review. *Cmgh*, 11(4), 1177-1197. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.12.013>

Lee, K. Y., Weintraub, S. T., & Yu, B. P. (2000). Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(2), 261-265. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00235-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00235-X)

Oikpfean E.,O., Ayinde B.,A., Mudassir A., Farooq A.,D., (2019) Comparative In Vitro Assessment of the Methanol Extracts of the Leaf, Stem, and Root Barks of *Cnidioscolus aconitifolius* on Lung and Breast Cancer Cell Lines. *Turk J Pharm Sci.* 2019 Dec;16(4):375-379. doi: 10.4274/tjps.galenos.2018.19942. Epub 2019 Nov 11. PMID: 32454739; PMCID: PMC7227881.

Tirado, L., & Mohar, A. (2008). Epidemiología del cáncer de colon y recto. In *Gaceta Mexicana de Oncología* (Vol. 7, Issue 5).

Viñas, G., Puig, T., & Porta, R. (2012). Oxidative stress in patients with cancer: Two sides of the same coin. *Medicina Clinica*, 139(4), 171-175. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2011.11.021>

Desarrollo de una vacuna contra la enfermedad hemorrágica viral de los conejos

Alumna: Rocha Solache Mariana

Resumen

La enfermedad hemorrágica viral de los conejos (EHVC) causada por el virus tipo 2 se presentó por primera vez en México en el 2020. Este virus no solo afecta al conejo europeo, sino también a las liebres, generando un peligro mayor para la cunicultura y el equilibrio de los ecosistemas del país. Se desarrolló una proteína quimérica recombinante basada en epítomos B y T de la proteína VP60 del virus de la enfermedad hemorrágica de los conejos tipo 2 que se expresó en un sistema bacteriano y se purificó mediante columnas de afinidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar la inmunogenicidad de esta vacuna, se probaron tres dosis de antígeno: 20, 40 y 60 ug de proteína emulsionada en adyuvante comercial. Se aplicaron dos dosis por vía subcutánea al día 0 y 21 y se tomaron muestras de suero los días: 0, 10, 21 y 31. Se realizó la determinación de anticuerpos a través de la prueba de ELISA indirecta. Los resultados demuestran que el antígeno vacunal es inmunogénico en conejos, generando anticuerpos específicos a partir de una segunda dosis vacunal, detectables a los 31 días post inmunización. No se observó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los tres tratamientos experimentales al día 31. Se sugieren nuevos ensayos para la evaluación de la inmunogenicidad y determinación de la dosis vacunal ideal.

Palabras clave: EHVC, vacuna, conejos.

Summary

The Rabbit Hemorrhagic Disease Type 2 (RHD 2) was presented for the first time in Mexico in 2020. This virus not only affects European rabbits, but also hares, generating a greater danger for rabbit farming and the balance of the country's ecosystems. A recombinant chimeric protein based on B- and T-cell epitopes of the VP60 protein of rabbit hemorrhagic disease virus type 2 was developed, expressed in a bacterial system and purified by affinity columns.

The objective of this work was to evaluate the immunogenicity of this vaccine. Three doses of

antigen were tested: 20, 40 and 60 ug of protein emulsified in commercial adjuvant. Two doses were administered subcutaneously on days 0 and 21, and serum samples were taken on days 0, 10, 21 and 31. The results show that the vaccine antigen is immunogenic in rabbits, generating specific antibodies from a second vaccine dose, detectable 31 days after immunization. No statistically significant difference ($P < 0.05$) was observed between the experimental treatments Tx2, 3 and 4 at day 31. New tests are suggested for the evaluation of immunogenicity and determination of the ideal vaccine dose.

Key words: RHD, vaccine, rabbits.

Introducción

La cunicultura se ha vuelto una actividad pecuaria económicamente favorable dentro del sector rural de nuestro país debido al aporte nutricional que brinda la carne de conejo, así como la facilidad de su manejo, alimentación, producción y aprovechamiento de la piel y el pelo, siendo una estrategia sustentable para el combate contra la desnutrición que aqueja a sectores de bajos recursos (SAGARPA, 2015). La mayor producción cunícola en México se concentra en granjas de traspatio (80% de la producción total), un 15% en granjas semitecnificadas y únicamente el 5% se encuentra en granjas tecnificadas. México ocupa el vigésimo lugar en producción de conejo, con aproximadamente 15 mil toneladas al año (Sistema Producto Cunícola del Distrito Federal, 2012). Aunado a la importancia económica y cultural de la cunicultura, México cuenta con una gran cantidad de especies de conejos y liebres silvestres que forman parte importante de las cadenas alimenticias y en el mantenimiento del equilibrio en los ecosistemas. Actualmente podemos encontrar 10 especies de conejos y 4 de liebres en nuestro país, de las cuales 6 especies de conejos y 1 de liebre son endémicas, por lo que México es reconocido como el país que alberga la mayor diversidad de estos animales (Fernández, *et al.*, 2015; Martínez, *et al.*, 2016; Romero y Cervantes, s.f). En 1973, a nivel nacional se dio inicio a un programa para el fomento de la producción cunícola. Por consiguiente, la cunicultura presentó un auge importante dentro del territorio nacional. En el año 1988 el tráfico ilegal de canales de conejos provenientes de China y EUA ocasionó el primer brote de la Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo (EHVC), por lo que se estableció un plan de emergencia donde se aplicó matanza zoonosanitaria a gran parte de la población cunícola del país, provocando que esta actividad pecuaria sufriera un

retroceso importante (Sistema Producto Cunicola del Distrito Federal, 2012; SADER, 2020). Fue hasta el 14 de enero de 1993 cuando oficialmente se declara erradicada la EHVC en México (Diario Oficial de la Federación, 1993).

La EHVC, también conocida como septicemia vírica, Neumonía hemorrágica (China) o Hepatitis necrótica infecciosa, es una enfermedad aguda, altamente contagiosa y letal que se presenta en los conejos europeos (*Oryctolagus cuniculus*) causada por un calicivirus del género Lagovirus, conocido como Virus de la Enfermedad Hemorrágica del Conejo o VEHC (SADER, 2020; Kerr y Vella, 2012; Spickler, 2020). Este virus posee una sola proteína estructural principal, la proteína VP60 con un peso molecular aproximado de 60kd y es una de las proteínas más importantes como antígeno vacunal (Urakova, *et al.*, 2015; Capilla, 2020). El virus se transmite por vía oral, nasal, conjuntival y parenteral. Los vectores como moscas, mosquitos, pulgas y los fómites son fuentes de infección. La signología que se puede apreciar en los animales varía de acuerdo a la presentación clínica, ya que puede ir desde muerte súbita hasta presentación de fiebre (hasta 42 °C), ictericia, epistaxis, dificultad respiratoria, ataxia y convulsiones. En los hallazgos a la necropsia se pueden observar necrosis hepática aguda y nefrosis (Neimanis *et al.*, 2018). Por las características de la enfermedad, es de notificación obligatoria a nivel internacional (SADER, 2020; Kerr y Vella, 2012; Spickler, 2020). SADER (2020), menciona que se conoce únicamente un serotipo del virus y los análisis filogenéticos de cepas patogénicas del VEHC indican la existencia de tres grupos distintos: el VEHC clásico con los genogrupos G1–G5 aislados en 1984, la variante antigénica VEHCa / G6 identificada en 1996, y el VEHC2 identificado en Francia en 2010, el cual desde entonces se ha extendido por todo el mundo. Esta última variante da lugar a la Enfermedad Hemorrágica viral de los Conejos Tipo 2 (EHVC 2), la cual afecta tanto al conejo doméstico, como al silvestre y a la liebre, por lo que se considera un peligro importante tanto para la actividad cunicola como para el equilibrio de los ecosistemas de nuestro país (CPA, 2020).

El 9 de abril del 2020 la SENASICA reportó ante la OIE el primer caso confirmado de la EHVC 2. El caso fue reportado en el municipio de Nuevo Casas Grandes, Chihuahua. Derivado de lo acontecido, el 26 de junio del 2020 se activó el Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal (DINESA), como herramienta para el control y erradicación de la enfermedad (Diario Oficial de la Federación, 2020).

Actualmente, cuatro países del continente americano han reportado casos de la EHVC 2: Canadá, Estados Unidos, México y Cuba. En nuestro país, se han reportado casos en los estados de Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Ciudad de México, Coahuila, Durango, Estado de México, Hidalgo, Jalisco, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas.

Por todo lo anterior, en el Laboratorio de Inmunología y Vacunas se generó una proteína quimérica recombinante basada en péptidos que contienen epítomos B y T de la proteína VP60 del VEHC 2. Esta proteína fue expresada en un sistema bacteriano y purificada mediante cromatografía de afinidad por columnas de níquel.

Objetivo general

Evaluar la inmunogenicidad y seguridad de la vacuna contra la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos.

Objetivos específicos

1. Evaluar la seguridad de la vacuna.
2. Evaluar la inmunogenicidad de la vacuna.

Metodología

1. Animales y alojamiento

Se utilizaron 28 conejos raza Nueva Zelanda de diez semanas de edad. El experimento se realizó en el módulo de conejos del Área Cunicola de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (ARCUN-UAQ), ubicado dentro de la Posta Zootécnica de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia en Amazcala, municipio de El Marqués, Querétaro. Los animales se encontraron alojados dentro de jaulas tipo americano de acero galvanizado, ubicadas a un metro del nivel del suelo. Se les brindó agua purificada por un sistema de filtros y luz UV a libre acceso y alimento comercial para conejo marca Nutroline®.

2. Tratamientos experimentales

Se distribuyeron de manera aleatoria 28 conejos en 4 tratamientos (Tx) experimentales: Tx 1) grupo control, Tx 2) inmunizado con 20 ug de proteína quimérica VHC, Tx 3) inmunizado con 40 ug de proteína quimérica VHC y Tx 4) inmunizado con 60 ug de proteína quimérica VHC, en donde cada grupo experimental contó con 7 individuos. Se colocaron dos conejos por jaula, siendo 4 jaulas por cada tratamiento. A cada conejo se le asignó un número de

identificación, el cual se marcó con tinta indeleble en el pabellón auricular de cada oreja.

3. Elaboración de las dosis vacunales

La elaboración de las dosis vacunales y el análisis de los sueros se realizaron en el laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro, ubicado en el campus Aeropuerto, Querétaro. Se elaboraron un total de 28 dosis vacunales, 7 por cada grupo experimental. Cada dosis se compuso por proteína quimérica de acuerdo a la concentración establecida para cada grupo (0, 20 40 y 60 ug), PBS estéril y adyuvante MONTANIDE™ ISA 71, a excepción del grupo control, para el cual las dosis vacunales sólo contenían PBS estéril y adyuvante MONTANIDE™ ISA 71. Las dosis fueron emulsificadas con sonicador durante 8 ciclos de 10 minutos cada uno. Durante los ciclos número 5 y 8 se analizó el tamaño de las micelas mediante microscopía en 100x aumentos, hasta que las micelas fueron menores a 5 micras y fueran uniformes. Cada dosis tuvo un volumen de 1 ml, las cuales fueron cargadas en jeringas de 3 ml con agujas de 22G.

4. Inmunización y obtención de muestras sanguíneas

Se aplicaron dos dosis vacunales, al día 0 y 21 del experimento. Las dosis se aplicaron de manera subcutánea, en la región del cuello. Una vez aplicadas las dosis vacunales, se monitorearon a los animales 24 y 48 hrs post-vacunación, obteniendo la temperatura corporal vía rectal y revisando el sitio de aplicación en busca de una reacción local. La toma de muestra sanguínea se efectuó al día 0, 10, 21 y 31 mediante la punción de la arteria central auricular con agujas 22G. La sangre fue colectada en tubos vacutainer para la posterior extracción del suero por centrifugación a 1600 rpm por 10 minutos. Los sueros se conservaron a -15°C hasta su uso.

5. Titulación de la proteína quimérica mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA indirecto)

Se realizó la técnica de ELISA indirecta para la titulación de la proteína quimérica. El protocolo utilizado para la elaboración de las ELISAS fue el siguiente: La proteína quimérica se evaluó a diferentes concentraciones: 8.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 ug/ml empleando solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.6. Se colocaron 100 ul por pozo y se incubó por 24 horas a 4 °C. Se realizaron tres lavados utilizando solución de lavado colocando 200 ug por pozo. Se bloquearon las placas utilizando leche al 5% en PBS-T 1x, colocando 200 ul por pozo e incubando por 1 hora a 37C a 200 rpm de agitación. Se realizaron

tres lavados con solución de lavado colocando 200 ul por pozo. Se bloquearon las placas utilizando leche al 5% en PBS-T 1x, colocando 200 ul por pozo e incubando por 1 hora a 37 °C a 200 rpm de agitación. Nuevamente se realizaron tres lavados con solución de lavado colocando 200 ul por pozo. Se realizaron diluciones de sueros del día 0 y 31 post inmunización, los cuales se colocaron por triplicado con 100 ul por pozo y se incubaron por 1 hora a 37 °C a 200 rpm de agitación. Se realizarán tres lavados con solución de lavado colocando 200 ul por pozo. Se agregó a la placa el anticuerpo secundario (anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano), el cual fue preparado en una dilución 1:6000 y colocando 100 ul por pozo. Se incubó por 1 hora a 37C a 200 rpm de agitación. Se realizaron tres lavados con solución de lavado colocando 200 ul por pozo. Se colocaron 100 ul de solución de revelado por pozo y se leyó la placa en un espectrofotómetro a los 15, 20, 25 y 30 minutos de haberse agregado la solución de revelado. Se realizó la lectura de los resultados en un lector de placas a una longitud de onda de 450 nm. El análisis estadístico y la elaboración de las gráficas se realizaron en el software GraphPad Prism®.

6. Determinación de anticuerpos mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA indirecta)

Para la determinación de anticuerpos se realizó la técnica de ELISA indirecta utilizando placas de poliestireno de 96 pozos. La evaluación del suero de cada individuo se realizó por triplicado. El protocolo utilizado para la elaboración de las ELISAS fue el siguiente: Las placas se tamizaron con la concentración ideal de proteína quimérica determinada anteriormente, disuelta en solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.6 utilizando 100 ul por pozo. Se incubaron 24 horas a 4C. Se realizaron tres lavados utilizando solución de lavado colocando 200 ug por pozo. Se bloquearon las placas utilizando leche al 5% en PBS-T 1x, colocando 200 ul por pozo e incubando por 1 hora a 37 °C a 200 rpm de agitación. Nuevamente se realizaron tres lavados con solución de lavado colocando 200 ul por pozo. Se realizaron las diluciones de los sueros en una concentración por definir. Se colocaron dichas diluciones por triplicado en la placa utilizando 100 ul por pozo y se incubaron por 1 hora a 37C a 200 rpm de agitación. Se realizaron tres lavados con solución de lavado colocando 200 ul por pozo. Se agregó a la placa el anticuerpo secundario (anticuerpo anti IgG de conejo unido a peroxidasa), el cual fue preparado en una dilución 1:6000 y colocando 100 ul por pozo. Se incubó por 1 hora a 37 °C a 200 rpm de agitación. Se realizaron tres lavados con solución de

lavado colocando 200 ul por pozo. Se colocaron 100 ul de solución de revelado por pozo y se leyó la placa de acuerdo al tiempo obtenido gracias a la titulación. Se realizó la lectura de los resultados en un lector de placas a una longitud de onda de 450 nm. El análisis estadístico y la elaboración de las gráficas se realizaron en el software GraphPad Prism®.

Resultados

1. Titulación del antígeno

El análisis de las lecturas a los diferentes tiempos (10, 15, 20, 25 y 30 minutos) y de las diferentes concentraciones del antígeno (8.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 ug/ml) se obtuvo que el tiempo de lectura y concentración del antígeno óptimos corresponden a los 20 minutos a 2 ug/ml, respectivamente.

2. Inmunogenicidad

La evaluación de la producción de anticuerpos en contra de la proteína quimérica mostró que la vacuna genera anticuerpos específicos a partir de una segunda dosis vacunal, visible a los 31 días post inmunización (Figura 1). No se observó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos experimentales Tx2, 3 y 4 al día 31, pero sin contar el grupo inmunizado solo con el adyuvante, por lo que se sugieren nuevos ensayos para la evaluación de la dosis vacunal ideal.

Si bien ciertos individuos de cada tratamiento experimental desarrollaron una respuesta inmune humoral específica contra la proteína quimérica utilizada como antígeno vacunal, no todos tuvieron el mismo resultado.

Discusión y conclusiones

Ensayos de vacunación en conejos realizados en otros estudios han detectado anticuerpos entre la segunda y la tercera semana post inmunización (Cheng, *et al.*, 2013; Bárcena, *et al.*, 2000; Mikschofsky, *et al.*, 2009; Salmons, *et al.*, 2018). La administración de una segunda dosis vacunal potencia la respuesta inmune, como se ha observado en otros ensayos de vacunación en conejos (Cheng, *et al.*, 2013; Mikschofsky, *et al.*, 2009; Park, *et al.*, 2019), siendo resultados similares a los observados en este estudio.

Factores relacionados con la vacuna (contaminación de los reactivos, antígeno en cantidad y calidad inadecuados, rompimiento de la cadena fría) y con el hospedador (factores genéticos, edad, estado de

salud) deben ser considerados en los próximos ensayos de vacunación (Wiedermann, *et al.*, 2016; OPS, 2021).

Se sugiere realizar nuevos estudios para evaluar la inmunogenicidad y la determinación de la dosis vacunal ideal, así como estudios para determinar los niveles de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes, así como la afinidad de dichos anticuerpos.

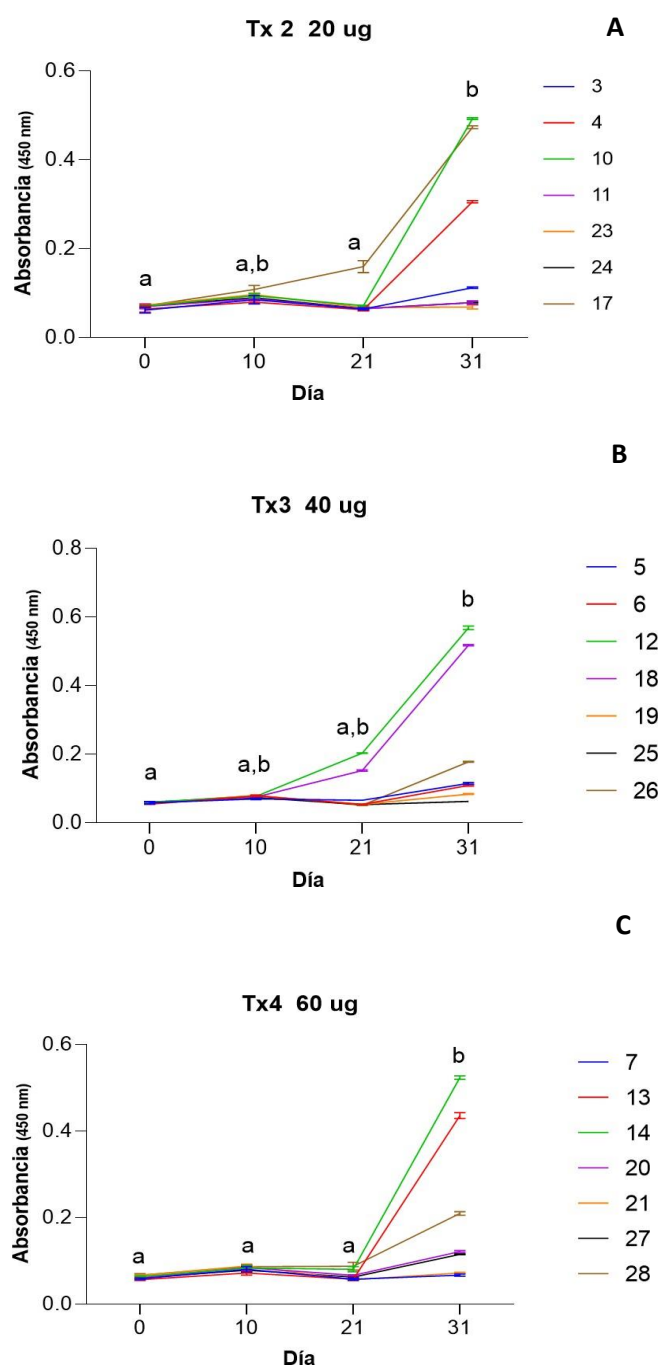


Figura 1. Determinación de anticuerpos por tratamiento (Tx) experimental. Las barras indican la desviación estándar de tres repeticiones de cada individuo. a-b Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

Referencias bibliográficas

(CPA) Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales. 2020. AVISE 03. Voletín digital de la Comisión México Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales.

(SADER) Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2020. Plan de Emergencia para la Atención de un Brote de la Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo en los Estados Unidos Mexicanos.

(SAGARPA) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2015. Manual de buenas prácticas de producción de carne de conejo. 1era. Edición. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)

Bárcena, J., Morales, M., Vázquez, B., Boga, J. A., Parra, F., Lucientes, J., Pagès-Manté, A., Sánchez-Vizcaino, J. M., Blasco, R., & Torres, J. M. 2000. Horizontal transmissible protection against myxomatosis and rabbit hemorrhagic disease by using a recombinant myxoma virus. *Journal of virology*, 74(3), 1114-1123. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1114-1123.2000>

Capilla, C. 2020. Enfermedad Vírica Hemorrágica Viral del Conejo: Revisión. *CuniNews*. junio, 2020.

Cheng, Y., Chen, Z., Li, C., Meng, C., Wu, R., & Liu, G. 2013. Protective immune responses in rabbits induced by a suicidal DNA vaccine of the VP60 gene of rabbit hemorrhagic disease virus. *Antiviral Research*, 97(3), 227-231. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.12.0

De la Sota, Marcelo Daniel. 2005. "Manual de Procedimientos: Recolección y Envío de Muestras." Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria 3: 1-31. [http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales_de_procedimiento/03 Reco Muestras.pdf](http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales_de_procedimiento/03_Reco_Muestras.pdf).

DOF Diario Oficial de la Federación. 1993. ACUERDO por el que se declara el territorio de los Estados Unidos Mexicanos, libre de la enfermedad hemorrágica viral de los conejos.

DOF Diario Oficial de la Federación. 2020. ACUERDO mediante el cual se activa, integra y opera el Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal (DINESA), para el control y en su caso, erradicación de la enfermedad hemorrágica viral de los conejos, tipo 2 (EHVC2) en los estados de Chihuahua y Sonora, así como para prevenir su diseminación dentro del territorio nacional, y en caso de que se detecte o se tenga evidencia científica de la presencia o inminente diseminación de la enfermedad en otros estados del territorio nacional, extender su aplicación paulatina, parcial o total a las 8 regiones contempladas en el artículo 134 del Reglamento de la Ley Federal de Sanidad Animal.

Fernández, J., F. Cisneros., F. Cervantes., A. Melgoza. 2015. Conejos y liebres silvestres de México. *Biodiversitas*.

Kerr, P., & Vella, D. 2012. Rabbits: Hemorrhagic Disease. *Clinical Veterinary Advisor: Birds and Exotic Pets*, 381-382. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-3969-3.00169-4>

Martínez Caldera, J., Palacio-Nuñez, J., Martínez-Montoya J. F., Clemente-Sánchez F., Sanchez-Rojas, G., & Olmos-Oropeza, G. 2016. Abundancia relativa y distribución de lagomorfos en el centro-norte de México. *Agroproductividad*, 9, 67-72.

Mikschofsky, H., Schirrmeyer, H., Keil, G. M., Lange, B., Polowick, P. L., Keller, W., & Broer, I. 2009. Pea-derived vaccines demonstrate high immunogenicity and protection in rabbits against rabbit hemorrhagic

disease virus. *Plant Biotechnology Journal*, 7(6), 537-549. doi:10.1111/j.1467-7652.2009.00422.x

Neimanis, A., Larsson Pettersson, U., Huang, N., Gavier-Widén, D., & Strive, T. 2018. Elucidation of the pathology and tissue distribution of *Lagovirus europaeus* Gl.2/RHDV2 (rabbit haemorrhagic disease virus 2) in young and adult rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Research*, 49(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0540-z>

Park, B.-J., Ahn, H.-S., Han, S.-H., Go, H.-J., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Choi, I.-S. 2019. Evaluation of the protective effects of a nanogel-based vaccine against rabbit hepatitis E virus. *Vaccine*. doi:10.1016/j.vaccine.2019.08.029

Romero, P.A., F.A. Cervantes. s.f. Los conejos y liebres silvestres orgullosamente mexicanos. *Especies: Revista sobre conservación y diversidad*. *Naturalia*.

Salmons, B., Lim, P.-Y., Djurup, R., & Cardosa, J. 2018. Non-clinical safety assessment of repeated intramuscular administration of an EV-A71 VLP vaccine in rabbits. *Vaccine*. doi:10.1016/j.vaccine.2018.09.062

Sistema productivo cunícola del Distrito Federal, 2012. Plan Rector Sistema Producto Cunícola del Distrito Federal, México. Consultado el 23 de enero del 2020. Disponible en: http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/estatales/EPT%20COMITE%20SISTEMA%20PR-ODUCTO%20CUNICOLA%20DF/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR_CUNICOLA_DF_2012.pdf

Spickler, A. R. 2020. Rabbit Hemorrhagic Disease and Other Lagoviruses Rabbit Hemorrhagic Disease. *Rabbit Hemorrhagic Disease and Other Lagoviruses*, 1-10. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/rabbit_hemorrhagic_disease.pdf

Urakova, N., Frese, M., Hall, R. N., Liu, J., Matthaei, M., & Strive, T. 2015. Expression and partial characterisation of rabbit haemorrhagic disease virus non-structural proteins. *Virology*, 484, 69-79. doi: 10.1016/j.virol.2015.05.004

Wiedermann, U., Garner-Spitzer, E., & Wagner, A. 2016. Primary vaccine failure to routine vaccines: Why and what to do?. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12(1), 239-243. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1093263>

Alinear la subcontratación

¿Quiénes se beneficiarían de limitar el outsourcing?

Hernández Mendoza Paulina (FCA, UAQ, phernandezm23@gmail.com), Enrique Kato Vidal (FCA, UAQ, enriquekato@uaq.mx), Alejandra Elizabeth Urbiola Solís (FCA, UAQ, alejandra.urbiola@uaq.mx)

Resumen

La subcontratación es un fenómeno que ha modificado las condiciones laborales de los empleados. El propósito del presente trabajo es mostrar la tendencia que ha mantenido la subcontratación en México. El análisis se realizó de 2003 a 2020 usando datos del Censo Económico y de la Encuesta Nacional de Ocupación y Empleo de Inegi. Se calculó el porcentaje de subcontratación por sexo y grupos de ocupación. Los resultados muestran un aumento de la subcontratación en todas las categorías estudiadas. Por tanto, si la subcontratación se asocia con bajas condiciones laborales, entonces el aumento (absoluto y relativo) de empleados subcontratados revela una creciente precariedad laboral.

Palabras clave: Subcontratación, empleos, condiciones laborales, México

Abstract

Outsourcing is a phenomenon that has change the working conditions of subcontracted workers. The aim of this paper is to show the trend that has sustained the outsourcing. The analysis was carried out from 2003 to 2020, using Inegi's Economic Census and the National Employment Survey. The percentage of outsourced employee was calculated by sex and occupation group. The results show an increase in outsourcing in every category. Thus, if outsourcing is related to low labour, then an (absolute and relative) increase in outsourced jobs reveals a growing precarization.

Key words: Outsourcing, employees, working conditions, Mexico

Introducción

La subcontratación es un fenómeno que han adoptado diversas empresas para obtener beneficios y facilitar la contratación del personal requerido. Sin embargo, los empleados son los que presentan un impacto

negativo al momento que las empresas recurren a la subcontratación.

El hecho de que las empresas hayan adoptado el fenómeno se debe a distintos factores, los cuales permiten a la empresa maximizar sus ganancias, reduciendo los beneficios para los empleados subcontratados, entre los que se encuentra: 1) la flexibilidad para contratar y despedir empleados con mayor facilidad, 2) la búsqueda de la disminución de los costos de operación mediante la reducción de costos (Goldschmidt y Schmieder, 2017).

Una vez detectado que los argumentos por los que las empresas recurren a la subcontratación son negativos para los empleados subcontratados, es posible plasmar resultados obtenidos en estudios realizados, en los que se muestran que los empleados subcontratados experimentan condiciones diferentes y perjudiciales en sus salarios y ganancias, respecto a los trabajadores que pertenecen a la empresa. De acuerdo con una investigación realizada por Goldschmidt y Schmieder (2017), es posible observar que los salarios de los empleados dentro de la subcontratación disminuyeron en un 10 y 15 por ciento respecto a los empleados similares fuera de la subcontratación. También se vinculó el aumento de la desigualdad con la subcontratación.

Asimismo, un estudio muestra que existe una brecha salarial entre los trabajadores permanentes y los subcontratados, aunque en el mismo estudio se muestra que es posible disminuir la brecha si se toman variables como la edad, sexo o zona geográfica, se argumenta que no es posible eliminar la brecha (Segal y Sullivan, 1997).

En México, en 2021 se modificó la reforma a la Ley Federal del Trabajo (DOF, 2021), en la cual se incluyen diversas limitantes para las empresas prestadoras de servicio de subcontratación, así como a las empresas que recurren al uso de estos servicios.

Esta reforma prohíbe la subcontratación de personal, ese decir, se prohíbe la transferencia de trabajadores propios a otra empresa como patrones cuando ésta no genera directamente una actividad productiva (STPS, 2021). Sin embargo, la subcontratación está permitida en términos de especialización. Los subcontratistas de personal especializado deben estar registrados y especificar el servicio que brinda (DOF, 2021).

Objetivo: Determinar la tendencia y tasa de subcontratación de 2003 a 2020, mediante dos bases de datos (Censo Económico y Encuesta de Empleo, Inegi)

Metodología

Para estudiar la subcontratación a lo largo del tiempo, se utilizó una única variable la cual fue calculada mediante dos fuentes de datos distintas, la variable se explica a continuación. Los años de estudio fueron los siguientes: 2003 - 2020.

El indicador para el caso del Censo Económico (CE) es el porcentaje de personal contratado y proporcionado por otra razón social respecto al personal ocupado total. Para el caso de la Encuesta Nacional de Ocupación y Empleo (Enoe) es el porcentaje de empleados en las instalaciones de otras empresas o instituciones donde se les envía, ambos respecto al total de trabajadores.

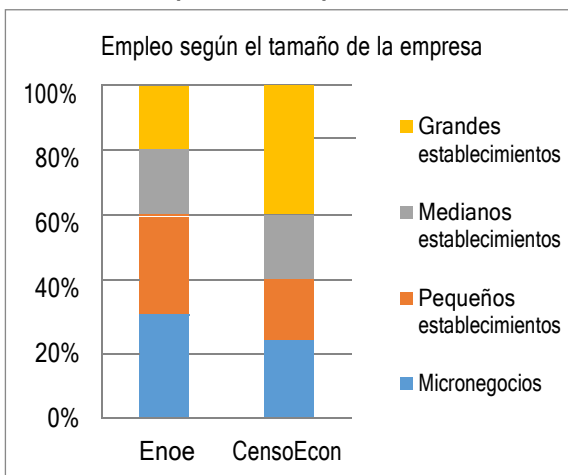
$$(1) S\%_t = \frac{SC}{T} * 100$$

Donde %S es el indicador de empleados subcontratados para CE o Enoe, PSC es el personal contratado y proporcionado por otra razón social (CE) y empleados en las instalaciones de otras empresas o instituciones donde se les envía (Enoe), TT es el personal ocupado total para ambas fuentes de información, t se refiere a los años de estudio, para CE 2003 - 2018 y para Enoe 2005 - 2020.

Las fuentes de información fueron dos: (1) Censo Económico (CE) del Sistema Automatizado de Información Censal (SAIC), en esta fuente se muestran todos los datos referentes a personal ocupado en las distintas condiciones, geografía y actividad económica. (2) Encuesta Nacional de Ocupación y Empleo (Enoe) en el conjunto de datos de trabajadores subordinados y remunerados, en esta fuente se encuentran datos del lugar de trabajo que indican si el trabajador es subcontratado.

El uso de ambas fuentes de información es importante debido a que, aunque en efecto, ambas fuentes muestran variables referentes a la subcontratación, existen sesgos en los datos que presentan. Comparando dos años de estudio, 2008 y 2018, es posible argumentar que el Censo Económico tiene una alta representación de los empleos en grandes establecimientos y la Enoe tiene una representación del empleo en micro negocios (Ver Gráfica 1). Es decir, los datos proporcionados por el Censo Económico son útiles para conocer las condiciones de la subcontratación en los grandes establecimientos y los datos de Enoe funcionan mejor para conocer la subcontratación en los micro negocios.

Gráfica 1. Participación del empleo en 2018



Fuente: Elaboración propia con datos de la Encuesta Nacional de Ocupación y Empleo (2018) y Censo Económico (2018), Inegi.

En la gráfica 1 se puede observar que para el caso de Enoe, del 100% de la información registrada, 32% pertenecen a micronegocios, mientras que el 19% corresponden a datos de grandes establecimientos. Por el contrario, para el caso del Censo Económico, del 100% de la información registrada 23% corresponde a micronegocios, mientras que el 40% son datos de grandes establecimientos.

Para mostrar la tendencia de ambas variables se realizó una interpolación, para determinar los valores de los años faltantes para cada una de las bases de datos, la cual se muestra a continuación (Ver tabla 1). Así mismo, en el panel c) se plantea el insourcing, el cual se calcula de una forma sencilla mediante la diferencia entre los valores de la subcontratación y el porcentaje de la subcontratación del panel a) respecto del b). Aunque el cálculo del insourcing es imperfecto, se valida con el aumento observado de los trabajadores temporales de 2003 a 2018.

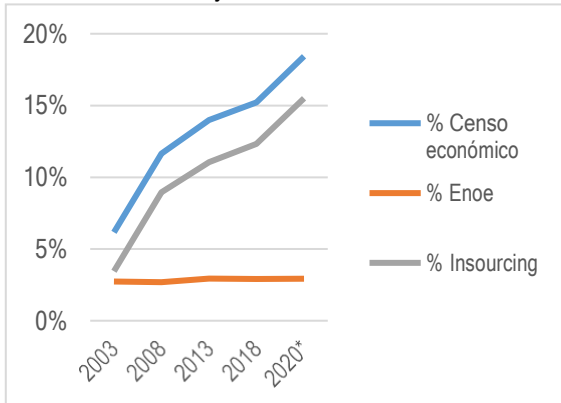
Tabla 1 México: Subcontratación (Porcentaje y miles de personas)

	2003	2020
<i>Panel a) Censo económico</i>		
Empleos subcontratados	1,003	5,481
Total de trabajadores	16,239	29,737
[1] Subcontratación (%)	6.1%	18.4%
<i>Panel b) Encuesta de empleo</i>		
Enviados a otra empresa (Outsourcing)	701	1,112
Trabajadores subordinados y remunerados	25,740	37,975
[2] Outsourcing (%)	2.7%	2.9%
<i>Panel c) inferencia usando paneles a y b</i>		
Contratados por otra razón social de su empresa	302	4,369
[3 = 1- 2] Insourcing (implícito)	3.4%	15.5%

Fuente: Elaboración propia con datos de Inegi, Censo Económico y Encuesta Nacional de Ocupación y Empleo.

En la tabla 1 es posible visualizar un crecimiento de la subcontratación de 2003 a 2018, por parte del Censo Económico este ha tenido un crecimiento de 8.4% a 23.4% y por parte de la Enoe el crecimiento se ha visto constante pasando de 2.7% a 2.9%. Por parte del insourcing, también se muestra un crecimiento como consecuencia del aumento de las dos variables anteriores, pasando del 5.7% al 20.4%.

Gráfica 2. Porcentaje de subcontratación en México



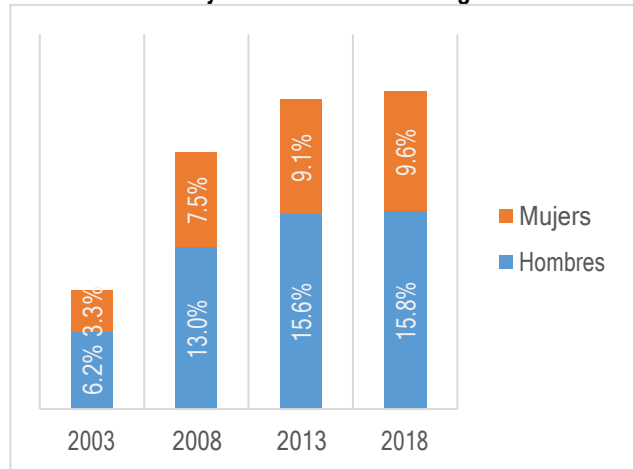
Nota: el * indica que el año más reciente para analizar es el 2020.
Fuente: elaboración propia con datos de la tabla 1.

Una vez realizada la interpolación es posible determinar la tendencia que presentan los datos tanto en la Enoe como en el Censo Económico, respecto a la subcontratación. En la gráfica es posible observar la tendencia de los tres elementos expuestos en la tabla 1, se puede observar una similitud de tendencias en los datos de censo económico y de insourcing, ambas bases de datos muestran crecimientos de 6.1% y 3.4% en 2003 y 18.4% y 15.5% en 2020 respectivamente. Por parte de Enoe, es posible notar un crecimiento constante que va de 2.7% en 2003 a 2.9% en 2020. Así mismo, es posible observar un crecimiento exponencial desde 2003 hasta 2020.

Resultados

Una vez observado el crecimiento del personal subcontratada de 2003 – 2020, es posible determinar la tendencia desde dos diferentes ángulos, por una parte, se determina la subcontratación respecto a los grupos de hombres y mujeres. También se puede determinar respecto a los grupos de ocupación, para el presente estudio se determinaron cinco grupos, los cuales se enlistan a continuación, 1) Profesionistas, 2) Oficinistas, 3) Trabajadores industriales, 4) Comerciantes y 5) Trabajadores en servicios de protección.

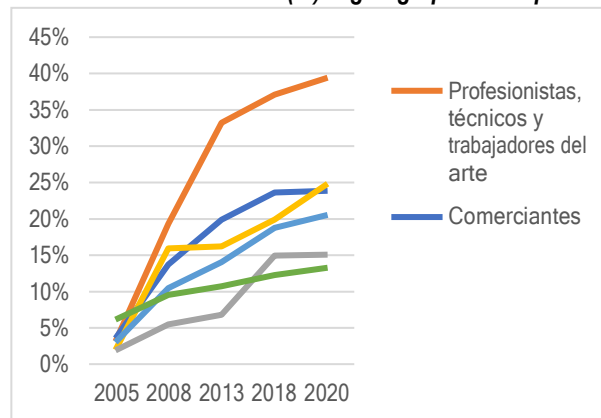
Gráfica 3. Porcentaje de subcontratados según sexo



Fuente: Elaboración propia con datos del Censo Económico, Inegi.

A continuación, se presenta la gráfica en donde se muestran las tendencias de la tasa de variación de la subcontratación en el grupo de hombres y mujeres. En la tabla es posible observar tendencias de crecimiento diferentes, por una parte, la base de datos de hombres, muestra un crecimiento de 6.2% en 2003 a 15.8% en 2018, el cual es mucho mayor que el 3.3% en 2003 a 9.6% para el caso de las mujeres. Sin embargo, es posible ver que en ambas tendencias, a partir del 2013 comienza una estabilización de los datos, manteniéndose en 9% las mujeres y 15% los hombres.

Gráfica 5. Subcontratados (%) según grupo de ocupación



Fuente: Elaboración propia con datos de la Encuesta Nacional de Ocupación.

Finalmente, se presenta la gráfica en donde se muestran las tendencias de la tasa de variación de la subcontratación en los distintos grupos de ocupación. En la gráfica 5 es posible observar tendencias similares en las tasas de variación para la mayoría de los grupos de ocupación, desde 2% en 2003 hasta 25% en 2020. El grupo de trabajadores profesionistas, técnicos y trabajadores del arte presenta una variación un poco distante del resto de grupos, comenzando en 3% para 2003 y concluyendo en 39% para 2020.

Conclusiones

La subcontratación es un fenómeno que ha experimentado un crecimiento en los últimos años, debido a que ha sido una alternativa de contratación para las empresas. Lo anterior, ya que la subcontratación genera una forma más sencilla de contratar, así como de despedir a los empleados.

Para el presente estudio se utilizó una única variable, analizada con dos bases de datos distintas, censo económico y Enoe, en el periodo 2003 - 2020. El uso de dos distintas bases de datos se realizó debido a que los datos expuestos por cada base de datos, representan empleos en distintos establecimientos.

Posteriormente se plantearon las tendencias de la subcontratación, tanto para el censo económico como para Enoe, además, se agregó una nueva variable, que se denominó “insourcing”, la cual expresa la diferencia entre los valores del censo económico y los de Enoe.

Una vez planteadas las tendencias, fue posible determinar las situaciones que enfrentaban dos diferentes clasificaciones: 1) hombres y mujeres y 2) grupos de ocupación.

Al finalizar los cálculos fue posible observar que tanto en la tendencia general de subcontratación, como en los dos diferentes grupos se presentaba una tendencia de crecimiento. Sin embargo, no todas las tendencias son iguales, algunas tienen un crecimiento más acelerado, mientras otras presentan crecimientos constantes.

Estudios revelan que la presencia de la subcontratación tiene como consecuencia factores negativos, como una disminución en los salarios, desigualdad, así como una brecha salarial entre los empleados subcontratados y los que pertenecen directamente a la empresa.

Por lo que se puede deducir que, si existe un crecimiento en términos de subcontratación, es posible determinar que cada día un mayor número de empleados enfrentan condiciones laborales negativas en términos de salario e igualdad.

Para eliminar la brecha entre empleados subcontratados y contratados directamente por la empresa, se deben plantear elementos que mejoren las condiciones laborales que enfrentan los empleados subcontratados. Por otra parte, es importante que se impongan medidas contundentes que restrinjan tanto a las empresas prestadoras de servicios de

subcontratación como empresas que contratan este tipo de servicios.

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Autónoma de Querétaro por darnos la oportunidad de participar en el Verano de la Ciencia UAQ 2021.

Referencias:

Bernhardt, A., Batt, R., Houseman, E., & Appelbaum, E. (2016). Domestic outsourcing in the U.S.: A research Agenda to Assess Trends and Effects on Job Quality. U.S. Department of Labor.

Diario Oficial de la Federación -DOF-. (2021). Acuerdo. Secretaría de Gobernación. Recuperado de: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5619148&fecha=24/05/2021

Goldschmidt, D., & Schmieder, J. F. (2017). The rise of domestic outsourcing and the evolution of the German wage structure. The Quarterly Journal of Economics, 132(3), 1165-1217.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2020). Censo económico. Recuperado de: <https://inegi.org.mx/app/saic/default.html>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2020) Encuesta nacional de ocupación y empleo. Recuperado de: https://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/consulta/general_ver4/MDXQueryDatos_Colores.asp?proy=enoe_pe_ed15_tr Secretaría del Trabajo y Previsión Social -STPS-.

(2021). Reforma en materia de subcontratación. Gobierno de México. Recuperado de: <https://www.gob.mx/stps/articulos/reforma-en-materia-de-subcontratacion>

Segal, L. M., & Sullivan, D. G. (1997). The growth of temporary services work. Journal of economic perspectives, 11(2), 117-136.

Gobiernos recaudadores: Incremento de impuestos a la vivienda en México

Olvera Olvera Luis Alejandro (FCA, UAQ,
lolvera12@alumnos.uaq.mx)

Dr. Enrique Leonardo Kato Vidal (FCA, UAQ,
enriquekato@uaq.mx)

Dra Ilia Violeta Cázares Garrido (FCA, UAQ,
ilia.violeta.cazares@uaq.mx)

Resumen

Los impuestos patrimoniales han sido materia de estudio desde hace tiempo y la manera en como éstos se desarrollan con el paso de los años y el efecto que provocan en la sociedad mexicana ha cobrado gran relevancia. En este documento se obtuvieron las tasas de crecimiento de la recaudación en impuestos patrimoniales de las capitales más importantes de México, además se agruparon en diferentes regiones y se realizó un análisis comparativo sobre el crecimiento en la recaudación y la relevancia que tienen las variables de: tarifa predial, aumento en la cantidad de viviendas e impuesto al traslado de dominio sobre este crecimiento. Los resultados arrojan hallazgos muy interesantes, como el abuso del impuesto al traslado de dominio, en algunas regiones, lo que ha reducido el crecimiento en el número de viviendas, debido al incremento en el costo de la vivienda que produce este impuesto. De continuar así esto podría provocar grandes distorsiones en el mercado inmobiliario lo que afecta directamente a la calidad de vida de los adultos jóvenes y sus futuras familias.

Palabras clave

Impuestos patrimoniales, Predial, Viviendas, Traslado de dominio.

Abstract

Property taxes have been a matter of study for a long time and the way in which they develop over the years and the effect they cause on Mexican society has gained great importance. In this document we obtained the growth rates of the collection in property taxes of the most important capitals of Mexico in addition they were grouped in different regions and a comparative analysis was carried out on the growth in the collection and the relevance of the variables of: property rate, increase in the number of homes and tax on the transfer tax over this growth. The results show very interesting findings, such as the abuse of the transfer tax, in some regions, which has reduced the growth in the number of dwellings, due to the increase in

the cost of housing produced by this tax. If this continues, it could lead to major distortions in the real estate market, which directly affects the quality of life of young adults and their future families.

Key Words

Property taxes, Housing, Transfer tax.

Introducción

Los impuestos son parte fundamental de una sociedad funcional, pues nos ayudan a “generar ingresos significativos y reducir la desigualdad, particularmente cuando estos ingresos se gastan con fines sociales” (Ahmad, Brosio y Jiménez, 2019). Además, estos ingresos ayudan a proveer a la población de servicios como seguridad, hospitales, educación, carreteras, etc. En este trabajo nos centraremos en estudiar los impuestos patrimoniales, que como indica Ahmad y colaboradores en su investigación (Options for retooling preproperty taxation in Latin America) El hecho de que el impuesto a la propiedad esté basado sobre bienes inmóviles lo convierte en un impuesto eficiente con bajas distorsiones económicas (Ahmad, Brosio y Jiménez, 2019) lo que podemos entender como un impuesto más justo para la recaudación y redistribución de la riqueza. Sin embargo, es necesario que estos impuestos estén bien fundamentados y se entienda el impacto que provocan más allá de una recaudación efectiva.

Existe una gran cantidad de trabajo empírico que investiga el impacto de los impuestos sobre el precio de la vivienda, comenzando con el trabajo de Oates (1969), quien encuentra que los impuestos a la propiedad y el valor de los servicios públicos se capitalizan en precio de la propiedad. (Tsoodle y Turner, 2008). En México estos impuestos se dividen en predial e impuesto al traslado de dominio y cada uno de ellos provocan efectos interesantes.

El predial es el impuesto recurrente que grava la propiedad de bienes inmuebles, éste se relaciona con los servicios públicos y amenidades que posee una propiedad. (Tsoodle y Turner, 2008) En países desarrollados como Estados Unidos es el pilar fundamental en los ingresos constituyendo un 73 por ciento de los ingresos de los gobiernos locales (Tsoodle y Turner, 2008). Éste depende de varios factores relacionados con la cantidad y calidad de los servicios de una zona determinada. Factores como la pobreza, índice de crimen, olor, parques, cercanía a cuerpos de agua, estacionamiento etc. fueron estudiados en el artículo “Property Taxes and

Residential Rents” y se encontró una relación entre estos factores y las variaciones en el impuesto a la propiedad, lo que a su vez tiene grandes consecuencias en el costo de la renta de las unidades habitacionales.

En el caso del impuesto al traslado de dominio el impacto que puede llegar a tener éste, es muy controvertido, tanto en la política como en la investigación académica (Fritzsche y Vandrei, 2016). Por un lado, algunos autores consideran que reduce la volatilidad y especulación en el mercado inmobiliario (Catte, Girouard, Price y André, 2004). Por otro lado, impuestos altos a la transacción de bienes inmuebles puede desalentar a las ventas y compras, lo que lleva a una menor actividad en el mercado inmobiliario además de una pérdida de bienestar para compradores y vendedores (Büttner, 2016). “Los altos impuestos a la transferencia de bienes raíces también podrían disminuir la movilidad de los trabajadores, lo que agrega imperfecciones en el mercado laboral cuando los propietarios permanecen en su hogar, aunque podría ser más eficiente para mudarse a un lugar diferente” (Fritzsche y Vandrei, 2016, p4). Otro punto a considerar es que los impuestos a las transferencias tienen un potencial de ingresos sustancial y una relativa facilidad de administración en los países más avanzados. Sin embargo, en los países en desarrollo, estos podrían contribuir a la subestimación general de los valores de la propiedad, que afecta también al impuesto a la propiedad per se, por lo que se pueden generar muy pocos ingresos (Fritzsche y Vandrei, 2016)

Por último, un efecto que vale la pena mencionar es la impopularidad política provocada por el sentimiento de injusticia por pagar impuestos, lo que hace más difícil la discusión e implementación efectiva de estos. Esta impopularidad se debe a que no existe una completa transparencia al momento de calcular y entregar el importe por los impuestos patrimoniales y debido a esto son percibidos como injustos (Ahmad, Brosio y Jiménez, 2019). En este trabajo nos centraremos en explicar la recaudación municipal, a partir del crecimiento de viviendas y el tipo de impuestos.

Datos y Metodología

Para poder llevar a cabo esta investigación es importante entender cómo funcionan estos impuestos patrimoniales y el impacto que genera cada una de las variables que participan en ellos. El impuesto más conocido de las propiedades es el predial y los

propietarios pagan un monto en función de las características de su vivienda (tamaño, construcción, ubicación, etc.). De tal manera, que las tesorerías municipales reciben un ingreso total por predial dependiendo de la tarifa (o monto) que cobran y el número de propiedades en su territorio, tal que

$$\text{Recaudación} = \text{Tarifa} * \text{Viviendas} \quad [1]$$

donde la Recaudación son los ingresos totales por el cobro del impuesto predial, la tarifa es el monto promedio pagado por las propiedades y las viviendas es el número de claves catastrales en el municipio.

Aplicando una de las reglas de tasas de crecimiento y siguiendo la ecuación [1], la recaudación aumenta cuando crece la tarifa, el número de viviendas o ambos. La ecuación [1] expresada con tasas de crecimiento, quedaría de la siguiente manera

$$g(R) = g(T) + g(V) \quad [2]$$

donde $g(\cdot)$ indica la variación porcentual en el tiempo o tasa de crecimiento de una variable. Así, $g(R)$ es la tasa de crecimiento de la recaudación, $g(T)$ es la tasa de crecimiento de la tarifa promedio y $g(V)$ es la tasa de crecimiento del acervo de viviendas.

Adicionalmente, los gobiernos municipales generan una segunda fuente de ingresos relacionados con la vivienda a través de los impuestos por la compra-venta de bienes inmuebles. Estos ingresos reciben diversos nombres, los dos más usados son: impuesto sobre traslado de dominio (ISTD) e impuesto sobre la adquisición de inmuebles (ISAI). Aunque es reducido el número de propiedades compradas y vendidas en un año cualquiera, los gobiernos financian con estos impuestos un porcentaje alto de su gasto anual. En México, se reciben 600 mil pesos por cobro de traslado de dominio, por cada un millón de pesos obtenidos por predial. Es decir, los ingresos por traslado de dominio son una fuente muy importante que complementa fuertemente, acercando mucho a la cuantía de recaudación predial.

De hecho, puede observarse que en algunos municipios las autoridades dejaron de usar el impuesto predial para aumentar sus ingresos. En vez de ello, están cubriendo sus gastos cada vez más a través de los ingresos por traslado de dominio.

Podemos plantear que los ingresos obtenidos por los impuestos municipales al patrimonio es la suma de los ingresos por predial más el traslado de dominio

$$\text{Ingresos Patrimoniales} = \text{Recaudación por predial} + \text{Traslado de dominio} \quad [3]$$

donde 'Ingresos patrimoniales' es la suma de lo recaudado por impuestos al patrimonio, 'Recaudación por predial' refiere lo especificado en la ecuación [1] y 'Traslado de dominio' son los ingresos obtenidos bajo impuestos con diversos nombres según el estado, en cualquier caso, se obtienen por la compra-venta de bienes inmuebles.

Nuevamente, usando tasas de crecimiento, la ecuación [3] se transforma a

$$g(I) = g(R) + g(D) \quad [4]$$

$$= [g(T) + g(V)] + g(D)$$

donde g(I) es la tasa de crecimiento de los ingresos patrimoniales y g(D) es la tasa de crecimiento por traslados de dominio. Dado que 'T' es la tarifa promedio por vivienda (= Predial / Viviendas), entonces g(T) ~ [g(R) - g(V)]. Esta expresión puede validarse con la ecuación [2]. De esta forma, la ecuación [4] nos es de interés porque puede analizarse como

$$g(I) = [g(R) - g(V)] + g(V) + g(D) \quad [5]$$

$$= g(r) + g(V) + g(D)$$

Así, los gobiernos municipales pueden obtener más ingresos mediante tres formas: por intensidad, incrementando la tarifa predial [g(r) = g(R) - g(V)], por volumen, al tener más viviendas [g(V)] o aumentando el cobro de traslado de dominio [g(D)], ya sea con una tarifa mayor o por un número mayor de transacciones.

La ecuación [5] se traduce a una contabilidad del crecimiento, la cual describe o sintetiza cuál ha sido la importancia de cada fuente de ingresos para las finanzas municipales. Dado que las tasas de crecimiento describen cantidades que pueden ser muy distintas, es necesario hacer las comparaciones usando cifras ponderadas. Primeramente, necesitaremos el ponderado del predial ('a') y de traslado de dominio ('b'). Ambas cifras deben sumar uno, es decir, el 100%.

$$a = R / I \quad [6]$$

= Recaudación por predial / Ingresos patrimoniales

$$b = D / I \quad [7]$$

= Ingresos por compra-venta de bienes inmuebles / Ingresos patrimoniales

Entonces, para obtener el desglose (cercanamente) exacto de g(I) la operación es

$$g(I) = g'(R) + g'(D) \quad [8]$$

$$= [a * g(R)] + [b * g(D)]$$

Después debe separarse la recaudación por predial entre el crecimiento de la tarifa y el crecimiento del acervo de viviendas. Para ello hay una dificultad, la vivienda no se mide en unidades monetarias, sino en unidades físicas. Es decir, no se puede calcular directamente la ponderación. Por tanto, una ponderación (alternativa) se logra con las tasas de crecimiento

$$c = g(r) / g(R) \quad [9]$$

= Crecimiento de la tarifa / Crecimiento del predial

$$d = g(V) / g(R) \quad [10]$$

= Crecimiento de las viviendas / Crecimiento del predial

Así, para calcular qué parte de la recaudación del predial surge de la tarifa y cuál de las viviendas

$$g'(R) = g'(r) + g'(V) \quad [11]$$

$$= [c * g(r)] + [d * g(V)]$$

Sin embargo, según la ciudad y el año, R(I) puede tomarse un rango amplio de valores, desde 1%-2% a 10%-12%. En búsqueda de sencillez, se puede igualar R(I) = 100% y calcular el porcentaje de cada fuente

$$g(I) = 100\% \quad [12]$$

= Contribución de 'r' + Contribución de 'V' + Contribución de 'D'

$$= g'(r) / g(I) + g'(V) / g(I) + g'(D) / g(I)$$

1 Grandes ciudades: Guadalajara y Monterrey
2 Ciudades (cercanas) a la frontera norte: Mexicali, Chihuahua y Hermosillo
3 Sur: Mérida, Campeche y Oaxaca
4 Bajío: Querétaro, San Luis Potosí, Morelia y Aguascalientes
5 Centro: Cuernavaca y Toluca

Tabla 1 Zonas de estudio. Elaboración propia. La regionalización usada es cercana a la utilizada por Banco de México. Reporte sobre las Economías Regionales; excepto que las metrópolis de Guadalajara y Monterrey se analizaron por separado dadas las diferencias de sus mercados inmobiliarios.

Los datos para llevar a cabo la investigación se obtuvieron del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) de dos secciones en específico. Para recabar datos sobre el incremento en las viviendas

se consultó la base de datos del “Censo General de Población y Vivienda” de los años 2000, 2010, 2020 y para obtener información sobre los impuestos se consultó la base de datos de la sección “Estadísticas de Finanzas públicas estatales y municipales” (Efipem) de los años 1990, 2000, 2010 y 2019. Inicialmente se consultaron estos datos de las 31 capitales de los estados de la República, con base a la calidad de los datos se seleccionaron catorce capitales y se dividieron en cinco grupos de la siguiente manera. Esto con el objetivo de hacer un análisis de las diferentes zonas de la República.

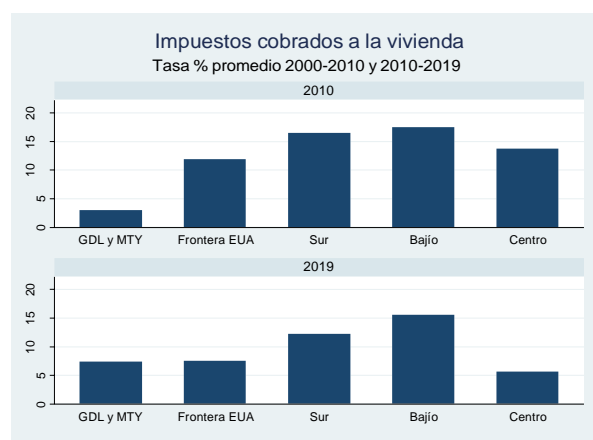
Resultados

Esta sección se divide en dos partes. En la primera se hace un análisis más específico donde se observa la evolución de las viviendas del año 2000 al 2020 por zona y por capital en los apartados de: Aumento en el número de viviendas, predial promedio por vivienda, porcentaje del impuesto a las transacciones inmobiliarias respecto a los impuestos patrimoniales.

Se observó que las regiones que han tenido un mayor crecimiento son las regiones 2 frontera norte y 3 Sur. También se calculó el predial promedio por vivienda. Se observó que las regiones 1 Grandes ciudades y 4 Bajío son las que poseen un valor promedio más alto. Por último, calculó cuánto (porcentaje) de los impuestos patrimoniales provienen del traslado de dominio (variable "transacciones inmobiliarias" = Impuestos patrimoniales - Predial). En la región 3 Sur es donde se recauda menos porcentaje por traslado de dominio aproximadamente 30%. Mientras que la región 4 Bajío es donde se obtiene un mayor porcentaje, aproximadamente 42% y ese porcentaje estuvo estable entre 2000 y 2010 y luego aumentó entre 2010 y 2019

En la segunda parte de nuestros resultados se hace una síntesis por región donde se reportan los datos de 2010 y 2019. De esta manera en la primera gráfica podemos apreciar la tasa de crecimiento promedio de los impuestos patrimoniales. Ésta, es una tasa real de crecimiento esto es, se resta la inflación (la variación del deflactor de la administración pública) a la tasa de crecimiento nominal. Se observa que el Bajío sigue aumentando su recaudación en 2010-2019 a una cifra tan alta (15% anual) como en la década previa.

También el sur del país (Mérida) mantiene una fuerte expansión de los impuestos patrimoniales, superior al 10% anual. Es algo interesante observar el cambio de tendencia pues en la década 2000-2010, la región de la frontera con EUA y el Centro del país tenían altas tasas, mayores al 10% anual mientras que en los años recientes 2010-2019, pareciera que Guadalajara y Monterrey capturaron parte de esa expansión inmobiliaria que, en la década previa, se observó en Frontera norte y Centro (Toluca y Cuernavaca).

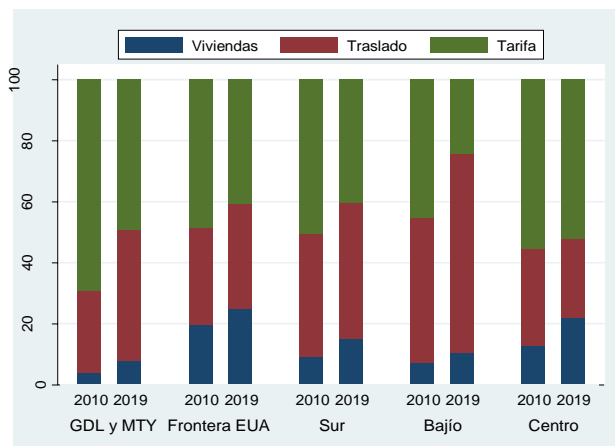


Gráfica 1 Tasa de crecimiento promedio de los impuestos patrimoniales. Elaboración propia.

En la segunda gráfica, se hizo un análisis para 'descomponer' las tasas de crecimiento en tres factores-causas (aumento de la tarifa, aumento del número de viviendas y aumento de la recaudación por traslado de dominio). De esta manera es más fácil apreciar la relevancia de cada uno de estos factores según la región. Para simplificar el análisis cada columna es igual al 100%.

Región 1. Aunque aumentó la importancia-contribución por un mayor número de viviendas, en realidad, la mayor recaudación es causa de un mayor cobro de traslado de dominio en GDL y MTY.

Región 2. En la gráfica 1 vimos que esta región tenía una recaudación anual en 2000-2010 superior al 10%. Ahora, 2010-2019, la recaudación crece a una tasa de 7.5% anual por lo tanto el crecimiento de la vivienda es la fuente más importante para sostener la actual tasa de recaudación. También se observa que la tarifa tiene una menor contribución, antes crecía al 12% anual y en la década reciente (2010-2019) al 7% anual.



Gráfica 2 Contribución a impuestos patrimoniales.
Elaboración propia

Región 3. El crecimiento de la vivienda es la principal fuente de recaudación de impuestos patrimoniales, en segundo lugar, la recaudación por traslado de dominio además al igual que en la región 2, hubo una moderación en el cobro del predial.

Región 4. La recaudación patrimonial ha continuado al alza, mayor al 15% anual, debido al traslado de dominio y a la expansión sostenida de la vivienda (3% anual en las dos décadas).

Región 5. Esta región perdió el fuerte impulso recaudador como se observa sus ingresos patrimoniales crecían al 14% anual (2000-2010) y ahora (2010-2019) al 6%. Al ritmo actual de 6%, sus ingresos provienen principalmente del aumento de la tarifa predial y en segundo lugar, tanto por el traslado de dominio, como por la expansión de la vivienda.

Discusión y Conclusiones

Se cumplió el objetivo de la investigación que fue explicar la recaudación municipal, a partir de una metodología que calculó la contribución del crecimiento de viviendas y el tipo de impuestos. Como pudimos observar en los gráficos, la composición de la recaudación es muy variada según la región, también podemos notar un gran cambio en las decisiones que han tomado los municipios en materia impositiva, puesto que en el 2010 la mayoría de ellos aseguraba la mayor parte de sus ingresos a la tarifa predial, lo que algunos autores consideran como una mejor planeación de estos impuestos patrimoniales.

Un caso atípico de este periodo es la región del Bajío que desde 2010 ha cimentado su recaudación en el traslado de dominio, lo que según la literatura debió haber provocado grandes distorsiones en el mercado inmobiliario, incrementando desproporcionadamente a lo largo de 20 años el costo de la vivienda, y como consecuencia ha modificado la decisión de migración provocando que a pesar del gran crecimiento industrial de esta región, no haya destacado en el crecimiento en el número de viviendas como si lo han hecho las regiones del Sur y de la Frontera norte.

De continuar de esta manera y tomando en cuenta la evolución de 2010 a 2019 cada vez se dependerá más del impuesto al traslado de dominio lo que no solo afectará a los nuevos prospectos que quieran migrar a esta región, sino que tendrá grandes repercusiones negativas a causa del encarecimiento en las nuevas generaciones de adultos jóvenes que buscan apropiarse de una vivienda digna. Por otro lado, en este mismo periodo de 2010 también es interesante la región de Guadalajara y Monterrey donde al contrario de la región del Bajío ellos obtienen la mayor parte de sus ingresos de la tarifa del impuesto predial, siendo esta la más cara de todo el país. Como consecuencia también han experimentado un pobre crecimiento en proporción en el número de viviendas.

Por lo que podemos concluir que la importancia radica en encontrar el equilibrio entre la recaudación de estos impuestos al patrimonio, con el fin de asegurar el crecimiento continuo de los centros económicos, pero más importante aún mantener un mercado inmobiliario estable y sano que permita mantener los costos de las viviendas asequibles para asegurar la calidad de vida de la población. Lo que abre camino a nuevas investigaciones sobre la proporción ideal entre estos dos impuestos.

Agradecimientos

Es un honor poder haber trabajado con el Dr. Enrique Leonardo Kato Vidal quien me guío en el proceso para desarrollar esta investigación y me apoyo en cada paso, también agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro por crear estos programas donde comenzar a generar experiencia en el área de investigación y, por último, pero igual de importante a mi familia y amigos que me apoyaron durante esta investigación.

Referencias

Ahmad, Ehtisham; Brosio, Giorgio y Jiménez, Juan Pablo. (2019). Options for retooling property taxation in Latin America. Serie: Macroeconomía para el Desarrollo. Comisión Económica para América Latina -CEPAL. Santiago de Chile.

Büttner, T. (2017), Welfare Cost of the Real Estate Transfer Tax, VfS Annual Conference 2017 (Vienna): Alternative Structures for Money and Banking, German Economic Association.

Catte, P., Girouard, N., Price, R. and C. André (2004), Housing Markets, Wealth and the Business Cycle, OECD Economics Department Working Papers 394.

Fritzsche, Carolin; Vandrei, Lars (2016): The German Real Estate Transfer Tax: Evidence for Single-Family Home Transactions. *Regional Science and Urban Economics*, 74, 131-143.

Oates, W.E. 1969. The Effect of Property Taxes and Local Public Spending on Property Values: An Empirical Study of Tax Capitalization and the Tiebout Hypothesis. *Journal of Political Economy* 77: 957-971.

Tsoodle, L. J., & Turner, T. M. (2008). Property taxes and residential rents. *Real Estate Economics*, 36(1), 63-80.

Detección de bordes en segmentos de video mediante el operador Sobel modificado utilizando programación secuencial y paralela con CUDA/C++

Vargas Francisco Javier González. Universidad Autónoma de Querétaro. franciscojaviergonzalezvargas3@gmail.com

Chávez Gómez Joaquín Alexander. Universidad Autónoma de Querétaro. joaqaalex22@gmail.com

Sandra Luz Canchola Magdaleno. Universidad Autónoma de Querétaro. sandra.canchola@uaq.mx

Resumen

Las imágenes pueden ser definidas como una matriz numérica con valores en estado binario u oscilantes entre 0 y 255 sobre 3 canales (RGB); con dicho espectro de valores las imágenes cuentan con el dinamismo suficiente para que sobre de ellas sean aplicados un conjunto diverso de técnicas, entre las cuales destacan los filtros que con frecuencia trabajan para procesar una imagen bajo el rigor de una ecuación matemática denominada convolución que da como resultante una matriz de valores(máscara), la cual se emplea para modificar el valor de un píxel según los valores de los píxeles contiguos. Siguiendo la premisa del principio de la aplicación de los filtros a imágenes, se decidió experimentar con la adaptación de un filtro a una secuencia de video, no obstante teniendo en consideración la necesidad de recursos de procesamiento por el cuantioso volumen de imágenes en las que se descompone el video y el número significativo de operaciones a realizarse, se justificó como viable el uso de programación paralela ejecutada sobre la GPU para aumentar las posibilidades de optimización y rendimiento de la aplicación del filtro, que en este caso se trató del filtro de sobel, el cual fue seleccionado debido a su posibilidad de ser paralelizable por la independencia de los datos necesarios para su aplicación. Sin embargo, para comprobar la fidelidad de la aplicación y el aumento del rendimiento, se generó un contraste con los resultados

obtenidos de la ejecución secuencial del filtro sobre la CPU.

Palabras Clave

Frames, GPU, CPU, Paralelo, Pixel, Cuda, Hilos, Filtro de video.

Abstract

An image can be defined as a numerical matrix with binary or oscillating values between 0 and 255 over 3 channels (RGB); With such a spectrum of values, images have enough dynamism for a diverse set of techniques to be applied to them, among which are the filters that often work to process an image under the rigor of a mathematical equation called convolution that results in a matrix of values (mask), which is used to change the value of a pixel according to the values of neighboring pixels. Following the premise of the principle of the application of filters to images, it was decided to experiment with the adaptation of a filter to a video sequence, but, taking into consideration the need for processing resources due to the large volume of images in which the video is decomposed and the significant number of operations to be performed, the use of parallel programming executed on the GPU was justified as viable to increase the possibilities of optimization and performance of the filter application, which in this case was the sobel filter, which was selected due to its possibility of being parallelizable due to the independence of the data necessary for its application. But, to check the fidelity of the application and the increase in performance, a contrast was generated with the results obtained from the sequential execution of the filter on the CPU.

Keywords

Frames, GPU, CPU, Parallel, Pixel, Cuda, Threads, Video Filter.

Introducción

Las necesidades de procesamiento de cómputo cada vez se vuelven más elevadas en la vida cotidiana del ser humano al tener la necesidad de alcanzar un tiempo de respuesta óptimo en algunas de las distintas aplicaciones de las tecnologías de información. Y es que cabe mencionar que la incorporación de la GPU en las tarjetas gráficas de la actualidad ha tenido un impacto considerable en los requerimientos de mejora de la velocidad computacional, al poder ofrecer un nivel mayor de procesamiento en

paralelo, pero sobre todo aumentar el acceso a estos recursos por un costo económico moderado. Por lo que bajo dicho contexto surgió la necesidad de comprobar la diferencia en el rendimiento y los tiempos de ejecución entre la programación paralela sobre GPU y la programación secuencial sobre CPU.

Sin embargo, fue necesario tener en consideración que el paralelismo o programación paralela “requiere especificar e implementar procesos explorando la concurrencia implícita o explícita en el problema a resolver, y al mismo tiempo optimizar la adaptación del algoritmo desarrollado a la arquitectura física de soporte”(Marcelo, n.d.), por lo que se tomó la decisión de generar el programa sobre la plataforma de desarrollo CUDA(Compute Unified Device Architecture), debido a que esta tecnología aprovecha el poder del hardware de la GPU para la realización de operaciones de propósito general.

Así que se optó por iniciativa de abarcar el campo del procesamiento y análisis de digital de imágenes como base para la comparativa debido a que en la actualidad dicha área se enfrenta a problemas relacionados con su aplicación a la visión artificial por el tiempo de ejecución de los algoritmos y la demanda de prestaciones de recursos de cómputo, cuestiones que en ocasiones son agravadas por la necesidad de realizar la ejecución en tiempo real, la problemática de los tiempos de ejecución se llega a agravar aún más y esta cuestión es atribuida al hecho de que habitualmente las plataformas elegidas para realizar estos algoritmos son las basadas en programas secuenciales, por lo que se justifica la búsqueda de nuevos sistemas segmentados para aplicar el procesamiento de imágenes en paralelo, cuestión que se abordó en esta investigación realizando la aplicación de una propuesta de filtro de Sobel sobre una secuencia de vídeo.

Objetivos

Detectar los bordes en una secuencia de imágenes mediante un operador Sobel modificado, realizar la implementación secuencial y la alternativa paralela aplicando C++ y Cuda C, respectivamente. Realizar el comparativo de ambas ejecuciones con respecto a los bordes detectados y el tiempo de corrida de ambas soluciones.

Metodología

Procesamiento de imágenes

Es posible ver el procesamiento y análisis digital de imágenes como “un área de la ingeniería que manipula y

analiza la información contenida en una imagen digital por medio de un procesador”(Mendoza, 2009), no obstante es importante tener en cuenta que dentro de lo que se denomina procesamiento de imágenes se engloba una serie de técnicas que comprenden operaciones cuyo origen es una imagen y cuyo resultado final es una imagen transformada, puesto que sus píxeles se encuentran en función de los valores que tenía la imagen de entrada, de los valores de los píxeles vecinos o incluso de todos los puntos de la imagen de entrada, por lo tanto se puede afirmar que la secuencia del procesamiento digital “se inicia digitalizando una imagen, la cual se almacena en una matriz con dígitos en binarios en la memoria del computador”(Aguilar, 1996); posteriormente se puede someter la imagen a la aplicación de alguna de las técnicas requeridas para así cumplir con la modificación requerida y mostrar el resultado obtenido. A continuación, se muestra una secuencia típica en el procesamiento digital de imágenes en donde un objeto pasa a ser una representación digital que atraviesa un método de procesamiento:

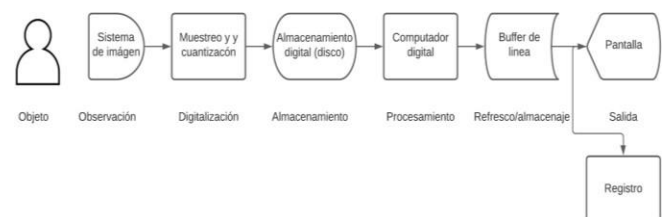


Fig. 1. Secuencia típica en el procesamiento digital de imágenes. Elaboración propia, 2021.

Y es que para lograr convertir una imagen a formato digital se requiere hacer un proceso de discretización tanto para las coordenadas espaciales de la imagen como para la intensidad. La digitalización de las coordenadas se llama muestreo, mientras que la digitalización de la intensidad se denomina cuantización.

Convolución

Para comprender la operación de procesamiento aplicada en la investigación es necesario definir en qué consiste la técnica de convolución, la cual es descrita por Cowley, J. (2018) como “una operación matemática, en la que una función se aplica de alguna manera a otra función. El resultado se puede entender como una mezcla de las dos funciones”, siguiendo dicho concepto aplicándolo de manera concreta a las matrices, al existir una interacción matemática entre dos matrices, que siguen las directrices o propiedades de alguna de las técnicas de procesamiento en particular, se da origen a una nueva matriz denominada núcleo, kernel de convolución o también máscara, que

sirve como base fundamental para la aplicación de la convolución matricial al tratamiento de imágenes.

Método Sobel

Como se había mencionado con anterioridad el filtro aplicado para la presente investigación fue el filtro de Sobel, el cual se puede ver como “la combinación de un filtro de suavizado del ruido con un operador de aproximación imprecisa del gradiente de la imagen”(Martínez & Martínez, 2012), además utiliza una máscara de 3x3, esta máscara se mueve píxel a píxel, calculando el valor del gradiente para cada uno de ellos (el píxel central de la máscara), aplicando las fórmulas anteriormente mencionadas. Como ya se ha explicado anteriormente, una vez obtenido el valor del gradiente. Se decide si es un borde o no en función de un umbral prefijado. Este proceso es común a todos los operadores.

Mascara propuesta

El filtro de Sobel por lo general implementa un gradiente mediante la convolución de dos máscaras que son aplicadas a las coordenadas x, y de la imagen (filas, columnas), sin embargo, este proceso fue considerado como un obstáculo para la implementación del filtro en programación paralela, ya que el simple hecho de ejecutar dos procesos de convolución involucra un aumento considerable en los tiempos de ejecución y los recursos de cómputo.

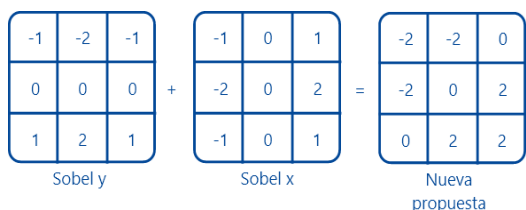


Fig. 2. máscaras. Elaboración propia, 2021

Por lo que se tuvo la iniciativa de proponer una máscara que considerara las dos máscaras de sobel y las unifica a través de la suma de sus elementos, lo cual dio como resultado una propuesta de máscara, la cual, en un inicio al ser aplicada con los valores resultantes de la suma inicial, no reflejaban el efecto deseado del filtro de sobel por lo que a dicha máscara se le ajustaron los valores en función del resultado que iba arrojando.



Fig. 3. Máscara con valores ajustados. Elaboración propia, 2021

Dimensiones de grid

De manera general un programa realizado bajo la sintaxis de CUDA puede mandar a ejecutar funciones en paralelo, las cuales reciben el nombre de kernel, dichas funciones son ejecutadas directamente en la GPU como un conjunto de hilos organizados en una jerarquía de bloques, que a su vez, se distribuyen formando un grid. Tanto el grid como los bloques pueden estar constituidos por una, dos o tres dimensiones, siempre y cuando estas no sobrepasen el número máximo de hilos permitido.

Para la configuración implementada en el programa se dividen las columnas y las filas de nuestros frames en cuatro secciones, obteniendo así un grid de dos dimensiones (N x M bloques), cada uno de estos bloques contiene a su vez una matriz bidimensional de hilos.

De esta manera los hilos asignados por bloque se encargan de procesar los píxeles contenidos dentro del bloque tal como se muestra en la figura 2.

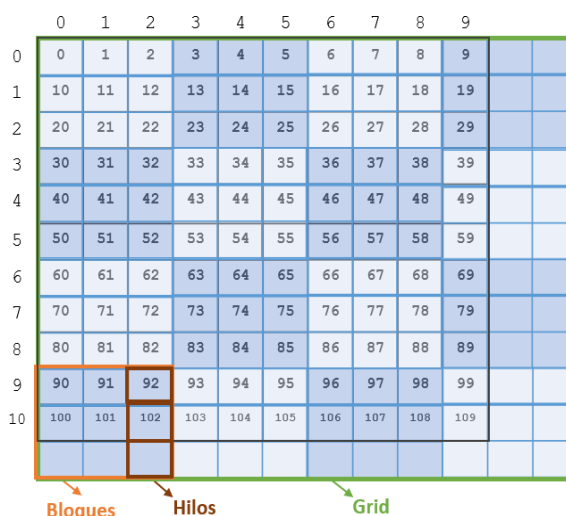


Fig. 4. Representación de Grid utilizado. Elaboración propia, 2021.

Lógica del programa

El programa realizado cuenta con ambas implementaciones tanto la versión paralela ejecutada en la GPU como la versión secuencial ejecutada sobre la CPU, separadas por funciones independientes. Ambas implementaciones comienzan recibiendo la ruta de la secuencia de video para posteriormente realizar la carga y comenzar la aplicación del filtro en cada iteración sobre cada uno de los frames hasta no tener frames disponibles.

De manera consecutiva fue necesario la reserva de memoria de las variables que almacenarán las imágenes requeridas durante el proceso por la recurrencia de acceso de memoria.

En la versión de CPU se itera sobre cada píxel y a su vez sobre cada píxel se enteró sobre los vecinos directos de

cada píxel en consideración de una vecindad de uno. Y en la versión de GPU no fue necesaria la iteración sobre cada píxel ya que la configuración del grid abarca en su totalidad el tratamiento de todos los píxeles de cada frame, de esta manera contamos con varios hilos ejecutándose de manera simultánea para aplicar la máscara propuesta sobre los píxeles y sus vecinos.

Y para finalizar la ejecución se muestran los resultados obtenidos de ambas versiones en ventanas emergentes, teniendo en consideración el copiado de los resultados obtenidos en la versión paralela de GPU.

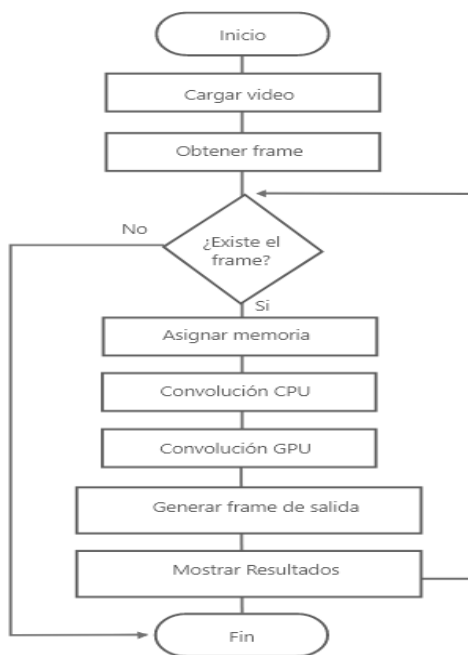


Fig. 5. Diagrama de flujo del programa. Elaboración propia, 2021

Software y Hardware

Para el desarrollo del programa se utilizó el lenguaje C++, haciendo el uso de la utilería CUDA en la cual podemos hacer uso de la GPU mediante hilos, junto a OpenCV.

Para la realización y ejecución del programa se utilizó una computadora portátil con las siguientes especificaciones:

- Procesador (CPU): Intel Core i5-9300H 2.40 Ghz
- Tarjeta gráfica (GPU): NVIDIA GeForce GTX 1050.
- Almacenamiento: SSD 250GB
- RAM: 8GB a 2666 MHz
- Sistema Operativo: Microsoft Windows 10 Home

Resultados

El programa realizado se ejecutó sobre 3 videos con duración y resolución distintas entre sí. Y a partir de resultados obtenidos de dichas ejecuciones podemos concluir lo siguiente:

Como primer punto es posible afirmar que la aplicación de la máscara propuesta nos muestra resultados satisfactorios para la detección de bordes tal y como sería con la aplicación del filtro de Sobel, tanto en la versión ejecutada sobre GPU como en la versión de CPU.

```

    >>>>>> Video Convolution CPU / GPU <<<<<<<<
    - Device Name: GeForce GTX 1050
    - Maximum number of threads per block: 1024

    - Numero de frames: 67
    - Dimensiones del frame: 400 x 400
    - Numero de pixeles por frame: 160000
    - Total de convoluciones: 10720000
    - Operacion en CPU toma: 699.000 ms.
    - Operacion en GPU toma: 18.000 ms.

    - Numero de frames: 221
    - Dimensiones del frame: 1024 x 576
    - Numero de pixeles por frame: 589824
    - Total de convoluciones: 130351104
    - Operacion en CPU toma: 7607.000 ms.
    - Operacion en GPU toma: 181.000 ms.

    - Numero de frames: 689
    - Dimensiones del frame: 848 x 480
    - Numero de pixeles por frame: 407040
    - Total de convoluciones: 280450560
    - Operacion en CPU toma: 17559.000 ms.
    - Operacion en GPU toma: 571.000 ms.
  
```

Fig. 6. Datos de ejecución del programa en los 3 videos. Elaboración propia, 2021.

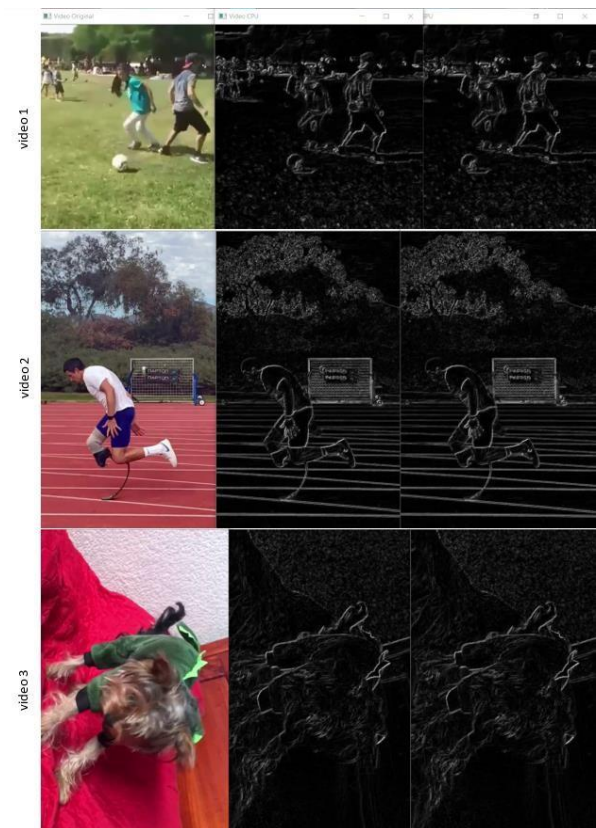


Fig. 7. Captura de video bajo la aplicación del filtro en 3 distintos videos. Elaboración propia, 2021.

Y como segundo punto a partir de los resultados obtenidos, podemos darnos cuenta de primera instancia

que la diferencia en los tiempos de ejecución es bastante considerable, haciendo un uso más eficiente los recursos de procesamiento.

Conclusiones

Partiendo del hecho de que se consiguieron resultados satisfactorios, podemos concluir que la metodología empleada fue la adecuada ya que, gracias a esta, podemos observar la comparación de los tiempos de ejecución de nuestro programa tanto en CPU como en GPU y la aplicación de nuestro filtro frame por frame en el video.

Teniendo como resultado definitivo, que la versión implementada mediante el uso de programación paralela y ejecutada sobre la GPU en la plataforma de desarrollo de CUDA arroja los resultados más óptimos tras la ejecución del programa de la detección de bordes a través de la aplicación de una máscara propuesta para unificar las máscaras de la convolución del filtro de Sobel.

Agradecimientos

Agradecemos especialmente a la Doctora Sandra Luz Canchola Magdaleno por su apoyo y asesoramiento durante el desarrollo de este proyecto en este verano. Agradecemos también a nuestras familias que brindaron motivación y apoyo.

Bibliografía

Cowley, J. (2018). Redes neuronales convolucionales. *Ibm*.

Mesa Hidalgo, F. J. (2020). Convolución paralela con GPU. *Enseñanza y Aprendizaje de Ingeniería de Computadores*. <https://doi.org/10.30827/digibug.36575>

Giménez Palomares, F., Monsoriu Serrá, J. A., & Alemany Martínez, E. (2016). Aplicación de la convolución de matrices al filtrado de imágenes. *Modelling in Science Education and Learning*, 9(1), 97. <https://doi.org/10.4995/msel.2016.4524>

Rivera G, I. O., & Vargas-Lombardo, M. (2012). Principios y Campos de Aplicación en CUDA Programación paralela y sus potencialidades. *Nexo Revista Científica*, 25(2), 39–46. <https://doi.org/10.5377/nexo.v25i2.684>

Salgado Patrón, J., Vásquez Díaz, L., & Vidal Solano, M. (2013). Diseño e implementación de algoritmos para el procesamiento de imágenes en sistemas embebidos.

Ingeniería y Región, 10, 41. <https://doi.org/10.25054/22161325.756>

Aguilar, C. G. G. (1996). Procesamiento digital de imágenes. *Perfiles Educativos*, 72, 395. <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/5249/1/T171.pdf>

Cervantes, M. G. S. (2013). Algoritmos de detección y filtrado de Imágenes para arquitecturas Multicore y Manycore. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/28854/Tesisv3MGSC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

López Verástegui, G., Felipe Riverón, E., & Suárez Guerra, S. (2014). Implementación de algoritmos de procesamiento de imágenes en FPGA. 103. <http://148.204.63.111/SABERv3/Repositorios/webVerArquivo/26041>

Marcelo, L. E. D. G. A. M. T. N. (n.d.). Modelización y evaluación de performance en patrones de Procesamiento Paralelo. 8, 3–5.

Martínez, C., & Martínez, T. (2012). Detección de Bordes. 1–32.

Mendoza, M. A. D. E. L. A. (2009). Procesamiento y Análisis Digital De Imágenes Mediante Dispositivos Lógicos Programables. 134. http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/10726.pdf

Cálculo de PI mediante el procesamiento secuencial y paralelo con uso de C++/CUDA C

Cruz Lozano Roberto. Universidad Autónoma de Querétaro.
rcruz15@alumnos.uaq.mx

Mata Pacheco Roberto Carlos. Universidad Autónoma de Querétaro.
robertocarlosmata29@gmail.com

Sandra Luz Canchola Magdaleno. Universidad Autónoma de Querétaro. sandra.canchola@uaq.mx

Resumen

El procesamiento paralelo fue creado con el propósito de cubrir las carencias no satisfechas por el procesamiento secuencial. El principal objetivo de la paralelización es sacar el mayor provecho del hardware para la optimización de procesos. Con esto en mente se crearon herramientas como Cuda, la cual es capaz de hacer manejo de las unidades de procesamiento gráfico (GPU), que tienen el propósito específico de paralizar procesos mediante sus hilos. Con este contexto decidimos comprobar las capacidades y alcances que tiene CUDA frente a la forma con la que trabajan las unidades de procesamiento central (CPU). Esto aplicado al cálculo de la constante PI mediante el método de series infinitas de Euler, con el motivo de que en esta ecuación se requiere de una alta capacidad de cómputo y es viable la aplicación de ambas formas de procesamiento. En la fase de experimentación constatamos que la herramienta CUDA es una utilidad fiable frente a procesos secuenciales, ya que obtuvo rendimientos superiores a los producidos con CPU.

Palabras Clave

Paralelo, GPU, Secuencial, CPU, Cuda, PI, Hilos.

Abstract

Parallel processing was created for the purpose of filling the gaps not met by sequential processing. The main objective of parallelization is to get the most out of the hardware for process optimization. With this in mind, tools such as CUDA were created, which are capable of handling graphic processing units (GPU), which have the specific purpose of paralyzing processes through their threads. With this context, we decided to check the

capabilities and scope that CUDA has compared to the way the central processing units (CPU) work. This applied to the calculation of the constant PI by means of the method of infinite series of Euler, with the reason that in this equation a high computational capacity is required and the application of both forms of processing is feasible. In the experimentation phase, we found that the CUDA tool is a reliable utility compared to sequential processes, since it obtained higher yields than those produced with CPU.

Keywords

Parallel, GPU, Sequential, CPU, Cuda, PI, Threads.

Introducción

La necesidad de alto poder de procesamiento y obtener resultados en el menor tiempo posible ha sido una problemática presente desde el inicio de la informática. Iniciando con dispositivos simples como CPU mononúcleo, el cual era un artefacto que funcionaba realizando cálculos simples de manera secuenciada así como la evolución de esta tecnología que fue transformada en procesadores multinúcleo que son capaces de asemejar la multifuncionalidad, con el inconveniente de que no trabajan realmente con paralelismo, esto fue hasta que aparecieron las unidades de procesamiento gráfico, que si bien fueron creadas para procesar gráficos en tiempo real en la actualidad se usan como procesadores de uso general (GPGPU), que con sus multihilos fueron idóneas para cubrir las necesidades que existían en el campo del multiprocesamiento. De ahí es donde nace la programación paralela, que su uso podría sintetizarse como “para resolver problemas en los que los recursos de una sola máquina no son suficientes” (Vázquez et al., 2014, p. 61). Algunas de las áreas cubiertas por la programación paralela son el procesamiento digital de imágenes, búsqueda de patrones, ordenamiento y al área competente a este artículo, cálculo de constantes, entre otras. He aquí la importancia de la paralelización, ya que es aquella que nos permite computar y obtener resultados precisos aplicados a áreas de interés tanto cotidiano como técnico. Es por eso que, si bien la constante PI ha sido muy estudiada, lo que incumbe es demostrar que la aportación de la programación paralela a la informática puede ser mayor a la programación secuencial, en términos de tiempo, es decir más procesamiento en menor tiempo.

Objetivos

Implementar el algoritmo de cálculo de la constante PI basado en el método de series infinitas de Euler, en un programa secuencial en C++ y en otro paralelo en Cuda C,

de manera que podamos comparar la precisión y tiempos de ejecución de ambas soluciones. Para lo anterior se iteran crecientemente n elementos de la serie de Euler para ambos programas, hasta encontrar el punto donde alcancemos un resultado óptimo.

Metodología

Método de Euler para PI

El presente es un trabajo de investigación en el área de las Matemáticas, donde nuestro punto de interés es trabajar con el cálculo de constantes irracionales, cuya precisión depende de los elementos considerados en su cálculo. Y el cálculo de PI es de interés general en las Matemáticas, y muy adecuado para comparar las técnicas de programación tradicionales con una opción innovadora en paralelo. Referente al cálculo de PI, Zagonel (2016) expresa que PI es la razón (división) de la circunferencia de un círculo por su diámetro y que este no se ve afectado a las dimensiones de dicho círculo. El motivo de esta elección es la gran cantidad de cálculos independientes que se tienen que hacer para su producción. Aunque existen diversos métodos para calcular PI, elegimos el método de series infinitas de Euler, donde:

$$\frac{\pi^2}{6} = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \quad [1]$$

Dicho método fue obtenido gracias a la resolución del conocido Problema de Basilea el cual explica Muñoz (2015) que “consiste básicamente en hallar la suma infinita de los recíprocos de los cuadrados de los números naturales” (p. 27). Referente a esta demostración podemos desarrollar las siguientes igualdades para obtener PI, donde:

$$\pi^2 = 6 * \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \quad [2]$$

$$\sqrt{\pi^2} = \sqrt{6 * \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2}} \quad [3]$$

$$\pi = \sqrt{6 * \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2}} \quad [4]$$

Software y Hardware

El sistema será desarrollado en el lenguaje de programación C++ y haciendo uso de la utilería CUDA para el manejo de GPU mediante hilos, junto al compilador Microsoft Visual C++ (MSVC) el cual se encuentra

presente en el entorno de desarrollo de Visual Studio. Con respecto a la elección de dicho lenguaje Mayoral (2018) argumenta que el uso de los lenguajes C / C++ son perfectamente aplicables a problemas de cálculo extenso, ya que al ser un lenguaje de medio a bajo nivel, este cuenta con gran manejo de memoria y además que nos permite el uso de la herramienta Cuda. La implementación de CUDA está sustentada en el entendido que da acceso a la programación de los hilos dentro de la GPU por lo que según Gonzaga (2015) “CUDA es una arquitectura de programación paralela” (p. 53).

Referente a el hardware a usado, todo el desarrollo, compilaciones y ejecuciones fueron realizadas en una computadora portátil ASUS TUF gaming A15 con las siguientes especificaciones:

- Procesador (CPU): AMD Ryzen 7 4800H con Radeon Graphics.
- Tarjeta gráfica (GPU): NVIDIA GeForce GTX 1660 Ti.
- Almacenamiento: SSD KINGSTON 500GB OM8PCP3512F-AB y HDD ST1000LM035-1RK172 1TB.
- RAM DDR4 16GB.
- Sistema Operativo: Windows 10 Home Single Language.

Lógica y Código

En relación a la forma usada para las comparaciones de ejecución, se utilizó la librería ctime del lenguaje C++ para medir los tiempos usando la lógica propuesta en el siguiente diagrama de flujo, ver figura 1.

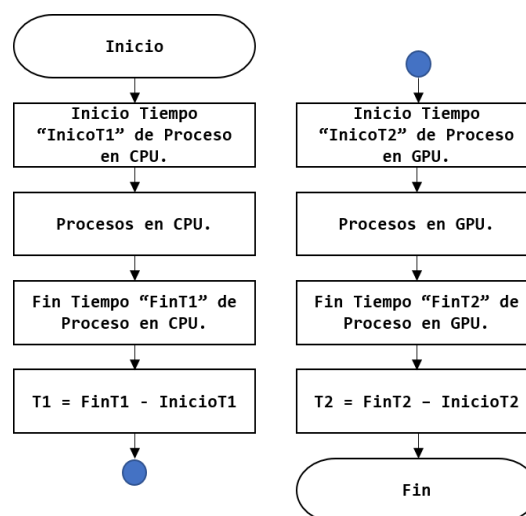


Fig. 1. Diagrama de flujo para la explicación de la toma de tiempo. Elaboración propia, 2021.

Como se mencionó anteriormente uno de los criterios de comparación fue la cantidad de tiempo de cálculo, en milisegundos como métrica, según el dispositivo en uso, ya sea CPU o GPU, Además de la precisión que se alcanzó para el cálculo de PI.

```

__host__ double piCPU()
{
    double sum = 0;
    for (double i = 1; i < iterations; ++i)
    {
        sum += (1 / (i * i));
    }
    return sqrt(sum * 6);
}

```

Fig. 2. Método usado para el cálculo de PI en CPU. Elaboración propia, 2021.

Con esto tomamos segmentos de cantidad de iteraciones, ya en los procesos para los cálculos de PI fuimos designando un esquema de 10^n donde n representa el bloque y sirve para obtener la cantidad de iteraciones deseada, con un límite superior de 10^8 , de acuerdo a las limitaciones del hardware. Una vez realizadas las primeras 8 pruebas, se decidió realizar otro conjunto de 8 pruebas, en donde las iteraciones sean mayores a las de las pruebas anteriores, respetando el límite superior de 10^8 , con el objetivo de tener un amplio campo de comparación y gran cantidad de datos a procesar, asimismo ya sin tomar en cuenta la precisión de PI, ya que el valor de PI no tenía una mayor precisión significativa entre dispositivos, sino que como referencia principal se tomó el tiempo de ejecución. Para las siguientes pruebas, se tomaron 8 valores aleatorios enteros entre 10^7 y 10^8 , en las que se acomodaron de mayor a menor y se ejecutaron según su número de prueba.

Una vez reconocidos los criterios de comparación y ejecución conciernen la definición de los métodos a usar para dichas ejecuciones en código.

Denotamos la forma en que se trabajara en CPU, en donde se aplicó de forma literal la ecuación obtenida del desarrollo previamente explicado en la figura 2, con la única sustitución del símbolo infinito por el esquema de iteración también ya explicado. Todo este desarrollo se ejemplifica en el siguiente código, ver figura 2. En donde lo que se hace es ejecutar un ciclo según la cantidad de iteraciones para calcular la suma, después se calcula la multiplicación y la raíz porque que finalmente sea retornado al resultado.

Para la ejecución en GPU, primeramente, tenemos que precisar algunos conceptos y determinar la forma en que trabaja CUDA. La herramienta desarrollada por NVIDIA, Compute Unified Device Architecture (CUDA), es una utilidad que “permite que los programadores escriban el código paralelo, usando lenguaje C estándar más algunas extensiones” (Sanches et al., 2011, p. 66). CUDA cuenta con una lógica que podría definirse como rejilla (Grid), bloque (Block) e hilo (Thread), esta forma de trabajo se puede definir como configuración del dispositivo (Device) que es la conformación en la que se ejecutará el código dentro de la GPU, que para términos del reporte manejamos una configuración de grid adaptable a las capacidades de la GPU, tomando como máximo de hilos la cantidad máxima posible por la tarjeta gráfica. Sin entrar mucho en detalle el manejo de memoria que hicimos es con base a la jerarquía de memoria que maneja CUDA, que se ejemplifica de la siguiente manera, ver figura 3.

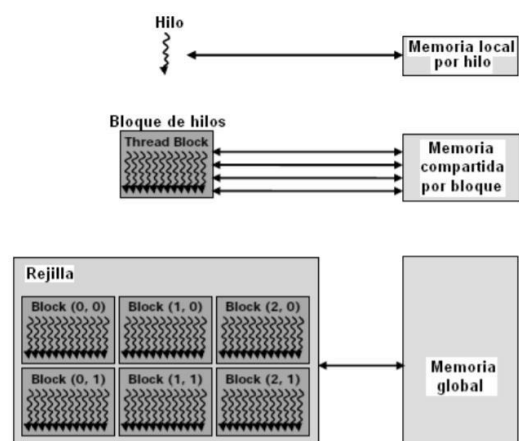


Fig. 3. Jerarquía de la memoria del GPU NVIDIA. Sanches et al., 2011.

CUDA maneja dos conceptos clave para definir en donde se ejecutará la lógica según el dispositivo, host para cuando el código se ejecutará en el CPU y usará únicamente memoria de dicho dispositivo, global para cuando se ejecute en GPU pero con memoria compartida con CPU y device donde de igual forma se ejecutará en la

GPU pero solo con accesos a la memoria de dicho dispositivo.

De acuerdo con lo anterior podemos denotar la lógica según el código desarrollado en CUDA para el cálculo de PI. Se decidió manejar la ejecución en tres métodos para así poder tener, por un lado, un mejor control de los hilos y sus bloques, y por otro, un máximo aprovechamiento de los recursos de la GPU. Como primera función tenemos la división en donde cada hilo calcula la operación y guarda el resultado según la posición de su ID en un arreglo, con la condición de que su id coindia según la cantidad de iteración a realizar, ya que podría existir un desfase en la relación de cantidad de hilos por iteraciones, ver figura 4.

```
global__ void crazyDivisions(double* ti, double iter)
{
    int tid = (blockIdx.x * blockDim.x) + threadIdx.x;
    if ((tid) <= (int)iter - 1)
    {
        ti[tid] = (double)1 / (double)((double)tid
            + (double)1) * ((double)tid + (double)1));
    }
}
```

Fig. 4. Método crazyDivisions de ejecución en GPU. Elaboración propia, 2021.

Posteriormente se calculó la suma en donde cada hilo estaba encargado de una pareja de divisiones previamente calculada, con la misma limitante de coincidencia hilos - iteraciones, ver figura 5.

```
global__ void crazySums(double* ti01, double* ti02, double iter)
{
    int tid = (blockIdx.x * blockDim.x) + threadIdx.x;
    if ((tid * 2) <= (int)iter)
    {
        ti02[tid] = ti01[(tid * 2)] + ti01[(tid * 2) + 1];
    }
}
```

Fig. 5. Método crazySums de ejecución en GPU. Elaboración propia, 2021.

Finalmente, el cálculo de la multiplicación y la raíz cuadrada en donde solo un hilo se encargó de dicha tarea, ver figura 6.

```
global__ void crazyPI(double* ti, double* pi)
{
    pi[0] = sqrt(ti[0] * 6);
}
```

Fig. 6. Método crazyPI de ejecución en GPU. Elaboración propia, 2021.

Para el resultado tendremos un despliegue de información en donde se especificarán datos informativos, resultados obtenidos y tiempos de ejecución, ver figura 7.

```
>>>>>> PI Calculation with CPU and GPU <<<<<<<
- Device Name: NVIDIA GeForce GTX 1660 Ti
- Maximum number of threads per block: 1024
- Number of iterations: 1.0
=====
<<<<< CPU >>>>>
- The value of PI in CPU is: 0.00000000
- Total CPU time: 0.000000 ms.
=====
<<<<< GPU >>>>>
- The value of PI in GPU is: 0.00000000
- Total GPU time: 1.000000 ms.
- Total Threads: 1024
- Configuracion de ejecucion:
+ Grid [1, 1, 1] Bloque [1024, 1, 1]
=====
```

Fig. 7. Despliegue de información y resultados por consola. Elaboración propia, 2021.

Por último, se realizaron las ejecuciones y se creará una tabla de comparación, con información de CPU y GPU, tiempos y cantidad de iteraciones, para la elaboración de una gráfica en donde se analizaron los resultados obtenidos.

Resultados

Como se mencionó con anterioridad se realizaron 8 pruebas en primer lugar, en donde la cantidad de iteraciones se calcula con 10^n donde n es el número de prueba actual, lo que conlleva a un máximo de 10^8 de iteraciones en la prueba final. Los resultados obtenidos de las pruebas se desglosan en la siguiente tabla, ver figura 8.

Prueba	Iteraciones	Dispositivo	PI	Tiempo
1	10	CPU	3.03950759	0 ms.
		GPU	3.02729786	1 ms
2	100	CPU	3.13198075	0 ms.
		GPU	3.12675279	1 ms.
3	1000	CPU	3.1406371	0 ms.
		GPU	3.13972882	1 ms.
4	10000	CPU	3.14149715	0 ms.
		GPU	3.14147609	1 ms.
5	100000	CPU	3.1415831	0 ms.
		GPU	3.14157808	1 ms.
6	1000000	CPU	3.1415917	1 ms.
		GPU	3.14159083	2 ms.
7	10000000	CPU	3.14159256	13 ms.
		GPU	3.14159254	8 ms.
8	100000000	CPU	3.14159264	121 ms.
		GPU	3.14159264	63 ms.

Fig. 8. Despliegue de información y resultados. Elaboración propia, 2021.

De la tabla anterior podemos analizar que, la CPU resulta ser un mejor dispositivo para procesamiento de pequeñas

cantidades, ya que de la prueba 1 a la 6 resultó tener mejores resultados en cuanto a tiempo y precisión, asimismo la GPU resultó vencedora en las últimas pruebas en las que la programación paralela resultó ventajosa, ya que tuvo ganancia en tiempo y precisión, pero esto se verá reflejado en el siguiente segmento de pruebas.

El segmento final de pruebas se llevó a cabo con los parámetros previamente explicados en la metodología y el valor de iteraciones usadas, así como los resultados obtenidos se desglosan en la siguiente tabla, ver figura 9.

Prueba	Iteraciones	Dispositivo	PI	Tiempo
1	10001024	CPU	3.14159256	12 ms.
		GPU	3.14159254	8 ms.
2	37537408	CPU	3.14159263	45 ms.
		GPU	3.14159263	24 ms.
3	41927194	CPU	3.14159263	50 ms.
		GPU	3.14159263	28 ms.
4	58406165	CPU	3.14159263	71 ms.
		GPU	3.14159263	38 ms.
5	58604919	CPU	3.14159263	71 ms.
		GPU	3.14159263	38 ms.
6	67527569	CPU	3.14159263	82 ms.
		GPU	3.14159263	43 ms.
7	83469775	CPU	3.14159263	101 ms.
		GPU	3.14159263	52 ms.
8	94906264	CPU	3.14159263	115 ms.
		GPU	3.14159263	58 ms.

Fig. 9. Despliegue de información y resultados. Elaboración propia, 2021.

Como se puede apreciar, a diferencia de la tabla anterior, la GPU sobresale cuando se manejan grandes cantidades de datos, ya que la capacidad de paralelizar operaciones la hace como mínimo 40% más rápida que la CPU, también podemos comentar que si bien la GPU es más rápida sabemos que también es menos precisa, que, para términos de este artículo, no representa una precisión significativamente negativa.

Conclusiones

Si bien no podemos decir que ninguno de los dos dispositivos es mejor que el otro podemos afirmar diferentes cosas de ellos. Sabemos que para la CPU y con programación secuencial, las pequeñas cantidades de datos, su manejo es sumamente eficiente, además que su precisión resulta ser mayor. Nosotros recomendamos su uso para procesamientos en los que no se requieren grandes cantidades de datos. Para la GPU y la programación paralela con CUDA se puede asegurar que, el manejo de grandes cantidades de datos se le da muy bien, aunque, a un costo de precisión, todo dependería de que es lo que se requiera calcular. Recomendamos su uso para los problemas en los que se requiera manejar

grandes cantidades de datos y en los cuales sean independientes, claro, en el entendido de que siempre se pagará un costo de precisión.

Agradecimientos

Damos gracias a la Doctora Sandra Luz Canchola Magdaleno por su apoyo, guía y asesoramiento durante todo el verano para la realización de este artículo. Además, agradecemos a nuestras familias ya que estuvieron al pendiente de nosotros, brindando motivación y apoyo.

Bibliografía

Gonzaga Noguera, R. M. (2015). Comparativa de los paradigmas de programación paralela: por manejo de threads, por paso de mensajes e híbrida (Bachelor's thesis).

Laguna-Sánchez, G. A., Olguin-Carbajal, M., & Barrón-Fernández, R. (2011). Introducción a la programación de códigos paralelos con CUDA y su ejecución en un GPU multi-hilos. *ContactoS*, 80, 65-69.

Mayoral Briz, E. (2018). Implementación paralela de algoritmos de control y optimización en CUDA.

Muñoz, J. M. S. (2015). Euler y el Problema de Basilea. *Pensamiento Matemático*, 5(1), 27-56.

Vázquez, L., Valdez, A., Campos, G., Campos, R., & Hernández, R. (2014). Programación paralela en una técnica de optimización de tiempos de producción de una empresa. *de Cuerpos Académicos*, 60-66.

Zagonel, M. (2016). Cálculo de PI paralelizado usando OpenMP. *Simposio de Ciencia, Innovación y Tecnología*, 20.

Evaluación fotoelectrocatalítica de un semiconductor en configuración de película delgada.

Fuentes Molina David¹, M. en C. Luis Alejandro Martínez Chávez².

¹ Estudiante de Ingeniería en Nanotecnología, Facultad de Ingeniería, UAQ, Cerro de las Campanas, C.P. 76010, Santiago de Querétaro, Qro., México; dfuentes12@alumnos.uaq.mx

² Anfitrión del programa Verano de la Ciencia UAQ.

Resumen

Se evaluó el desempeño de una película delgada de dióxido de titanio modificada con plata metálica como electrocatalizador y fotoelectrocatalizador para la decoloración de una solución de rodamina B. Probando ser superior el desempeño del semiconductor como electrocatalizador, lo que se atribuye a propiedades de la plata como buena conductividad y adsorción de oxígeno. Cualitativamente se logró decolorar una serie de soluciones, comprobándose con el espectro de adsorción de UV-Vis, señalando como posible campo de estudio futuro la comprobación de una degradación del colorante orgánico, así como la manera en que la plata modifica al dióxido de titanio.

Palabras clave: dióxido de titanio, decoloración, electrocatalisis, fotoelectrocatalisis.

Summary

In this work, the performance of a thin film made of titanium dioxide modified with metallic silver was evaluated as an electrocatalyst and photoelectrocatalyst, in order for decolorate a solution of rhodamine B. Probing that the performance of the semiconductor as electrocatalyst was superior, which is attributed to metallic silver due to its conductivity and adsorption of oxygen. Qualitatively the discoloration of the solutions was

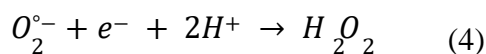
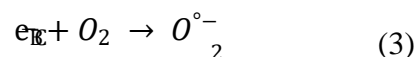
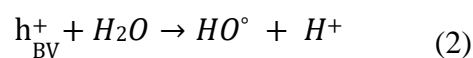
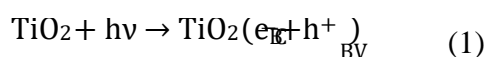
successful and confirmed by the absorption spectra of UV-Vis, noting as a possible field of investigation the degradation of the organic colorant and the method by which the silver modifies the semiconductor.

Key words: titanium dioxide, discoloration, electrocatalysis, photoelectrocatalysis.

Introducción

El tratamiento de agua se realiza para mejorar la calidad de la misma y remover contaminantes empleando métodos físicos, químicos o biológicos (Karapanagioti 2016), sin embargo existen ciertos contaminantes con una estructura química altamente estable que no pueden ser removidos por métodos convencionales (O'Connor et al. 2018), estos contaminantes recalcitrantes se pueden tratar mediante procesos avanzados de oxidación (PAO's), logrando degradar y mineralizar los compuestos empleando el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) el cual es altamente reactivo y oxida la materia orgánica (Moreno-Benito et al. 2013).

Para la formación de este radical derivado del oxígeno se ha estudiado con anterioridad el empleo de dióxido de titanio (TiO_2) en fase cristalina anatasa, el cual por ser un semiconductor puede formar pares electrón-hueco al superar la energía de la banda prohibida (3.2 eV); la promoción de electrones de la banda de conducción (BC) a la banda de valencia (BV) produce sitios que aumentan la producción de radicales derivados del oxígeno como se muestra en las reacciones (1)-(4).



Debido a esta propiedad el dióxido de titanio es ampliamente usado como fotocatalizador. Se define a la fotocatalisis como la aceleración de una reacción fotoquímica sobre una superficie sólida, la cual

usualmente es un semiconductor (Carneiro et al. 2011).

En adición, se ha reportado la fabricación de electrodos de dióxido de titanio para la reacción de reducción de oxígeno, así como su empleo en la fabricación de un electrocatalizador para la reacción de evolución de hidrógeno (HER por sus siglas en inglés), esto debido a su estabilidad en distintas condiciones relevantes a la electrocatálisis (Ren et al. 2020; Gholamreza y Pezhman 2016; Lavacchi et al. 2021).

En el presente trabajo se evalúa un semiconductor al emplearlo como electrodo para la decoloración de una solución de rodamina B empleando electrocatálisis y fotoelectrocatálisis. El semiconductor es dióxido de titanio en configuración de película delgada, la cual se ha modificado con plata metálica.

Objetivos

Evaluar las propiedades fotoelectrocatalíticas de un semiconductor con base en TiO_2 en configuración de película delgada y relacionar los resultados con la información obtenida a través de la caracterización fisicoquímica de los materiales.

Metodología

Las películas delgadas de $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ fueron depositadas sobre un recubrimiento conductor de óxido de indio y estaño (ITO por sus siglas en inglés) el cual está soportado sobre vidrio. Para obtener la película delgada se empleó un sistema híbrido de ablación con láser pulsado (PLD por sus siglas en inglés) y magnetron sputtering, empleando un blanco de titanio metálico el cual fue pulverizado por sputtering para formar la película delgada y modificada mediante la ablación láser de un blanco de plata metálica.

Con la película delgada se fabricó un electrodo el cual consistió en unir un cable de cobre al recubrimiento de ITO mediante tinta de plata y aislando la unión empleando resina epóxica (**Figura 1**) para realizar pruebas electrocatalíticas y fotoelectrocatalíticas, buscando decolorar un contaminante orgánico modelo: rodamina B. Para este objetivo se preparó una solución a 25 ppm, 0.5 mM Na_2SO_4 y pH 1 de

esta manera se asegura el paso de corriente eléctrica a través de la solución y se lleva a cabo la electrólisis.



Figura 1: Electrodo fabricado con la película delgada $\text{TiO}_2\text{-Ag}$

Para las pruebas electrocatalíticas se empleó una diferencia de potencial de 4.8 V entre el ánodo (electrodo de película delgada) y el cátodo (electrodo de grafito) **Figura 2**. Las pruebas fotoelectrocatalíticas se realizaron de igual manera, adicionando una fuente de radiación ultravioleta con una longitud de onda de 340 nm a una distancia de 5 cm de la celda. Ambas pruebas incluyeron la agitación constante de la solución, así como el suministro constante de aire, agregando oxígeno a la reacción. El sistema en el cual se realizaron las pruebas consistió en una celda fotoelectroquímica, maquinada en teflón y con un vidrio de cuarzo el cual transmite las longitudes de onda correspondientes al ultravioleta.

Se realizó una serie de degradación por tiempo para ambas pruebas, siendo los intervalos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos, obteniendo 8 muestras al contar el blanco de rodamina B a 25 ppm.

Todas las muestras se analizaron en un espectrofotómetro Halo XB-10 en celdas de cuarzo.

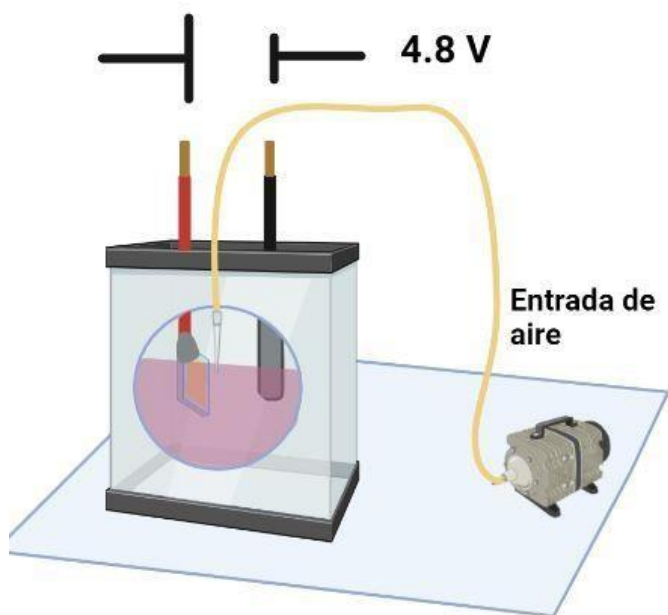


Figura 2: Esquema del sistema para realizar las pruebas electrocatalíticas.

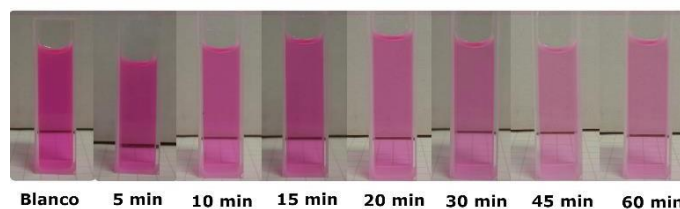


Figura 3: Serie de degradación mediante electrocatalisis.

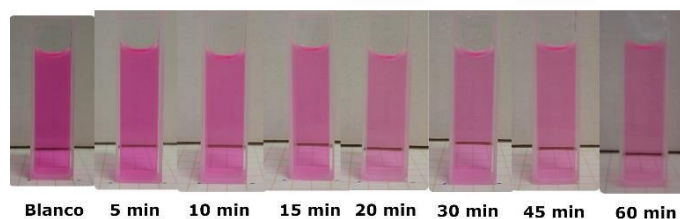


Figura 4: Serie de degradación mediante fotoelectrocatalisis.

Resultados

Las soluciones de rodamina B empleadas para las pruebas dejar ver cualitativamente una decoloración progresiva conforme aumenta el tiempo (**Figura 3 y Figura 4**). Empleando la ley de Beer-Lambert se obtuvo el coeficiente de extinción molar de la rodamina B diluida en agua destilada:

$$A = s \cdot b \cdot C$$

Se obtuvo el coeficiente para rodamina B a partir del blanco cuya concentración es conocida, siendo el resultado de $46000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a partir de este resultado se realiza la **Tabla 1** para comparar las pruebas electro y fotoelectrocatalíticas.

Tabla 1: Comparación de las concentraciones obtenidas para las pruebas electrocatalíticas y fotoelectrocatalíticas.

Muestra	Electro	Foto
Blanco	25 ppm	25 ppm
5 min	15.49 ppm	14.87 ppm
10 min	11.51 ppm	13.62 ppm
15 min	10.88 ppm	11.36 ppm
20 min	8.98 ppm	9.44 ppm
30 min	7.15 ppm	6.72 ppm
45 min	5.57 ppm	7.32 ppm
60 min	5.57 ppm	7.32 ppm

Discusión y conclusiones

El emplear plata metálica tiene múltiples ventajas para la electrocatalisis, ya que este elemento tiene una buena capacidad de adsorción de oxígeno, estabilidad en un medio con un electrolito, buena conductividad, así como un bajo costo (Maheswari, Sridhar, y Pitchumani 2012). Debido a estas características, es posible que el desempeño del electrodo fabricado a partir de la película delgada haya sido superior en electrocatalisis que en fotoelectrocatalisis.

Los espectros de absorbancia para ambas pruebas (**Figura 5 y**

Figura 6) dejan en evidencia que el electrodo se satura y llega a un límite para decolorar la rodamina B, en la electrocatalisis ocurre a los 45 min y la fotocatalisis lo confirma, siendo este el tiempo en el cual se obtiene la máxima decoloración de la rodamina B.

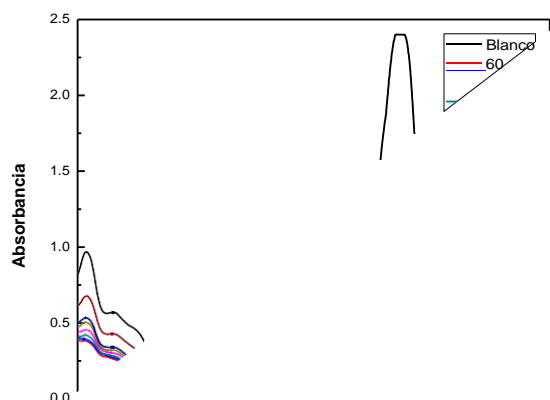


Figura 5: Espectro de absorción obtenido por espectroscopía UV-Vis para la serie de degradación por electrocatalisis.

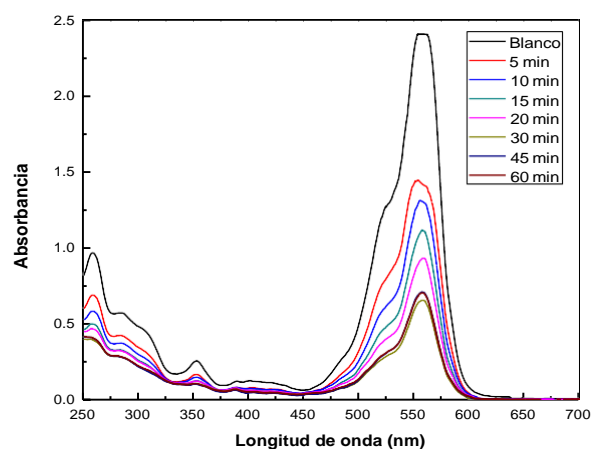


Figura 6: Espectro de absorción obtenido por espectroscopía UV-Vis para la serie de degradación por fotoelectrocatalisis.

La evaluación del electrodo $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ mediante pruebas de electrocatalisis y fotocatalisis deja en evidencia el desempeño superior del electrodo si se emplea únicamente como electrocatalizador. Aunado a esto, el emplear el semiconductor en configuración de película delgada es de mayor practicidad que emplearlo en forma de polvo, ya que permite su recuperación de la solución sin necesidad de tratamientos posteriores. Si bien el desempeño como

fotocatalizador del dióxido de titanio no fue superior si se compara con las pruebas electrocatalíticas, es posible su mejora, ya que debido al valor de su banda de energía prohibida del TiO_2 , no emplea en su totalidad la energía irradiada sobre él, siendo posible una reducción en la brecha energética al dopar metales (Jedsukontorn et al. 2018), lo que plantea un posible campo de investigación en el semiconductor aquí evaluado para determinar la manera en que la plata metálica está modificando al semiconductor.

Agradecimientos

Al laboratorio de materiales nanoestructurados y funcionales (LMNF) por prestar el espacio, así como el equipo y reactivos para la realización de esta estancia. Al maestro Luis Alejandro Martínez Chávez por la aceptación de la estancia y el desarrollo del proyecto aquí expuesto, a la Dra. Karen Esquivel Escalante por su asesoría en las prácticas y la redacción del reporte, así como a la Universidad Autónoma de Querétaro por el programa Verano de la Ciencia.

Referencias bibliográficas

- Carneiro, J.O., V. Teixeira, P. Carvalho, S. Azevedo, y N. Manninen. 2011. «Self-Cleaning Smart Nanocoatings». En *Nanocoatings and Ultra-Thin Films*, 397-413. Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857094902.2.397>.
- Gholamreza, Mirshekari, y Shirvanian1 Pezhman. 2016. «Catalytic Activity of Titanium Dioxide Nanoparticles As a Non-Platinum Cathode Catalyst for Oxygen Reduction Reaction». *ECS Meeting Abstracts*. <https://doi.org/10.1149/MA2016-02/38/2834>.
- Jedsukontorn, Trin, Tomonaga Ueno, Nagahiro Saito, y Mali Hunsom. 2018. «Narrowing Band Gap Energy of Defective Black TiO_2 Fabricated by Solution Plasma Process and Its Photocatalytic Activity on Glycerol Transformation». *Journal of Alloys and Compounds* 757 (agosto): 188-99. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.05.046>.
- Karapanagiotti, H.K. 2016. «Water Management, Treatment and Environmental Impact». En *Encyclopedia of Food and Health*, 453-57. Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00740-6>.

Lavacchi, Alessandro, Marco Bellini, Enrico Berretti, Yanxin Chen, Andrea Marchionni, Hamish Andrew Miller, y Francesco Vizza. 2021. «Titanium Dioxide Nanomaterials in Electrocatalysis for Energy». *Current Opinion in Electrochemistry* 28 (agosto): 100720.

<https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100720>.

Maheswari, Subbiah, Parthasarathi Sridhar, y Sethuraman Pitchumani. 2012. «Carbon-Supported Silver as Cathode Electrocatalyst for Alkaline Polymer Electrolyte Membrane Fuel Cells». *Electrocatalysis* 3 (1): 13-21.

<https://doi.org/10.1007/s12678-011-0071-0>.

Moreno-Benito, M., E. Yamal-Turbay, A. Espuña, M. Pérez-Moya, y M. Graells. 2013. «Optimal Recipe Design for Paracetamol Degradation by Advanced Oxidation Processes (AOPs) in a Pilot Plant». En *Computer Aided Chemical Engineering*, 32:943-48. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63234-0.50158-5>.

O'Connor, David, Deyi Hou, Yong Sik Ok, Yinan Song, Ajit K. Sarmah, Xuanru Li, y Filip M.G. Tack. 2018. «Sustainable in Situ Remediation of Recalcitrant Organic Pollutants in Groundwater with Controlled Release Materials: A Review». *Journal of Controlled Release* 283 (agosto): 200-213.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.06.007>.

Ren, Bowen, Qiuyan Jin, Yinwei Li, Yan Li, Hao Cui, y Chengxin Wang. 2020. «Activating Titanium Dioxide as a New Efficient Electrocatalyst: From Theory to Experiment». *ACS Applied Materials & Interfaces* 12 (10): 11607-15.

<https://doi.org/10.1021/acsami.9b21575>.

Síntesis de hidroxiapatita para posibles aplicaciones médicas.

González Emmert Javier Contacto:

jagonem@live.com.mx

Asesores:

Juan Carlos Calderón de la Rosa

Genoveva Bailón Matehuala

Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo Contacto:

rodrigo.velazquez@uaq.mx

Universidad Autónoma de Querétaro.

Resumen:

Durante la estancia de laboratorio se realizaron tres metodologías para la síntesis de nanofibras de hidroxiapatita (HAp) sintetizadas por el método hidrotermal asistido con microondas (Monowave 300). En el primero se sintetizó HAp a partir de nitrato de calcio, hidróxido de potasio y fosfato de potasio. La segunda se adicionaba ácido glutámico a la solución de nitrato de calcio para una orientación preferencial de cristales en la dirección [3 0 0]. Por último, una vez sintetizada la HAp con ác. glutámico, se realizó un tratamiento térmico utilizando un horno para la dilatación de las fibras para posteriormente doparlas con quercetina para la aplicación de liberación de fármacos. Finalmente se caracterizaron los tres experimentos por difracción de rayos X (DRX) para confirmar el uso de la metodología para la síntesis de hidroxiapatita, el crecimiento preferencial y también la dilatación de las fibras.

Palabras clave: hidroxiapatita, nanofibras, biomateriales.

Abstract:

During the laboratory research stay, three methodologies were used to synthesize hydroxyapatite (Hap) nanofibers using hydrothermal-microwave assisted method. In the first methodology calcium, nitrate CaNO_3 , potassium hydroxide KOH and potassium phosphate K_2HPO_4 were used as precursors. In the second one, glutamic acid was

added to the mixture of calcium nitrate in order to obtain a preferential crystalline growth orientation in the [300] directions. In the latter, Hap with glutamic acid was thermally treated using an oven to expand the nanofibers to dope them with quercetin for a drug-delivery possible application. Finally, the three experiments were characterized using X-ray diffraction (XRD) to confirm the first method to synthesize the Hap, the preferential crystalline growth and the expansion of the fibers.

Key words: hydroxyapatite, nanofibers, biomaterials.

Introducción:

Los fosfatos de calcio engloban el grupo más grandes de biominerales en los animales vertebrados. El más importante y abundante biológicamente es la hidroxiapatita o hidroxiapatito ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, HAp), ya que es principalmente encontrado en el tejido óseo y en dientes, constituyendo 69% en peso. La estructura de la HAp es la determinante de sus propiedades elásticas y mecánicas de tejidos duros. La estructura cristalina más frecuente de la HAp es la hexagonal, teniendo la simetría de grupo espacial $P63/m$ con los parámetros de red $a = b = 9.432 \text{ \AA}$, $c = 6.881 \text{ \AA}$ y $\gamma = 120^\circ$. La estructura consiste de un arreglo tetraédrico de PO_4 mantenidos unidos por iones Ca intercalados entre ellos. Los grupos hidroxilo (OH) se encuentran en columnas en los ejes de tornillo, y el punto adyacente OHs en direcciones opuestas.

La HAp sintética es de gran interés ya que comparte propiedades del hueso estructural, volviéndolo un material con alta biocompatibilidad. Por esto, la HAp sintética ha sido motivo de experimentación para el área médica como un material de implante para la restauración de dientes y huesos dañados. Otros usos que se le están dando a la HAp son: material piezoeléctrico, catalizador y acarreador de fármacos.

Existen varios métodos de síntesis para la HAp sintética, como sol-gel, hidrotermal, hidrólisis, precipitación o incluso ser extraído de recursos naturales -huesos de pez, coraza de huevo, huesos bovinos, entre otros-. Sin embargo, la mayoría de estas metodologías no enfatizan en el control de la morfología, tamaño y parámetros estructurales de la HAp. Entre estos, el método hidrotermal asistido por microondas se ha mostrado efectivo para la síntesis de

HAp, además de ser de bajo costo y simplicidad para la síntesis de esta en grande escala y alta pureza.

El uso de microondas provee la energía necesaria para iniciar reacciones químicas y este método es utilizado para controlar la morfología, tamaño y orientación preferencial del cristal. Por lo que utilizar el método hidrotermal asistido por microondas es una excelente opción para sintetizar HAp con un control de estos parámetros donde el producto que se suele obtener son nanofibras, nanopartículas y nanorods.

Objetivos:

Evaluar el uso del microondas monowave 300 en el método hidrotermal asistido por microondas para la síntesis de nanofibras de HAp hexagonal, HAp con orientación preferencial [3 0 0] lograda por el aditamento de ácido glutámico y el tratamiento térmico de las fibras orientadas para doparlas con quercetina para una aplicación de liberación de fármacos.

Metodología:

Experimento 1: Hidroxiapatita sin orientación preferencia:

Preparar dos soluciones denominadas A y B.

Solución A:

1. En un vaso de precipitado de 300mL agregar 2.02g de ácido glutámico ($C_5H_9NO_4$).
2. Añadir 0.76g de nitrato de calcio ($Ca(NO_3)_2$).
3. Verter 150mL de agua destilada.
4. Calentar a 70°C (38°C reales) con agitación durante 60 minutos.

Solución B (10 minutos antes del tiempo de solución A):

1. En un vaso de precipitado de 100mL agregar 0.38g de hidróxido de potasio (KOH).
2. Añadir 0.55g de fosfato de potasio (K_2HPO_4).
3. Verter 50mL de agua destilada.
4. Calentar a 70°C (38°C reales) con agitación durante 10 minutos.

Una vez concluido el tiempo se mide la temperatura y pH de ambas soluciones, basándose en los parámetros siguientes:

Sol. A: Temperatura= 39°C y pH=3

Sol. B: Temperatura= 32°C y pH=11.7

Posteriormente se vierte la solución B en la solución A donde la temperatura final debe de ser alrededor de 38°C y un pH de 4.

El microondas utilizado fue el Monowave 300 de la marca Anton Para con viales de 30mL donde utilizaba 27mL de solución.

Condiciones de microondas:

Durante 15 minutos mantener una temperatura de 170°C. Después 45 minutos a 45°C.

Experimento 2: Hidroxiapatita con orientación preferencial:

A la solución A se agregan 2.02g de ácido glutámico y se continúa con la misma metodología de síntesis.

Experimento 3: Hidroxiapatita con orientación preferencial, tratada térmicamente y dopada con quercetina:

Se utiliza la metodología completa del segundo experimento y se realiza lo siguiente:

1. Meter la HAp sintetizada en un horno a 600°C durante 3 horas.
2. Posteriormente agregar 10.5 mg de la HAp tratada térmicamente (HAp-T) a 6mL de etanol.
3. Hacer un proceso de centrifugación durante 15 minutos a 6500rpm.
4. Verter 1.5mg de quercetina en 6mL de agua destilada y colocar en calentamiento y ligera agitación para disolución total.
5. Agregar la solución de la quercetina a la de HAp-T y centrifugar nuevamente.
6. Colocar en un horno a 65°C por 72 horas.

Caracterización:

Para la caracterización de la HAp obtenida en los tres experimentos se utilizó la difracción de rayos X utilizando un difractómetro D8 Advance hecho por Bruker donde las condiciones del equipo son las siguientes: 35kV de voltaje acelerado y una corriente de 15mA. Se utilizó una placa de cobre donde la radiación utilizada fue CuK_α (longitud de onda

$\lambda=1.5406 \text{ \AA}$. Todos los experimentos se realizaron desde 10° a 70° en la escala 2θ con un paso de 0.05° .

Otro parámetro a considerar para el control de morfología y tamaño son los precursores utilizados. Recientemente se ha investigado que, al adicionar ciertos compuestos químicos como el ácido glutámico, es posible modificar su estructura. Dependiendo de la concentración del ácido glutámico se pueden formar nanofibras, nanoalambres, nanoplatos y nanopartículas. En el área de aplicación, es de extrema importancia cuidar la morfología del material sobre todo si nos fijamos en el área de biomateriales. En este caso se trabajó se utilizó el método hidrotérmal asistido por microondas añadiendo a uno de los experimentos el ácido glutámico para la obtención de nanofibras y así en otro experimento realizar un tratamiento térmico para la dilatación de las mismas.

Resultados:

Los análisis de DRX mostraron resultados similares entre sí. Todos los difractogramas obtenidos fueron comparados con el banco *powder diffraction file* (PDF) proporcionado por el *International Centre for Diffraction Data* (ICDD) para identificar las fases cristalinas presentes. La única fase cristalina presente en las muestras fue hidroxiapatita según el PDF 86-1199.

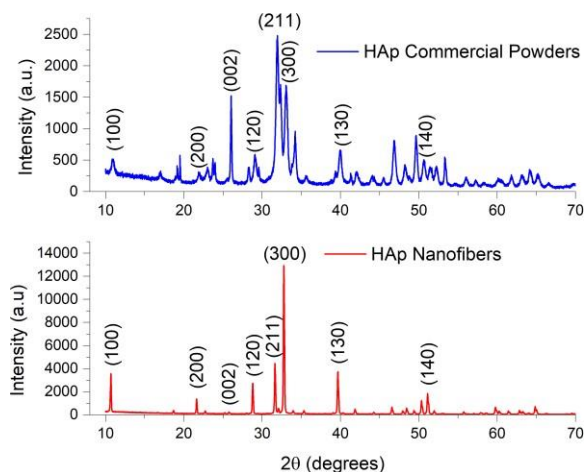


Ilustración 1: difractograma de HAp comercial (azul) comparada con nanofibras de HAp (rojo) con ác. glutámico.

Como se puede observar en la ilustración 1, se realiza una comparación entre un difractograma de la HAp comercial y las nanofibras sintetizadas con la

metodología empleada con el uso de ácido glutámico. También podemos apreciar la alta cristalinidad del producto obtenido ya que los picos son definidos y delgados, además de una línea base bien definida. Otro detalle a remarcar es como la dirección [300] se aprecia con mayor intensidad, lo cual confirma que el ácido glutámico crea esta orientación preferencial, siendo posible la obtención de nanofibras de HAp.

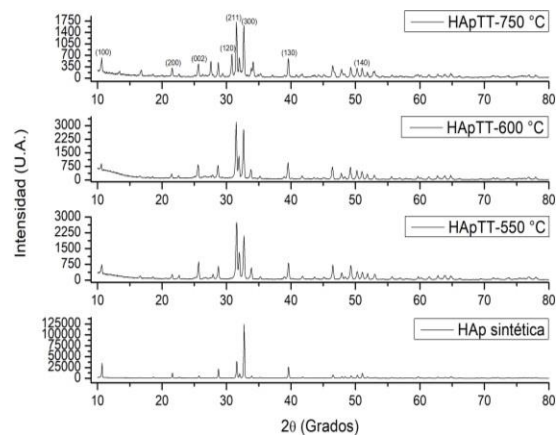


Ilustración 2: difractogramas de HAp tratada térmicamente a distintas temperaturas.

En la segunda ilustración se compara el difractograma obtenido al tratar la HAp térmicamente a 600°C con otros difractogramas tratados a distintas temperaturas y sin el tratamiento. Se puede observar que en los tres tratamientos, la dirección [300] disminuyó en intensidad a tal punto que la dirección [211] tiene un mayor rango. Entre el difractograma de HApTT- 550°C y HApTT- 600°C podemos observar muchas similitudes, pero a comparación con el difractograma HApTT- 700°C este contiene más intensidad en las direcciones [002], [200] y [120].

Discusión y conclusiones:

Una vez realizados los análisis podemos confirmar la eficiencia del método hidrotérmal asistido por microondas, en específico el *monowave 300*. También se pudo concluir la importancia del uso del ácido glutámico como parte de precursor para el crecimiento preferencial para la obtención de nanofibras de HAp.

La cantidad de quercetina ideal para un correcto dopaje parece ser de una décima parte en masa de la HAp-T con el tratamiento térmico de 600°C para no dañar a la estructura. Sin embargo, creemos que, para un mejor análisis de la dilatación de las fibras y el correcto anclaje de la quercetina a estas, es necesario realizar más caracterizaciones como SEM y FTIR.

La estructura cristalina de la HAp sintetizada en este trabajo fue siempre hexagonal, por lo que hay una gran área de oportunidad en la síntesis y aplicación de la HAp con estructura monoclinica.

G. Ma y X. Yiang Liu. "Hydroxyapatite: hexagonal or monoclinic?" *Crystal Growth & Design*. 2009 Vol. 9, NO 7, 2991-2994. Disponible en: doi:10.1021/cg900156w [consultado 2021].

Agradecimientos:

El autor principal, Javier González Emmert, quiere agradecer al Dr. Rodrigo Velázquez Castillo por la aceptación en el proyecto, además de brindar el apoyo e información práctica y teórica del tema.

También agradecer a Veranos de la Ciencia UAQ 2021 por ofrecer estas actividades para los alumnos y a la Universidad Autónoma de Querétaro por impulsar proyectos de este estilo, a sus docentes y al alumnado.

Referencias:

N. Méndez-Lozano; R. Velázquez-Castillo; E.M. Rivera-Muñoz; L. Bucio-Galindo; G. Mondragón-Galicia; A. Manzano-Ramírez; m. A. Ocampo y L.M. Apátiga-Castro. 2016. "Crystal Growth and structural analysis of hydroxyapatite nanofibers synthesized by the hydrothermal microwave-assisted method." *Ceramics International*, (), S0272884216317096-. Disponible en doi:10.1016/j.ceramint.2016.09.179 [consultado 2021].

J. R Alanís-Gómez; E. M Rivera-Muñoz; J. S Cervantes-Medina; H Almanza-Reyes; R. Nava-Mendoza; C. Cortes-Romero; R. Velázquez-Castillo(2016). "Synthesis of Micro and Nano-Sized Hydroxyapatite Fibers Through the Microwave Assisted Hydrothermal Method". *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(7), 7557–7566. Disponible en: doi:10.1166/jnn.2016.12829 [consultado 2021].

R. Pérez-Solis; J. Gervacio-Arciniega; B. Joseph; M. Mendoza; A. Moreno (2018). "Synthesis and Characterization of a Monoclinic Crystalline Phase of Hydroxyapatite by Synchrotron X-ray Powder Diffraction and Piezoresponse Force Microscopy".

Crystals, 8(12), 458-. Disponible en: doi:10.3390/cryst8120458 [consultado 2021]

Evaluación del compuesto $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ como barrera hidrofóbica en cartón.

Mandujano Gómez Hugo Alberto ¹, Alicia Rosales Pérez ².

¹ Estudiante de Ingeniería en Nanotecnología, Facultad de Ingeniería, UAQ. Cerro de las campanas, C.P. 761010, Santiago de Querétaro, Qro., México; hugo.almg99@gmail.com

² Anfitrión del programa Verano de la Ciencia; alicia.ros.perez@hotmail.com

Resumen

En el sector industrial de envase y embalaje, el uso del cartón es muy extendido debido a su bajo costo, abundancia y flexibilidad mecánica (Ministerio de Comercio Exterior y Turismo, 2009). Sin embargo, ciertas propiedades de este material como su alta permeabilidad, porosidad, degradabilidad térmica y superficie química no uniforme favorecen su descomposición en condiciones de alta humedad (B. Balu et al. 2008). Esto hace del cartón un material perecedero, con una vida útil más corta en comparación a los empaques y envases de materiales no biodegradables (S. Ahmad Qamar et al. 2020). Por lo tanto, es de interés el desarrollo de recubrimientos que ayuden al empaque de cartón a ralentizar su descomposición y mantener un ambiente adecuado para el producto empaquetado. En el presente texto se reporta la síntesis del compuesto hidrofóbico de $\text{SiO}_2\text{@TiO}_2$ empleando el método sol-gel asistido por ultrasonido para su aplicación sobre cartón como recubrimiento. Las muestras de cartón recubiertas con $\text{SiO}_2\text{@TiO}_2$ se evaluaron con mediciones de ángulo de contacto con el fin de determinar sus propiedades hidrofóbicas.

Palabras clave: cartón, sol-gel, ultrasonido, $\text{SiO}_2\text{@TiO}_2$, hidrofobicidad.

Summary.

In the industrial packaging sector, the use of paperboard is widespread due to its low cost, abundance and mechanical flexibility (Ministerio de

Comercio Exterior y Turismo, 2009). However, certain properties of this material such as its high permeability, porosity, thermal degradability and non-uniform chemical surface favor its decomposition under high humidity conditions (B. Balu et al. 2008). This makes paperboard a perishable material, with a shorter shelf life compared to packaging made of non-biodegradable materials (S. Ahmad Qamar et al. 2020). Therefore, it is of interest to develop coatings that help carton packaging to slow down its decomposition and maintain a suitable environment for the packaged product.

In the present text we report the synthesis of hydrophobic $\text{SiO}_2\text{@TiO}_2$ composite using the ultrasound-assisted sol-gel method for its application on cardboard as a coating. The $\text{SiO}_2\text{@TiO}_2$ coated paperboard samples were evaluated with contact angle measurements in order to determine their hydrophobic properties.

Key words: paperboard, sol-gel, ultrasound, $\text{SiO}_2\text{@TiO}_2$, hydrophobicity.

Introducción.

El cartón es un material que por su facilidad y bajo costo de producción se ha mantenido presente en la vida cotidiana. El sector que más emplea el cartón es el de envases y embalajes (Ministerio de Comercio Exterior y Turismo, 2009). No obstante, su aplicación se ve limitada cuando se trata del transporte de productos que son sensibles a la humedad y agentes microbiológicos, como es el caso de la mayoría de los alimentos.

En orden de extender la vida útil del cartón usado para la fabricación de empaques y embalajes, como el caso del tetra pak, se han desarrollado diversas películas plásticas como el polietileno y metálicas como el foil de aluminio (D. Vidales Giovannetti 2015). No obstante, por su corto tiempo de vida útil de la mayoría de estos envases, su alto consumo se relaciona directamente con un aumento en la generación de desechos que pese a las políticas de reciclaje terminan en rellenos sanitarios. La descomposición de envases como el tetra pak generan gases contaminantes, producto de la descomposición del polietileno en metano y etileno (Y. Ma 2018). Por lo tanto, se considera de interés el desarrollo de recubrimientos/películas que puedan ser una alternativa al uso de materiales como los empleados en envases tetra pak.

En la literatura es posible encontrar tratamientos cerámicos y poliméricos para el papel que le otorgan una superficie hidrofóbica o autolimpiable (H. Oghara et al. 2012; S. Li et al. 2008). Para que un material exhiba esta propiedad, debe tener una rugosidad en la que exista poca área de contacto entre la superficie y un líquido depositado sobre esta (S. G. Croll 2020). Este sistema se le denomina de mojado parcial o estado de Cassie-Baxter y es propio de las superficies hidrofóbicas (A. B. D. Cassie et al. 1944). En este sistema, una fase líquida se deposita sobre una fase sólida con alta rugosidad. Entre la fase sólida y la fase líquida queda atrapada una fase gaseosa debido a que la tensión superficial del líquido no le permite deformarse para alcanzar a filtrarse entre las rugosidades. Los líquidos sobre estas superficies suelen exhibir ángulos de contacto de entre 80° y 110° como se muestra en la **Fig. 1** (D.

M. Spori 2010).

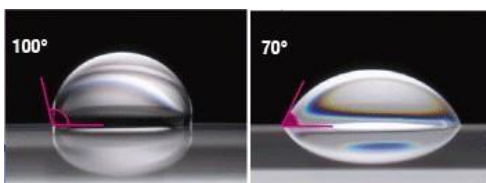


Fig. 1 Un ángulo de contacto superior a 80° es característico de los sistemas de mojado parcial.

Objetivos.

Sintetizar mediante el método de sol-gel asistido por ultrasonido un compuesto de $\text{SiO}_2@TiO_2$ para aplicarlo como recubrimiento de cartón.

Evaluar sus propiedades hidrofóbicas con mediciones del ángulo de contacto y determinar si el tiempo de exposición al baño de ultrasonido tiene efecto en esta propiedad.

Metodología.

El compuesto se sintetizó mediante la técnica de sol-gel asistido por baño ultrasónico. El recubrimiento se obtiene a partir de la mezcla de dos soles de SiO_2 y TiO_2 por ultrasonido. Los reactivos y precursores para la síntesis del compuesto $\text{SiO}_2@TiO_2$ son tetraetilo ortosilicato (TEOS, Sigma Aldrich 98%), isopropóxido de titanio IV (TTIP, Sigma Aldrich 97%), alcohol etílico (EtOH, JT Baker 98%), ácido oxálico dihidratado (JT Baker), polidimetilsiloxano (PDMS, Sigma Aldrich, 2550-3570 cSt), alcohol isopropílico (IP-OH, 98 % laboratorio) y agua

destilada. En la **Tabla 1** se presentan las relaciones molares de cada uno de los reactivos.

Tabla 1. Relación molar de los reactivos empleados para la síntesis del compuesto $\text{SiO}_2@TiO_2$.

Reactivo	Relación molar
Tetraetilo ortosilicato (TEOS)	1
Agua destilada	5.5
Alcohol etílico (Et-OH)	5.6
Ácido oxálico (AcOx)	0.05
Polidimetilsiloxano (PDMS)	0.15
Alcohol isopropílico (IP-OH)	0.05
Isopropóxido de titanio IV (TTIP)	0.05

Síntesis del compuesto $\text{SiO}_2@TiO_2$.

Para la síntesis del sol de SiO_2 se inicia con la preparación de una solución de agua destilada, alcohol etílico y ácido oxálico en un baño ultrasónico durante 15 minutos. Posteriormente, se añade el PDMS por goteo manteniendo las condiciones de ultrasonido. Después de 3 minutos se añade el TEOS a la solución por goteo.

Paralelo a la preparación del sol de SiO_2 , se lleva a cabo la síntesis del sol de TiO_2 . Se inicia poniendo el alcohol isopropílico en agitación magnética bajo atmósfera inerte (nitrógeno) durante 5 minutos. Posteriormente se añade el TTIP por goteo y se mantiene en agitación durante 10 minutos.

Una vez terminado el procedimiento para la síntesis de cada uno de los soles, se mezclan añadiendo el sol de TiO_2 al sol de SiO_2 y conservando las condiciones de ultrasonido. Se mantuvieron en baño ultrasónico durante 30 minutos “S₃₀” y 40 minutos “S₄₀”.

Ambos recubrimientos se aplican en la superficie de muestras de vidrio y de cartón. La técnica de aplicación en vidrio fue dispersión manual sobre portamuestras de vidrio. Previo a aplicar el recubrimiento se limpia la superficie para retirar cualquier partícula de suciedad que afecte la uniformidad del recubrimiento. Posteriormente, el recubrimiento se dejó secar a condiciones estándar. Para aplicar el recubrimiento en cartón, se utilizaron 3 diferentes tipos de muestras: a) cartón manila, b)

cartón couché blanco y c) cartón corrugado. La aplicación del recubrimiento se realiza calentando las muestras de cartón en una plancha eléctrica. La temperatura de aplicación del recubrimiento a cada muestra de cartón fue 115 °C. Una vez alcanzada la temperatura estable, el composito se dispersa por la superficie de manera mecánica utilizando una brocha suave. La aplicación se realizó de forma homogénea sobre la muestra dos veces.

Medición del ángulo de contacto.

Para evaluar la hidrofobicidad del recubrimiento, se realiza la medición de ángulo de contacto estático en las muestras de vidrio y cartón.

Se deposita una gota de agua empleando un dosificador sobre la superficie de las muestras. Las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ®.

Resultados.

La modificación de la superficie de las muestras de vidrio y cartón con el composito de SiO₂@TiO₂ generó que estas muestras exhibieran un carácter hidrofóbico como se muestra en la **Fig. 2**.



Fig. 2 Fotografía tomada para la medición de ángulo de contacto en a) vidrio y b) cartón.

El ángulo de contacto estático de las muestras de vidrio y cartón con los compositos S₃₀ y S₄₀ se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Ángulos de contacto de las muestras de vidrio y cartón a las que se les aplicó los recubrimientos S₃₀ y S₄₀.

Muestra	Recubrimiento	Ángulo de contacto (°)
Vidrio	S ₃₀	93.7
Vidrio	S ₄₀	96.4
Cartón manila	S ₃₀	111.1

Cartón couché	S ₃₀	111.8
Cartón corrugado	S ₃₀	111.8

En la **Fig. 3** se muestran los ángulos de contacto obtenidos para cada una de las muestras.

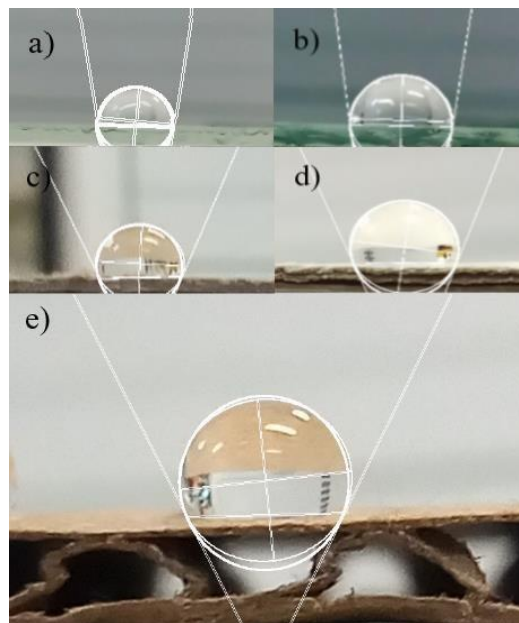


Fig. 3 Ángulos de contacto de las muestras de a) portamuestras con S₃₀, b) portamuestras con S₄₀, c) cartón manila, d) cartón couché y e) cartón corrugado.

Discusión y conclusiones.

Los resultados obtenidos del ángulo de contacto de las muestras de vidrio y cartón indican el carácter hidrofóbico del composito SiO₂@TiO₂. El ángulo de contacto de los portamuestra de vidrio recubiertos con S₃₀ y S₄₀ indican que el aumento en el tiempo de baño ultrasónico del composito incrementa la hidrofobicidad del recubrimiento de 93.7° a 96.4°.

El ángulo de contacto estático en las muestras de cartón incremento con valores de entre 111.1°-111.8° lo que se atribuye a la topografía superficial del cartón, siendo más irregular que la del vidrio. Por lo que se da una conjunción entre la arquitectura de las fibras de celulosa del cartón, y la microestructura del recubrimiento, aumentando la rugosidad de la superficie.

En la **Fig. 4** se observan las muestras de los tres diferentes tipos de cartón con el recubrimiento de SiO₂@TiO₂.

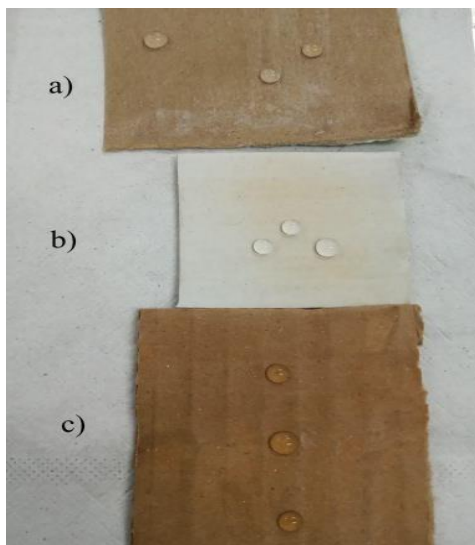


Fig. 4 Muestras de cartón a) manila, b) couché blanco y c) corrugado con el recubrimiento aplicado.

El recubrimiento fue efectivo al ser utilizado como barrera contra la humedad. Los resultados obtenidos demuestran como el recubrimiento tiene una mejor aplicación en el cartón tipo couché blanco (0.8 mm) y corrugado (2.7 mm de grosor). Esto se atribuyó a la diferencia en el grosor de cada muestra y cómo afecta esto la conducción del calor hasta la superficie. El efecto de la temperatura fue más notable en el cartón manila, el cual tuvo un recubrimiento poco homogéneo en su topografía, causado por la velocidad de secado del composito. El grosor de 0.5 mm facilita la conducción de calor hasta la superficie afectando la velocidad de secado y por lo tanto la dispersión del composito $\text{SiO}_2@ \text{TiO}_2$ en la superficie de la muestra. Por ende, se debe considerar una temperatura ideal de aplicación con base en el grosor de la muestra a la que se aplicará el recubrimiento con el fin tanto de mejorar la dispersión del recubrimiento como de no afectar el ángulo de contacto estático (y con ello las

propiedades hidrofóbicas del recubrimiento).

Agradecimientos.

Universidad Autónoma de Querétaro por darme la oportunidad de participar en el programa Verano de la Ciencia.

Bibliografía.

B. D. Cassie, y S. Baxter, “Wettability of porous surfaces”, *Transactions of the Faraday Society*, núm. 40, pp.

546-551, 1944. Disponible en:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1944/TF/TF9444000546> [consultado en 2021]

Balu, V. Breedveld, y D.W. Hess, “Fabrication of ‘Roll-off’ and ‘Sticky’ Superhydrophobic Cellulose Surfaces via Plasma Processing”, *Langmuir*, vol. 24, núm. 9, pp. 4785- 4790, 2008.

Disponible en

<https://doi.org/10.1021/la703766c> [consultado en 2021]

D. M. Spori, “Structural influences on self-cleaning surfaces,” ETH Zurich, Zurich, 2010. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/299469157_Structural_Influences_on_Self-cleaning_Surfaces [consultado en 2021]

ctural_Influences_on_Self-cleaning_Surfaces [consultado en 2021]

D. Vidales Giovannetti, “El mundo del envase: manual para el diseño y producción de envases y embalajes”, 2015. Disponible en:

<https://vdocuments.mx/dolores-vidales-giovannetti-el-mundo-del-envase.html> [consultado en 2021]

H. Ogihara, J. Xie, J. Okagaki,; y T. Saji, “Simple Method for Preparing

Superhydrophobic Paper: Spray Deposited Hydrophobic Silica Nanoparticle Coatings Exhibit High Water-Repellency and Transparency”, *Langmuir*, vol. 28, núm. 10, pp. 4605-4608, 2012. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la204492q> [consultado en 2021]

Ministerio de Comercio Exterior y Turismo de Perú, “Guía de envases y embalajes”, 2009. [consultado en 2021]

S. Ahmad Qamar, M. Asgher, M. Bilal, & H. M. N. Iqbal, “Bio-based active food packaging materials: Sustainable alternative to conventional petrochemical-based packaging materials”, *Food Research International*, 109625, 2020. Disponible en: [doi:10.1016/j.foodres.2020.109625](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109625) [consultado en 2021]

S. G. Croll, “Surface roughness profile and its effect on coating adhesion and corrosion protection: A review. *Progress in Organic Coatings*”, 148, 105847, 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.105847> [consultado en 2021]

S. Li, S. Zhang, y X Wang, “Fabrication of Superhydrophobic Cellulose-Based Materials through a Solution-Immersion Process”, *Langmuir*, vol. 24, núm. 10, pp. 5585-5590, 2008. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la800157t> [consultado en 2021]

Y. Ma, “Changing Tetra Pak: from waste to resource”, *Science Progress*, 101(2), 161–170, 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.3184/003685018X15215434299329> [consultado en 2021]

Evaluación de procesos germinativos

Martínez Barras Alexis¹, Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez².

¹ Estudiante de Ingeniería en nanotecnología, Facultad de ingeniería, UAQ. Cerro de las campanas, C.P. 76010, Santiago de Querétaro, Qro. México; amartinez241@alumnos.uaq.mx

²Anfitrión del programa Verano de la ciencia.

Resumen

Este ensayo tuvo como propósito estandarizar el proceso germinativo de las especies *Medicago sativa L.* y *Amarathus retroflexus ssp.*, con el objetivo de encontrar las condiciones no controladas como temperatura y humedad, en las que dichos especímenes germinarían mejor. Dicho ensayo se realizó para estudiar el desarrollo de los germinados y cómo distintos parámetros pueden afectar el proceso de emergencia. De esta manera se pretende poder aplicar en futuros experimentos, distintos tratamientos sobre el proceso germinativo con el propósito de evaluar los efectos sobre esta primera etapa de crecimiento. Este experimento se llevó a cabo según la metodología de "papel húmedo". Las semillas fueron lavadas con una solución al 1% de hipoclorito de sodio comercial por cinco minutos y enjuagadas posteriormente con agua destilada varias veces previo a cada siembra, con la finalidad de evitar contaminación por hongos, finalmente

fueron sembradas en charolas y cajas de Petri. Los resultados para las semillas de Alfalfa fueron buenos, obteniendo germinados de 7 centímetros, mientras que para el amaranto fueron de 8 cm en promedio, sin embargo, debido a las condiciones ambientales no controladas, esta especie tendió a contaminarse con hongos.

Palabras clave: Germinación, Alfalfa, Amaranto

Abstract

The purpose of this trial was to standardize the germination process of *Medicago sativa L.* and *Amarathus retroflexus ssp.* with the aim of finding the uncontrolled conditions, such as temperature and humidity in which these specimens would germinate better. This trial was carried out to study the development of the germinated specimens and how different parameters can affect the emergence process. In this way, it is intended to be able to apply, in future experiments, different treatments on the germination process in order to evaluate the effects on this first stage of growth. This experiment was carried out according to the "paper towel" methodology. The seeds were washed with a 1% solution of commercial sodium hypochlorite for five minutes and then rinsed with distilled water several times before each sowing, in order to avoid contamination by fungi and finally they were sown in trays and Petri dishes. The results for alfalfa seeds were good, obtaining sprouts of 7 centimeters, while for amaranth they were 8 cm on average, however, due to uncontrolled environmental conditions, this species tended to be contaminated with fungi.

Keywords: Germination, Alfalfa, Amaranth

Introducción

La semilla es la unidad reproductiva sexual de las plantas teniendo la función de perpetuar y multiplicar a la especie, resultando en un mecanismo sumamente eficaz para que esta se disperse en tiempo y espacio. Constituye el mecanismo de perennización por el que las plantas perduran por generaciones y son el punto de partida para la producción de cultivos alimenticios. Por lo tanto, resulta indispensable que tengan una buena respuesta en las condiciones de siembra y que produzca plántulas vigorosas con un buen rendimiento.

Para que la semilla cumpla con el objetivo de reproducirse y perpetuarse, es imperativo que el embrión se transforme en una plántula capaz de valerse por sí misma a través de distintos mecanismos metabólicos y morfogénicos, conocidos como proceso de germinación. Este proceso se puede dividir en tres fases principales:

- I) El primero de estos se refiere a una etapa en la que la semilla absorbe una cantidad de agua importante, con la cual se inicia el proceso de hinchamiento y en consecuencia se pone en marcha el mecanismo de emergencia. Este es llamado imbibición.
- II) El segundo, incluye los procesos de activación del metabolismo y el de respiración, síntesis de proteínas y movilización de sustancias de reserva presentes en el endospermo, el cual funge como una reserva de carbohidratos, aceites y proteínas.
- III) Finalmente tiene lugar la elongación del embrión y

ruptura de la testa a través de la cual se observa la salida de la radícula.

El ensayo de germinación, es una prueba realizada en laboratorio; la cual, consiste en colocar semillas en un sustrato húmedo, en condiciones controladas de temperatura, humedad y luz para que germinen y alcancen un nivel de desarrollo. De esta manera, se puede evaluar las estructuras esenciales de la planta, y determinar si son aptas para continuar con su crecimiento normal. El resultado del análisis es reportado en porcentaje, independientemente de la cantidad de semillas que se utilizó para realizar la prueba. Este porcentaje indica la cantidad de plántulas que cuenta con las estructuras esenciales para continuar su crecimiento en condiciones favorables, a lo que se le llama: plántulas normales. Los beneficios para el agricultor al saber el porcentaje de germinación de su semilla son enormes; ya que, puede determinar la cantidad de semillas que debe o necesita sembrar en su superficie. De tal manera, se establece un cultivo óptimo y, por ende, mejores resultados en la producción.

Actualmente la agricultura exige que las semillas presenten buena calidad lo cual se traduce principalmente en que sea un buen insumo con atributos como la calidad genética, fisiología, rasgos físicos y sanidad. Por ejemplo, en México el cultivo de la alfalfa (*Medicago sativa* L.) se emplea para la alimentación del ganado bovino.

Objetivos

Estandarizar experimentalmente el proceso de germinación del amaranto y alfalfa a partir de condiciones no controladas de temperatura y humedad.

Metodología

Materiales

Las semillas de alfalfa y amaranto fueron adquiridas en “La semillería” ubicada en el municipio de corregidora, Col. Los Ángeles. Carretera Celaya-Querétaro KM114.

El ensayo de germinación se realizó mediante la técnica de “papel húmedo” con las especies *Amarathus retroflexus ssp.* y *Medicago sativa L.*

Antes de comenzar el ensayo, las semillas fueron lavadas con una solución al 1% de hipoclorito de sodio comercial por cinco minutos y enjuagadas posteriormente con agua destilada varias veces. Enseguida, se colocaron sobre sanitas para eliminar el excedente de humedad. Finalmente, las semillas fueron sembradas comparando dos métodos de germinación. En un primer ensayo usando charolas, las semillas fueron dispuestas sobre papel filtro previamente humedecido con agua destilada, colocando filas de 8 x 12 e introduciendo estas charolas en bolsas transparentes para evitar la pérdida de humedad, haciendo 2 repeticiones por especie, como en Fig.1. En un segundo ensayo se utilizaron cajas Petri de 100 x 15 mm para evaluar la germinación en condiciones ligeramente más controladas. En este caso las semillas fueron depositadas entre papel filtro previamente humedecido y sellando las cajas con Parafilm para evitar la fuga de humedad y contaminación de los germinados, Fig.2. Se tomaron mediciones de temperatura y humedad a diario en condiciones no controladas con ayuda de un sensor de humedad y temperatura modelo TER-150 de la marca Steren.

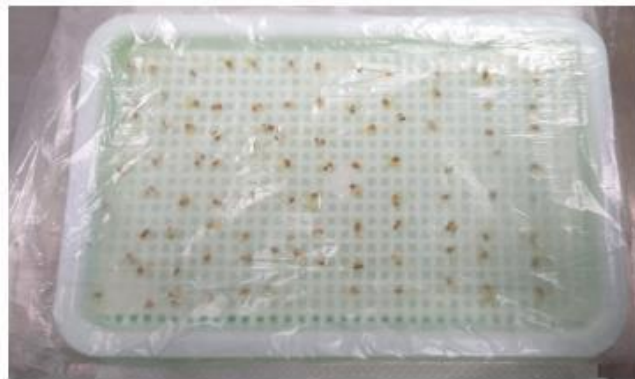


Fig 1. Semillas en charolas.



Fig 2. Semillas en cajas de Petri.

En ambas especies, se probaron dos tipos de riego con distintas cantidades de agua y periodicidad de riego. Se probó con 2, 3 y 4 ml de agua destilada y riego por aspersion.

Resultados

El ensayo realizado sobre bandejas, probó ser poco eficaz, debido a que las semillas seguido entraban en un periodo de letargo derivado de un estrés generado por la ausencia de humedad. Ambas especies comenzaban creciendo de manera óptima, no obstante, después de 3 días, el crecimiento se detenía a causa de la falta de humedad en el papel.

Aun cuando la cantidad de agua fuese muy elevada, las semillas tendían a estresarse y

retardar el crecimiento. La solución propuesta a este problema fue hacer uso de bolsas plásticas con la intención de contener un poco más la humedad en las bandejas; sin embargo, esta medida no aportó suficiente humedad a las semillas las cuales continuaron secándose. En una primera etapa, los germinados comenzaron con riegos diarios humedeciendo el papel mediante aspersión. Esto provocó que las semillas tuvieran un crecimiento lento pero constante hasta el día 3 o 4, posterior a este momento ambas especies entraron en fase de letargo o en ocasiones deteniendo su crecimiento por completo.

En el segundo ensayo, el uso de cajas de Petri selladas con Parafilm probó tener un grado de eficacia mucho mayor para la alfalfa.

Los germinados de alfalfa presentaron un comportamiento más resistente en cuanto a la cantidad de agua, la temperatura y humedad, ya que, aunque a través de los días estas condiciones variaron ampliamente, no se tuvo un gran impacto en la calidad, tamaño y vigor de las plántulas. Después de un periodo de 7 días los germinados de alfalfa estaban completamente desarrollados.

En el caso del amaranto, la falta de condiciones controladas propició la aparición de hongos en el papel filtro. Inicialmente las semillas comenzaron a tener un buen comportamiento de crecimiento, no obstante, a partir del cuarto día de germinación las cajas comenzaron a presentar signos de contaminación, Fig 3.

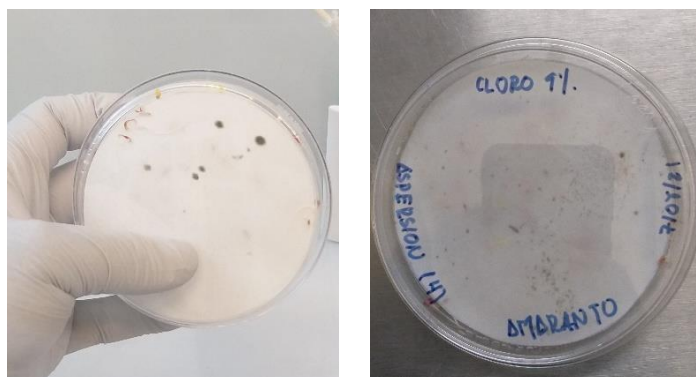


Fig 3 y 4. Contaminación de hongos en semillas de Amaranto.

El riego con cantidades fijas de agua sobre los germinados de amaranto y alfalfa, arrojó resultados distintos. Para la alfalfa en cajas con 2 y 3 mL de agua destilada, el crecimiento fue normal hasta el cuarto día y para la caja con 4 mL fue normal hasta el tercer día. Una vez terminada la germinación, las plántulas presentaron buen tamaño, radículas bien desarrolladas y color intenso en las hojas verdaderas. El amaranto continuó contaminándose sin importar la cantidad de agua, del sellado de la caja y del porcentaje de hipoclorito empleado, Fig 4. No obstante, se generaban germinados de buen tamaño, color y con hojas verdaderas visiblemente saludables.

Para realizar un seguimiento de crecimiento diario para ambas especies se siguió la metodología de sincronizado a 1 día; sembrando a diario una repetición y registrando las condiciones de temperatura y humedad.



Fig 5. Etapas de crecimiento.

En un inicio, los germinados de ambas especies presentaron distintos tiempos de brote de hipocótilo y desarrollo de cotiledones. A la alfalfa le tomó menos tiempo alcanzar un desarrollo completo, normalmente en los días 5 y 6 los germinados estaban visiblemente desarrollados con un tamaño que oscilaba entre los 6 y 8 cm de longitud, las hojas verdaderas tenían un color verde intenso y la radícula poseía un color blanco brillante, Fig 5. El amaranto poseía un brote mucho más largo, llegando a medir en promedio 11 cm, con un color blanco un poco más opaco, pelillos más desarrollados, visiblemente más largos y en mayor cantidad que en el caso de la alfalfa; las hojas verdaderas comenzaban con un color violeta y conforme la plántula se desarrollaba adquirían un color más verdoso, Fig 6.

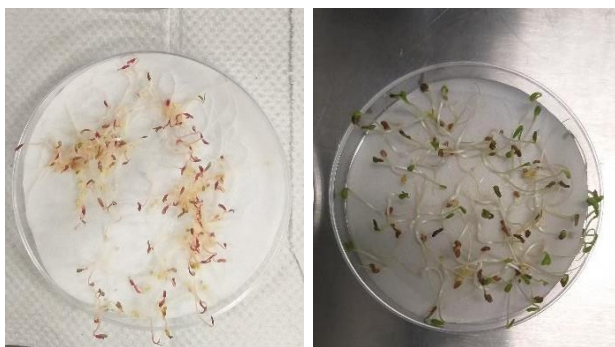


Fig 6. Germinados de Amaranto y Alfalfa.

Estas características fueron analizadas con una cámara modelo A3503S integrada a un microscopio de marca OMAX.

Discusión y conclusiones

El previo lavado de semillas con la solución de hipoclorito de sodio comercial, resultó ser efectiva con la alfalfa, sin embargo, para el amaranto no evitó que el cultivo se contaminara con hongos.

Una mayor contaminación en los cultivos de amaranto que en los de alfalfa se puede atribuir a la gran cantidad de azúcares y carbohidratos presentes en el endospermo de la semilla, esto aunado a condiciones no controladas de humedad y temperatura pudieran propiciar un ambiente adecuado para la aparición de hongos. No obstante, es importante señalar que la contaminación de los cultivos, no afectaba significativamente el crecimiento de los germinados, pero sí tenía un impacto en el tiempo que era posible mantener las repeticiones hasta completar el ciclo de crecimiento. Se consideraron germinados, a aquellos brotes con las primeras dos hojas verdaderas.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro por permitirme el acceso al laboratorio de metabolitos y nanocompositos, a la doctora Ana Angélica Feregrino Pérez, por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación, por su guía y apoyo en la redacción de este reporte y experimentos, así como facilitar los recursos necesarios para realizar los ensayos necesarios.

Referencias

Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales*, 31(1), 00-00.

Castañares, J. L. (2010). El priming de semillas y sus aplicaciones en cultivos hortícolas.

Cedeño Duplaá, M. J. y Palma Vera, J. D. (2016). *Determinación de la concentración óptima de humedad para la germinación en semillas de guayacán rosado (Tabebuia rosea bertol a. Dc.)* (Bachelor's thesis, Calceta: Espam).

Shinde, S., Paralikar, P., Ingle, A. P. y Rai, M. (2020). Promotion of seed germination and seedling growth of Zea mays by magnesium hydroxide nanoparticles synthesized by the filtrate from *Aspergillus niger*. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 3172-3182.

NOELTING, Maria C.; SANDOVAL, Maria C. y ABBIATI, Nilda N..Determinación de microorganismos fúngicos en semillas de Amaranto (*Amaranthus spp.*) mediante diferentes métodos de análisis. *Rev. peru biol.* [online]. 2004, vol.11, n.2, pp.169-178. ISSN 1727-9933.

Lopez, J., Torres, N., Saldivar, R., Reyes, I. y Argüello, B. (2016). Técnicas para evaluar germinación, vigor y calidad fisiológica de semillas sometidas a dosis de nanopartículas. *Centro de Investigación En Iquímica Aplicada (CIBQ)*, 129-140.

Efectos del cortisol en la reacción acrosomal del espermatozoide

Investigadores

M. en C. Sheini Ruturi Sánchez González.¹

Doctorado en Ciencias en Biomedicina.
sheiniruturi_006@hotmail.com

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie.¹

Laboratorio de Fisiología Celular y Molecular. Departamento de Investigación Biomédica. anatusie@gmail.com

Alumno

Méndez Guerrero Ailed Cecilia.²

Licenciatura en Ingeniería Biomédica.
amendez30@alumnos.uaq.mx

1. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro. Col. Prados de la Capilla, Querétaro, Santiago de Querétaro, Querétaro. C.P 76170; México.
2. Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro. Centro Universitario, Cerro de las Campanas, Santiago de Querétaro, Querétaro. C.P 76010; México.

Resumen

Los espermatozoides sufren una serie de cambios bioquímicos en el tracto genital femenino donde adquieren la capacidad de fecundar, este proceso se denomina capacitación y permite que los espermatozoides se sometan a la reacción acrosomal (RA), un proceso exocitótico que lleva a la exposición de la membrana acrosomal interna y permite la fecundación. En el tracto genital femenino, los espermatozoides están expuestos a hormonas esteroideas, entre ellas el cortisol. Debido a altos niveles de estrés, las concentraciones de esta hormona pueden llegar a ser elevadas e interferir

con las funciones y procesos del espermatozoide. CatSper es un canal de Ca^{2+} específico de los espermatozoides situado en el flagelo, esencial para su motilidad hiperactivada y fertilidad. En humanos, CatSper es activado por progesterona y está involucrado en procesos como la RA. Sin embargo, se desconocen los efectos de otras hormonas esteroideas en este canal. El objetivo del presente estudio fue analizar los efectos de diferentes concentraciones de hidrocortisona (HC) en la RA de espermatozoides humanos. Para lo cual se utilizó la técnica Azul de Coomassie. Los resultados mostraron que a bajas concentraciones de HC se presenta mayor porcentaje de RA espontánea, sin embargo, a partir de 10 μM este porcentaje disminuye. Además, se observó que al incubar la muestra con HC y progesterona hay una disminución de RA inducida comparando con el grupo de control.

Palabras clave: Hidrocortisona, capacitación espermática, reacción acrosomal, progesterona, CatSper.

Abstract

Sperm undergo a series of biochemical changes in the female genital tract where they acquire the ability to fertilize, this process is called capacitation and allows the sperm to undergo the acrosome reaction (AR), an exocytotic process that leads to the exposure of the inner acrosomal membrane and allows fertilization. In the female genital tract, sperm are exposed to steroid hormones, including cortisol. Due to high levels of stress, concentrations of this hormone can become elevated and interfere with sperm functions and processes. CatSper is a sperm-specific Ca^{2+} channel located in the flagellum, essential for its hyperactivated motility and fertility. In humans, CatSper is activated by

progesterone and is involved in processes such as AR. However, the effects of other steroid hormones on this channel are unknown. The objective of the present study was to analyze the effects of different concentrations of hydrocortisone (HC) on the acrosome reaction of human spermatozoa. For this purpose, the Coomassie Blue technique was used. The results showed that at low concentrations of HC there is a higher percentage of spontaneous AR, but from 10 μ M onwards this percentage decreases. In addition, it was observed that when the sample was incubated with HC and progesterone, there was a decrease in induced AR compared to the control group.

Keywords: Hydrocortisone, sperm capacitation, acrosome reaction, progesterone, CatSper.

Introducción

Durante el tránsito por el tracto genital femenino, los espermatozoides experimentan una serie de eventos bioquímicos y moleculares consecutivos, conocidos como capacitación, que les permite adquirir la capacidad de fecundar el gameto femenino. Este proceso se caracteriza por una disminución de la rigidez de la membrana plasmática asociada a la remoción de colesterol, una redistribución del contenido de fosfolípidos de la membrana, una hiperpolarización de la membrana plasmática y cambios del contenido iónico y metabólico intracelular. La capacitación *in vitro* puede lograrse mediante incubación de los espermatozoides en un medio que imita los fluidos del tracto genital femenino que regularmente contienen albúmina sérica, Ca^{2+} , HCO_3^- y otros componentes que aportan energía a

las células y una presión osmótica adecuada (López-Torres & Chirinos, 2016).

Los cambios de capacitación preparan a las células para sufrir la RA, un evento excitotóxico que permite la liberación de proteasas localizadas en la cabeza de los espermatozoides que contribuyen a la penetración de las capas externas del ovocito, un proceso que puede ser estimulado por la progesterona y/o las proteínas de la zona pelúcida (Saldívar-Hernández et al., 2015). La RA es un proceso especializado de fusión de la membrana citoplasmática con la membrana acrosomal externa en la zona apical de la cabeza espermática originando la liberación de las enzimas almacenadas en el acrosoma y la exposición de la membrana acrosomal interna (Cardona-Maya & Cadavid, 2005).

La RA es necesaria para que los espermatozoides puedan atravesar la zona pelúcida, se fusionen con el ovocito y lo penetren. La progesterona, secretada por las células del cúmulo, es un cofactor importante para que se produzca este evento de excitosis (Patrat et al., 2000). Se ha demostrado que concentraciones micromolares de progesterona inducen la RA y se ha indicado que esta hormona es la molécula que media, a concentraciones sub-nanomolares, la quimiotaxis espermática en la proximidad del ovocito (Tamburrino et al., 2014). La RA también da lugar a la modificación de algunas proteínas de la membrana plasmática en el segmento ecuatorial acrosómico y a nivel post acrosómico.

En condiciones de altos niveles de estrés, pueden presentarse concentraciones elevadas de cortisol en el tracto genital femenino, lo cual alteraría el medio natural en el que los espermatozoides se capacitan y por lo tanto el porcentaje de

espermatozoides que presentan RA. El canal de calcio de los espermatozoides (CatSper) es esencial para la motilidad y la fertilidad espermática. Está situado en la pieza principal del espermatozoide (flagelo) (Lishko et al., 2011). El influjo de Ca^{2+} mediado por CatSper en el flagelo conduce a la elevación de Ca^{2+} incluso en la cabeza del espermatozoide (envoltura nuclear redundante) y, por tanto, puede contribuir a la RA dependiente de Ca^{2+} (Patrat et al., 2000).

CatSper está involucrado en la RA estimulada por progesterona. La hormona esteroidea progesterona activa el CatSper del espermatozoide humano a través de la unión a la serina hidrolasa ABHD2 perteneciente al subgrupo de las proteínas que contienen el pliegue α,β -hidrolasa, la cual está implicada en la propagación del virus, la respuesta inmunitaria y la fecundación (Mannowetz et al., 2017).

Las hormonas esteroideas controlan funciones fundamentales del organismo como el desarrollo, el metabolismo, la inflamación, la homeostasis iónica y la reproducción. Sin embargo, el papel preciso de CatSper en la RA no está claro y la especificidad esteroidea de ABHD2 no se ha evaluado. La HC como hormona esteroidea puede tener cierta afinidad al receptor de progesterona en el espermatozoide, lo que daría origen a una competencia de estas dos hormonas por unirse al receptor que se cree es dominio del CatSper, ABHD2. De interactuar con el receptor, la HC podría tener efectos en la inducción o inhibición de la RA en el espermatozoide.

Objetivos

Analizar el efecto de diferentes concentraciones de hidrocortisona sobre la reacción acrosomal del espermatozoide humano.

Metodología

Participantes y procesamiento de la muestra.

Se recolectaron muestras de semen de sujetos sanos de 18-45 años que presentaron de 2 a 7 días de abstinencia sexual y que aceptaran firmar la carta de consentimiento informado. De dichas muestras se realizó la evaluación de los parámetros de calidad del semen: macroscópicos (color, volumen, viscosidad y pH) y microscópicos (motilidad y concentración espermática). Para estos últimos, se colocaron 10 μl de la muestra original en un portaobjetos y en el microscopio a 40x, se realizó el conteo de 200 espermatozoides para determinar su tipo de motilidad: progresiva, no progresiva e inmotilidad. Posteriormente, mediante el conteo por campo y en cámara de Neubauer en el microscopio (40x), se calculó el número de espermatozoides en 1 ml así como en la totalidad de la muestra.

Evaluación morfológica.

Para determinar la morfología de los espermatozoides se realizó un frotis de la muestra original y una vez seco el portaobjetos se sumergió durante 15 s en metanol, 10 s en eosina y 5 s en hematoxilina. En la Fig. 1 se muestra la placa de morfología.

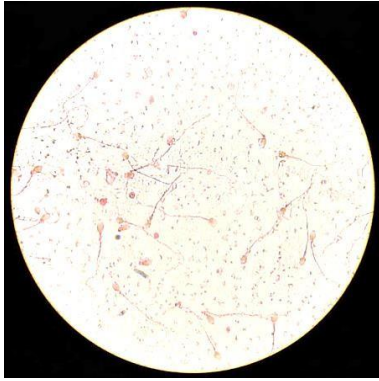


Figura 1. Placa para evaluación de morfología vista en el microscopio a 100x.

Separación mediante swim-up.

Para realizar el separado mediante swim-up, se colocó toda la muestra en un tubo falcon inclinado a 45°, y se agregó el mismo volumen (relación 1:1) de medio HAM's F-10 suplementado con BSA. Se incubó durante 1 hora para después separar la fase superior en un tubo nuevo.

Capacitación espermática.

Las muestras se llevaron a una concentración de 10^7 espermatozoides/ml. Para ello, se tomaron 10 μ l de la muestra post-swim para realizar conteo por campo en el microscopio (40x), dependiendo del número de espermatozoides se realizó su correspondiente dilución con fijativo para colocar 10 μ l de dicha dilución en la cámara de Neubauer. A partir del resultado del conteo se realizaron los cálculos para preparar una dilución con medio HAM's suplementado de la muestra post-swim para obtener la concentración de 10^7 espermatozoides por ml. Finalmente, la capacitación espermática se realizó incubando la muestra durante 3 horas a 37°C.

Inducción de RA y Azul de Coomassie.

Se repartió la muestra en 16 tubos eppendorf. Se agregó HC a 14 tubos en 7 diferentes concentraciones (0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 30 μ M, 100 μ M). Para inducir RA se añadió progesterona a la mitad de estos tubos. Además, se incluyeron un control negativo (DMSO) y uno positivo (progesterona). Se incubaron durante 30 minutos y se agregó metanol a cada tubo, para después centrifugar, eliminar sobrenadante y resuspender con PBS (phosphate buffer solution). Se colocaron 50 μ l de cada tubo en un portaobjetos y se extendió la muestra con un cubreobjetos. Los frotis se tiñeron con el colorante Azul de Coomassie durante 2 minutos y se dejaron secar.

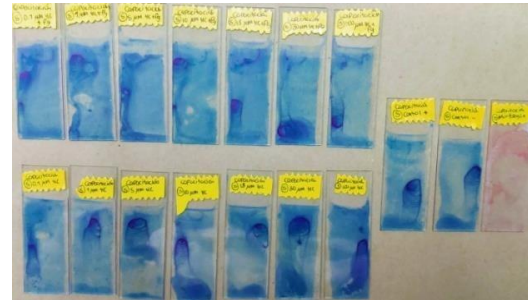


Figura 2. Se muestran las 16 placas de Azul de Coomassie, obtenidas tras procesar una muestra y placa de morfología (en color rosa).

Evaluación de RA.

Las placas se analizaron en el microscopio a 100x, realizando el conteo de 100 células espermáticas que se catalogaron como reaccionados y no reaccionados. Se consideraron como reaccionados aquellos que presentaron una coloración más tenue en la cabeza (Fig. 3) y como no reaccionados los que conservaron una coloración azul en toda la cabeza (Fig. 4).

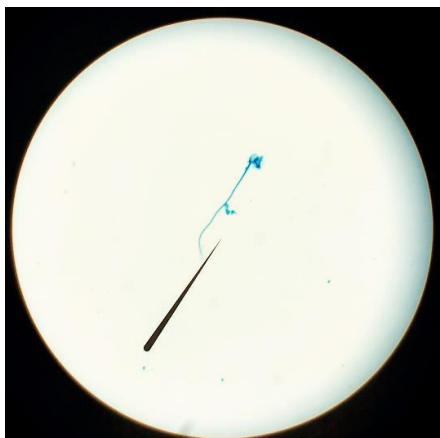


Figura 3. Espermatozoide reaccionado con la tinción Azul de Coomassie.

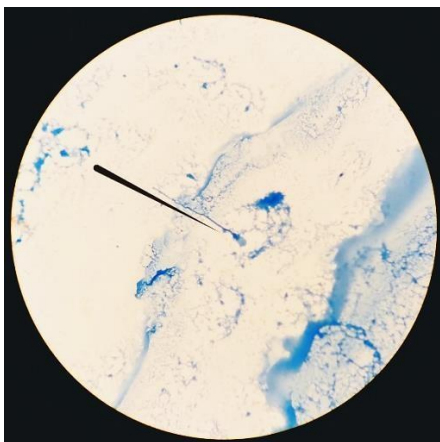


Figura 4. Espermatozoide no reaccionado con la tinción Azul de Coomassie.

Resultados

Los resultados de la evaluación de RA en las 7 muestras procesadas mediante la técnica de tinción con Azul de Coomassie se muestran en la Fig. 5, donde se puede observar la RA espontánea (sin progesterona) y la RA inducida (con progesterona), además de los controles positivos (progesterona) y negativos (DMSO).

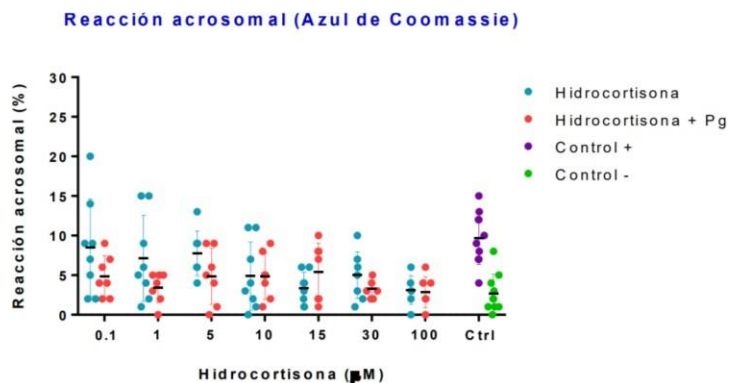


Figura 5. Comparación de los porcentajes de RA espontánea (azul) e inducida (rojo) a distintas concentraciones de HC.

Los resultados mostrados indican que la HC a bajas concentraciones induce RA, dichas concentraciones van desde 0.1 µM a 5 µM. Aunque a partir de 10 µM este porcentaje de RA se ve reducido.

Se observa que al incubar las muestras con HC y progesterona a la vez, la RA es menor independientemente de la dosis, si se compara con los controles positivos.

Discusión y conclusiones

La RA representa un paso fundamental para la fecundación. Altos niveles de cortisol en el tracto genital femenino alteran el curso natural de este proceso. A partir de los resultados obtenidos se puede observar que, al parecer, hay una competencia entre la HC y la progesterona por unirse a un mismo receptor.

Diversos autores han realizado estudios acerca de las corrientes generadas por CatSper, sin embargo, existe mucha controversia acerca de si la HC y la testosterona son agonistas o antagonistas de este canal.

Mannowetz et al. (2017) concluyeron que la HC antagoniza la acción de la activación de CatSper por progesterona. Sus resultados obtenidos mediante técnicas electrofisiológicas mostraron que la HC por sí sola no activa CatSper, pero reduce o impide la activación de CatSper por progesterona. Una posibilidad de este efecto podría ser que la HC se une con una mayor afinidad al ABHD2 que la progesterona, impidiendo así la activación del CatSper.

Los resultados anteriores coinciden con lo observado en este estudio, dado que al usar 1 μM de HC (misma concentración utilizada por Mannowetz) se presenta una disminución de la RA. Es decir, un efecto antagonista de la HC. Si esta hormona tiene un efecto antagonista sobre CatSper, la motilidad se vería afectada y provocaría que el espermatozoide no avance lo necesario, no experimente RA y por ende, no habría fecundación. Debido a esto, niveles elevados de HC en el organismo femenino desencadenarían problemas de infertilidad.

Brenker et al. (2018) emplearon un ensayo fluorimétrico de Ca^{2+} basado en la población de espermatozoides. Dicho estudio sostiene que la HC aumenta las corrientes generadas por CatSper y estimula el influjo de Ca^{2+} a través de este canal. Contrario a Mannowetz, postula que la HC, de hecho, es un agonista de CatSper. Los experimentos de desensibilización cruzada demuestran que todos estos esteroides utilizan el mismo sitio de unión para activar el CatSper.

Rehfeld (2020) apoya la idea de que la HC actúa de forma agonista sobre CatSper imitando así el efecto de la progesterona. Su estudio se basó principalmente en un ensayo fluorimétrico de Ca^{2+} basado en la población de espermatozoides.

El presente estudio mostró que la HC induce RA espontánea a bajas concentraciones y reduce la RA inducida con progesterona. Estos hallazgos contribuyen a conocer la interacción de las hormonas esteroideas presentes en el tracto genital femenino con los receptores del espermatozoide involucrados en el desencadenamiento de la RA. Dado que las hormonas tienen roles fundamentales en el organismo, comprender los efectos del estrés en las funciones reproductivas permite el desarrollo de estrategias que ofrezcan soluciones a las problemáticas presentes en el área de la salud y la reproducción.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a la Dra. Tusie por habernos recibido en el laboratorio, por todo su apoyo y toda su amabilidad a lo largo de este tiempo. Gracias por brindarnos esta oportunidad de aprendizaje en el área de las ciencias biomédicas.

De igual manera quiero agradecer de todo corazón a la M. en C. Sheini por todas sus enseñanzas, paciencia, tiempo, dedicación, y la convivencia dentro y fuera del laboratorio. Gracias por compartir su etapa final en el doctorado con todos nosotros.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, la Dirección de Investigación y Posgrado, y a la Facultad de Medicina que nos permitieron realizar esta estancia de verano.

Referencias bibliográficas

Brenker, C., Schiffer, C., Wagner, I. V., Tüttelmann, F., Röpke, A., Rennhack, A., Kaupp, U. B., & Strünker, T. (2018). Action of steroids and plant triterpenoids on CatSper Ca²⁺ channels in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(3), E344-E346. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717929115>

Cardona-Maya, W., & Cadavid, A. (2005). Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Actas Urológicas Españolas*, 29(7). <https://doi.org/10.4321/s0210-48062005000700007>

Lishko, P. V., Botchkina, I. L., & Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca²⁺ channel of human sperm. *Nature*, 471(7338), 387-391. <https://doi.org/10.1038/nature09767>

López-Torres, A. S., & Chirinos, M. (2016). Modulation of Human Sperm Capacitation by Progesterone, Estradiol, and Luteinizing Hormone. *Reproductive Sciences*, 24(2), 193-201. <https://doi.org/10.1177/1933719116641766>

Mannowetz, N., Miller, M. R., & Lishko, P. V. (2017). Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(22), 5743-5748. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700367114>

Patrat, C., Serres, C., & Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell*, 92(3-4), 255-266. [https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(00\)01072-8](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(00)01072-8)

Rehfeld, A. (2020). Revisiting the action of steroids and triterpenoids on the human sperm Ca²⁺ channel CatSper. *Molecular Human Reproduction*, 26(11), 816-824. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa062>

Saldívar-Hernández, A., González-González, M. E., Sánchez-Tusie, A., Maldonado-Rosas, I., López, P., Treviño, C. L., Larrea, F., & Chirinos, M. (2015). Human sperm degradation of zona

pellucida proteins contributes to fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0094-0>

Tamburrino, L., Marchiani, S., Minetti, F., Forti, G., Muratori, M., & Baldi, E. (2014). The CatSper calcium channel in human sperm: relation with motility and involvement in progesterone-induced acrosome reaction. *Human Reproduction*, 29(3), 418-428. <https://doi.org/10.1093/humrep/det454>

Evaluación de películas delgadas de TiO₂ en degradación fotoelectrocatalítica

Quillo Hernández Juan Carlos¹, M. en C. Luis Alejandro Martínez Chávez².

Resumen

Se evaluó la eficiencia de una película delgada de TiO₂ dopada con oro y con plata en forma de electrodo TiO₂-Au-Ag como electrocatalizador y fotoelectrocatalizador para la degradación de Rodamina B. Se realizó la decoloración del colorante en distintos intervalos de tiempo, los cuales demuestran cualitativamente un buen rendimiento del electrodo. Los análisis espectrofotométricos demuestran cuantitativamente que se obtiene un mayor rendimiento con la aplicación directa de radiación ultravioleta sobre el electrodo, esto se atribuye a las propiedades de los metales dopantes que en conjunto con la fase cristalina anatasa y la forma de película delgada del TiO₂, logran absorber la luz ultravioleta y aprovecharla para el proceso de degradación de compuestos orgánicos emergentes en efluentes acuosos; lo cual abre un inmenso campo en la investigación de semiconductores dopados en la aplicación de remoción de contaminantes orgánicos.

Palabras clave: Dióxido de titanio, electrocatalisis, fotoelectrocatalisis, degradación, compuestos orgánicos.

Summary

The efficiency of a thin film of TiO₂ doped with gold and silver in the form of a TiO₂-Au-Ag electrode was evaluated as an electrocatalyst and photoelectrocatalyst for the degradation of Rhodamine B. The colorant was decolorized at different time intervals, which qualitatively demonstrate good electrode performance. The spectrophotometric analyzes quantitatively show that a higher performance is obtained with the direct application of ultraviolet radiation to the electrode, this is attributed to the properties of doping metals that, together with the anatase crystalline phase and the thin film form of TiO₂, are able to absorb ultraviolet light and take advantage of it for the degradation process of emerging organic compounds in aqueous effluents; which opens an immense field in the investigation of doped semiconductors in the application of elimination of organic pollutants.

Keywords: Titanium dioxide, electrocatalysis, photoelectrocatalysis, degradation, organic compounds.

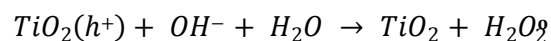
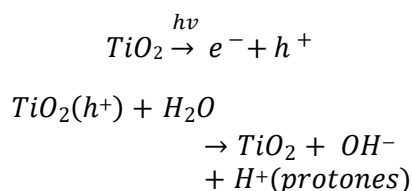
1.0 Introducción

La contaminación del agua es uno de los problemas ecológicos más preocupantes en la actualidad. Puesto que es un recurso imprescindible para la vida, la humanidad enfrenta un gran reto con las aguas residuales contaminadas con compuestos orgánicos. Los colorantes son un tipo de contaminante orgánico que están presentes en muchos residuos de industrias textiles, y a menudo suelen ser tóxicos y su tiempo de degradación en el medio ambiente es

extenso. Se estima que la industria textil se pierde una cantidad cercana al 15 % del tinte en procesos de teñido (Zulkarnain et al. 2005) el cual finalmente termina en aguas residuales.

La rodamina B es un colorante con mucha presencia en residuos de laboratorio, lo cual genera un problema por ser un compuesto orgánico muy estable que es difícil desechar, es un compuesto que se le acredita ser cancerígeno y es altamente riesgoso no degradarlo de manera correcta (Corzo et al. 2011). Los procesos avanzados de oxidación son capaces de degradar este y otros tipos de compuestos que son difíciles de degradar por métodos convencionales debido a la alta estabilidad química que estos presentan (Terán et al. 2016).

El dióxido de titanio (TiO₂) es un semiconductor que funciona como fotocatalizador cuando es dopado con partículas metálicas, este en su fase cristalina anatasa aprovecha la generación de pares electrón-hueco (Gárces et al. 2004), generando una reacción de alta energía que libera radicales (OH⁻) que provocan la degradación o mineralización de compuestos orgánicos de la siguiente manera:



Gracias a esta propiedad del dióxido de titanio es que se puede utilizar como fotocatalizador. Un fotocatalizador es capaz de acelerar una reacción fotoquímica (YanJun et al. 2011) y el TiO₂

se considera un buen fotocatalizador debido a su estabilidad, buen rendimiento, baja toxicidad y bajo costo (Mascolo et al. 2007); y se ha demostrado que tiene un buen rendimiento, pero se considera que tiene aún mayor rendimiento cuando se aplica en forma de electrodo empleando un voltaje positivo sobre este, a este proceso se le llama fotoelectrocatalisis (Terry et al. 2011) y es ampliamente utilizado en el dióxido de titanio para aumentar el aprovechamiento de la energía que generan los pares electrón-hueco en la reacción y realizar una degradación más eficiente (Zhang et al. 2017).

En el presente trabajo se evalúa la eficiencia de un semiconductor de TiO₂ dopado con oro y con plata para la degradación de una solución de Rodamina B. Se emplea el material en forma de película delgada para la creación de un electrodo y se realizan pruebas electrocatalíticas y fotoelectrocatalíticas.

2.0 Objetivos

Evaluar las propiedades fotoelectrocatalíticas de un semiconductor con base en TiO₂ en configuración de película delgada y relacionar los resultados con la información obtenida a través de la caracterización fisicoquímica de los materiales

3.0 Metodología

Se realizó una técnica combinada para el depósito de películas delgadas, combinando PLD y sputtering para crear la película delgada, produciendo la primera capa del material semiconductor de TiO₂,

que fue modificado posteriormente con oro (Au) y con plata (Ag) metálicos.

Sputtering

Se utilizó la técnica de magnetrón sputtering empleando un sustrato de vidrio con un recubrimiento conductor de óxido de indio y estaño (ITO), y un blanco de titanio con un alto grado de pureza para crear la película delgada de titanio depositada sobre el sustrato.

PLD

La modificación la película delgada de titanio se realizó con las partículas metálicas Au-Ag, y se llevó a cabo utilizando blancos de Ag y Au con alto un grado de pureza, depositándolos sobre el sustrato de titanio.

Posterior al depósito, las películas delgadas fueron sometidas a un tratamiento térmico (450 °C) en una mufla durante una hora para favorecer la estructura cristalina del material, dejando a las películas delgadas de TiO₂-Au-Ag en su fase anatasa.

Para las pruebas electrocatalíticas y fotoelectrocatalíticas se fabricó un electrodo con la película delgada creada anteriormente. La creación del electrodo consistió en unir un cable de cobre al recubrimiento de ITO empleando tinta de plata, excluyendo el contacto con la película delgada mediante resina epóxica **Figura 1**. Las pruebas consistieron en degradar un contaminante orgánico, utilizando como modelo una solución de Rodamina B a 25 ppm, 0.5 mM Na₂SO₄ y pH 1 a temperatura ambiente para generar el paso de corriente eléctrica en la solución y llevar a cabo la electrólisis.



Figura 1: Electrodo TiO₂-Au-Ag.

Las pruebas electrocatalíticas y fotoelectrocatalíticas se realizaron en una celda a base de teflón con un vidrio de cuarzo en medio para favorecer el paso de radiación ultravioleta hacia la película delgada. Se realizaron ambas pruebas utilizando un ánodo (electrodo de la película delgada) y un cátodo (electrodo de grafito) empleando una diferencia de potencial de 4.8 V en el ánodo. Con el motivo de que la degradación del colorante ocurriera enteramente por la actividad de la película delgada con el medio, se mantuvo a temperatura ambiente durante todas las degradaciones, en agitación constante y con una entrada de aire que funcionó como provisión de oxígeno en la solución para generar el proceso de oxidación como se muestra en la **Figura 2**. Las pruebas fotoelectrocatalíticas se realizaron de igual manera que las pruebas electrocatalíticas con la diferencia de que se agregó una lámpara de radiación ultravioleta a 5 cm de la celda.

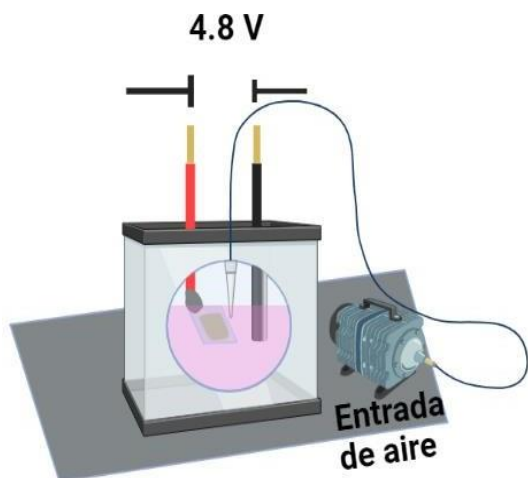


Figura 2: Diseño de sistema para pruebas electrocatalíticas.

Las pruebas de degradación, tanto electrocatalítica y fotoelectrocatalítica se realizaron en series de degradación por tiempos, en lapsos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos, tomando en cuenta la no degradación o 0 minutos como el blanco de la solución.

Posteriormente todas las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro, modelo Halo XB-10 utilizando celdas de cuarzo.

4.0 Resultados

Se puede observar cualitativamente una degradación en los resultados de ambas pruebas (**Figura 3** y **Figura 4**) para las soluciones de Rodamina B a 25 ppm, 0.5 mM Na₂SO₄ y pH 1 a temperatura ambiente.

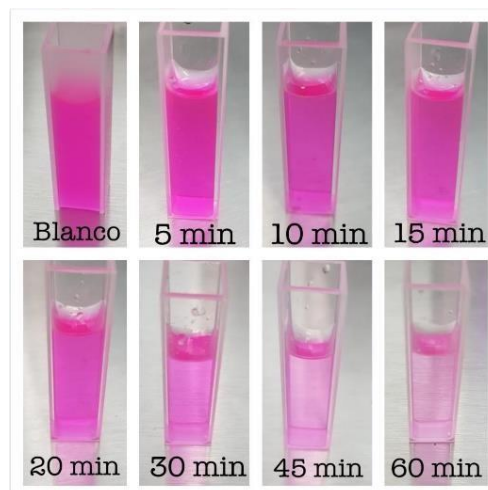


Figura 3: Serie de degradaciones electrocatalíticas.

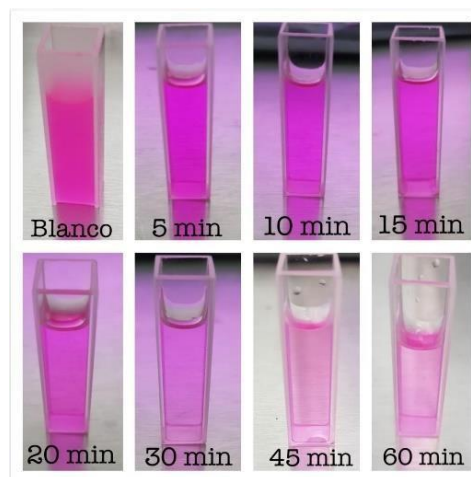


Figura 4: Serie de degradaciones fotoelectrocatalíticas.

Para cuantificar los resultados de las degradaciones se empleó la ley de Lambert-Beer para encontrar el coeficiente de extinción molar de la Rodamina B a 25 ppm.

$$A = \epsilon c l$$

Conociendo la absorbancia y la concentración del blanco, se encontró que el coeficiente de extinción molar de la

Rodamina B a 25 ppm fue de $46000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, con lo cual se procedió a realizar la **Tabla 1** para comparar los resultados de las concentraciones resultantes de las pruebas electrocatalíticas y fotoelectrocatalíticas.

Tabla 1: Comparación de concentraciones resultantes de pruebas electrocatalíticas y fotoelectrocatalíticas.

Muestra	Electrocatalisis	Fotoelectrocatalisis
Blanco	25 ppm	25 ppm
5 min	22.61 ppm	20.86 ppm
10 min	19.58 ppm	19.54 ppm
15 min	19.28 ppm	16.75 ppm
20 min	16.79 ppm	16.04 ppm
30 min	11.82 ppm	12.45 ppm
45 min	7.40 ppm	6.49 ppm
60 min	4.75 ppm	2.25 ppm

5.0 Discusión y conclusiones

Los resultados de las pruebas de degradación mostrados en la **Tabla 1** demuestran que el ánodo de la película delgada de $\text{TiO}_2\text{-Au-Ag}$ es más efectivo cuando es irradiado con luz ultravioleta, lo cual evidencia que los metales dopantes Au y Ag, infieren directamente en el funcionamiento degradativo del material semiconductor, es decir que provocan un mayor rendimiento en la degradación al aprovechar las propiedades de absorción de luz de los metales.

Esto se ve reflejado en los espectros de absorbancia (**Figura 5 y Figura 6**), que a su vez demuestran que existe un punto límite de degradación, este está marcado por una saturación que es la capacidad que tiene el material para degradar. Esta capacidad podría aumentar o disminuir con diferentes condiciones experimentales, pero se le atribuye

completamente el potencial degradativo al electrodo debido al control de las condiciones experimentales que se manejan.

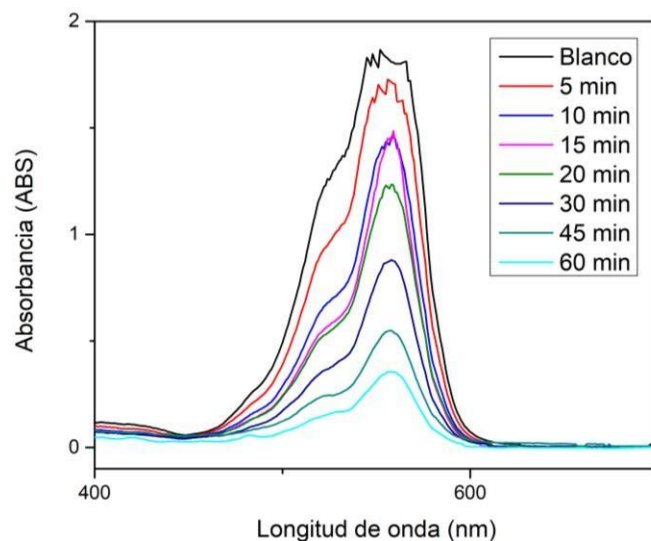


Figura 5: Espectro de absorbancia de pruebas electrocatalíticas.

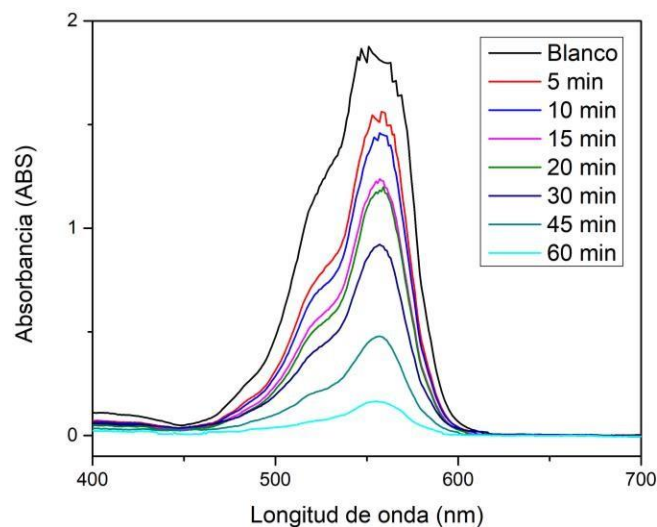


Figura 6: Espectro de absorbancia de pruebas fotoelectrocatalíticas.

El dopaje con oro y con plata en la película semiconductor de TiO_2 logra favorecer la degradación del compuesto orgánico Rodamina B (Hernández et al. 2018) y puede ser utilizado para degradaciones

posteriores con otro tipo de compuestos gracias a que el electrodo se puede limpiar de manera fácil y no requiere de condiciones estrictas para su conservación.

6.0 Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Querétaro por permitir el acceso al Verano de la Ciencia. Al laboratorio de materiales nanoestructurados y funcionales (LMNF) por brindar sus instalaciones, equipo y reactivos para la investigación. A la Dra. Karen Esquivel Escalante por su ayuda en la realización y redacción del reporte e investigación y al M.C. Luis Alejandro Martínez Chávez por la aceptación en el programa y su asesoría durante el desarrollo de este.

7.0 Referencias bibliográficas

Corzo Lucioni, Alberto. 2011. Estudio cinético de la degradación fotocatalítica oxidativa de rodamina B con ZnO y luz solar. "Revista de la Sociedad Química del Perú", 77(4), 267-274.

Garcés Giraldo, Luis Fernando, & Rodríguez Restrepo, Alejandra 2004. *Evaluación de la fotodegradación sensibilizada con TiO₂ Y Fe³⁺ para aguas coloreadas*. "Revista Lasallista de Investigación, 1"(2),54-60.

Hernández, Rafael; Olvera-Rodríguez, Isidoro; Guzmán, Carlos; Medel, Alejandro; Escobar-Alarcón, Luis; Brillas, Enric; Sirés, Ignasi; Esquivel, Karen. 2018. *Microwave-assisted sol-gel synthesis of an Au-TiO₂ photoanode for the advanced oxidation of paracetamol as model pharmaceutical pollutant*. "Electrochemistry Communications", 96(), 42-46. doi:10.1016/j.elecom.2018.09.009

Mascolo, G., Comparelli, R., Curri, M. L., Lovecchio, G., Lopez, A., & Agostiano, A. 2007. *Photocatalytic degradation of methyl red by TiO₂: Comparison of the*

efficiency of immobilized nanoparticles versus conventional suspended catalyst. "Journal of Hazardous Materials", 142(1-2), 130-137. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.07.068

Terán, M. 2016. *Estudio de la aplicación de procesos de oxidación avanzada a aguas contaminadas*. Repositorio "Unitécnica de Cataluña", 100. https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/88273/01_TFG.pdf

Terry A. Egerton. 2011. *Does photoelectrocatalysis by TiO₂ work?*. , 86(8), 1024–1031. doi:10.1002/jctb.2616

YanJun Xin; Huiling Liu; Lei Han; Yabin Zhou. 2011. *Comparative study of photocatalytic and photoelectrocatalytic properties of alachlor using different morphology TiO₂/Ti photoelectrodes*. , 192(3), 1812–1818. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.07.005

Zhang, Yu; Cui, Wenquan; An, Weijia; Liu, Li; Liang, Yinghua; Zhu, Yongfa 2017. *Combination of photoelectrocatalysis and adsorption for removal of bisphenol A over TiO₂-graphene hydrogel with 3D network structure*. *Applied Catalysis B: Environmental*, (), S0926337317308123–. doi:10.1016/j.apcatb.2017.08.076

Zulkarnain Zainal; Lee Kong Hui; Mohd Zobir Hussein; Yun Hin Taufiq-Yap; Abdul Halim Abdullah; Irmawati Ramli 2005. "Removal of dyes using immobilized titanium dioxide illuminated by fluorescent lamps". 125(1-3), pp 113–120. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.05.013.

Evaluación de la interacción de nanopartículas magnéticas en sangre

Sánchez Ruíz Brenda Aracely, M. en C.
Jesús Roberto Vargas Ortiz, Dra. Karen
Esquivel Escalante ¹

¹ Universidad Autónoma de Querétaro,
campus Aeropuerto. Correo:
karen.esquivel@uaq.mx

Resumen

El uso de nanopartículas magnéticas (NPMs) en nanomedicina ha ayudado a la obtención de diagnósticos menos invasivos en menor tiempo y terapias dirigidas para el tratamiento de enfermedades, incluso en estadios más tempranos, evitando así un tratamiento tardío. Por lo que las nanopartículas magnéticas, especialmente las de la magnetita al tener hierro (Fe^{2+} , Fe^{3+}) en su composición podrían provocar una afección crónica si hay un exceso en la sangre o una deficiencia, lo cual generaría enfermedades en sangre que impedirían el bienestar de quién haya estado en contacto con dichas nanopartículas en torrente sanguíneo, pues recordando que la sangre es la encargada de llevar nutrición, oxígeno (O_2) y liberación de dióxido de carbono (CO_2) en el cuerpo. Conocer la toxicología que dichas nanopartículas en células hematopoyéticas será posible mediante el uso de agar sangre y tinción de Perls para conocer el daño generado de

manera cualitativa, dado que las muestras de agar que se tiñeron con tinción de Perls y dieron positivo a la prueba con una coloración azul nos corroboró el exceso de hierro que se generó en células hematopoyéticas.

Palabras clave: nanopartículas, sangre, magnetita, magnético, hierro, tinción, agar, Perls, nanomedicina, hematopoyéticas, células

Summary

The use of magnetic nanoparticles (NPMs) in nanomedicine has helped to obtain less invasive diagnoses in less time and targeted therapies for the treatment of diseases, even in earlier stages, thus avoiding late treatment. Therefore, magnetic nanoparticles, especially those of magnetite, having iron (Fe^{2+} , Fe^{3+}) in their composition could cause a chronic condition if there is an excess in the blood or a deficiency, which would generate blood diseases that would prevent the well-being of those who have been in contact with these nanoparticles in the bloodstream, remembering that the blood is responsible for carrying nutrition, oxygen (O_2) and release of carbon dioxide (CO_2) in the body. To know the toxicology of these nanoparticles in hematopoietic cells will be possible through the use of blood agar and Perls staining to know the damage generated in a qualitative way, since the agar samples that were stained with Perls staining and were positive to the test with a blue coloration corroborated the excess of iron that was generated in hematopoietic cells.

Keywords: nanoparticles, blood, magnetite, magnetic, iron, staining, agar, Perls, nanomedicine, hematopoietic, cells

Introducción

El área de nanomedicina ha ido implementado el uso de diferentes nanopartículas magnéticas (NPMs) para el diagnóstico y terapia de enfermedades, siendo terapias menos invasivas y así poder obtener diagnósticos en menor tiempo. Es por esto Por lo que se busca conocer la nanotoxicología de estas partículas, ya que aún se conoce muy poco acerca de los efectos adversos en el organismo [1].

Sin embargo, se ha estudiado muy poco acerca de la toxicología que tienen las nanopartículas magnéticas [2] y a largo plazo podrían generar otro tipo de enfermedades o padecimientos que podrían ser aún más complejos de solucionar que el problema inicial. Por lo que determinar el tipo de interacción y posibles efectos adversos que puedan presentar las NPMs en células sanguíneas es un paso clave para sus aplicaciones biomédicas.

Con ello, el uso de nanopartículas magnéticas ha sido de gran interés por los investigadores, debido a su amplio abanico de disciplinas con las que cuenta como es nanomedicina, agronomía, imagenología, biomédica y con ello diversas aplicaciones como lo son los fluidos magnéticos, catálisis, biotecnología/biomedicina, imágenes por resonancia magnética, almacenamiento de datos y recuperación del medio ambiente [2].

En la aplicación de nanomedicina se han utilizado NPMs como acarreadores de fármacos, tratamiento de cáncer, tratamiento de hipertermia, tratamiento de hemorragias internas, así como conocer la trayectoria de la sangre [3,4].

En el caso de la aplicación en sangre, es importante conocer la toxicidad pues la sangre es un fluido que circula constantemente proporcionando nutrición, oxígeno y eliminación de residuos en el cuerpo [5].

Objetivos

Evaluar la interacción de nanopartículas de magnetita en sangre mediante el proceso de hemólisis y la tinción de Perls.

Objetivos específicos

- Obtener nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) y magnetita recubierta de sílice ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$), mediante la síntesis de coprecipitación química y método de Störber.
- Caracterizar las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ para conocer su morfología, tamaño y cristalinidad, mediante las técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) y difracción de rayos X (XRD).
- Realizar tinción de Perls en sangre para identificar el exceso de hierro en las células hematopoyéticas.
- Evaluar la interacción de las nanopartículas de magnetita recubiertas de sílice en la sangre mediante la prueba toxicológica de agar sangre.

Metodología

- Síntesis de nanopartículas magnéticas

Se prepararon dos soluciones de 0.5 M de FeCl_3 y FeSO_4 con baño sónico a condiciones operacionales de 85% de amplitud y 100% de cavitación durante 15

minutos a atmósfera inerte. Después mediante goteo lento se agrega NH_4OH y se deja en baño sónico 15 minutos. Enseguida se hace un triple lavado con etanol hasta obtener un pH neutro y finalmente se retira el solvente excedente mediante el uso de horno de convección a una temperatura de $50\text{ }^\circ\text{C}$ en un tiempo de 12 h. [6]

- Recubrimiento de nanopartículas magnéticas

Para el recubrimiento de las nanopartículas se hizo uso del método de Störber, para el cual se mezclaron las nanopartículas magnéticas con una solución de etanol, agua destilada y amoníaco mediante sonicación 15 minutos. Después se agregó una solución de TEOS y etanol y se volvió a sonicar durante 15 minutos más. Posteriormente se lavaron las nanopartículas recubiertas con etanol tres veces y finalmente se colocaron en horno de convección durante 12 h a $50\text{ }^\circ\text{C}$. [6]

- Agar sangre

Se suspendieron 4 g de agar en 100 ml de agua destilada y se dejó reposar 5 minutos, pasado este tiempo se mezcló hasta obtener una consistencia homogénea. Luego se calentó con agitación constante hasta que hirvió y se dejó hervir durante 1 minuto. Posteriormente se esterilizó a $120\text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos y después se dejó enfriar hasta una temperatura de $40\text{-}50\text{ }^\circ\text{C}$ y se agrega sangre ovina estéril entre un 5-10% de la solución total y se homogenizó. Por último, se distribuyó uniformemente en tubos y se incubó durante 48 h a una temperatura del $37\text{ }^\circ\text{C}$. [7]

- Tinción de Perls

Se fijaron extendidos de agar sangre con metanol, luego se lavaron con agua destilada por inmersión tres veces. Después se añadió una mezcla a partes iguales de ferrocianuro de potasio al 2% y HCl al 2%. Se dejó reposar 1 h a temperatura ambiente, Posteriormente se lavó con agua destilada y finalmente se lavó con una solución de safranina en un lapso entre 30-45 segundos. [8]

Resultados

Nanopartículas No Recubiertas			
Número/letra de muestra	Temperatura	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Resultado
1	Control	Control	Nada
A	120 °C	1	Nada
B		0,1	Azul
C		0,01	Azul intenso
D		0,001	Azul intenso
E	160 °C	1	Azul intenso
F		0,1	Azul
G		0,01	Azul intenso
H		0,001	Nada
I	200 °C	1	Azul intenso
J		0,1	Azul intenso
K		0,01	Azul intenso
L		0,001	Azul intenso

Tabla 1. Resultados de tinción de Perls en nanopartículas no recubiertas a distintas concentraciones

Nanopartículas Recubiertas			
Número/letra de muestra	Temperatura	Concentración (µg/ml)	Resultado
1	Control	Control	Azul
2	120 °C	1	Ligeramente azul
3		0,1	Nada
4		0,01	Nada
5		0,001	Azul intenso
6	160 °C	1	Azul
7		0,1	Azul
8		0,01	Azul y aglomerado
9		0,001	Azul

Tabla 2. Resultados de tinción de Perls en nanopartículas recubiertas a distintas concentraciones

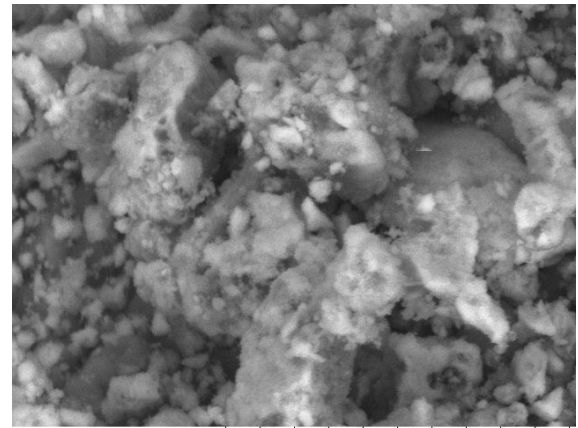


Figura 2. Agregado de nanopartículas a 160 °C sin forma definida

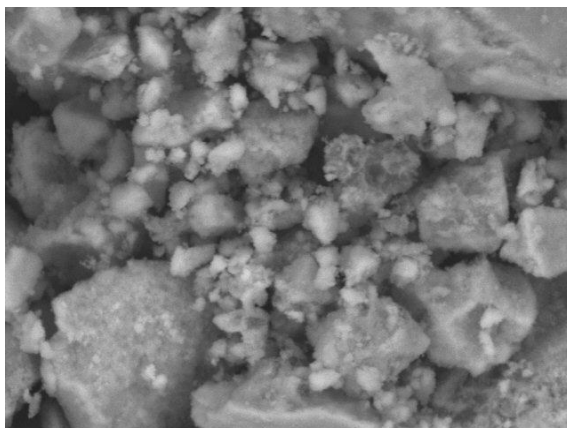


Figura 1. Agregado de nanopartículas, sin forma definida a una temperatura de 120 °C

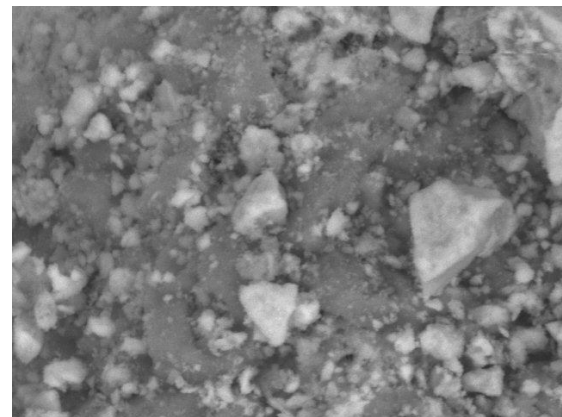


Figura 3. Agregado de nanopartículas a 200 °C sin forma definida

A continuación, se muestran las imágenes captadas en microscopio de las muestras que presentaron ser positivas en la tinción de Perls.

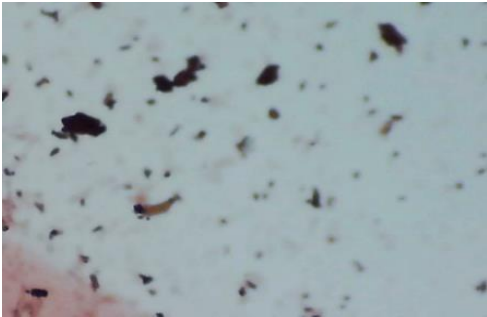


Figura 4. Control

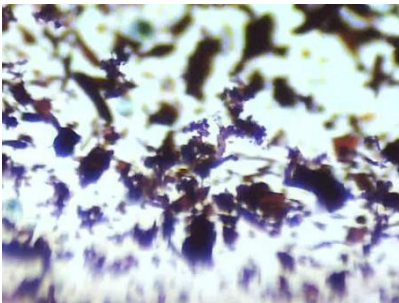


Figura 5. Nanopartículas recubiertas a 120 °C en concentración de 0.1 µg/ml

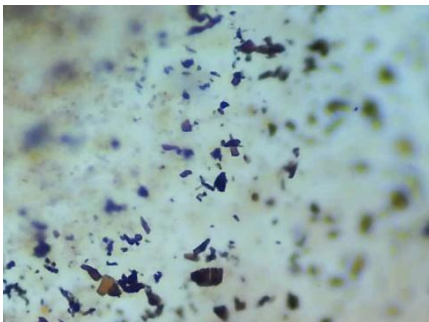


Figura 6. Nanopartículas recubiertas a 120 °C en concentración de 0.001 µg/ml

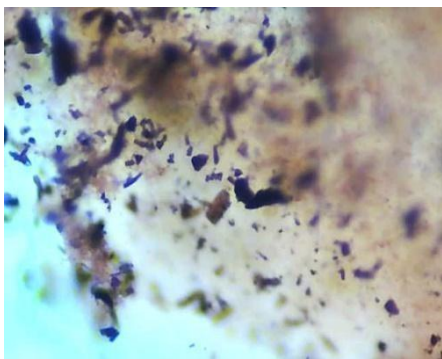


Figura 7. Nanopartículas recubiertas a 160 °C en concentración de 1 µg/ml

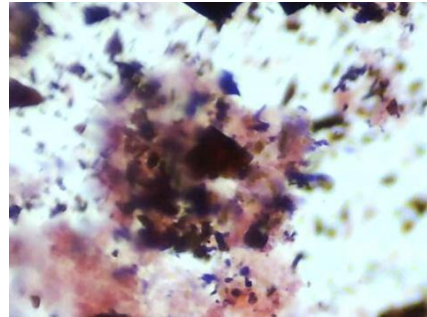


Figura 8. Nanopartículas recubiertas a 160 °C en concentración de 0.01 µg/ml

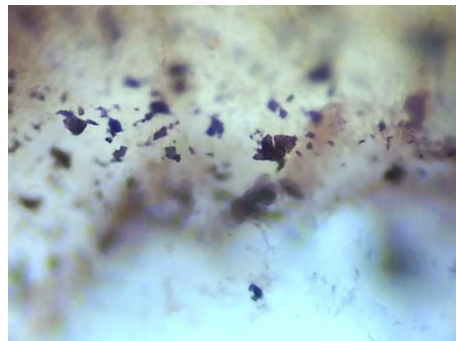


Figura 9. Nanopartículas recubiertas a 160 °C en concentración de 0.001 µg/ml



Figura 10. Nanopartículas recubiertas a 120 °C en concentración de 0.01 µg/ml

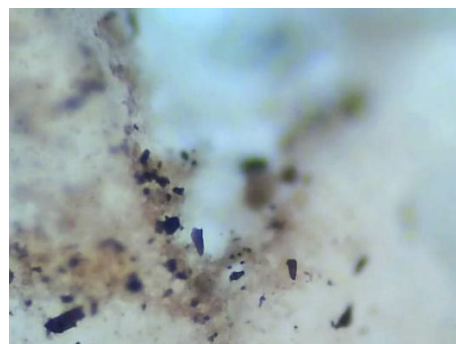


Figura 11. Nanopartículas no recubiertas a 120 °C en concentración de 0.001 µg/ml

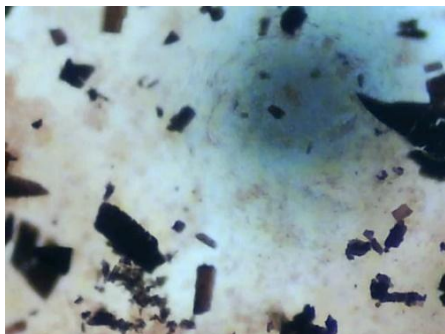


Figura 12. Nanopartículas no recubiertas a 160 °C en concentración de 0.01 µg/ml

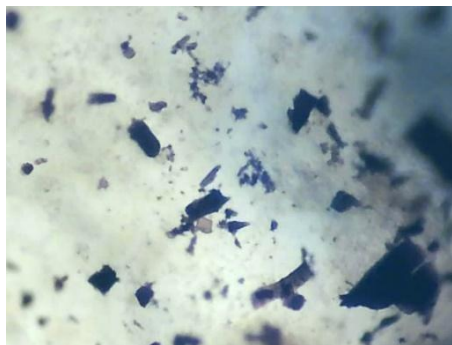


Figura 15. Nanopartículas no recubiertas a 200 °C en concentración de 0.1 µg/ml

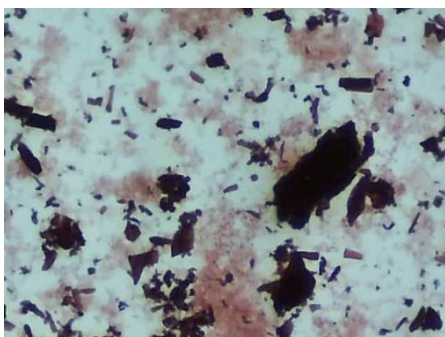


Figura 13. Nanopartículas no recubiertas a 160 °C en concentración de 1 µg/ml

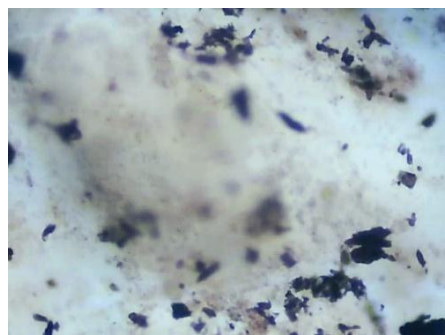


Figura 14. Nanopartículas no recubiertas a 200 °C en concentración de 1 µg/ml

Discusión y conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en el laboratorio se observa que en las nanopartículas no recubiertas cuando aumentan la temperatura de síntesis tienen mayor posibilidad de liberar hierro en torrente sanguíneo tal como se ven los resultados de la tabla 1, así mismo en las nanopartículas recubiertas a una temperatura de 160 °C se obtuvo que al ir reduciendo la concentración se generó un decremento en la tinción de Perls, algo similar a lo que se observó en la tabla 2 de las nanopartículas recubiertas, las cuales a una temperatura de 160 °C la coloración azul se lograba observar, tal cual se ve en las figuras 7,8 y 9.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro por haber realizado el Verano de la Ciencia 2021, pues sin el financiamiento que otorga para este tipo de actividades que acercan más a los jóvenes a la ciencia y ejercer en el campo de la ciencia, el cual despierta no sólo la curiosidad sino la motivación para que

más jóvenes se decidan a estudiar una carrera en ciencias exactas o en el caso de alumnos de licenciatura a experimentar y aprender a trabajar en un laboratorio a visualizar un campo laboral de una forma más realista, así mismo la oportunidad de adquirir conocimiento y habilidades para trabajar en un laboratorio de investigación.

[8] Crudo, C., Erramouspe, B., Sueldo, E., & Arias, M. (2016, 28 abril). Tinción de hierro medular. Coloración de Perls. LABORATORIO EN HEMATOLOGÍA, 20(2). <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/14%20vol%2020%20N2%20%202016.pdf>

Referencias bibliográficas

[1] Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la tecnología, 2007

[2] A. Lu, E. Salabas and F. Schüth, "Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application", *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, no. 8, pp. 1222-1244, 2007. Available: 10.1002/anie.200602866

[3] A. Nacev, C. Beni, O. Bruno and B. Shapiro, "Magnetic nanoparticle transport within flowing blood and into surrounding tissue", *Nanomedicine*, vol. 5, no. 9, pp. 1459-1466, 2010. Available: 10.2217/nnm.10.104

[4] D.J. Rodríguez, Patarroyo, L.M. Roa, Barrantes, F. Pantoja, Benavides (2019, julio). "Efecto del campo magnético en la trayectoria de nanopartículas magnéticas en flujo sanguíneo, un modelo computacional". 17th LACCEI International Multi-Conference for Engineering, Education, and Technology. 1-4. Available: http://laccei.org/LACCEI2019-MontegoBay/student_papers/SP527.pdf

[5] M. Hoffman (2010, 27 abril). Human Anatomy: Blood - Red and White Cells, Plasma, Circulation, and More. WebMD. <https://www.webmd.com/heart/anatomy-picture-of-blood>

[6] D. de Santiago Colín et al., "Sonochemical coupled synthesis of Cr-TiO₂ supported on Fe₃O₄ structures and chemical simulation of the degradation mechanism of Malachite Green dye", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 364, pp. 250-261, 2018. Available: 10.1016/j.jphotochem.2018.06.004

[7] Britania Lab. (s. f.). Sangre Agar Base. Britania https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5b6b262facd0e.pdf

Efecto de cortisol sobre la reacción acrosomal del espermatozoide humano.

Alumno:

Serratos Miguel Angel
Estudiante de Ingeniería Biomédica.
Faculta de Ingeniería, UAQ.

Investigadoras:

M. en C. Sheini Ruturi Sánchez González
Maestra en Ciencias en
Neurometabolismo.
Estudiante de Doctorado en Ciencias en
Biomedicina.
Facultad de Medicina, UAQ.
Asesora: Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie.
Departamento de Investigación Biomédica
Facultad de Medicina, UAQ.

Resumen

La reacción acrosomal (RA) es un evento de exocitosis la cual es esencial para la fecundación, debido a que este proceso es la manera en la que el espermatozoide puede penetrar las capas más externas del óvulo. Sin embargo, para que esto ocurra, el espermatozoide debe completar un proceso que le conferirá la capacidad de fecundar llamado capacitación el cual tiene lugar en el tracto genital femenino (TGF). El ion Ca^{2+} es esencial para la capacitación (hiperactividad del flagelo) y

la RA. Estos iones atraviesan la membrana del espermatozoide mediante el canal CatSper, aunque existe controversia sobre las hormonas que activan este canal, en específico la hormona esteroidea hidrocortisona (HC). Por esa razón, en este protocolo se determinó el efecto de la HC sobre la RA del espermatozoide humano. La técnica para comprobar la RA fue la tinción con el colorante azul de coomasie. Se encontró que la HC a bajas concentraciones induce la RA y también se demostró que incubando la muestra con Pg más HC, independientemente de la concentración empleada, disminuye la RA comparado con el control positivo.

Palabras clave: Inducción de reacción acrosomal, hidrocortisona, progesterona.

Abstract

The acrosome reaction (AR) is an exocytotic event which is essential in the fertilization, due this process is the way that the sperm can penetrate the outermost layers of the oocyte. Nevertheless, first the sperm has to complete a process that will give it the ability to fertilize called capacitation which takes place in the female genital tract. The Ca^{+2} is essential for the capacitation (hyperactivity of sperm flagellum) and AR. These ions pass through the sperm membrane via the CatSper channel, although there is controversy about the hormones that activate this channel, specifically the steroid hormone Hydrocortisone (HC). For that reason, in this protocol the effect of HC on the acrosome reaction of human sperm was determined. The techniques in

testing the acrosome reaction is the Staining solution with Coomassie Blue.

It was demonstrated that HC at low concentrations induces acrosome reaction and it was also demonstrated that incubating the sample with progesterone plus HC, regardless of the concentration used, decreases acrosome reaction compared to the positive control.

Key words: induction of the acrosome reaction, hydrocortisone, progesterone.

Introducción

Un espermatozoide necesita estar en el tracto genital femenino (TGF) para poder adquirir su capacidad para fecundar. Esto se debe a que el TGF proporciona diversos factores como el calcio, bicarbonato, albúmina, entre otros que actúan como desencadenantes de diversas cascadas de señalización para que ocurra la fecundación.

La capacitación espermática es una serie de cambios bioquímicos por los que atraviesa el espermatozoide para adquirir la capacidad de fecundar al óvulo.

Estos cambios incluyen: incremento en la fluidez de la membrana, movimiento lateral del colesterol a la región apical de la cabeza del esperma y salida de colesterol de la membrana plasmática hacia el entorno extracelular. Martha O. et al., (2006). Una vez que el espermatozoide se encuentra capacitado, puede llevar a cabo la RA.

La RA es el evento en el que el espermatozoide penetra las capas más externas del óvulo mediante un proceso de exocitosis, en el cual se fusiona la

membrana citoplasmática con la membrana acrosomal externa de la zona apical de la cabeza del espermatozoide provocando una liberación de enzimas y la exposición de la membrana acrosomal interna. Uno de los inductores fisiológicos de la RA es la Progesterona (Pg); una hormona esteroidea que se encuentra en concentraciones micro molares en el TGF. Sin embargo, existe controversia acerca del efecto que tienen otras hormonas esteroideas. De hecho, hasta el momento, no existen estudios que hayan investigado la relación del efecto de la HC directamente sobre la RA en espermatozoides humanos. Por ello, esta investigación podría aportar conocimiento en la fisiología y funcionalidad del espermatozoide lo cual tiene un impacto en la comprensión de la infertilidad o bien, podría ser un punto de partida para el desarrollo de métodos anticonceptivos masculinos.

Objetivos

Determinar el efecto de la Hidrocortisona sobre la Reacción Acrosomal del espermatozoide humano.

Metodología

En este estudio se incluyeron muestras de semen de 15 hombres con edades de 18 a 45 años que firmaron la carta de consentimiento informado.

Lo primero que se realizó fue la determinación de los parámetros de calidad del semen mediante un análisis de propiedades macro y microscópicas

Para el análisis de propiedades macroscópicas, primero se determinó el

color de la muestra colocando el vaso a contra luz y se clasificó en blanco opalescente, amarillento o café rojizo. Después, se midió el volumen de la muestra y se determinó su viscosidad mediante la longitud de la hebra y por último se midió el pH de la muestra mediante tiras reactivas.

Para el análisis de propiedades microscópicas se colocaron 10 µL de la muestra en un portaobjetos, posteriormente se hizo el conteo de 200 células y se clasificó su motilidad en motilidad progresiva, motilidad no progresiva e inmovilidad.

Para determinar la concentración espermática se se tomaron 10 µL de la muestra, se colocaron en un portaobjetos y se realizó el conteo de espermatozoides de un solo campo (40x). De acuerdo con la cantidad obtenida se realizó la dilución requerida para el conteo en la cámara de Neubauer, según el manual de la OMS.

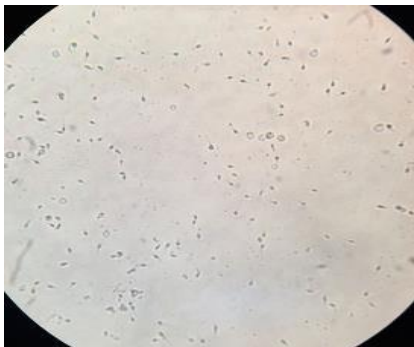


Figura 1. Visualización de espermatozoides con aumento de 40x

En la cámara de Neubauer se hizo el conteo de 200 espermatozoides en filas; en caso de que se empezara a contar una fila, se debía de finalizar.

Se utilizó la Ec. 1 para determinar la concentración espermática contenido en un ml.

$$c = \left(\frac{\# \text{ de espermatozoides}}{\# \text{ de filas}} \right) \left(\frac{1}{20} \right) (\text{Factor de dilución}) (1 \times 10^6)$$

Ecuación 1. Concentración espermática en un ml.

Una vez determinada la concentración, se procedió a realizar la técnica de swim up, la cual permite separar a los espermatozoides de mejor calidad). Para ello, se colocó la mayor parte de la muestra en un tubo falcon a 45° de inclinación y se agregó medio HAM's F-10 suplementado en relación 1:1. El medio se agregó por las paredes del tubo procurando no mezclar las fases.

Este medio es suplementado con albúmina debido a que esta proteína es un aceptor de colesterol y, por lo tanto, promueve que la membrana del espermatozoide se vuelva más fluida y de esta manera el espermatozoide tenga un mejor nado. Posteriormente, la muestra se incubó durante 1 hora y luego se procedió a la recuperación de la fase superior donde se esperaba encontrar a los espermatozoides con mayor motilidad.

Se tomaron 10 µL de la muestra recuperada y se hizo un conteo de células móviles en un solo campo. De acuerdo con la cantidad obtenida, se utilizó la dilución correspondiente para el conteo en la cámara de Neubauer; esto se realizó para conocer la concentración de la muestra recuperada después del swim-up.

Con el dato anterior, de igual forma sustituyó en la ecuación 1 para conocer la concentración post swim up.

En este punto se requirió llevar la concentración a 1×10^7 por lo que se ocupó la Ec. 2.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Ecuación 2.

Donde:

C_1 : es la concentración de la muestra

V_1 : los ml de la muestra

C_2 : 1×10^7

V_2 : volumen final

Una vez obtenido el volumen necesario para obtener la concentración deseada, se restó el volumen de la muestra recuperada y el resultado fue el volumen de medio HAM's suplementado que se agregó a la muestra recuperada. Posteriormente, se incubó durante 3 horas a 37°C para simular el proceso de capacitación. Una vez que los espermatozoides se encontraban capacitados, se distribuyó la muestra en cantidades iguales entre 16 tubos eppendorf, de los cuales a 7 se les agregó HC, a 7 se les agregó HC con Pg y al control positivo y negativo se les agregó Pg y DMSO, respectivamente. Se ingresó la gradilla a la incubadora por 30 min para inducir la RA.



Figura 2. Tubos eppendorf que contienen las diferentes concentraciones de HC.

Posterior a la incubación, se agregaron $100 \mu\text{L}$ de metanol a cada uno de los tubos eppendorf, y se centrifugaron a 3500 rpm durante 4 minutos.

A continuación, se eliminó el sobrenadante de todos los tubos y se resuspendió cada uno de ellos en $400 \mu\text{L}$ de PBS. Se colocaron $50 \mu\text{L}$ de la muestra resuspendida en cada portaobjeto y se extendió con un cubreobjetos. Después, los frotis se tiñeron con el colorante Azul de Coomassie durante 2 minutos. Para secar se utilizó una plancha caliente.



Figura 3. Portaobjetos en cubeta de tinción Azul de Coomassie

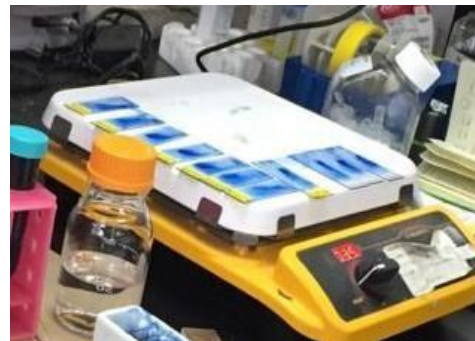


Figura 4 Secado de tinción.

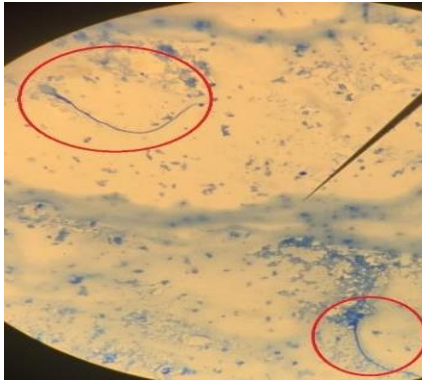


Figura 5. Visualización de espermatozoides después de la tinción Azul de Coomassie

En la Fig. 6 se pueden observar dos espermatozoides; el que no tuvo RA tiene la cabeza azul, y el que llevó a cabo la RA tiene la cabeza con una tonalidad traslúcida

Resultados

Mediante la tinción de Azul de Coomassie se evaluó el porcentaje de espermatozoides que llevaron a cabo la RA. Como lo indica la Fig. 6 se encontró que la HC a bajas concentraciones induce la RA y también se demostró que incubando la muestra con Pg más HC, independientemente de la concentración empleada, disminuye la RA comparado con el control positivo.

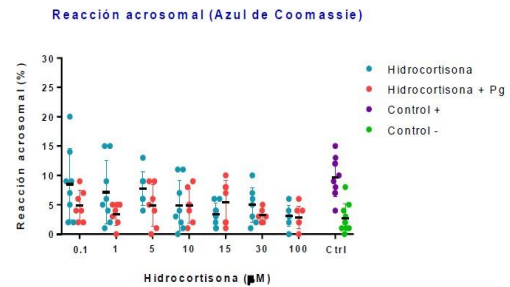


Figura 6. Porcentaje de RA de diferentes concentraciones de HC.

Discusión y conclusiones

La importancia de la hormona esteroidea Pg y el canal CatSper en procesos de fecundación es aceptada por distintos autores, aunque todavía no hay un acuerdo común que indique la relación de HC y si es que esta hormona compite con la Pg en la activación de CatSper.

En este estudio se demostró que la HC en bajas concentraciones induce RA espontánea pero cuando los espermatozoides se incuban de manera conjunta con HC y Pg, la RA disminuye. Este resultado es acorde con autores como Mannowetz et al., (2017) quienes indican que la HC inhibe la activación de CatSper por Pg.

Por otra parte, Brenker et al., (2018) y Rehfeld (2020), indican no estar de acuerdo con Mannowetz et al., (2017) en que la HC es antagonista que anulan la activación de CatSper por Pg. Brenker y Rehfeld sostienen que la HC potencia las corrientes de CatSper y estimulan la entrada de Ca^{2+} .

Futuras investigaciones podrían centrarse en la relación de la hidrolasa ABHD2 con las hormonas esteroideas, porque

actualmente se ha demostrado que influye directamente en la RA.

El resultado de este estudio es un avance en la comprensión de factores hormonales en la infertilidad y puede ser el inicio del desarrollo de métodos anticonceptivos que aprovechen la relación de la HC con el canal CatSper el cual, de acuerdo con diversos estudios, es un blanco potencial.

Agradecimientos

Agradezco enormemente la oportunidad que me brindó la Dra. Ana Alicia Sánchez en el verano de la ciencia, siempre mostrando un gran profesionalismo y amabilidad.

También es importante mencionar todo el apoyo recibido por parte de la Mtra. Sheini Sánchez, quien ha sido una excelente guía en el aprendizaje teórico y práctico en el laboratorio.

Por último, me gustaría agradecer a la Dirección de Investigación y Posgrado que hace posible el Verano de la Ciencia.

Referencias bibliográficas

Brenker, C., Schiffer, C., Wagner, I. V., Tüttelmann, F., Röpke, A., Rennhack, A., Kaupp.. Action of steroids and plant triterpenoids on CatSper Ca²⁺ channels in human sperm. Proceedings of the National Academy of Sciences(2018).

Cardona-Maya, W.D., & Cadavid, A.P.. Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. (2005).

Sun, Xh., Zhu, Yy., Wang, L. et al. The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. Reprod

Biol Endocrinol 15, 65 (2017). Actas Urológicas Españolas, 29(7), 676-684. Recuperado en 21 de julio de 2021

Mannowetz, N., Miller, M. R., & Lishko, P. V. Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids. Proceedings of the National Academy of Sciences(2017).

Martha Olivera, Tatiana, Tarazona, Ariel, & Giraldo, Carlos. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 19(4), 426-436 (2006)

Rehfeld, A. Revisiting the action of steroids and triterpenoids on the human sperm Ca²⁺ channel CatSper. Molecular Human Reproduction, 26(11), 816-824 (2020).

Sobre el concepto fenomenológico de “realismo” en la interpretación literaria

Ledesma Juárez Luz del Carmen
Director del proyecto y asesor: Dr. Gerardo Argüelles Fernández
Universidad Autónoma de Querétaro
Correos de contacto:
luzdelcarmenqro@hotmail.com
gerardo.arguelles67@gmail.com

Resumen

“Realismo mágico” o “realismo maravilloso” son algunas de las variantes conceptuales en la literatura subsidiarias de un sólo término, usado para distinguir estatutos ontológicos contrarios a una experiencia de lo fantástico y, con ello, de la “vida real”. De las teorías fenomenológicas de Edmund Husserl se tiene que la noción de “existencia intencional” refiere a una certeza de realidad pese a su estatuto ficcional, y por ello en esta investigación me propongo, en primer lugar, elucidar qué tipo de virtudes epistémicas ofrece el concepto de “realismo” desde la teoría de la “intencionalidad fenomenológica”, teniendo como anticipo la distinción entre i) un realismo apegado a la inmanencia, frente a un ii) realismo que presume objetividad fáctica. En otra instancia

quiero averiguar ¿cómo es que la conciencia significativa logra constituir objetos puramente intencionales que por su efecto de realidad reciben el nombre de “verosímil”; todo ello en independencia a los argumentos tradicionales inmersos en la historiografía de los estudios literarios, en donde el “realismo” ha sido acotado a una sentencia especulativa, convertida en lugar común la cual anuncia un mero “reflejo de realidad” atado a una o varias épocas literarias.

Palabras clave: realismo, mimesis, realismo inmanente, inteligencia autoral, mundos posibles

Abstract

“Magical realism” or “marvelous” are some of the conceptual variants for literature subsidiary of just one term, used to distinguish ontological statutes that are opposed to an experience of the fantastic and, thereby, of “real life”. From the phenomenological theories of Edmund Husserl, it is followed that the notion of “intentional existence” refers to a certainty of reality despite its fictional statute, which is why this research proposes to elucidate what type of epistemic virtues does the concept of “realism” provides from the “phenomenological intentionality” theory, having as presupposition the distinction between i) a realism attached to the immanence, compared with a ii) realism which boasts factual objectivity. In addition, it aims to determine how does the significant conscience get to establish purely intentional objects named as “credible”, independently to the traditional arguments embedded in the historiography of literary studies, in which “realism” has

been delimited to a speculative sentence, declaring a “reflection of reality” attached to one or many literary periods? The methodology acts within a documentary research at primary and original sources regarding the topic, in order to proceed towards an analytic-interpretative analysis of specific works that serve as a conclusive example. The most significant results include at least 3 articles published in prestigious specialized journals, along with a bachelor’s dissertation approved for its defense over the course of this summer.

Keywords: Realism, mimesis, immanent reality, authorial intelligence, possible worlds.

Introducción

Tras la llegada de la novela realista del siglo XIX la creencia de que el arte, y la obra poética en general, debía ser un espejo de la realidad proliferó en la tradición académica, lo que provocó el surgimiento de teorías emotivistas que veían a la literatura como una herramienta para educar el espíritu y moldearlo para su mejora, y a la interpretación como la búsqueda de las propias emociones dentro de los límites del texto literario. De esta manera, la obra literaria debía proporcionar a sus lectores una mirada que, justamente, reflejara una serie de características históricas, sociales e incluso psicológicas del contexto real y del mundo externo. Desde esta perspectiva, el autor debía, a su vez, desempeñar un papel educador a través del cual promovía ciertos valores morales, ideas políticas y sociales, etc., siendo los datos biográficos del mismo una parte importante de las investigaciones académicas en torno a un

texto literario. Es en este sentido en el que la presente investigación pretende alejarse de este tipo de análisis de la literatura en el que las obras literarias se convierten, en palabras de Gyorgy Lukacs, en “novels of education” (2001, p. 1044); en un mero documento cultural e histórico cuyo valor se encuentra determinado por el grado de “realismo” que ofrece, es decir, por el grado en que la obra refleja o replica la realidad.

Así, mediante el cuestionamiento de dicha percepción del concepto de “realismo” y con el auxilio de autores tales como Edmund Husserl y Horst-Jürgen Gerigk, buscamos explorar la posibilidad de que dicha noción sea analizada ya no desde distintos marcos de referencia externos a la literatura misma como lo son la psicología y la historia, sino desde los mecanismos poetológicos edificados por la inteligencia autoral —la cual se desprende, asimismo, de la vida empírica del autor— para construir un mundo literario independiente de la realidad. Es aquí, entonces, donde cobra relevancia el concepto fenomenológico de “mundo de la vida” (*Lebenswelt*) propuesto por Husserl, pues al ser entendido como la manera en la que el sujeto individual constituye el entorno inmediato que se le presenta, éste bien puede ser asociado con el espacio literario: ese mundo donador de sentido construido por la inteligencia autoral para su comprensión, por lo que todo lo que se necesita para interpretarlo se encuentra dentro de los límites del mismo texto. En otras palabras,

la viabilidad del concepto de *Lebenswelt* correspondiente a la certeza epistémica de la conciencia trascendental que edifica sentido, ajusta con los procesos de constitución de ese sentido literario trazado desde «la mesa de trabajo» de la inteligencia autoral. Si todo esto es certero, me

permiso advertir que el mundo de la ciencia, que cosifica *a priori* al individuo y sus experiencias, resulta incompatible con una lectura literaria que busca comprender la diferencia hermenéutica entre el sentido de la vida real propia —de todo lector, él o ella— con el sentido diferido y ficcionalizado, *v. gr.* un sentido atado a una presunción de verdad no por eso menos genuina que cualquier tesis de realidad empírica. (Argüelles, G., 2021, p. 10)

De acuerdo con Gerigk, por su parte, existe un cisma otológico muy sencillo que disgrega a una obra literaria de un texto científico o periodístico y el cual puede ser incluso reconocido de inmediato por un niño: su finitud. Es decir, una obra literaria es un imperio semántico cuya información se rectifica a sí misma y que no requiere que el lector cuestione al redactor implícito del texto sobre los saberes descritos —como a menudo sucede con un artículo no literario abierto que continúa admitiendo correcciones—. Ahora bien, si la constitución de una obra literaria en su distinción entre la realidad mundo vitalicia construida en tal texto y la realidad empírica es perfectamente reconocida por un niño, ¿cuál es el propósito del estudio de la ciencia literaria? La respuesta a dicha pregunta es inherente al juego que la inteligencia autoral de la obra poética edifica ante nosotros y aquélla que conduce a Gerigk a afirmar que “el arte jamás será realista” (2016: p. 20).

En este sentido, la lectura de un niño se diferencia de la hecha por un especialista en literatura debido a la indagación crítica que lleva a cabo este último sobre las estructuras de realidad que están desafiando a las suyas según su posicionamiento histórico. Dicho de otra forma, la inteligencia artística se sustenta

de la habilidad innata del hombre de registrar, de acuerdo con Alfred Schütz, *multiple realities* y de admitir el mundo concebido en una obra literaria como “una posibilidad realista de organizar la experiencia” (2016: p. 20), para establecer una inteligibilidad absoluta que se contrapone a la realidad empírica. Es esto lo que intentamos defender con esta investigación: que la labor de la inteligencia autoral a nivel ontológico es, precisamente, edificar una realidad ficticia —entendiendo a la ficción como un gran disimulo de las experiencias mundanas— aceptada por el lector. Es decir, defendemos que una obra poética es un mundo concebido para ser comprendido y éste está compuesto, a su vez, de formas, patrones y situaciones que el lector es capaz de imaginar, simbolizar y metaforizar y, al mismo tiempo, comparar con las referencias de su mundo empírico, permitiéndole, de esta manera, admitir dicha realidad como una posibilidad.

Ahora bien, reafirmando lo anterior, la becaria FODEC del Dr. Argüelles, María Teresa Vergara Téllez (253493) expone en su tesis de licenciatura (dispuesta ya para su defensa este semestre en el marco mismo de esta investigación) lo siguiente:

todo escritor de ficción persigue el “realismo”, esto es, que todo autor desea que sus lectores, a pesar de ser conscientes de estar leyendo una obra ficcional, perciban lo narrado como algo “real”, posible, verosímil, en la realidad propuesta por el texto, sin importar que esta realidad sea más o menos cercana a la que conocemos empíricamente, y sin que esta intención autoral de “realismo” excluya la exposición de experiencias imposibles, mundos paradójicos y desplazamientos ontológicos que, dado el caso, culminan en un absurdo. (2021: p. 46)

Tal afirmación es de mucha utilidad para analizar obras como el “William Wilson” de Edgar Allan Poe y “El huésped” de Ampara Dávila; obras que, al ser estudiadas, a menudo se desintegran las sensaciones de miedo, terror y angustia edificadas por dichas inteligencias autorales al recurrir a ciencias auxiliares como la psicología y la psiquiatría para atribuir, en el caso de los dos textos mencionados, la aparición de figuras del doble a meras condiciones patológicas de los personajes. Así, mi participación principal en la presente investigación consistió, precisamente, en un análisis de ambos cuentos focalizado en las estrategias poetológicas empleadas por las inteligencias autorales de Poe y Dávila mediante las cuales lograron edificar mundos literarios magistrales donde el uso de la ambigüedad, principalmente, se posiciona como el recurso fundamental para generar angustia en el lector literato que acepta la existencia real tanto del doble del William Wilson narrador, como de la criatura maravillosa identificada como “el huésped” en la narrativa de Dávila.

Así, con la ayuda de los autores ya expuestos y trabajando con el motivo del doble en la literatura, participé como co-autora, junto con el Dr. Argüelles, en la elaboración del artículo titulado “*Doppelgänger*, susurros y reflejos: El fenómeno de autoscopia y su realización literaria en “William Wilson” de E. A. Poe”, el cual se encuentra actualmente en dictaminación ciega en la revista “F451” Barcelona (índice SCOPUS), y como autora de correspondencia en el artículo “Vértigo frente a la libertad y angustia vital; dos hipótesis sobre el fenómeno autoscópico en “El huésped” de Amparo Dávila”, el cual se elaboró para ser presentado en el homenaje a Amparo Dávila que se llevará a cabo en septiembre

del presente año en la Facultad de Lenguas y Letras, y cuya versión in extenso acaba de ser enviada a la revista *Diseminaciones* (UAQ) para su posible publicación.

En el primer texto, entonces, ofrecemos una reflexión en torno al fenómeno autoscópico dentro del “William Wilson” defendiendo que el verdadero reto del académico de la literatura no es reducir el artificio poetológico ideado por Poe a una alegorización de la crisis individual del personaje, sino respetar el mundo literario creado por la inteligencia autoral y tratarlo como un imperio semántico diseñado para ser comprendido y admitido dentro de sus propios límites. En el segundo texto, por otro lado, se busca admitir la existencia maravillosa del llamado “huésped” dentro del mundo finito del relato y no verlo como una mera alegoría de una crisis traumática psicológica de la narradora. Posteriormente se ofrecen dos hipótesis en la que dicha criatura es un desdoblamiento del marido, en la primera, o de la narradora en la segunda, quien, en una lucha constante con la angustia nacida de sus constantes enfrentamientos con sus anhelos y posibilidades de libertad, experimenta tal desdoblamiento.

Objetivos

Objetivo general:

Analizar el concepto de “realismo” en sus términos fenomenológicos respecto a su relevancia para los estudios literarios, en especial para la hermenéutica literaria.

Objetivos específicos:

- Camino a una adecuada distinción, el primer objetivo es problematizar

y deconstruir el término tradicional de “realismo” aplicado a la literatura.

- El segundo objetivo consiste en explorar las alternativas que ofrece el enfoque fenomenológico para una interpretación literaria del realismo distinta a la tradicional.
- El tercer objetivo radica en contribuir con material inédito (y luego dictaminado) en tanto apoyo a este capítulo obligado de la teoría literaria y ponerlo a prueba también en una tesis de grado.

Metodología

Dado que esta investigación es meramente documental y cualitativa, se excluye cualquier involucramiento y afectación de terceros, sean personas u otros seres vivos.

a) Procedimientos generales:

1. Evaluación de bibliografía sobre la definición de realismo, con el fin de esclarecer la concepción tradicional del término.

2. Evaluación de bibliografía de fuentes primarias en las obras de Edmund Husserl, Roman Ingarden, Paul Ricoeur y Horst-Jürgen Gerigk, con el objetivo de explorar las posibilidades que ofrece la fenomenología para el análisis literario y la concepción de lo realista en la literatura.

3. Evaluación de bibliografía de fuentes secundarias para asegurar una adecuada resolución a la hipótesis de esta investigación, la cual consiste nuevamente en la “ampliación” del concepto de

realismo, promoviendo una interpretación apegada únicamente al texto literario.

4. Ampliar el diálogo y relevancia de los estatutos teóricos más allá de la particularidad del propio marco de referencia delimitado en esta investigación gracias a un acompañamiento de dirección de tesis, en donde se incluyen análisis concretos de obras literarias determinadas (destacadas en la bibliografía primaria).

5. No se requieren recursos materiales ni humanos, salvo el compromiso del fomento a la investigación de dos becarias de licenciatura, una de ellas ligada al presente proyecto en calidad de tesista.

b) Cronograma de actividades:

- Evaluación de bibliografía: enero-mayo de 2020.
- Preparación del artículo indizado internacional: marzo–octubre, 2020.
- Envío del artículo arriba mencionado: noviembre, 2020.
- Entrega del primer reporte parcial: 20 de julio, 2020.
- Lectura del sínodo, rectificaciones y enmiendas a la tesis dirigida: octubre-diciembre, 2020.
- Entrega del segundo reporte técnico parcial: 13 de diciembre, 2020.
- Preparación de un segundo artículo indizado nacional (en co-autoría con mi colaborador): noviembre, 2020–abril, 2021.
- Redacción y entrega de reporte técnico final: 30 de junio, 2021.

Resultados

Entre los resultados de esta investigación se encuentra el enriquecimiento de la temática tratada al interior de la Academia de estudios literarios en diálogo con el propio CA y otros Cuerpos Académicos de literatura. Además, se buscó y se busca fomentar entre los egresados de la carrera de Estudios literarios el interés en la materia destacada por medio de al menos una tesis defendida al final del tiempo de duración de la investigación, situación que se dio mediante la tesis de la alumna de maestría Paulina Mercedes Rosales Prieto titulada “Reflexión sobre las estrategias didácticas en la enseñanza de la literatura para el Telebachillerato Comunitario”, trabajo en el cual la temática de esta investigación se coloca como una de las partes integrales del mismo.

De igual manera, uno de los objetivos principales de esta investigación era publicar en revistas internacionales y nacionales indizadas (coherente a las exigencias del SNI) y con ello dar la difusión adecuada a un tema poco o nada explorado. Lo anterior se logró a través de la publicación del artículo titulado “Aproximaciones críticas al realismo literario” con el Dr. Gerardo Argüelles y la Lic. María Teresa Vergara Téllez como autores, y los artículos “Contra el realismo mimético. Sobre una hermenéutica literaria con sustento fenomenológico y poetológico” —publicado en *Actio Nova: Revista de Teoría de la Literatura Comparada*— y “Sobre el arribo del concepto del mundo-de-la-vida (*Lebenswelt*) a los estudios literario” —publicado en *Open Insight*—, ambos escritos por el Dr. Argüelles. Asimismo, se realizó el artículo “*Doppelgänger*, susurros y reflejos: El fenómeno de autoscopia y su realización literaria en

“William Wilson” de E. A. Poe”, que actualmente se encuentra en dictaminación ciega en la revista “F451” Barcelona (índice SCOPUS) y en el cual tuve la oportunidad de participar como co-autora, y el texto “Vértigo frente a la libertad y angustia vital; dos hipótesis sobre el fenómeno autoscópico en “El huésped” de Amparo Dávila”, el cual se elaboró para ser presentado en el homenaje a Amparo Dávila que se llevará a cabo en septiembre del presente año, y cuya versión in extenso acaba de ser enviada a la revista *Diseminaciones* para su posible publicación.

Discusión y conclusiones

El desarrollo de la presente investigación nos ha permitido indagar en una nueva perspectiva del concepto del “realismo” mediante la cual nos es posible distanciarnos de aquella línea de análisis en la que dicho término aplicado a la literatura está sumamente relacionado con la manera en la que esta última refleja su realidad histórica, social, cultural o política, y en la cual el autor de un texto literario desempeña un papel educador. En este sentido, el acercarnos a obras literarias ya no desde una mirada que privilegia las aportaciones de ciencias auxiliares — como la psicología— en los análisis de dichas obras, sino desde aquella en la que el estudioso de la literatura respeta la finitud del texto y acepta el mundo diseñado por la inteligencia autoral como real dentro de tales límites, nos permite indagar con mucha mayor profundidad en las estrategias poetológicas utilizadas para lograr edificar dicho mundo.

Así, enfocándome en los dos cuentos a los que mis aportaciones a esta investigación se dedicaron, en el artículo

sobre el motivo del doble en el “William Wilson” nos fue posible explorar dos líneas de análisis: una en la que el doble del Wilson narrador es una mera alegoría de una crisis de personalidad del personaje en la que incluso el epígrafe donde se cita a Chamberlayne sugiere que el cuento estará repleto de conflictos éticos y morales enfrentados a la constante intervención de ese presunto doble, y otra en la que la constante ambigüedad que se manifiesta durante toda la lectura del “William Wilson” es una estrategia poetológica digna de analizar sin que esto signifique tratar de dar una explicación racional a los sucesos para eliminar las sensaciones de miedo producidas en el lector. Además, al explorar esta segunda línea de investigación, nos fue posible mirar desde otro ángulo elementos como el ya mencionado epígrafe, el cual, según explicamos en el artículo, bien puede otorgar una clave distinta a sus lectores a partir de la palabra “espectro”, pues si se desprende a la misma de su significado de monstruo o fantasma que, en el caso específico del “William Wilson”, va a colocar al personaje principal en un enfrentamiento entre la inmoralidad y los límites éticos, nos remite en su lugar a su sentido etimológico más antiguo: el de reflejo; ese reflejo que, desde una mirada poetológica, nos habla de una conciencia llena de incertidumbre.

En cuanto a las indagaciones que se hicieron a través del artículo sobre Amparo Dávila, considero que es importante resaltar que la mayoría de las investigaciones académicas hechas sobre el cuento “El huésped” giran alrededor de afirmar que la narradora padece algún tipo de desorden psiquiátrico ocasionado por la violencia doméstica que sufre y, por lo tanto, el “huésped” es una criatura imaginada por ella. Sin embargo, en dicho artículo nosotros defendemos que la

existencia de la criatura dentro del mundo edificado por la inteligencia autoral de Dávila es real, por lo que en lugar de pensar en ella como una alucinación nos enfocamos en proponer dos hipótesis en las que el “huésped” es un desdoblamiento de identidad ya sea del marido de la protagonista o de esta última. En la primera hipótesis sugerimos que la criatura es un doble aliado o suplente del marido que lo sustituye en su tarea de vigilar a la esposa mientras éste se encuentra ausente. Es decir, el “huésped” se manifiesta como la monstruosidad y el abuso, ya no ocultos tras una apariencia humana, del marido. En la segunda hipótesis, por su parte, ahondamos en el concepto de la angustia como aquél que coloca a la narradora al borde de una crisis de identidad en la que finalmente cae y que la desprende de su espacio vital: la deja sin ese hogar interno, si seguimos el concepto de *homeless* propuesto por Andrew J. Webber (1996). Es decir, la criatura, como doble de esta última, la orilla a una serie de enfrentamientos con la poca libertad que tiene dentro de su propia casa y que, al final del relato, la obligan a encerrar al “huésped” para provocarle su muerte y, entonces, regresar a ese origen —doloroso y violento, sí, pero que ya había hecho costumbre— en el que se encontraba antes de la llegada del huésped.

Cabe agregar, además, que otro de los aportes más importantes que se despliegan en este artículo es la asociación del “huésped” con la *figura del umbral* (*Schwellenfigur*) descrita por Rolf Parr (2009), pues dicho concepto nos permite volver a la estrategia poetológica de la ambigüedad utilizada por Dávila para, por ejemplo, limitar la descripción de la criatura monstruosa a sus ojos amarillos. Al hacer esto, entonces, el “huésped” se convierte en un ser que no solamente inflige terror objetivo, sino que se

convierte en fuente primordial de la incertidumbre de la que brotan los escalofríos del lector al colocarse justo en el límite entre lo conocido y aquello que permanece en las sombras de lo enigmático. Es en este sentido en el que podemos afirmar que el recurrir a una investigación que parte de la premisa de que el llamado “realismo” no es un reflejo de la realidad, sino que cada inteligencia autoral construye un mundo real dentro de los propios límites de su texto literario, nos da la pauta para comenzar a indagar en las cuestiones poetológicas que hacen de obras como el “William Wilson” y “El huésped” construcciones artísticas magistrales dignas de analizar desde la literatura.

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi agradecimiento al Dr. Gerardo Argüelles por permitirme formar parte de esta ardua investigación, pues ha sido gracias a su guía como mentor que me ha sido posible estudiar a profundidad temas literarios tan complejos como lo es el motivo del doble, generar aportes relevantes al respecto y elaborar trabajos escriturales con el nivel necesario para pensar en su publicación. De igual manera, agradezco a mis compañeras becarias y a las traductoras que trabajan con el Dr. Argüelles por su apoyo académico en los dos artículos en los que tuve la oportunidad de participar.

Referencias bibliográficas

Argüelles, G. (2021). „Sobre el arribo del concepto del mundo-de-la-vida (*Lebenswelt*) a los estudios literarios. *Open Insight*. Vol. XII, No. 25, pp. 66-90.

Gerigk, H-J. (2016). “Ciencia literaria. ¿Qué es eso?”. *Semiosis* Vol. XII, No. 24, pp. 9-43.

Lukacs, G. (2001). “Realism in the balance.” *The Norton Anthology of Theory and Criticism*. Editado por Vincent B. Leitch, pp. 1033-1056. New York: W.W. Norton & Company.

Parr, R. (2009). “Monströse Körper und Schwellenfiguren als Faszinations- und Narrationstypen ästhetischen Differenzgewinns”. En A. Geisenhanslüke y G. Mein (Eds.), *Monströse Ordnungen. Zur Typologie und Ästhetik des Anormalen* (pp. 19-42). Bielefeld: Transcript Verlag.

Vergara, M-T. (2021). “Sobre el concepto de “realismo” en la teoría literaria bajo un enfoque fenomenológico” [Tesis de licenciatura no publicada en trámite de defensa]. México: Universidad Autónoma de Querétaro.

Webber, A. J. (1996). *The Doppelgänger: Double visions in German Literature*. Oxford: Clarendon Press.

Efectos del consumo de hoja de frijol en la morfología del intestino delgado.

Borges Garcia Inti Atzayacatl¹, Perla Viridiana Ocampo-Anguiano², Santiago Marisela Ahumada-Solórzano³

¹ Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. iborges23@alumnos.uaq.mx.

² Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. perla_viri_25@hotmail.com

³ Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. santiago.marisela.ahumada@uaq.mx

Resumen

El epitelio del intestino delgado es la primera barrera celular entre el lumen del intestino y el sistema circulatorio. Su permeabilidad influye en la salud de todo el organismo y se encuentra regulada por las proteínas de unión estrecha (TJs): zonula occludens, claudina y ocludina. Una dieta alta en grasa y fructosa disrumpe la permeabilidad del epitelio al inhibir la expresión de las TJs, esto resulta en una inflamación local en el intestino y riesgo de endotoxemia debido a la filtración de partículas patógenas del lumen intestinal hacia el sistema circulatorio. La fibra es un componente natural que ha demostrado ser capaz de reducir la inflamación en el intestino. La hoja de frijol (*Phaseolus vulgaris*) tiene una alta cantidad de fibra por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del consumo de este alimento en la recuperación de la

permeabilidad y la morfología del intestino delgado en ratas con alteraciones tempranas por una dieta alta en grasa y fructosa. Los animales fueron alimentados por 6 semanas con una dieta estándar y una hipercalórica, ambas suplementadas con hoja de frijol. En la eutanasia se recolectaron muestras de yeyuno para su análisis morfológico. Los resultados indican en primera instancia que la implementación de la hoja de frijol no influye en la mejora de la morfología intestinal, sin embargo, es necesario ampliar el número de muestras en el análisis para comparar de manera estadística los resultados. De igual forma es necesario considerar otros parámetros como la profundidad de las criptas.

Palabras clave *Phaseolus vulgaris*, hoja de frijol, proteínas de unión estrecha, yeyuno.

Abstract

The small intestine epithelium is the first cellular barrier between the lumen and the circulatory system. Its permeability depends upon tight junction proteins (TJs): zonula occludens, claudin and occludin and it has a big impact in the organism's wellbeing. High fat and fructose diets disrupt the permeability of the epithelium due to an inhibitory effect of TJs; this results in local inflammation of the gut and endotoxaemia derived from the leak of pathogenic molecules from the lumen into the bloodstream. Fiber is a natural molecule that's been demonstrated to ease gut inflammation and it is found in a fair quantity in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves. The objective of this study was to assess the effect of supplementation of bean leaves in the

recovery of gut permeability and morphology in rats fed with a hypercaloric diet. The animals were fed for 6 weeks with a standard diet and a high fat and fructose diet, both supplemented with bean leaves. After euthanasia, their jejunum was extracted for morphological analysis. Results show no correlation between bean leaves and gut restoration however, more samples are needed from each subject to obtain statistical and reliable results. Furthermore, it is necessary to consider other parameters such as crypt depth.

Key words *Phaseolus vulgaris*, bean leaves, tight junction proteins, jejunum.

Introducción

El intestino delgado es un órgano importante del sistema digestivo en donde ocurre la degradación y la mayor absorción de nutrientes que aportan la dieta de un individuo. Puede tener un largo de 3 a 5 metros y se divide en tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon (Collins et al., 2020). Este órgano se encuentra recubierto por una monocapa epitelial que tiene dos funciones esenciales las cuales son: dejar pasar selectivamente los nutrientes de la dieta, así como agua y electrolitos, y prohibir el paso de toxinas (Slifer & Blikslager, 2020).

En 1963 se descubrió la existencia de complejos de unión entre las células de diversos epitelios (Farquhar & Palade, 1963). Estos complejos se encuentran conformados por uniones estrechas (TJs), uniones de adherencia (AJs) y desmosomas. Las TJs se encuentran en el ápice de las células endoteliales. Tienen un papel importante en la permeabilidad del

endotelio al formar barreras de difusión (Heinemann & Schuetz, 2019).

Por su parte, las uniones estrechas se conforman por proteínas transmembranales (TM) y la placa citoplasmática. Entre las proteínas transmembranales se encuentran la claudina y las ocludinas. La placa citoplasmática está constituida por las proteínas *zonula occludens* ZO-1, ZO-2 y ZO-3 y los complejos PAR-3/PAR-6/aPKC y Crumbs/PALS1/PATJ (Heinemann & Schuetz, 2019).

Las claudinas son las proteínas TM más abundantes en las TJs. Existen 23 claudinas diferentes en los humanos que, a pesar de ser homólogas, tienen muy pocas regiones conservadas. Se dividen en dos grupos de acuerdo a su función: formación de barreras o canales (Heinemann & Schuetz, 2019). Un estudio cristalográfico (H. Suzuki et al., 2014) reveló la estructura de las claudinas. Cuatro hélices anti-paralelas transmembranales con los extremos N y C terminales del lado citoplasmático. Del lado extracelular se encuentran 5 láminas beta anti-paralelas que interactúan entre sí en uniones *cis* dentro de la misma membrana y *trans* entre membranas.

Las ocludinas son proteínas transmembranales que tienen una estructura similar a las claudinas en cuanto a sus cuatro dominios TM. Las diferencias notables entre los dos tipos de proteínas TM se encuentran en las estructuras extracelular y las citoplasmáticas (Heinemann & Schuetz, 2019).

Las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3 pertenecen a la familia de proteínas MAGUK las cuales contienen tres dominios: PDZ, SH3 y GUK. El dominio PDZ puede reconocer motivos C-terminales específicos tales como los que

se encuentran en la mayoría de las claudinas (Lorenza González-Mariscal et al., 2019). El dominio GUK es homólogo a la guanilato cinasa; sin embargo, carece de actividad catalítica que, en este escenario, permite la interacción proteína-proteína con el extremo C-terminal de la ocludina (L. González-Mariscal et al., 2000).

A parte de los dominios ya mencionados, ZO-1, ZO-2 y ZO-3 también tienen un dominio de unión a la F-actina. Estas proteínas sirven como puente entre las TMs y el citoesqueleto. Esta interacción otorga estabilidad estructural a las TJs y por ende regulan la permeabilidad del endotelio (Fanning et al., 2002).

Alteraciones en la expresión de las proteínas TJ se asocian a diversas enfermedades como cáncer, fibrosis quística, la enfermedad de Crohn y endotoxemia, entre otras (Zeisel et al., n.d.). Se han realizado estudios que demuestran que dietas altas en grasa y fructosa resultan en endotoxemia debido a un aumento en la permeabilidad del intestino que permite el paso de lipopolisacárido (LPS), producido por bacterias entéricas Gram negativas, hacia el torrente sanguíneo. Esto se relaciona a una disminución en la expresión de las proteínas TJ (Paula Boroni Moreira et al., 2021)(Do et al., 2018).

La pérdida de permeabilidad afecta a nivel local facilitando la infiltración de bacterias o antígenos patógeno, lo cual induce la expresión de citocinas proinflamatorias (Esposito et al., 2018). También se ha señalado que la grasa por sí misma puede activar células inmunitarias que liberan citosinas proinflamatorias (T. Suzuki, 2020).

A nivel histológico se ha reportado edema, pérdida del ápice y acortamiento de las vellosidades debido a la inflamación (Su et al., 2019). Una dieta con grasa resulta también en una disminución en el número de vellosidades y ensanchamiento de las mismas (Ruan et al., 2021). La inflamación también ocasiona hiperplasia de las criptas, pérdida de células caliciformes, abscesos en las criptas e infiltración de más leucocitos (Erben et al., 2014).

En diversos estudios se ha reportado el efecto de los carbohidratos accesibles a microbiota (MACs) en la permeabilidad intestinal. Dichos MACs demostraron restaurar la permeabilidad del epitelio al regular tanto la expresión de proteínas TJ como la activación de células inmunitarias (Usuda et al., 2021) (Makki et al., 2018).

La hoja de frijol (*Phaseolus vulgaris*) tiene un alto contenido de proteínas (Martínez-Zavala et al., 2016) y compuestos fenólicos (Ocampo, P, 2020). En particular la fibra en la hoja de frijol podría suponer un elemento importante para restaurar la permeabilidad intestinal y la morfología al ser incorporado en la dieta.

Objetivos

El propósito de esta investigación es observar si la implementación de hoja de frijol en la dieta de ratas con una alimentación alta en grasa y fructosa afecta en la morfología del yeyuno.

Metodología

Obtención de imágenes de yeyuno

Se utilizó un microscopio VELAB Ve-b5 para tomar fotografías de cortes transversales de yeyuno de ratas Wistar. Las capturas fueron tomadas a 4x y 10x de ratas pertenecientes a cuatro grupos de estudio diferentes: control (C), control + hoja de frijol (CHF), dieta hipercalórica (O) y O + hoja de frijol (OHF). Cada grupo estaba constituido por cuatro ratas.

Análisis morfológico y conteo

Utilizando el software ImageJ, del Instituto Nacional de Salud (NIH), se realizaron las mediciones de la longitud y el grosor de las vellosidades. Se midieron tres vellosidades utilizando las fotografías a 10x de cada una de las ratas de cada grupo experimental. Se obtuvo el promedio de las medidas y la desviación estándar (SD) por rata y posteriormente se utilizó el programa GraphPad Prism 9 para graficar los promedios de cada grupo y sus SD.

Se utilizaron las imágenes a 4x para el conteo de vellosidades. El análisis morfológico se realizó de manera general. Se consideró una vellosidad a cualquier prolongación que tuviera su ápice completo.

Resultados

Medición de las vellosidades

En la figura 1 se observa que el grupo C en comparación al O presenta una mayor longitud de sus vellosidades. De igual manera el grupo CHF exhibió una mayor altura que el grupo OHF. El grupo C demostró una mayor altura en promedio que el grupo CHF al igual que el O en comparación al OHF.

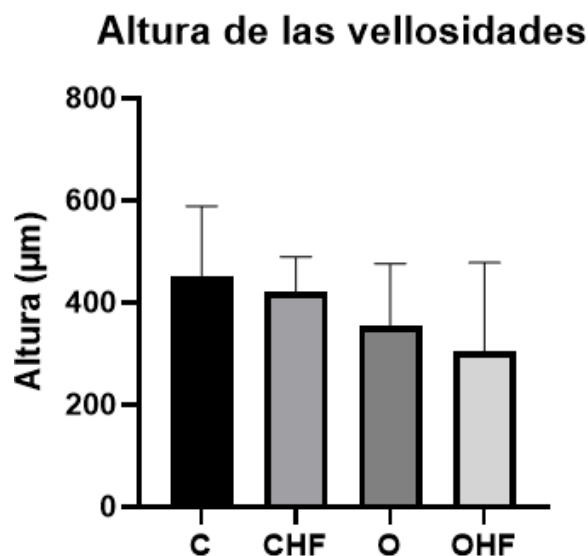


Fig. 1 Medición de la altura de las vellosidades. Se muestran las medias de cada grupo \pm SD. C \pm 127.36 (n=6). CHF \pm 67.95 (n=12). O \pm 120.80 (n=19). OHF \pm 173.32 (n=14).

El grosor de las vellosidades del grupo C en comparación al grupo O es menor, tal y como se muestra en la figura 2. Se observa una mínima diferencia en el promedio de los grosores entre el grupo CHF y el OHF. No se observan diferencias en los promedios de los grupos O con OHF. Hay un ligero incremento en el grosor entre el grupo C y el CHF.

Las tendencias observadas entre las medias de los grupos C y O en las figuras 1 y 2 corresponden con lo reportado por (Su et al., 2019). En dicho estudio las vellosidades en el grupo sano con dieta estándar (SN) eran más largas y delgadas que aquellas en el grupo enfermo con dieta alta en grasa (HN). Las ratas del grupo HN presentaron pérdida del ápice debido a un ensanchamiento de la punta de las vellosidades.

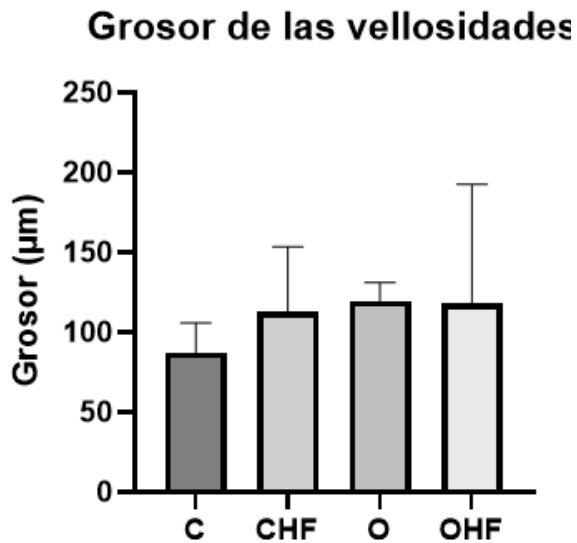


Fig. 2 Medición del grosor de las vellosidades. Se muestran las medias de cada grupo \pm SD. C \pm 87.43 (n=6). CHF \pm 112.92 (n=12). O \pm 119.44 (n=19). OHF \pm 94.62 (n=14).

Análisis morfológico

En las figuras 3a y 3b se aprecia un bajo número de vellosidades y alta destrucción del epitelio. Esto se puede atribuir a una mala manipulación del tejido durante su procesamiento para ser evaluado. En la figura 3b se observan lo que se consideró como una vellosidad completa.

Al comparar las pocas vellosidades observadas en la figura 3a con las de la figura 3c, se puede apreciar la gran diferencia en el grosor entre ratas sanas con ratas obesas. Entre el grupo C y CHF (figuras 3a y 3b) se observa que las vellosidades son más gruesas en el grupo CHF. En las figuras 3c y 3d se observan diferencias en grosor entre el grupo O y OHF, donde c es el grupo que más

incremento tuvo en el grosor, pero más bajo en altura, situación que sugiere ser modificada de forma positiva en OHF sin embargo no hubo diferencia significativa, por lo que es necesario realizar más análisis al respecto.

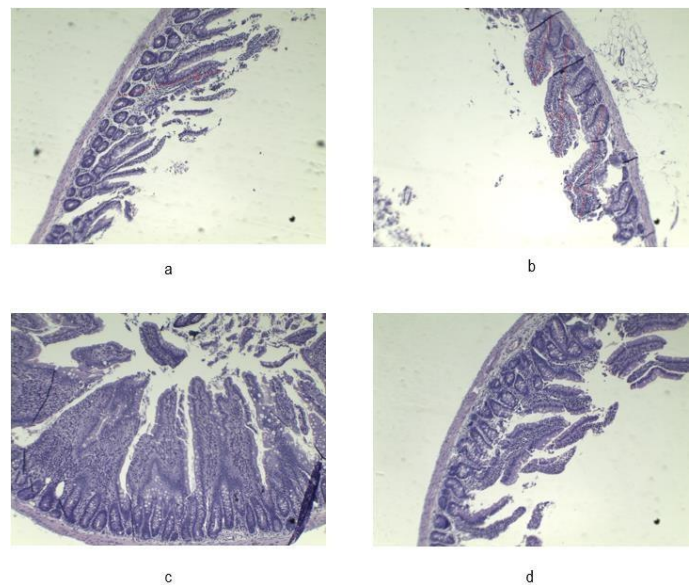


Fig. 3 Laminillas pertenecientes a cada uno de los grupos experimentales, 10x. a) C. b) CHF. c) O. d) OHF.

Discusión y conclusiones

Las tendencias observadas entre las medias de los grupos control tanto para las alturas como los grosores de las vellosidades concuerdan con lo anteriormente reportado. La respuesta de inflamación causada por la dieta alta en grasa y fructosa resulta en un ensanchamiento de las vellosidades por la filtración de líquido hacia el epitelio.

La pérdida en altura se debe posiblemente a la apoptosis de las células epiteliales inducidas por las citocinas liberadas durante la respuesta inmunitaria. Se ha demostrado que las citosinas IFN- γ y TNF pueden inducir la apoptosis de las células epiteliales (Cominelli et al., 2018).

(Satokari, 2020) menciona que la dieta alta en fructosa promueve el crecimiento de bacterias con características proinflamatorias. Las citosinas IFN- γ , TNF α e IL-1 liberadas por la activación de células inmunitarias reducen la expresión de las TJs. La bilis ácida liberada para la digestión de las grasas también afecta la expresión de las proteínas. Se ha observado que los ácidos grasos desplazan a las TJs, disruptiendo la estructura y aumenta la permeabilidad (T. Suzuki, 2020).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente se espera una reducción en la expresión de proteínas de unión estrecha en el grupo O en comparación al C. El grupo OHF debería presentar un aumento en la expresión en comparación al O debido a los efectos antiinflamatorios de la fibra. Para medir esto aún se necesitan realizar estudios de expresión genética por medio de RT-qPCR e inmunodetección.

La altura promedio en los grupos OHF en comparación con los O fue menor. La fibra en la hoja de frijol debería reducir los efectos inflamatorios de la dieta alta en grasa y fructosa de las ratas en el grupo O. Se esperaba que las vellosidades del grupo OHF en promedio fueran más altas que en las ratas obesas debido a una menor destrucción del epitelio.

En cuanto al grosor de las vellosidades se esperaba que este fuera menor en el grupo OHF en comparación al O. Esto debido a los efectos antiinflamatorios de la hoja de frijol lo cual reduciría el edema en las ratas del grupo OHF.

A pesar de que en las figuras 1 y 2 se observa la tendencia adecuada entre los grupos C y O los valores no son estadísticamente diferentes. Esto indica que las diferencias no son significativas y

no se puede atribuir de manera confiable que las diferencias morfológicas se deben a la dieta.

Otras complicaciones durante el análisis de las laminillas fueron la falta de muestras del sujeto de prueba 1 del grupo C y en general no había suficientes muestras de los demás sujetos para realizar un buen análisis comparativo. De igual manera, en muchas laminillas se observó la destrucción del epitelio ocasionado por el manejo brusco del tejido por lo que no se puede asumir con seguridad que el daño fue causado por la dieta.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano por aceptarme en su grupo de trabajo, así como a la Mtra. Perla Viridiana Ocampo Anguiano por permitirme ayudarlo en su investigación. De igual manera agradezco a todo el equipo del laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Y al Verano de la Ciencia 2021 por la Dirección de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Referencias

- Collins, J. T., Nguyen, A., & Badireddy, M. (2020). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestine. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459366/>
- Cominelli, F., Ivanov, A., Andrews, C., Mclean, M. H., & Durum, S. K. (2018). Cytokine Tuning of intestinal epithelial Function. *Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function. Front. Immunol*, 9, 1270. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01270>

- Do, M. H., Lee, E., Oh, M.-J., Kim, Y., & Park, H.-Y. (2018). *High-Glucose or-Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change*.
<https://doi.org/10.3390/nu10060761>
- Erben, U., Loddenkemper, C., Doerfel, K., Spieckermann, S., Haller, D., Heimesaat, M. M., Zeitz, M., Siegmund, B., & Kühl, A. A. (2014). A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(8), 4557. /pmc/articles/PMC4152019/
- Esposito, G., Pagano, E., Ii, F., Kaji, I. I., Scarpignato, C., Colucci, R., Pellegrini, C., Fornai, M., Tirota, E., Antonioli, L., Renzulli, C., Ghelardi, E., Piccoli, E., Gentile, D., Benvenuti, L., Natale, G., Fulceri, F., Palazón-Riquelme, P., López-Castejón, G., & Blandizzi, C. (2018). *Pathophysiology of NSAID-Associated Intestinal Lesions in the Rat: Luminal Bacteria and Mucosal Inflammation as Targets for Prevention*.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01340>
- Fanning, A. S., Ma, T. Y., & Anderson, J. M. (2002). Isolation and functional characterization of the actin-binding region in the tight junction protein ZO-1. *The FASEB Journal*.
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0121fje>
- Farquhar, M. G., & Palade, G. E. (n.d.). *JUNCTIONAL COMPLEXES IN VARIOUS EPITHELIA*. <http://rupress.org/jcb/article-pdf/17/2/375/1401642/375.pdf>
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., & Ávila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 11(4), 315–324.
<https://doi.org/10.1006/SCDB.2000.0178>
- González-Mariscal, Lorenza, Gallego-Gutiérrez, H., González-González, L., & Hernández-Guzmán, C. (n.d.). *Molecular Sciences ZO-2 Is a Master Regulator of Gene Expression, Cell Proliferation, Cytoarchitecture, and Cell Size*.
<https://doi.org/10.3390/ijms20174128>
- Heinemann, U., & Schuetz, A. (2019). *Molecular Sciences Structural Features of Tight-Junction Proteins*.
<https://doi.org/10.3390/ijms20236020>
- Martínez-Zavala, M., Mora-Avilés, M. A., Anaya-Loyola, M. A., Guzmán-Maldonado, H., Aguilera-Barreyro, A., Blanco-Labra, A., & García-Gasca, T. (2016). Common Bean Leaves as a Source of Dietary Iron: Functional Test in an Iron-Deficient Rat Model. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(3), 259–264.
- O.Anguiano, P. V. (2020). *Análisis de la composición y efecto del consumo de hoja de frijol (Phaseolus vulgaris L.) en ratas Wistar con obesidad y/o diabetes mellitus*. [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Querétaro].<https://doi.org/10.1007/s11130-016-0554-5>
- Paula Boroni Moreira, A., Fische Salles Teixeira, T., Barbosa Ferreira, A., do Carmo Gouveia Peluzio, M., & de Cássia Gonçalves Alfenas, R. (2021). *Review Article Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia*.
<https://doi.org/10.1017/S0007114512001213>
- Ruan, M., Bu, Y., Wu, F., Zhang, S., Chen, R., Li, N., Liu, Z., & Wang, H. (2021). Chronic consumption of thermally processed palm oil or canola oil modified gut microflora of rats. *Food Science and Human Wellness*, 10, 94–102.
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2020.06.005>
- Satokari, R. (2020). High Intake of Sugar and the Balance between Pro- and Anti-Inflammatory Gut Bacteria. *Nutrients*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/nu12051348>
- Slifer, Z. M., & Blikslager, A. T. (n.d.). *Molecular Sciences The Integral Role of Tight Junction Proteins in the Repair of Injured Intestinal Epithelium*.
<https://doi.org/10.3390/ijms21030972>
- Su, Y.-R., Hong, Y.-P., Mei, F.-C., Wang, C.-Y., Li, M., Zhou, Y., Zhao, K.-L., Yu, J., & Wang, W.-X. (2019). *High-Fat Diet Aggravates the Intestinal Barrier Injury via TLR4-RIP3 Pathway in a Rat Model of Severe Acute Pancreatitis*.
<https://doi.org/10.1155/2019/2512687>

Suzuki, H., Nishizawa, T., Tani, K., Yamazaki, Y., Tamura, A., Ishitani, R., Dohmae, N., Tsukita, S., Nureki, O., & Fujiyoshi, Y. (2014). Crystal Structure of a Claudin Provides Insight into the Architecture of Tight Junctions. *Science*, *344*(6181), 304–307.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1248571>

Suzuki, T. (2020). Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal Science Journal*, *91*(1).
<https://doi.org/10.1111/asj.13357>

The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease | Elsevier Enhanced Reader. (n.d.). Retrieved August 25, 2021, from
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S193131281830266X?token=D1F651EF6AB2A5EC6FD34F5D2E83B42BD07688DF478A948590D79FBF2906E9C4A41E6786A085B567079EA3693CA56FFD&originRegion=us-east-1&originCreation=20210825185015>

Usuda, H., Okamoto, T., & Wada, K. (2021). *Molecular Sciences Leaky Gut: Effect of Dietary Fiber and Fats on Microbiome and Intestinal Barrier*.
<https://doi.org/10.3390/ijms22147613>

Zeisel, M. B., Dhawan, P., Baumert, T. F., Thomas, P., & Baumert, F. (n.d.). *Tight junction proteins in gastrointestinal and liver disease HHS Public Access*.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316906>

Perfil fenólico y efecto citotóxico de dos extractos acuoso de hoja de *Cnidoscolus Aconitifolius* y de *Aloe Barbadensis* en cáncer de colon in vitro

Ibarra-Miranda Susana, Hernández-Santillán José Miguel, ¹Vargas-Madriz Ángel Félix, ¹Kuri-García Aarón.

¹ Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, México.

Resumen

El cáncer de colon es el segundo tipo de cáncer más común. En México, en el 2002 se registraron un total de 3,791 nuevos casos de cáncer de colon, situación que motivó que esta neoplasia se ubique de las primeras 10 causas de morbilidad por neoplasias malignas en México. Uno de los tratamientos para la prevención del cáncer es el consumo de antioxidantes, ya que se ha observado que el daño causado por los radicales. Se ha encontrado en las hojas de chaya y en la aloe vera propiedades antioxidantes. Es por ello que en el presente estudio se buscó analizar los compuestos fenólicos totales y los flavonoides totales de la *Cnidoscolus Aconitifolius* y *Aloe Barbadensis* Miller y se buscó determinar el efecto citotóxico en células de cáncer de colon. Para la determinación de compuestos fenólicos totales, se

llevó a cabo con el método de Folin-Ciocalteu por triplicado, y para la determinación de flavonoides totales se utilizó el método colorimétrico de cloruro de aluminio triplicado. Como resultados se observó que en el caso de *Cnidoscolus Aconitifolius* se observó que presentó mayor cantidad de CFT en comparación de *Aloe Barbadensis* con una diferencia estadística significativa. Por el otro lado, no se observó una diferencia estadística significativa en los FT entre los dos extractos. En conclusión ambos extractos tienen efectos citotóxicos similares en la línea celular HT-29 a 24 horas de la exposición al tratamiento. Se requiere más investigación para continuar con el proceso de búsqueda de compuestos bioactivos de los alimentos nativos mexicanos.

Palabras clave: *Cnidoscolus Aconitifolius*, chaya, *Aloe Barbadensis*, flor de aloe vera, cáncer de colon, fenoles.

Abstract

Colon cancer is the second most common type of cancer. In Mexico, in 2002, a total of 3,791 new cases of colon cancer were registered, a situation that made this neoplasm one of the first 10 causes of morbidity due to malignant neoplasms in Mexico. One of the treatments for cancer prevention is the consumption of antioxidants, since it has been observed that the damage caused by radicals. Antioxidant properties have been found in chaya leaves and aloe vera. That is why in the present study we sought to analyze the total phenolic compounds and total flavonoids of *Cnidoscolus Aconitifolius* and *Aloe Barbadensis* Miller and to determine the cytotoxic effect on colon cancer cells. For the determination of total phenolic compounds, the Folin-Ciocalteu method

was used in triplicate, and for the determination of total flavonoids, the aluminum chloride colorimetric method was used in triplicate. As results it was observed that in the case of *Cnidioscolus Aconitifolius* it was observed that it presented a greater amount of CFT compared to *Aloe Barbadensis* with a significant statistical difference. On the other hand, no significant statistical difference was observed in the TF between the two extracts. In conclusion both extracts have similar cytotoxic effects on HT-29 cell line at 24 hours of treatment exposure. Further research is required to continue the process of searching for bioactive compounds from native Mexican foods.

Key words: *Cnidioscolus Aconitifolius*, chaya, *Aloe Barbadensis*, aloe vera flower, colon cancer, phenols.

Introducción

El cáncer de colon es una enfermedad en donde se forman células transformadas malignas. El cáncer de colon se origina en crecimientos benignos llamados pólipos los cuales, tienen el potencial de transformarse en malignos, pero aquellos que tienen tal capacidad se denominan adenomas. En la mayoría de los casos, a un adenoma le llevamos de 10 años convertirse en cáncer. En general, el cáncer colorrectal es el segundo tipo de cáncer mortífero más común, y la tercera causa más común de muertes relacionadas al cáncer en los Estados Unidos, tanto en hombres como en mujeres (Tirado & Mohar, 2008).

En México, se carece de información sobre la tasa de incidencia del cáncer colorrectal ya que no existen registros poblacionales que permitan el cálculo de la misma, sin embargo, se tiene el número de casos nuevos notificados por los patólogos y médicos oncólogos incorporados al Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas

(RHNM). En el 2002, se registraron un total de 108,064 casos nuevos con diagnóstico histopatológico de cáncer; del total de casos nuevos, 3,791 (3.5%) correspondieron a cáncer de colon (2.3%) y cáncer de recto (1.2%), situación que motivó que esta neoplasia se ubique de las primeras 10 causas de morbilidad por neoplasias malignas en México, específicamente en el tercer lugar. Se puede afirmar, que la alta incidencia de colorrectal en el mundo occidental es debida tanto a factores ambientales como a una dieta fundamentalmente rica en grasa y proteínas, y pobre en fibra y vegetales, así como al progresivo envejecimiento de la población (Tirado & Mohar, 2008).

Uno de los tratamientos para la prevención del cáncer es el consumo de antioxidantes. Ya que el cáncer es *per se* una enfermedad inductora de estrés oxidativo. Las células neoplásicas producen de forma intrínseca una cantidad de especies reactivas del oxígeno (ERO), y en concentraciones elevadas de éstas, interaccionan con macromoléculas como los lípidos de membrana, las proteínas y el ADN, ocasionando daño oxidativo irreversible y alterando las funciones vitales de la célula (Viñas et al., 2012).

Y el daño oxidativo del ADN no reparado puede conducir a la acumulación de mutaciones que promueven el cáncer (Irrazabal et al., 2021).

La investigación realizada de esta manera ha observado que el daño causado por los radicales libres puede mitigarse suplementando uno o más antioxidantes. Por lo tanto, se han encontrado en plantas varios compuestos con diferentes propiedades antioxidantes, y se considera que estas plantas tienen un alto potencial biológico para prevenir y tratar el daño causado por los radicales libres (A. et al., 2017).

Las medicinas tradicionales y las plantas medicinales se utilizan ampliamente en la mayoría de los países en desarrollo y se consideran agentes terapéuticos para mantener una buena salud. Durante décadas, la gente ha realizado varios estudios sobre plantas medicinales y sus componentes. Uno de ellos se centra en la composición de unos compuestos, principalmente compuestos fenólicos, porque tienen múltiples beneficios en la lucha contra las enfermedades crónicas, como las cardiovasculares, la neurodegeneración y el cáncer (A. et al., 2017).

Chaya se refiere a cualquier grupo de plantas del género *Cnidoscolus*, que forma parte de la familia Euphorbiaceae. El género está compuesto por 50 especies, 20 de las cuales son endémicas de México. *Cnidoscolus aconitifolius* tiene cinco pétalos con lóbulos y bordes dentados, pecíolos largos, sin pubescencia, base sagital, glándulas y flores blancas. La chaya se ha utilizado como alimento desde antes de la era de Colón y actualmente se consume con frecuencia en ciertas poblaciones. Además, se ha descubierto que las hojas de té son una fuente importante de proteínas, β -caroteno, vitaminas, ácido ascórbico, calcio, potasio y hierro. Según los informes, las hojas de té se utilizan en la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades, tiene propiedades antidiabéticas, antioxidantes, hepatoprotectoras y está relacionada con las hormonas del eje pituitario-gonadal. (A. et al., 2017)

De igual manera, el aloe vera se ha utilizado durante mucho en productos de alimentos saludables, para fines médicos y cosméticos. Los informes atribuyen al Aloe propiedades antitumorales y antidiabéticas, además de su

eficacia en el tratamiento de las úlceras gástricas. Las actividades antiinflamatorias de componentes de las especies Aloe también se han investigado. En un estudio de Davis et al. demostraron las propiedades de cicatrización de heridas de *A. Barbadensis* y de cicatrización de heridas de *A. Barbadenis* (Lee et al., 2000).

El Aloe es una suculenta tropical resistente a la sequía. En botánica se conoce como Aloe vera (L.) Webb. (*Aloe barbadensis* Mill.) de la familia Liliaceae. El aloe vera es la variedad de aloe más común. Es originaria de la región mediterránea, la península arábiga, la India, China y el este de África. Las hojas están llenas de un jugo lechoso de color marrón o amarillito que contiene la mayoría de los compuestos bioactivos (Heş et al., 2019).

El aloe vera (*Aloe barbadensis* Mill./*Aloe vera* Linn), es la variedad de aloe más común. Es una planta perenne de tallo corto, que crece hasta una altura de 60-100 cm. Las plantas de aloe tienen hojas gruesas, verdes o grises y hojas carnosas de color verde en forma de espada. Los bordes de las hojas tienen espinas triangulares. El brote floral, que crece en verano, está formado por numerosas flores de color rosa y naranja en forma de campana. (Heş et al., 2019)

Es por ello que en el presente estudio busca analizar los compuestos fenólicos totales y los flavonoides totales de la *Cnidoscolus Aconitifolius* y *Aloe Barbadensis Miller* y el efecto citotóxico en células de cáncer de colon.

Materiales y métodos

Obtención de la muestra

Para obtener la muestra de chaya y la flor de aloe vera, se cosecharon y se secaron en un horno de aire forzado (Shel lab Fx 1375, North Carolina, USA) a 40°C aproximadamente 48 horas, hasta obtener un peso constante obteniendo una materia seca. Posteriormente, se molió la materia seca en un molino eléctrico con un diámetro de criba de 0.5mm (Thomas Wiley Model 4 Scientific, New Jersey, USA). El polvo molido se colectó en bolsas oscuras para protegerlas de la luz y temperatura en un ultracongelador (REVCO last II, Ohio, USA) a -80°C para su análisis.

Obtención del extracto

Se pesaron 200 mg de materia seca y molida, se extrajeron con 10 ml de agua durante 30 min con ayuda de un ultrasonificador (modelo BRANSON 5510) a 42 kHz +/- 6% a temperatura ambiente en ausencia de luz. Posteriormente el extracto se filtró a través de papel Whatman (0.20 µm), el sobrenadante obtenido se almacenó en frascos color ámbar a -80°C hasta su análisis.

Determinación de los compuestos fenólicos totales

Para la determinación de los compuestos fenólicos, éstos se determinaron espectrofotométricamente de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu por triplicado. Se realizó la curva de calibración para fenoles totales utilizando ácido gálico como estándar en las concentraciones (peso/volumen) de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 µl. Se tomó una alícuota del extracto (12.5 µl) y se llevó a un volumen de 50 µl de agua destilada. Posteriormente se mezcló con 32 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N), se le agregaron 156 µl de NaCo3 al 20% y se dejó reposar en ausencia de luz durante 2 horas a temperatura ambiente. El control se reparó de manera similar reemplazando la cantidad de muestra con agua destilada. Después de 2 horas se midió la

absorbancia de cada una de las muestras en un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 750 nm y los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por 100g de materia seca (mg EAG/100 g MS)

Determinación de los flavonoides totales

Para la determinación de flavonoides totales, se utilizó el método colorimétrico de cloruro de aluminio triplicado. Se realizó la curva de calibración utilizando catequina como estándar en las concentraciones (peso/volumen) de 100, 200, 300, 500, 700, 900, 1000 µl. Se tomó una alícuota del extracto (31.25 µl) y se añadieron 156 µl de agua destilada, después se añadieron 9.4 µl de NaNO2 al 5% y se dejó reposar durante 6 min, posteriormente se agregó AlCl3 al 10% y se dejó reposar por 5 min, después se añadió 63 µl de NaOH (1M); Finalmente se agregó 35 µl de agua destilada. El control se preparó de manera similar reemplazando la cantidad de muestra con agua destilada. La curva y la muestra se leyeron a 510 nm y los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de catequina por 100 g de materia seca (mg EC/100 g MS).

Determinación del efecto citotóxico

Se utilizaron cultivos celulares de cáncer de colon (HT29). A partir de estos cultivos celulares confluentes al 80%, se hicieron suspensiones de 5×10^3 células por 500 µL de medio de crecimiento, se sembrarán en 14 pozos de unaplaca de 24 (Nunclon Δ Thermo FisherScientific®, Sigma-Aldrich® No. Cat. D7039-1CS) para luego ser incubadas. Transcurridas 48 h, se realizó un cambio de condiciones para sincronizar los cultivos mediante el reemplazo del medio de crecimiento (DMEM suplementado con 2% de SFB + 1% de anti-anti). Luego de una incubación de 24 h se

realizó el conteo de control inicial, incorporando 500 μ L de tripsina + 0.02% de EDTA a dos de los pozos e incubando durante 5 min a 37° C. Se inactivó la enzima con 500 μ L de medio de crecimiento, las suspensiones celulares se trasladaron a tubos Eppendorf® de 1.5 mL (Sigma-Aldrich® No. Cat. T9661) y se centrifugarán (Eppendorf® 5415C) a 1200 rpm por 5 min. Luego de retirar 900 μ L de sobrenadante, los pellets serán cuidadosamente resuspendidos y 20 μ L de las suspensiones celulares concentradas serán introducidas en cada una de las dos cámaras de un contador celular de Neubauer (BLAUBRAND®, Sigma-Aldrich® No. Cat. BR717805-1EA). Se sincronizará cada par de pozos, con DMEM suplementado con 2% de anti-anti + 0.5% albúmina sérica bovina (ASB, GIBCO® Sigma-Aldrich® No. Cat. 9048-46-8) y concentraciones (0.1, 1.0, 10, 100, 1000 μ g/ml EL), o vehículo (ASB) al 0.5% (v/v). Transcurridas 24 h de exposición, los cultivos fueron tripsinizados y se procedió al recuento celular como ha sido descrito. El porcentaje de sobrevivencia será calculado en base a la media de los conteos de control inicial y el porcentaje de proliferación, a partir de la media de los conteos de control negativo (vehículo). Se realizaron regresiones simples de cada tratamiento, utilizando las medias de 4 experimentos independientes desarrollados con células de distintas transferencias, para determinar en cada caso las concentraciones inhibitorias media (CI50) y letal media (CL50).

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de los dos extractos en donde se determinaron los compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides

totales (FT) y concentraciones medias inhibitorias (CI50) y letales (CL50).

En el caso de *Cnidoscolus Aconitifolius* se observó que presentó mayor cantidad de CFT en comparación de *Aloe Barbadensis* con una diferencia estadística significativa. Por el otro lado, no se observó una diferencia estadística significativa en los FT entre los dos extractos.

Hablando acerca del efecto biológico, se obtuvo una CI50 de 916.2 para *Cnidoscolus* y 1248.2 para *Aloe*, lo cual nos indica que se necesita aproximadamente un 36 % más de extracto de *Aloe* para poder lograr la inhibición media. Dicho esto, se observa que *Cnidoscolus* presenta una mayor actividad para inhibir la proliferación celular contra este tipo de línea celular.

De igual manera se observó que *Cnidoscolus* presentó una menor concentración letal media, con una diferencia aproximadamente del 20 %, lo cual también nos indica su gran actividad de muerte celular en comparación con *Aloe*.

Tabla 1. Comparación de la caracterización del perfil fenólico (CFT y FT) y del efecto biológico en la línea celular HT-20 (CI50 y CL50) de los dos extractos.

	<i>Cnidoscolus Aconitifolius</i>	<i>Aloe Barbadensis</i>	<i>p</i>
CFT	5932.6 \pm 197.6	4831.3 \pm 127.4	0.0278*
FT	2682.4 \pm 67.6	2374.8 \pm 69.4	0.0641
CI50	916.2 \pm 45.4	1248.2 \pm 41.5	0.0471*
CL50	2614.1 \pm 98.4	3165.2 \pm 58.6	0.0184*

CFT: Compuestos fenólicos totales, FT: flavonoides totales, CI50: Concentración inhibitoria media, CL50: Concentración letal media. Los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar (n = 3). CFT se

muestran en mg Equivalentes de ácido gálico / g de extracto liofilizado y FT se muestran en mg Equivalentes de catequina / g de extracto liofilizado. Se muestra en $\mu\text{g/ml}$ de extracto liofilizado para las concentraciones inhibitorias y letales medias. * Prueba *t* de student con una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambos extractos.

Oikpejam y colaboradores (2019), reportaron los resultados de su trabajo realizado sobre el efecto de extractos de diferentes partes de *Cnidioscolus Aconitifolius* en las líneas celulares MCF-7 y NCI-H460.

A una concentración de $50 \mu\text{g/mL}$ el extracto tuvo un porcentaje de inhibición de $63.08 \pm 3.63\%$. Se encontró que la CI50 fue del 26.67 ± 3.33 y una CL mayor de $250 \mu\text{g/mL}$ para la línea celular MCF-7. Para el caso de la línea celular NCL-H460, se reportó una CI50 de 59.67 ± 0.75 y CL50 mayor de $250 \mu\text{g/mL}$ (Oikpejam et al., 2019).

Basak y colaboradores (2017) observaron el efecto del extracto de *Aloe Barbadensis* en la línea celular MCF-7 correspondiente a cáncer de mama, así como en la línea celular PBMC. En el extracto se encontró la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, azúcares reductores y alcaloides, pero no de taninos. Se observó que la concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ presentó un porcentaje de mortalidad del 92.687% así como un 100% de células vivas de PBMC.

Tanto menores como mayores concentraciones de extracto presentaron un incremento en el porcentaje de células vivas de MCF-7, lo que indica que la concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ presenta los mejores resultados (Balak et al., 2017). Esto nos indica la selectividad anticancerígena y su no toxicidad hacia PBMC.

De igual manera, Majumder y colaboradores (2019) observaron el efecto del extracto de *Aloe Barbadensis* en la línea celular MCF-7.

Reportaron que su extracto contenía grandes cantidades de ácidos fenólicos ($385.662 \mu\text{g/mL}$) y flavonoides ($160.402 \mu\text{g/mL}$). Encontraron que la CI50 fue de $23 \mu\text{g/mL}$ y para células no cancerígenas fue mucho mayor ($332 \mu\text{g/mL}$) (Majumder et al., 2019).

Conclusiones

El extracto de CA tiene más compuestos fenólicos que la AB, y de igual forma se observó una CI50 y CL50 menor, por lo que su efecto en la línea celular HT-29 es mayor. Es importante mencionar que AB al mismo tiempo mostró efectos en la línea celular pero siendo menores que CA. Por lo que ambos extractos tienen efectos citotóxicos similares en la línea celular HT-29 a 24 horas de la exposición al tratamiento. Se requiere más investigación para continuar con el proceso de búsqueda de compuestos bioactivos de los alimentos nativos mexicanos.

Conflicto de Interés

Los autores no refieren conflicto de interés.

Agradecimientos

A Joss y Andy, técnicos del laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Referencias

- Basak, P., Paul, S., & Majumder, R. (2017). In vitro cytotoxic study of aloe vera whole leaf extract on PBMC and breast cancer cell line. 2017 2nd International Conference for Convergence in Technology (I2CT). doi:10.1109/i2ct.2017.8226106
- Majumder, R., Parida, P., Paul, S., & Basak, P. (2019). In vitro and in silico study of Aloe vera leaf extract against human breast

- cancer. Natural Product Research, 1–4. doi:10.1080/14786419.2018.1534848
- 2019 Dec;16(4):375-379. doi: 10.4274/tjps.galenos.2018.19942. Epub 2019 Nov 11. PMID: 32454739; PMCID:PMC7227881.
- A., K.-G., J., L. C.-S., & S., H. G.-M. (2017). Phenolic profile and antioxidant capacity of *Cnidoscolus chayamansa* and *Cnidoscolus aconitifolius*: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(45), 713–727. <https://doi.org/10.5897/jmpr2017.6512>
- Tirado, L., & Mohar, A. (2008). Epidemiología del cáncer de colon y recto. In *Gaceta Mexicana de Oncología* (Vol. 7, Issue 5).
- Viñas, G., Puig, T., & Porta, R. (2012). Oxidative stress in patients with cancer: Two sides of the same coin. *Medicina Clinica*, 139(4), 171–175. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2011.11.021>
- Hęś, M., Dziedzic, K., Górecka, D., Jędrusek-Golińska, A., & Gujska, E. (2019). Aloe vera (L.) Webb.: Natural Sources of Antioxidants – A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(3), 255–265. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00747-5>
- Irrazabal, T., Thakur, B. K., Croitoru, K., & Martin, A. (2021). Preventing Colitis-Associated Colon Cancer With Antioxidants: A Systematic Review. *Cmgh*, 11(4), 1177–1197. <https://doi.org/10.1016/j.cmg.2021.03.001>
- Lee, K. Y., Weintraub, S. T., & Yu, B. P. (2000). Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(2), 261–265. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00235-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00235-X)
- Oikpefan E., O., Ayinde B., A., Mudassir A., Farooq A., D., (2019) Comparative In Vitro Assessment of the Methanol Extracts of the Leaf, Stem, and Root Barks of *Cnidoscolus aconitifolius* on Lung and Breast Cancer Cell Lines. *Turk J Pharm Sci*.

Relación del cortisol y la reacción acrosomal del espermatozoide humano

Monroy Valadez Mónica Jose Mayela ³⁺,
M. en C. Sheini Ruturi Sánchez González ^{4*},
Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie ^{5*}.

Resumen

El proceso de fecundación requiere de la migración de los espermatozoides desde la vagina hasta el oviducto. Dentro del oviducto, los espermatozoides sufren modificaciones favorables para la reacción acrosomal (RA). Además, la RA, un proceso de exocitosis que permite la entrada del espermatozoide al ovocito, requiere de un cambio en el flujo de calcio. Un primer estudio describió la inhibición del flujo de calcio por hormonas como testosterona (T) e hidrocortisona (HC). Sin embargo, otros investigadores han comprobado lo contrario. Este estudio busca la comprensión del efecto de estas hormonas en la RA, así como la comparación con los resultados de estudios previos. Muestras normospérmicas se sometieron a swim up, se capacitaron 3 h y se indujo RA, la cual se evaluó por tinción con Azul de

Coomassie. Se encontró una disminución del porcentaje de RA espontánea con ambas hormonas respecto al control positivo, para todas las concentraciones evaluadas. La RA inducida por progesterona (P4) se vio afectada por la presencia de T e HC, con una disminución del porcentaje de RA con respecto al control positivo, para todas las concentraciones evaluadas. Los resultados obtenidos coincidieron con el estudio realizado por Mannowetz y col. en 2017, que considera la T e HC como antagonistas de la RA.

Palabras clave: Reacción acrosomal, espermatozoide, acrosoma, hidrocortisona, cortisol, testosterona.

Abstract

The fertilization process requires the migration of sperm from the vagina to the oviduct. Inside the oviduct sperm go through changes favorable to the acrosomal reaction (AR). Additionally, RA, an exocytic process that allows sperm entry in the oocyte, requires a calcium flux change. A previous study described calcium flux inhibition by hormones such as testosterone (T) and hydrocortisone (HC). However, other researchers have proven the contrary. This study seeks to understand the effect of these hormones in RA, and to compare the findings with previous studies. Motile sperm cells were separated by swim up technique, capacitated for 3h and AR was induced. AR was evaluated by Coomassie Blue staining. For all evaluated concentrations,

³ monroymonica63@gmail.com

⁴ sheiniruturi_006@hotmail.com

⁵ anatusie@gmail.com

+ Estudiante de Ingeniería en Biotecnología.
Facultad de Química, UAQ.

* Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Reproducción. Departamento de Investigación Biomédica. Facultad de Medicina, UAQ.

both hormones decrease the percentage of RA, compared to positive control. Induction by progesterone (P4) was affected by the presence of T and HC, with a decrease in the percentage of RA for all tested concentrations, with respect to the positive control. The obtained results coincided with the study carried out by Mannowetz et al. in 2017, which considered T and HC as antagonists of AR.

Keywords: Acrosomal reaction, sperm, acrosome, hydrocortisone, cortisol, testosterone.

Introducción

La fecundación es un proceso molecular complejo que tiene como finalidad la fusión del espermatozoide y el ovocito, para permitir el intercambio de cromosomas y dar origen al cigoto (Moore, 2008).

Regularmente comienza con la eyaculación en el tracto genital femenino (Bhakta, 2019), estos espermatozoides son maduros, pero aún no tienen la capacidad de fecundar un ovocito (Okabe, 2013). Debido a ello son sometidos a selección, sólo aquellos espermatozoides cuya morfología sea normal, o mínimamente anormal, serán capaces de migrar a través del cérvix y atravesar el moco cervical (Puga, 2018).

La segunda selección ocurre cuando los espermatozoides restantes se dirigen hacia el oviducto a través de las uniones uterotubales. Aquellos que presenten el sistema de reconocimiento específico podrán entrar al oviducto (Okabe, 2013; Puga, 2018; Bhakta, 2019).

Durante su estadía en el oviducto el espermatozoide es sometido al proceso de

capacitación, que le proporciona las características necesarias para penetrar el ovocito (Bhakta, 2019). Algunos de los cambios bioquímicos y estructurales que suceden en este paso son: el incremento de fluidez de la membrana plasmática del espermatozoide, la disminución del contenido de colesterol, el incremento intracelular de la concentración de calcio y cAMP, la fosforilación de residuos de tirosina en proteínas y la modificación de los patrones de motilidad (Vigil, 2011).

Este último aspecto referente al cambio en la movilidad es de gran importancia. Previo a la capacitación, el movimiento flagelar es simétrico, con poca curvatura y genera un movimiento progresivo; se denomina motilidad activada. Sin embargo, tras la capacitación, se modifica a una motilidad hiperactivada, cuyas propiedades son: movimiento flagelar asimétrico, amplitud larga y alta curvatura (Darszon, 2011).

Esta hiperactividad favorece un movimiento más progresivo aún en condiciones de alta viscosidad, como en el tracto genital reproductivo (Darszon, 2011). Además, proporciona la fuerza necesaria para que el espermatozoide pueda atravesar las células de cúmulo y la zona pelúcida del ovocito (Puga, 2018; Bhakta, 2019).

Estos cambios bioquímicos y estructurales durante la capacitación favorecen la RA, el último paso necesario para que ocurra la fecundación del ovocito (Darszon, 2011).

El acrosoma se encuentra ubicado en la cabeza del espermatozoide y rodea parcialmente el núcleo (Vigil, 2011). Esta vesícula es considerada un organelo derivado de Golgi y la membrana que la

delimita presenta dos regiones: la interna, situada cerca del núcleo, y la externa, adyacente a la membrana plasmática del espermatozoide (Bhakta, 2019). Dentro de esta vesícula se encuentran diversas enzimas como, acrosina, acrogranina, hialuronidasa, entre otras (Vigil, 2011).

La RA consiste en la liberación del contenido enzimático del acrosoma, para permitir el paso del espermatozoide a través de las capas exteriores del ovocito (López, 2017). Esto permite la exposición de la membrana acrosomal interna y la adquisición de la capacidad de fusión de la membrana plasmática del segmento ecuatorial del espermatozoide (Vigil, 2011). Así, la membrana plasmática del espermatozoide y la del ovocito se fusionan, concluyendo el proceso de fecundación (Bhakta, 2019).

Se ha observado que estos dos eventos importantes para la fecundación, hiperactivación y RA, son inducidos por el flujo de calcio producido por la activación del canal de calcio específico de espermatozoides (CatSper) (Rahban, 2020; Sun, 2017).

Se ha considerado primordialmente la activación de CatSper a través de una hormona esteroidea, la P4, debido a que parece no ser coincidencia la excreción de esta hormona por las células de cúmulo (Rahban, 2020; Okabe, 2013). Sin embargo, esta no es la única hormona que se encuentra en el tracto genital femenino.

Algunas afecciones como el síndrome de ovario poliquístico o el estrés crónico se caracterizan por el incremento de hormonas esteroideas, en este caso T y cortisol respectivamente (Ashraf, 2020; Whirledge, 2010). Para responder al

cuestionamiento del efecto de estas hormonas en la fecundación del ovocito, se han realizado diversos estudios enfocados en el agonismo o antagonismo del flujo de calcio mediado por CatSper (Vigil, 2012; Mannowetz, 2017; Brenker, 2018; Rehfeld, 2020).

Sin embargo, estos estudios han arrojado resultados contrarios, generando incertidumbre sobre el verdadero efecto de estas hormonas.

Objetivo

Determinación del agonismo o antagonismo de diferentes concentraciones de T e HC sobre la RA del espermatozoide humano.

Metodología

Evaluación de características macroscópicas. Se observó y determinó el color de la muestra como: blanco opalescente, café rojizo o amarillo. Se analizó la viscosidad manejando la muestra con una pipeta para permitir la caída a gotas. Se midió el volumen recolectado. Se colocaron aproximadamente 20 μ L sobre una tira reactiva de pH para determinar este parámetro.

Swim up. Se extrajo el semen del vaso de muestra y se colocó en un tubo Falcon limpio colocado en un ángulo de 45° y etiquetado como swim up. Se conservaron alrededor de 500 μ L en el vaso para ensayos posteriores. Se vertió por la pared del tubo Falcon la cantidad correspondiente de medio HAM's F-10 suplementado en relación 1:1 evitando el rompimiento de las dos fases. Se incubó a 37 °C, durante 1 h.

Posteriormente, se extrajo la fase superior y se colocó en un tubo nuevo etiquetado como post-swim up. Se tomaron 10 μL de la muestra post-swim up y se colocaron en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y se llevó al microscopio (40x). Se realizó un conteo de células motiles en un solo campo.

De acuerdo con el número de espermatozoides, se realizó la dilución correspondiente en un tubo Eppendorf:

- $< 101 = 1:20$ (50 μL de muestra post-swim + 950 μL de fijativo)
- $16 - 100 = 1:5$ (50 μL de muestra post-swim + 200 μL de fijativo)
- $2 - 15 = 1:2$ (50 μL de muestra post-swim + 50 μL de fijativo)

Se colocaron 10 μL de la dilución en la cámara de Neubauer, se llevó al microscopio (40x) y se realizó un conteo de 200 células. Los datos recopilados fueron utilizados para calcular la concentración con la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ de espermatozoides}}{\# \text{ de filas}} \times \frac{1}{20} \times \text{Factor de dilución} \times 1 \times 10^6$$

Después, se calculó el volumen de HAM's necesario para llevar la concentración de espermatozoides a 1×10^7 con la fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Evaluación de características microscópicas. Se tomaron del vaso de muestra 10 μL de semen y se colocaron en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos, se llevó al microscopio (40x) y se realizó un conteo de 200 células clasificándolas de acuerdo con su movilidad en: progresiva, no progresiva e inmóviles.

Para la determinación de la concentración inicial, se realizó un conteo de células

totales en un solo campo. De acuerdo con el número de células, se elaboró la dilución correspondiente:

- $< 101 = 1:20$ (50 μL de muestra (original) + 950 μL de fijativo)
- $16 - 100 = 1:5$ (50 μL de muestra (original) + 200 μL de fijativo)
- $2 - 15 = 1:2$ (50 μL de muestra (original) + 50 μL de fijativo)

Se tomaron 10 μL de la dilución realizada y se colocaron en una cámara de Neubauer. Se observó al microscopio (40x) y se contaron 200 células. La concentración de espermatozoides se calculó con la fórmula:

$$\frac{\# \text{ de espermatozoides}}{\# \text{ de filas}} \times \frac{1}{20} \times \text{Factor de dilución} \times 1 \times 10^6 \times \text{ml de muestra total}$$

Evaluación de características

morfológicas. Se tomaron 20 μL de la muestra original y se colocaron sobre un portaobjetos para realizar un frotis. Se dejó secar. Se fijó el frotis con metanol durante

15 s, se tiñó con eosina durante 10 s y con hematoxilina 5 s. Se observó al microscopio (100x) y se contaron 100 células clasificándolas de acuerdo con variaciones en su morfología (cabeza, parte media y cola).

Capacitación. Posterior al ajuste de concentración de la muestra post-swim up con medio HAM's, se incubó durante 3 h. Se rotularon 7 tubos Eppendorf de acuerdo con la Tabla 1 para el análisis con HC de RA espontánea. Se rotularon 7 tubos más como HC + P4 para el análisis de RA inducida. Finalmente, se rotularon los controles.

El volumen final de la muestra post-swim up se distribuyó en cada tubo de forma equitativa. Se pipeteó para cada tubo el volumen correspondiente de HC de acuerdo con las concentraciones establecidas en la Tabla 1 y 3 μL de P4 a los tubos correspondientes (HC + P4). Los tubos se incubaron durante 30 min.

Concluidos los 30 min, se agregaron 100 μL de metanol a todos los tubos y se agitaron suavemente. Se centrifugaron durante 4 min a 3500 rpm. El sobrenadante de cada tubo fue desechado y el pellet se resuspendió en 400 μL de PBS.

Se realizó un frotis para cada uno de los 16 tubos utilizando 50 μL del tubo correspondiente y resuspendiendo previamente.

Se tiñó cada frotis con Azul de Coomassie durante 2 min, se eliminó el exceso de colorante y se dejó secar. Las placas se observaron al microscopio con (100x) y se contaron 100 células clasificándolas como: reaccionadas y no reaccionadas.

Para el análisis de T, se repitió el procedimiento previamente descrito y de acuerdo a los datos de la Tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de hormonas propuestas para la evaluación de su efecto sobre la reacción acrosomal.

Tubos	Hidrocortisona	Testosterona
1	[0.1 μM]	[0.03 μM]
2	[1 μM]	[0.1 μM]
3	[5 μM]	[0.3 μM]
4	[10 μM]	[0.5 μM]
5	[15 μM]	[1 μM]
6	[30 μM]	[3 μM]
7	[100 μM]	[10 μM]
Control +	Pg (3 μL)	Pg (3 μL)
Control -	DMSO (7.5 μL)	- (Muestra)

Análisis estadístico. Se determinó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente, se realizó un ANOVA para determinar las diferencias entre las medias de las diferentes concentraciones.

Resultados

En la Fig. 1 se observan los porcentajes de RA inducida y espontánea, así como la media característica para cada concentración de hormona (HC). Mediante este gráfico se observó la disminución del porcentaje de RA inducida respecto al control positivo, independientemente de la concentración de HC.

Los menores porcentajes de RA espontánea se observaron en las concentraciones 15 y 100 μM de HC. Mientras que, en presencia de ambas hormonas, P4 e HC, los porcentajes más bajos se observaron en las concentraciones

1, 30 y 100 μM , acercándose a la media del control negativo.

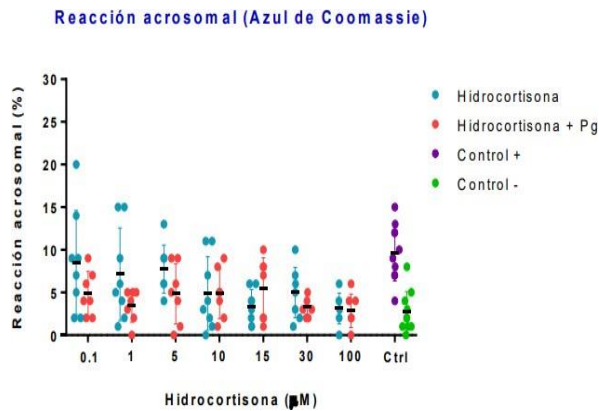


Figura 1. Porcentaje de RA por HC (n=11). La reacción espontánea (puntos azules) muestra mayor diferencia respecto a la media del control positivo a partir de 10 μM de HC. La inducción (puntos rojos) presenta una notable disminución del porcentaje de RA.

Como segundo análisis se evaluó la RA en presencia de T bajo el mismo procedimiento. Con los porcentajes obtenidos se elaboró el gráfico mostrado en la Fig. 2.

Reacción acrosomal (Azul de Coomassie)

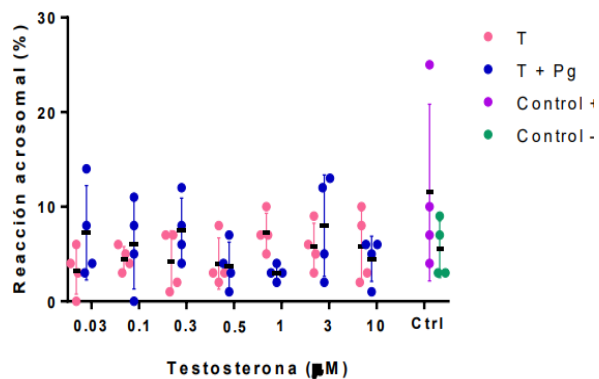


Figura 2. Porcentaje de RA por T (n=4). La reacción espontánea (puntos rosas) presenta porcentajes de RA bajos. El porcentaje de RA por inducción (puntos azules) parece disminuir conforme el incremento de concentración de T.

Comparando los porcentajes de reacción de las diferentes concentraciones de T, se apreció la diferencia de la media tanto de RA inducida como espontánea con respecto a la media del control positivo, siendo menores al control en ambos casos. En los experimentos de RA espontánea con T se observó que, en concentraciones de 0.03, 0.1 y 0.3 μM , los porcentajes de reacción fueron menores con respecto a los observados con la adición de P4. Sin embargo, a concentraciones mayores de 0.5 μM se observó una tendencia de disminución del porcentaje de RA inducida.

Se determinó, por tanto, la influencia antagonista de ambas hormonas en la RA, debido a la disminución del porcentaje de reacción observado con respecto al control.

Discusión y conclusiones

El gradiente de Ca^{2+} favorece la ocurrencia de procesos que permiten la fecundación, tal es el caso de la capacitación y la RA. CatSper, se encuentra ubicado en la membrana plasmática de la cola del espermatozoide maduro. Su activación se ve favorecida por ciertos estímulos o condiciones fisiológicas como, la presencia de P4, nucleótidos cíclicos (CAMP, cGMP, entre otros), glicoproteínas de la zona pelúcida (ZP), BSA y despolarización alcalina (Sun, 2017).

Los experimentos realizados por Mannowetz y col. (2017) se enfocaron en la comprensión de la activación de CatSper de espermatozoides humanos por hormonas esteroideas, así como triterpenoides. Algunas de las hormonas analizadas fueron T, P4 e HC. Los resultados registrados determinaron el

incremento de concentración de Ca^{2+} , por la activación de CatSper, debido a la unión de P4 al receptor esteroideo, proteína hidrolasa con dominio α/β (ABHD2, por sus siglas en inglés) (Mannowetz, 2017). Resultado esperado, debido a su bien conocida función como inductor de la RA y como activador de CatSper (Tamburrino, 2020).

T e HC demostraron ser incapaces de activar el canal de calcio por sí solas. Sin embargo, también realizaron estudios incubando en conjunto T e HC con P4, como experimentos individuales y con preexposición de las dos primeras hormonas mencionadas. Bajo estas condiciones se estableció que ambas hormonas previenen la activación de CatSper por P4, debido a la disminución del flujo de calcio sin llegar a ser nulo (Mannowetz, 2017).

Considerando que la activación de CatSper, para el incremento de la concentración interna de Ca^{2+} , es imprescindible para la RA (Darszon, 2011; Hirohashi, 2018; Jiang, 2021), se observa que los resultados de Mannowetz y col. (2017) pueden ser relacionados con los resultados obtenidos en este estudio.

Ambos intervalos de concentraciones utilizados para cada hormona comprueban la disminución del porcentaje de RA espontánea con respecto al control positivo. La HC en concentraciones de 15 y 100 μM , así como la T a 0.03, 0.3 y 0.5 μM , obtuvieron los porcentajes de reacción espontánea más bajos (Fig. 1 y 2 respectivamente). Esto concuerda con los resultados de antagonismo obtenidos por Mannowetz y col. (2017).

Por otro lado, la incubación en conjunto con P4 para ambas hormonas presenta porcentajes de RA menores al control positivo en la mayor parte del intervalo de concentraciones (Fig. 1 y 2). Lo cual indica una inducción reducida de RA debido a la presencia de antagonistas (T e HC), concordando con los resultados de Mannowetz y col. (2017).

El estudio realizado por Vigil y col. (2012) favorece también la hipótesis del antagonismo de T en la RA. Mediante la técnica de FITC-PSA, determinaron que esta hormona, en condiciones no fisiológicas, no favorecía la inducción de secreción del contenido del acrosoma (Vigil, 2012).

Tanto Brenker y col. (2018), como Rehfeld (2020) concluyen el efecto de T e HC como activadores de CatSper y por tanto de la RA, resultados que en este estudio son cuestionados. Sin embargo, concuerdan con la relación de T e HC en la inhibición de la inducción por P4 (Brenker, 2018; Rehfeld, 2020).

La relativa inhibición de la RA inducida observada en este estudio y en los previamente mencionados como la inhibición de activación de CatSper por inducción, podría justificarse debido a la teoría de la unión de HC y T al mismo sitio de unión que utiliza la P4 para activar CatSper (Mannowetz, 2017; Brenker, 2018; Rehfeld, 2020). Inclusive, se ha considerado que, debido a que la T provocó mayor inhibición, presenta mayor afinidad al receptor ABHD2 que la P4 (Mannowetz, 2017)

Comprender la relación de estas hormonas con la infertilidad permite considerar su adición a los estudios de rutina que son

realizados en personas que buscan un embarazo. Principalmente debido a la común situación de estrés provocada por el deseo de concebir o por situaciones cotidianas como la ocupación laboral, un estudio de cortisol debería ser considerado rutinario.

Como segunda opción, el entendimiento de la inhibición de la RA provocada por hormonas esteroideas u otras moléculas, favorece la búsqueda de anticonceptivos. Continuar con un estudio del efecto de triterpenoides provenientes de plantas en la RA podría resultar favorable en la determinación de un anticonceptivo que no modifique las concentraciones hormonales en las mujeres.

Utilizar un enfoque diferente al análisis de calcio permitió observar la problemática desde otra perspectiva, pero bajo el mismo propósito. Se espera que este estudio haya contribuido en el esclarecimiento de la funcionalidad del espermatozoide humano y que disipe la controversia del efecto de las hormonas T e HC en la inducción del flujo de calcio y la RA.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro y al Departamento de Investigación Biomédica de la Facultad de Medicina por la apertura del programa de Verano de la Ciencia y los permisos otorgados para la elaboración de esta metodología. De igual manera, agradezco a la Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie y a la M. en C. Sheini Ruturi Sánchez González por la enseñanza y la oportunidad otorgada para participar en este proyecto.

Referencias bibliográficas

Ashraf, S., Nabi, M., Rashid, F., & Amin, S. "Hyperandrogenism in polycystic ovarian syndrome and

role of CYP gene variants: a review". *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 20(1), 1-10, 2019.

Bhakta, H. H., Refai, F. H., & Avella, M. A. "The molecular mechanisms mediating mammalian fertilization". *Development*, 146(15), dev176966, 2019.

Brenker, C., Schiffer, C., Wagner, I. V., Tüttelmann, F., Röpke, A., Rennhack, A., & Strünker, T. "Action of steroids and plant triterpenoids on CatSper Ca²⁺ channels in human sperm". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(3), E344-E346, 2018.

Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Treviño, C. L. "Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa". *Physiological reviews*, 91(4), 1305-1355, 2011.

Hirohashi, N., & Yanagimachi, R. "Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization". *Biology of Reproduction*, 99(1), 127-133, 2018.

Jiang, F., Zhu, Y., Chen, Y., Tang, X., Liu, L., Chen, G., ... & Sun, X. "Progesterone activates the cyclic AMP-protein kinase A signalling pathway by upregulating ABHD2 in fertile men". *Journal of International Medical Research*, 49(3), 0300060521999527, 2021.

López-Torres, A. S., & Chirinos, M. "Modulation of human sperm capacitation by progesterone, estradiol, and luteinizing hormone". *Reproductive Sciences*, 24(2), 193-201, 2017.

Mannowetz, N., Miller, M. R., & Lishko, P. V. "Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(22), 5743-5748, 2017.

Moore, K., Persaud, T. V. N. *Embriología clínica*. Ed. Elsevier. España, 2008.

Okabe, M. "The cell biology of mammalian fertilization". *Development*, 140(22), 4471-4479, 2013.

Puga Molina, L. C., Luque, G. M., Balestrini, P. A., Marín-Briggiler, C. I., Romarowski, A., & Buffone, M. G. "Molecular basis of human sperm capacitation". *Frontiers in cell and developmental biology*, 6, 72, 2018.

Rahban, R., & Nef, S. "CatSper: The complex main gate of calcium entry in mammalian spermatozoa". *Molecular and cellular endocrinology*, 110951, 2020.

Rehfeld, A. "Revisiting the action of steroids and triterpenoids on the human sperm Ca²⁺ channel CatSper". *Molecular Human Reproduction*, 26(11), 816-824, 2020.

Sun, X. H., Zhu, Y. Y., Wang, L., Liu, H. L., Ling, Y., Li, Z. L., & Sun, L. B. "The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review". *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15(1), 1-12, 2017.

Tamburrino, L., Marchiani, S., Muratori, M., Luconi, M., & Baldi, E. "Progesterone, spermatozoa and reproduction: an updated review". *Molecular and Cellular Endocrinology*, 110952, 2020.

Vigil, P., Orellana, R. F., & Cortés, M. E. "Modulation of spermatozoon acrosome reaction". *Biological Research*, 44(2), 151-159, 2011.

Vigil, P., Barrientos, V. M., Vargas, G. G., Machuca, D. A., & Cortés, M. E. "Assessment of the effect of testosterone on the acrosome reaction of human spermatozoa". *Andrologia*, 44, 627-633, 2012.

Whirledge, S., & Cidlowski, J. A. "Glucocorticoids, stress, and fertility". *Minerva endocrinologica*, 35(2), 109, 2010.

Microbiota intestinal: impacto de una dieta alta en grasa y fructosa.

Sánchez-Hernández V.¹ Ahumada-Solórzano S.²
Ocampo-Anguiano P.³

¹ Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. vsanchez25@alumnos.uaq.mx

^{2,3} Doctorado en Ciencias de los alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. pocampo12@alumnos.uaq.mx

³ Laboratorio Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. santiaga.marisela.ahumada@uaq.mx

Resumen

La obesidad es una enfermedad sistémica, crónica y multicausal, definida como una acumulación anormal o excesiva de grasa. La causa fundamental de la obesidad y también del sobrepeso es una occidentalización de la dieta. La dieta es un factor que impulsa la composición y el metabolismo de la microbiota intestinal. Los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, representan más del 90% de la población de microbiota intestinal, así pues, este tipo de dieta occidentalizada se refleja en una reducción de *Bacteroidetes* y una elevación de *Firmicutes*. Se eligieron 4 bacterias pertenecientes a estos dos filos, *Clostridium difficile*, *Clostridium leptum*, *Bacteroides Fragilis* y *Prevotella sp.*, se revisó información que avalen su importancia en la microbiota intestinal y se construyeron cebadores para la determinación por una técnica molecular de qPCR, la cual fue propuesta debido a su gran utilización en otros estudios de la misma índole.

Palabras clave

Microbiota intestinal, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, qPCR

Summary

Obesity is a systemic, chronic and multicausal disease, defined as an abnormal or excessive accumulation of fat. The fundamental cause of obesity and also overweight is a westernization of the diet. Diet is a factor that drives the composition and metabolism of the gut microbiota. The Firmicutes and Bacteroidetes phyla represent more than 90% of the intestinal microbiota population, thus, this type of westernized diet is reflected in a reduction of Bacteroidetes and an elevation of Firmicutes. Four bacteria belonging to these two phyla were chosen, *Clostridium difficile*, *Clostridium leptum*, *Bacteroides Fragilis* and *Prevotella sp.*, Information was reviewed that support their importance in the intestinal microbiota and primers were constructed for the determination by a molecular technique of qPCR, which It was proposed due to its great use in other studies of the same nature.

Keywords

Gut microbiota, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, qPCR

Introducción

La obesidad (índice de masa corporal ≥ 30 kg/m²) es una enfermedad sistémica, crónica y multicausal, definida como una acumulación anormal o excesiva de grasa (Dávila et al., 2015) la cual se considera un factor de riesgo importante para enfermedades crónicas como la cardiopatía coronaria y la hipertensión, la

diabetes tipo 2 y algunos tipos de cáncer (Hariri y Thibault, 2010). México ocupa el segundo lugar de prevalencia mundial de obesidad en la población adulta (Dávila et al., 2015). La causa fundamental de la obesidad y también del sobrepeso es una occidentalización de la dieta (Dávila- et al., 2015), basadas en productos muy energéticos con alto contenido de grasas, en particular saturadas, sodio y azúcares (Kánter, 2021). El alto consumo de grasa saturada causa alteraciones como el aumento de peso corporal, modulación y expansión del tejido adiposo, variabilidad en la concentración de glucosa e insulina en plasma, concentración de lípidos hepáticos, ácidos grasos circulatorios y resistencia a la insulina (Molina, 2019). Por otro lado, una dieta alta en azúcares como fructosa disminuye las concentraciones circulantes de insulina y leptina (Carvalho, 2019) de igual forma, el consumo de fructosa genera diversas alteraciones metabólicas como alteraciones en la sensibilidad a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 y mala absorción de fructosa (MAF) (Riveros et al., 2014). La dieta es un factor que impulsa la composición y el metabolismo de la microbiota intestinal (Padrón et al., 2001). La microbiota intestinal es la comunidad de microorganismos vivos residentes en el tubo digestivo (Icaza, 2013). Se estima que alberga más de 10^{14} bacterias, también existe la presencia de *Archaeas* metanógenas, eucariotas (levaduras y protistas), virus en forma de fagos y virus animales (Robles y Guarner, 2013). Las alteraciones en la microbiota podrían explicar, por lo menos en parte, algunas epidemias de la humanidad como el asma y la obesidad ya que se ha reportado que los ratones libres de gérmenes (LG) no aumentan su peso cuando se exponen a dietas altas en grasa y en hidratos de carbono, lo que hace suponer que la dieta no es suficiente para inducir la obesidad,

de esta manera se ha descrito una microbiota humana de «tipo obeso», asociada al exceso de peso y al síndrome metabólico, con un incremento de la razón *Firmicutes/Bacteroidetes* (Icaza, 2013). Los *Firmicutes* tienen una estructura celular Gram-positiva. Adquieren la forma de bacilo y a veces de coco y muchas producen endosporas. En su género se incluyen algunos patógenos notables. Por otro lado, los *bacteroidetes* son un grupo amplio de bacterias Gram negativas y anaerobias. (Rumbo et al., 2018). Ambos filos, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, representan más del 90% de la población de microbiota intestinal (Méndez et al., 2018). Así pues, cuando se suministra a ratones con peso normal una dieta típica occidental elevada en calorías durante 8 semanas (aceptado mecanismo de generación de obesidad en ratones) se observa también una marcada reducción de *Bacteroidetes* y una manifiesta elevación de *Firmicutes* (Icaza, 2013). Es por ello que la utilización de técnicas moleculares ha permitido identificar y asignar taxonómicamente a la mayoría de los microorganismos sin necesidad de cultivarlos, este avance ha supuesto una verdadera revolución en el conocimiento de la microbiota y de su implicación en los estados de salud y enfermedad del ser humano (Campo et al., 2017).

Objetivos

El objetivo de este trabajo es revisar el impacto de una dieta alta en grasa y fructosa sobre la microbiota intestinal considerando como punto algunas de las bacterias pertenecientes a los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, así como proponer una técnica de identificación molecular para su detección en heces de un modelo biológico de rata Wistar.

Metodología

Revisión de fuentes bibliográficas de distintos artículos en línea. Elaboración de cebadores con *Primer designing tool* – NCBI ©.

Resultados y Discusión

Filo	Bacteria	Primer F Sequence (5'→3')	Primer R Sequence (5'→3')	Pares de bases
Firmicutes	<i>Clostridium difficile</i>	GGTGAGTAACCGTGGGTAA *	CAGGTCGGCTACTGATCGTC *	189 pb
Firmicutes	<i>Clostridium leptum</i>	GCACAAGCAGTGGAGT **	CTTCCTCCGTTTTGTCAA **	239 pb
Bacteroidetes	<i>Bacteroides fragilis</i>	TTGCTTTCTTTGCTGGCGAC *	TGAGCCGTTACCTCACCAAC *	190 pb
Bacteroidetes	<i>Prevotella sp.</i>	CGTATCCAACCTGCCCTTG *	GCTAATCAGACGCATCCCA *	127 pb

Tabla 1. Cebadores de bacterias pertenecientes a *Firmicutes* y *Bacteroidetes*.

*Elaboración propia. **Cebadores reportados por J. Kabeerdoss et al., 2013.

La microbiota intestinal está influenciada por factores como la genética, el estilo de vida, la dieta y la antibioterapia. La dieta es el principal componente modulador de la actividad bacteriana intestinal (Álvarez et al., 2021). Se seleccionaron dos bacterias por cada filo, las cuales según otros autores, han sido objeto de interés en experimentos en estudios relacionados con una dieta del tipo occidental, obesidad y su impacto sobre la microbiota intestinal (Bishara et al., 2013; Shinsmon et al., 2021; La primera de ellas, *Clostridium difficile*, es la causa más común de diarrea nosocomial infecciosa entre adultos en muchos países, es una bacteria anaerobia formadora de esporas grampositiva y miembro del género *Clostridium*, que forma parte del filo *Firmicutes* (Bishara et al., 2013) en un estudio hecho por Shinsmon et al., 2021, en comparación con los ratones de control, los ratones

alimentados con dieta alta en grasas [HFD] no lograron eliminar la bacteria *C. difficile*, lo que resultó en diarrea prolongada, pérdida de peso y daño colónico, lo que se explica cuando mencionan que una dieta HFD afecta a la microbiota intestinal autóctona la cual previene la infección por *C. difficile* (CDI) al inhibir la germinación de las esporas y el crecimiento celular vegetativo (Shinsmon et al., 2021). Por otro lado, *Clostridium leptum* es predominante en la microbiota colónica de seres humanos sanos; este subgrupo incluye bacterias que producen butirato, una fuente de energía para las células epiteliales intestinales (Lay et al., 2007). Diversos estudios, han demostrado que cuando se da una dieta rica en polifenoles u otras sustancias como fibra disminuye la aparición de *C. leptum*; en un estudio con ratas, hubo una disminución significativa en los grupos de *Clostridium leptum* mientras que el grupo de *Bacteroides* aumentó significativamente cuando se les administró una dieta rica en polifenoles (Smith et al., 2005). En otro trabajo titulado “La fibra de guisante amarillo mejora la glucemia y reduce el *Clostridium leptum* en ratas obesas inducidas por la dieta” se encontró que los cambios en la microbiota intestinal incluyeron una disminución de la relación Firmicutes / Bacteroidetes, así como la disminución de *Clostridium leptum* en los grupos alimentados con este guisante, en conjunto, este trabajo sugiere que las fracciones derivadas del guisante amarillo son capaces de modular claramente los parámetros metabólicos y la microbiota intestinal en ratas obesas (Eslinger et al., 2014).

De igual forma, del filo de los *Bacteroidetes*, se seleccionó a *Bacteroides fragilis* y *Prevotella sp.* Dentro de los *Bacteroidetes* destacan *Bacteroides*,

Prevotella y *Xylanibacter* (20-30% de la microbiota humana) (Garach et al., 2016). En un estudio de Santacruz et al., de 2014 se señaló que la prevalencia de la obesidad es cada vez mayor y especialmente en niños y adolescentes, en donde los adolescentes que experimentaron mayor pérdida de peso, presentaron mayor cantidad de bacterias *Bacteroides fragilis*. Además, Santacruz et al., en 2009 realizaron un estudio en jóvenes con obesidad, a quienes sometieron a una intervención dietética controlando la ingesta de grasas y calorías totales. Los investigadores reportaron cambios en la proporción de los géneros *Bacteroides*, *Clostridium coccoides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium* de la microbiota intestinal asociado a pérdida de peso de forma significativa. Así pues, Bacterias del género *Bacteroides* tienen la capacidad de reducir el colesterol en condiciones *in vitro*, metabolizan el colesterol a coprostanol, el cual es absorbido por el intestino en bajas cantidades. También estas bacterias tienen la capacidad de metabolizar los ácidos biliares a través de la desconjugación, oxidación y esterificación (Gérard, 2013). Por otro lado, en un estudio de 2009 se demostró que las proporciones del grupo de *Bacteroides-Prevotella* aumentan después de la pérdida de peso en adolescentes obesos (Nadal et al., 2009).

Por lo tanto, la proporción de Firmicutes es mayor en ratones obesos, y de Bacteroidetes en ratones delgados, siendo la primera evidencia que asocia la MI con la obesidad (Kotzampassi et al., 2014). Sin embargo, todavía no está claro cuál es el perfil de microbiota que se atribuye a la presencia de obesidad, aunque en modelos animales parece relacionarse con una mayor proporción de bacterias del filo Firmicutes, en detrimento de las del filo

Bacteroidetes (Fontané et al., 2018). Otros factores claramente implicados serían la diversidad en la microbiota intestinal o sus posibles cambios funcionales. Son necesarios más estudios en humanos para poder esclarecer cómo la disbiosis puede influir en el control ponderal. No obstante, se sigue demostrando que la proporción de Firmicutes es mayor en ratones obesos, y de Bacteroidetes en ratones delgados, siendo la primera evidencia que asocia la MI con la obesidad (Kotzampassi et al., 2014).

Por lo que es necesario la determinación de bacterias o grupos de bacterias de sobresalientes de estos filos, y mediante técnicas moleculares, de las cuales la PCR y PCR en tiempo real fueron de las técnicas más utilizadas para reportar la proporción de estas bacterias (Salazar, 2017; Santacruz et al., 2014; Abenavoli et al., 2009; Lay et al., 2007; Eslinger, et al. 2014).

Se propone la metodología de Eslinger, et al. 2014 como una alternativa para la detección de bacterias pertenecientes a los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, añadiendo algunas modificaciones adicionales, primero se extrae el ADN bacteriano total de muestras fecales utilizando Quick-DNA Fecal/soil Microbe Minipred Kit de Zymoresearch ®. Se cuantifica utilizando Nanodrop One Thermo Scientific ®. La amplificación y detección se realizan en placas de 96 pocillos con SYBR Green 2x qPCR Master Mix (BioRad). Las muestras se procesan por duplicado con un volumen final de 25 µL que contiene un cebador de 0,3 µmol / L y 20 ng de ADN genómico molde. El valor de copias del gen de ARN ribosómico 16S (ARNr) se calcula de acuerdo con la siguiente página web:

<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>
utilizando tamaños genómicos promedio. Las curvas estándar se normalizan al número de copias del gen rRNA 16S obtenido de la siguiente página web: <http://rrndb.umms.med.umich.edu/> según trabajos anteriores.

Finalmente, hay que destacar que, debido a sus propiedades nutricias, la ingesta de algunas especies vegetales como los quelites podría tener un efecto benéfico sobre la microbiota humana, ya que son fuente de minerales, vitaminas, antioxidantes y ácidos grasos como omega-3 y omega-6 (Mera et al. 2003, Morales et al. 2013). Por todo esto, los quelites no deben asociarse con pobreza, sino con su gran riqueza alimenticia (Linares y Bye 2015). Los quelites son plantas de uso en la cocina tradicional que, en general, por desconocimiento son poco valoradas y utilizadas (Petrini 2012). Por lo que resulta de especial interés su estudio que tendrían estas especies vegetales a nivel de microbiota intestinal.

Conclusión

Se realizó una revisión bibliográfica en donde se eligieron a 4 grupos de bacterias que han sido muy estudiadas por su relación con la obesidad y las dietas occidentalizadas, así mismo se propuso la técnica molecular de qPCR como la técnica de mejor alcance y más reportada en artículos a la hora de estudiar la relación de *Firmicutes/Bacteroidetes*.

Agradecimientos

A la Dra. Marisela Ahumada por la oportunidad de trabajar en este proyecto de investigación, a M. en C.N.H. Viridiana

Ocampo, a Inti Borges, Osvaldo Salinas, y a todo el equipo que conforma el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Naturales y al Verano de la Ciencia 2021 por la Dirección de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Querétaro. También agradezco a mi familia y a mi pareja por su apoyo siempre.

Bibliografía

A. Eslinger, et al., “Yellow pea fiber improves glycemia and reduces *Clostridium leptum* in diet-induced obese rats”. *Nutrition Research*. Vol. 34, pp 714–722. 2014.

A. Moreira, et al., “Influencia de una dieta rica en grasas sobre la microbiota intestinal, la permeabilidad intestinal y la endotoxemia metabólica”. *Rev. Británica de nutrición*, Vol. 108, pp. 801-809. 2012.

A. Muñoz, et al., “Microbiota y diabetes mellitus tipo 2”, *Endocrinología y Nutrición*, Vol. 63, pp. 560–568, 2016.

A. Padrón, “Microbiota intestinal humana y dieta” *Cienc Tecn UTEQ.*, Vol. 12, pp. 21-42, 2019.

A. Rumbo, “Mapa microbiano de la piel humana: conociendo a nuestros huéspedes”, *Enferm Dermatol.*, Vol. 12, pp 18-22, 2018.

AH. Smith, et al., “Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins”. *Microb Ecol*. Vol. 50, pp197–205. 2005.

C. Lay, et al., “Separation of bacteria of the *Clostridium leptum* subgroup from the human colonic microbiota by fluorescence-activated cell sorting or

group-specific PCR using 16S rRNA gene oligonucleotides". *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 60, pp 513–520. 2007.

E. Méndez et al., "Altered Gut Microbiota and Compositional Changes in Firmicutes and Proteobacteria in Mexican Undernourished and Obese Children", *Frontiers in Microbiology*, 2018.

Salazar, E. Interacción de la dieta con la microbiota intestinal y su relación con el perfil metabólico en jóvenes con obesidad y normopeso, [PhD Thesis]. Universidad Autónoma de Guerrero, Guerrero, 2017.

I. Nadal, et al., "Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents". *Int J Obes*. Vol. 33, pp. 758-767. 2009.

I. Santos et al., "Childhood Obesity and Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Gut Microbiota". *Rev. Med. Childhood Obesity*, Vol. 14, pp. 1-9. 2018.

J. Rosique et al., "Estado nutricional, patrón alimentario y transición nutricional en escolares de Donmatías (Antioquia)" *Revista Colombiana de Antropología*. Vol. 48, pp. 97-124, 2012.

J. Bishara, et al., "Obesity as a Risk Factor for *Clostridium difficile* Infection". *Clinical Infectious Diseases*, es. Vol. 57, pp 489–493. 2013.

J. Dávila, et al., "Panorama de la obesidad en México". *Rev. Med. Inst. Méx. Seguro Soc*. Vol. 53, pp 240-9. 2014.

J. Kaberdoss, et al., "*Clostridium leptum* group bacteria abundance and diversity in the fecal microbiota of patients with inflammatory bowel disease: a case-control study in India". *BMC Gastroenterology*. Vol. 13. 2013.

J. Mukherjee, et al., "El ácido obeticólico mejora la gravedad de la infección por *Clostridioides difficile* en ratones obesos inducidos por una dieta alta en grasas", *Mucosal Immunol*, Vol.14, pp. 500–510, 2021.

L. Abenavoli, et al., "Gut Microbiota and Obesity: A Role for Probiotics". *Nutrients*. Vol. 11, pp 2690. 2019.

L. Aranda, et al. Análisis de la actividad metabólica multiorgánica con 18F-FDG en ratones suplementados con glutamato monosódico y una dieta alta en grasa [PhD Thesis]. Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, 2019.

L. Fontané, et al., "Influencia de la microbiota y de los probióticos en la obesidad", *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, Vol. 42. 2018.

M. Icaza. "Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad". *Revista de Gastroenterología de México*, Vol. 78, pp. 240–248. 2013

M.E. Linares y R. Bye. "Las especies subutilizadas de la milpa". *Revista Digital Universitaria*. Vol.16. pp. 22. 2015.

M.J. Riveros, et al., "Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud; malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico". *Rev. Nutr Hosp*. Vol. 29, pp 491-499. 2014.

N. Hariri, L. Thibault, "Obesidad inducida por dietas altas en grasas en modelos animales". *Reseñas de investigaciones sobre nutrición*. Vol. 23, pp 270-299. 2010.

P. Carvallo, et al., "Efectos Metabólicos del Consumo Excesivo de Fructosa

Añadida”. International Journal of Morphology. Vol. 37, pp 1058–1066. 2019.

B. Bye, “Quelites - ethnoecology of edible greens - past, present and future”. Journal of Ethnobiology, Vol. 1. pp. 109-123. 1981.

R. Del Campo, et al., “Microbiota en la salud humana: técnicas de caracterización y transferencia”. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Vol. 36, pp 241–245.

S. Pathak, et al., “Metabolism of Dietary Polyphenols by Human Gut Microbiota and Their Health Benefits”. Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease, pp 347–359. 2018.

V. Robles, “Progreso en el conocimiento de la microbiota intestinal humana”. Rev. Nutr Hosp., Vol. 28, pp. 553-557. 2013.

Y. Santacruz, Influencia de la microbiota intestinal en la obesidad [PhD Thesis]. Universidad Politécnica de Valencia, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, 2012.

Introducción al Verano de la Ciencia

Índice

Facultad de Ciencias Naturales

[Álvarez Márquez Carolina](#)

[Granillo Carrasco Natalia](#)

[Rivera Corona Brandon](#)

[Salinas González Oswaldo](#)

[Tello Arellano Javier](#)

[Mandaluniz Zuzaeta Borja](#)

Facultad de Contaduría y Administración

[Salas Benítez Carlos Armando](#)

Facultad de Enfermería

[Cabrera Martínez Norma Mariana](#)

Facultad de Ingeniería

[Arellano Ordoñez Estefanía](#)

[Arredondo Munguía Luis Emilio](#)

[Castillejos Alfaro Arline Montserrat](#)

[García Guzmán Salvador](#)

[Solis Resendiz Paula Noemi](#)

[Vargas Peña Raúl Emilio](#)

Facultad de Lenguas y Letras

[Bárceñas Trejo Vanesa](#)

[Díaz Gutiérrez Fátima](#)

[Montoya Torres Verónica](#)

Facultad de Química

[Cárdenas Alvarado Aldo Alan](#)

[Castruita Amaro Joseph Eliezer](#)

[Chávez Arias Joaquín](#)

[Godoy Álamos José Emilio](#)

[Isidoro Escamilla Brayan Alexis](#)

[Iturria Miranda Hanna Dessire](#)

[Martínez Sánchez Diego Arath](#)

[Mori Huerta Sebastián](#)

[Rojas Medina Rodolfo Javier](#)

Vera Pérez Ricardo Balam

Escuela de Bachiller

Plantel Sur

[Herrera Zamorano María Fernanda](#)

Bioconservación de queso fresco mediante la producción de nisina de *Lactococcus lactis* UQ2

Autor: Álvarez Márquez Carolina. Estudiante de la Licenciatura en Microbiología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Correspondencia: calvarez04@alumnos.uaq.mx.

Asesor: Dr. Carlos Regalado González. Profesor-Investigador. DIPA, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. regcarlos@gmail.com

Resumen

El queso fresco es el queso más consumido en México y gran parte de América Latina, también es el queso más popular en Estados Unidos respecto a los quesos exportados por países hispanohablantes. Pero debido a su alta humedad, es muy susceptible al deterioro fisicoquímico y microbiológico, teniendo una vida útil corta incluso en refrigeración. El objetivo de este trabajo fue usar microcápsulas de la cepa productora de nisina *Lactococcus lactis* UQ2, incorporarlas al queso fresco elaborado con leche de vaca, y utilizar un recubrimiento activo comestible elaborado a base de quitosano y caseinato de sodio (RAC) para aumentar su vida útil sin comprometer la calidad del producto. No se encontraron diferencias significativas en los valores de pH y porcentaje de humedad, independientemente del tipo de tratamiento. Se encontraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) en los valores de pH y porcentaje de humedad dependiendo del tiempo de almacenamiento. Sin embargo, sí se observó un efecto significativo ($\alpha < 0.05$) en la capacidad de inhibición de la nisina producida por *L. lactis* UQ2 en los tratamientos QM y QRM sobre *Micrococcus*

luteus. Lo que indica que el uso de las microcápsulas de *L. lactis* combinado con el RAC cubren una función de bioconservación contra bacterias Gram positivas deterioradoras y patógenas de alimentos, como *Listeria monocytogenes*.

Summary

Fresh cheese is the most consumed cheese in Mexico and much of Latin America, it is also the most popular cheese in the United States with respect to the cheeses exported from Spanish-speaking countries. But due to its high humidity, it is very susceptible to physicochemical and microbiological deterioration, having a short shelf life even in refrigeration. The objective of this work was to use microcapsules of the nisin-producing strain *Lactococcus lactis* UQ2, incorporate them into fresh cheese made from cow's milk, and use an edible active coating made from chitosan and sodium caseinate (RAC) to increase its life. Useful without compromising product quality. No significant differences were found in the pH values and in the humidity percentage according to the type of treatment. Significant differences were found in the pH values and moisture content according to the sampling time, with a value of $P < 0.05$. However, a significant effect was observed in the nisin inhibition capacity produced by *L. lactis* UQ2 in the QM and QRM treatments on *Micrococcus luteus*. This indicates that the use of *L. lactis* microcapsules combined with RAC play a role in bioconservation against Gram positive bacteria of interest, such as *Listeria monocytogenes*.

Palabras clave: Bioconservación, queso fresco, recubrimiento activo comestible, *Lactococcus lactis*.

Keywords: Bioconservation, fresh cheese, edible active coating, *Lactococcus lactis*.

Introducción

La incorporación de bacterias ácido lácticas que promueven la producción de bacteriocinas han mostrado ser candidatos prometedores en la fabricación de queso y otros productos lácteos (Kondrotienė et al., 2019). El crecimiento de estos microorganismos inhibe a otros patógenos que causan el deterioro de alimentos de origen animal o vegetal, esto se conoce como bioconservación; el término hace referencia a la extensión de la vida útil de los alimentos y la mejora de la calidad microbiológica mediante cultivos microbianos controlados y/o compuestos antimicrobianos naturales (González-Toledo et al., 2010).

Lactococcus lactis es una de las especies de bacterias ácido lácticas más conocidas y caracterizadas en la industria de alimentos, por sus propiedades antimicrobianas. Se ha utilizado en algunos productos lácteos para reducir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y así prevenir la listeriosis, que es una infección grave causada por el consumo de productos alimenticios contaminados con este patógeno (Szendy et al., 2019; Khelissa et al., 2021). La bacteriocina más conocida producida por *L. lactis* es la nisina, se ha demostrado que este péptido es eficaz para el control microbiano en varios productos lácteos y se ha evaluado ampliamente en la fabricación de queso (González-Toledo et al., 2010). Actualmente, en América Latina se desconoce la prevalencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos, por lo que no se puede estimar el riesgo de listeriosis por consumo de queso (Barría et al., 2020).

Objetivos

Incorporar microcápsulas de la cepa productora de nisina *Lactococcus lactis* UQ2 en la elaboración de queso fresco, para la bioconservación del mismo, sin afectar sus propiedades y calidad.

Recubrir el queso fresco con un recubrimiento activo comestible elaborado a base de quitosano y caseinato de sodio en relación 8:1, para la bioconservación del mismo, sin afectar sus propiedades y la calidad.

Determinar la capacidad de producción de nisina por la cepa de *L. lactis* UQ2.

Metodología

Elaboración del recubrimiento activo

Se elaboró una suspensión de caseinato (CS) y quitosano (QT) en proporción 8:1 (CS-QT; p/p). Se agregó a la suspensión arginato láurico y natamicina en concentración previamente determinada para inhibir bacterias y hongos deterioradores del queso.

Elaboración del queso fresco

Para la elaboración del queso fresco se utilizó leche de vaca entera pasteurizada de la marca Lala, la cual se calentó hasta llegar a una temperatura de 35°C. En este punto se agregaron 20 gotas de cuajo por cada litro de leche y se mantuvo a 35°C por 45 minutos, la temperatura se monitoreó cada 5 minutos usando un termómetro de mercurio y un termómetro digital. Una vez pasado el tiempo de cuajado la temperatura se elevó hasta 40°C, y se cortó la cuajada. Después se pasó a una manta de cielo para retirar el exceso de suero en el queso, se mantuvo gran parte del suero puesto que el queso fresco es característicamente húmedo y blando.

El queso se pesó para obtener el rendimiento total y se usó un molino para obtener la consistencia deseada. El resultado de la molienda se dividió en dos, a la mitad del queso se le adicionaron microcápsulas de *L. lactis* (obtenidas mediante secado por aspersión) y sal de mesa común, se mezcló hasta obtener una masa homogénea; al resto del queso solo se le adiciona sal y se homogeneizó. Después se formaron quesos con

moldes de acero inoxidable de la siguiente manera: 24 quesos de 50 gramos (12 con microcápsulas y 12 del queso sin microcápsulas) para las pruebas de bioconservación y calidad.

Seis de los quesos de 50 gramos, que no tenían las microcápsulas se recubrieron con RAC y se dejaron secar en un campo estéril, se le aplicó el mismo procedimiento a seis de los quesos que tenían las microcápsulas de tal modo que se obtuvieron 4 tratamientos: el queso control (QC); el queso que solo tenía el recubrimiento activo (QR); el queso que solo contenía las microcápsulas pero que no estaba recubierto (QM); y el queso con microcápsulas y RAC (QRM). Una vez secos los recubrimientos los quesos se empacaron en bolsas estériles, se sellaron y se almacenaron en refrigeración hasta su uso.



Fig. 1. Queso elaborado para las pruebas de bioconservación.

Bioconservación del queso fresco

Se le dio un seguimiento de control de calidad a cada uno de los quesos elaborados mediante pruebas microbiológicas y fisicoquímicas de manera periódica para conocer el estado del queso a lo largo del tiempo. Se realizaron las pruebas de calidad en base al protocolo y lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-121-SSA1-1994). Se hicieron muestreos cada 4 días durante 20 días a partir del día cero o día de

elaboración. De manera aleatoria se seleccionó el queso que se utilizó en cada muestreo. A estos quesos se les determinó la presencia de coliformes fecales y *Salmonella* como análisis microbiológicos, y para los análisis fisicoquímicos se contemplaron: el porcentaje de humedad y el pH.

De manera adicional al muestreo para la bioconservación se pretendió determinar qué tan efectivos son los tratamientos con microcápsulas y con RAC para contrarrestar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en el queso fresco. Para lo anterior se realizó la comparación de la capacidad de inhibición de la nisina producida por *L. lactis*, a partir de 4 y 30 días después de la elaboración del queso.

Se prepararon placas de agar soya tripcaseína (STC) suplementados con *Micrococcus luteus* y una solución de Tween 80 al 5%. Para la preparación de la muestra se seleccionó de manera aleatoria un queso de cada tratamiento cada 4 días. De la parte central de cada queso se obtuvieron 0.2 g de muestra que se colocaron en tubos Eppendorf con 1 ml de ácido cítrico 50 mM. Las muestras se homogeneizaron y se centrifugaron a 14000 \times g durante 3min. Se decantaron 400 μ l de sobrenadante en otro tubo Eppendorf. Las placas de STC se dividieron en 3 cuadrantes en cada cuadrante se realizó una perforación usando un horador. En cada perforación se colocaron 50 μ l de muestra, de tal manera que se obtuvieron 2 placas con 3 perforaciones cada una por cada tratamiento. Este muestreo se repitió a los 4 y 30 días después de la elaboración del queso.

Para observar la concentración de células de *L. lactis*, se sembraron muestras de queso del día en dilución 1:10 siguiendo el método de siembra Miles y Misra o conteo de microorganismos viables, en agar PBC selectivo para bacterias ácido lácticas. Se colocaron 20 μ l de la dilución se colocó en forma de gotas y se dejó secar en campo estéril. Las placas se incubaron a una temperatura de

30°C. Este muestreo se repitió a los 4 y 30 días después de la elaboración del queso.

Análisis estadístico

Todos los datos recopilados se sometieron a análisis estadístico utilizando el programa *R project* versión 4.0.2. Se realizó un MANOVA para determinar diferencias significativas entre los cuatro tratamientos y el tiempo de muestreo para los datos de bioconservación. Se realizó la prueba t para comparar los promedios de las UFC/g de *L. lactis* entre el día 4 y el día 30 después de la elaboración del queso.

Resultados

Elaboración de queso fresco

El rendimiento neto en la elaboración del queso fue de 12% en relación a la cantidad de leche empleada para su elaboración.

Bioconservación

Los resultados para las pruebas de coliformes fecales y *Salmonella* fueron negativas en todos los muestreos realizados. No se encontraron diferencias significativas en los valores de pH y porcentaje de humedad para muestras evaluadas al mismo tiempo de almacenamiento. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas a los diferentes tiempos de almacenamiento de las muestras ($p > 0.05$)

Para cuantificar el efecto inhibitorio del queso sobre *M. luteus*, se midieron los diámetros de los halos formados alrededor de los pozos en las placas de STC. En los quesos QC y QR no se observó un efecto inhibitorio (Tabla 1), debido a la ausencia de microcápsulas de *L. lactis*. En cuanto a QM y QRM el efecto inhibitorio observado se asoció a la producción de nisina. El promedio de diámetros del halo de inhibición a los 4 y 30 días de almacenamiento a 4°C se observan en la Tabla 1.

Tabla 1. Efecto inhibitorio sobre *M. luteus* de los tratamientos realizados en queso fresco.

Tratamiento	Promedio de los halos de inhibición al día 4 (mm)	Promedio de los halos de inhibición al día 30 (mm)
QC	Sin efecto	Sin efecto
QR	Sin efecto	Sin efecto
QM	14.04±XX ^a	16.37±YY ^b
QRM	14.00±YY ^a	16.74±YY ^b

QC=queso control. QR=queso recubierto sin microcápsulas. QM=queso con microcápsulas sin recubrimiento; QRM queso recubierto y con microcápsulas. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Los resultados de la prueba t para QM ($p = 0.0625$) no fueron significativos. Pero en el caso de QRM se obtuvieron resultados significativos ($p < 0.05$).

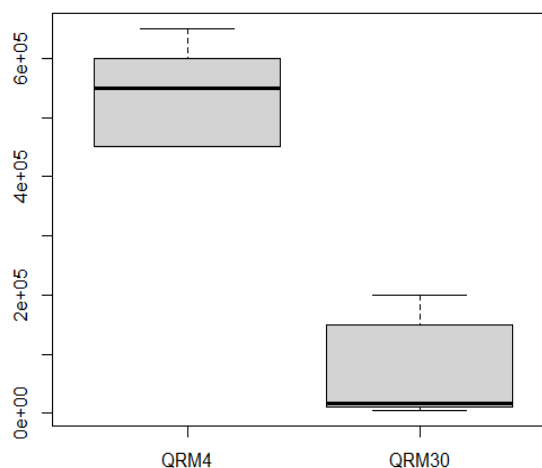


Figura 2. Diferencia en el crecimiento de *L. lactis* entre los días 4 y 30 después de la elaboración del queso. En el eje de Y se representan las UFC/g. Las barras representan el intervalo de confianza al 95%.

Discusión y conclusiones

Dado que no se observó un efecto significativo entre el tipo de tratamiento (QM, QRM) en las pruebas de bioconservación, se asume que la vida de anaquel es la misma para todos estos quesos. Puesto que en los cuatro tratamientos se vieron diferencias significativas en la disminución de pH y porcentaje de humedad de las muestras a los diferentes tiempos de almacenamiento, se concluye que existe un deterioro uniforme para los cuatro tratamientos. Se observó un efecto significativo en la inhibición de *M. luteus* debido a la nisina producida por *L. lactis* UQ2 en los tratamientos QM y QRM. Esto sugiere que el uso de las microcápsulas de *L. lactis* UQ2 combinado con el RAC permiten una función de bioconservación contra *M. luteus* y otras bacterias Gram positivas que pueden ser patógenos de alimentos, tal como *Listeria monocytogenes*. Además, este efecto se mantuvo constante después de 30 días de la elaboración del queso en el tratamiento QM, sin embargo, el tratamiento QRM mostró una disminución de la población de *L. lactis* en el queso.

El uso de bacterias ácido lácticas en la elaboración de productos lácteos como el queso fresco elaborado a base de leche de vaca, supone un futuro prometedor en el área de bioconservación de alimentos. Este tipo de tratamientos son de interés comercial en todo el mundo. Principalmente en países latinoamericanos es de suma importancia su implementación, pues no se cuenta con un monitoreo adecuado de los casos de enfermedades transmitidas por alimentos, tales como la listeriosis, que son contraídas por la contaminación en la elaboración de quesos artesanales e industriales.

Agradecimientos

A la Dirección de Investigación y Posgrado UAQ y a la IBQ Mayra Maya Plaza.

Referencias bibliográficas

- Almeida, G. et al. Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *International Journal of Food Microbiology* 167, 303–309 (2013).
- Barría, C. et al. Tracing *Listeria monocytogenes* contamination in artisanal cheese to the processing environments in cheese producers in southern Chile. *Food Microbiology* 90, 103499 (2020).
- González-Toledo, S. Y., Domínguez-Domínguez, J., García-Almendárez, B. E., Prado-Barragán, L. A. & Regalado-González, C. Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented whey as alternative culture medium. *Journal of Food Science* 75, M347–M353 (2010).
- Khelissa, S., Chihib, N.-E. & Gharsallaoui, A. Conditions of nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and its main uses as a food preservative. *Archives in Microbiology* 203, 465–480 (2021).
- Kondrotienė, K. et al. Evaluation of fresh cheese quality prepared with newly isolated Nisin Z-producing *Lactococcus lactis* bacteria. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*. 11, 713–722 (2019).
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Szendy, M. et al. Structural change in GadD2 of *Listeria monocytogenes* field isolates supports nisin resistance. *International Journal of Food Microbiology* 305, 108240 (2019).

Detección molecular de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso

Granillo-Carrasco Natalia¹, Andrea Margarita Olvera-Ramírez²

1 Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro (ngranillo24@alumnos.uaq.mx); 2 Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro (andrea.olvera@uaq.mx)

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un microorganismo de interés clínico dado que provoca la listeriosis, infección grave generalmente causada por el consumo de alimentos contaminados con la bacteria. En el presente estudio se buscó la estandarización de un método molecular con distintos oligonucleótidos que permita la detección del agente patógeno en muestras de queso, para ello se utilizaron técnicas de extracción de DNA por calor, una reacción en cadena de polimerasa (PCR) y una electroforesis. Los resultados obtenidos para la detección molecular usando 3 pares de oligonucleótidos distintos fue favorable y se pudo realizar la estandarización del método.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, patógeno, detección molecular.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a microorganism of clinical interest that causes listeriosis, a severe infection generally caused by the intake of contaminated food with this bacterium. This study seeks for the standardization of a molecular method using different oligonucleotides that allow the detection of the pathogen in cheese samples; to

achieve this, techniques such as heat DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR) and electrophoresis were used. The polymerase chain reaction was done using three different pairs of oligonucleotides; the results obtained from this analysis were favorable and the standardization of the method could be carried out.

Key words: *Listeria monocytogenes*, pathogen, molecular detection.

INTRODUCCIÓN

El género *Listeria* está constituido por seis especies, *Listeria innocua*, *Listeria weishimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi*, *Listeria murrayi*. Únicamente dos especies de este género son patogénicas: *Listeria monocytogenes* asociada con infección en humanos y animales, mientras que *Listeria ivanovii* asociada únicamente con infección en animales (1).

La listeriosis es una enfermedad bacteriana invasiva, producida por *Listeria monocytogenes*; cocobacilo Gram-positivo psicrótrofo, móvil, no esporulado, anaerobio facultativo, patógeno de origen alimentario en humanos y animales con una amplia distribución en la naturaleza. La contaminación alimentaria, en epidemias o en casos esporádicos, en poblaciones inmunosuprimidas, constituyen los dos factores fundamentales para la presentación de la enfermedad. La amplia distribución de *Listeria monocytogenes* se debe a la capacidad de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en diferentes medios. Por consiguiente, los alimentos se pueden contaminar en cualquier eslabón de la cadena productiva y en el almacenamiento en frío (2).

Las especies de *Listeria* están muy extendidas en el medio ambiente. Se han aislado del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, pollo fresco y congelado, alimentos frescos y procesados, queso, leche no procesada, desechos de los mataderos, así como en el tracto digestivo de humanos y animales

asintomáticos. *L. monocytogenes* se ha aislado de variadas especies de mamíferos, aves, peces, crustáceos e insectos. No obstante, su principal hábitat es el suelo y la materia vegetal en descomposición, en la cual sobrevive y crece como saprofito. Debido a su amplia distribución, este microorganismo tiene muchas oportunidades de contaminar alimentos en distintos pasos de la producción alimentaria, siendo ésta la vía más frecuente por la que el ser humano adquiere la infección (3).

La leche, el queso, los vegetales frescos, la berza, el pollo, las setas, el pavo y muchos otros suelen ser los alimentos más frecuentemente implicados en ella. La incidencia anual por 100.000 habitantes puede variar del 0,3 al 0,8% y alcanzar un 5% durante algunos brotes epidémicos (3).

La detección de *L. monocytogenes* en muestras de comida a través de métodos tradicionales son simples, sensibles y baratos si se comparan los métodos moleculares. Sin embargo, los métodos convencionales son laboriosos y consumen mucho tiempo ya que requieren de más de una semana para la detección y confirmación del patógeno. Gracias a los avances en la tecnología molecular, los métodos moleculares han sido usados como alternativa para el cultivo y los métodos serológicos para pruebas en comida. La detección de un patógeno presente en la comida se realiza por medio de métodos moleculares basados en la detección de secuencias específicas de ADN o ARN en el patógeno (4).

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio fue estandarizar el método molecular para la detección de *L. monocytogenes* en muestras de queso, además de cuantificar las unidades formadoras de colonias de la bacteria por goteo en un cultivo.

METODOLOGÍA

El trabajo inició con el pase a medio líquido de una colonia de *L. monocytogenes* (previamente cultivada en medio PALCAM) a Caldo Soya Tripticaseína, se homogenizó y se incubó por 3 horas a 37° C. El pase se realizó por triplicado: a) guardar en stock, b) diluciones e inocular el queso y c) extracción de ADN.

Una vez transcurridas las 3 horas, se inocularon 25 g de queso agregando 20 µl del cultivo de *L. monocytogenes* y se refrigeró por 30 minutos. Posteriormente se hace obtiene un pellet de dos quesos inoculados (denominados 5904 y 2207): primero, se añaden 25 ml de PBS estéril a los 25 g de queso inoculado y se macera el queso (también se puede hacer uso de un stomaker); después se toman 9 ml del sobrenadante y se colocan en una centrífuga a 13 000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se retira y se añaden 9 ml de PBS estéril para volver a centrifugar a 13 000 rpm por 10 min, este lavado se realiza dos veces más, con ello, los pellets de ambas muestras están listos para realizar la extracción de ADN.

Para realizar el conteo por goteo primero se hicieron 4 diluciones seriadas a partir del cultivo inicial en tubos de ensaye con 9 ml de agua peptonada. Las diluciones se realizan tomando 1 ml del cultivo inicial colocándolo en el primer tubo con la marca de 1×10^4 y se homogeniza, del tubo anterior (1×10^4) se toma 1 ml colocándolo en el segundo tubo con la marca 1×10^3 , y así sucesivamente hasta el tubo 1×10^1 . Una caja de Petri con medio PALCAM se divide en 4 secciones, en donde a cada sección se le coloca una gota de 20 µl de una de las diluciones, y se realiza un duplicado. Posteriormente se incubó a 37°C por 18 horas.

Para la extracción de ADN se ocupan 200 µl del pellet correspondiente a cada muestra y que se centrifugan a 14 000 rpm por 4 min., se retira el sobrenadante y se añaden 200 µl de H₂O destilada estéril para nuevamente centrifugar a 14 000 rpm por 4 min., se realiza otro lavado retirando el sobrenadante y añadiendo 200 µl de H₂O destilada

estéril y centrifugando una última vez a 14 000 rpm por 4 min., a continuación se retira el sobrenadante y se colocan 50 µl de H₂O destilada estéril para calentarse a 100°C por 5 min., posteriormente se homogeniza y, por último, se vuelve a calentar a 100°C por 5 min. Se toma 1 µl de la extracción obtenida para analizarse en el Nanodrop.

Los componentes para realizar la mezcla de la PCR se describen en la Tabla 1.

	1X
HOT START	6 µl
BSA	1.6 µl
H ₂ O	1.6 µl
Prlis1	0.4 µl
Prln	0.4 µl
LIP1	0.4 µl
LIP2	0.4 µl
Ino2	0.4 µl
LIS1B	0.4 µl
ADN	1 µl c/u

Tabla 1. Reactivos utilizados para realizar la PCR de las muestras de queso 5904 y 2207.

En la campana de UV se realiza la mezcla correspondiente de los reactivos obteniendo en total 9 tubos (Tabla 2).

TUBO	MUESTRA
9.1 Prlis1/Prln	2207
9.2 LIP1/LIP2	2207
9.3 Ino2/LIS1B	2207
9.4 Prlis1/Prln	5904
9.5 LIP1/LIP2	5904
9.6 Ino2/LIS1B	5904
9.7 Prlis1/Prln	<i>L. monocytogenes</i>
9.8 LIP1/LIP2	<i>L. monocytogenes</i>
9.9 Ino2/LIS1B	<i>L. monocytogenes</i>

Tabla 2. Orden y rotulación de los tubos usados para el PCR.

Los tubos se colocan en el termociclador (Biorad) para llevar el programa de termociclado descrito en la Tabla 3.

Ciclo	Temperatura y Tiempo
1	95°C por 5 minutos
30	95°C por 45 segundos 57°C por 30 segundos 72°C por 1 minuto
1	72°C por 5 minutos
1	12°C por ∞

Tabla 3. Programa de termociclado.

Una vez que el termociclador termina, se prepara el gel agarosa 1% que se utiliza para la electroforesis: mezclar 0.2 g de gel agarosa + 20 ml de TAE 1x; una vez que el gel agarosa se ha disuelto por completo, se coloca en el molde con su peine correspondiente. Después de que el gel esté endurecido, se procede a la carga de 2 µl de escalera, y, de 5 µl de muestra con 1 µl de Buffer de carga Orange Green Dye 6x. Tras cargar las muestras y reactivos en su pocillo correspondiente (en el primero pocillo se coloca la escalera, y, a partir del segundo se colocan las muestras como se describieron en la Tabla 2), se coloca la cámara de horizontal de electroforesis con el gel cargado y sumergido en TAE 1x reusado para conectarlo a su fuente de poder y correr la electroforesis a 70 V por 45 min.

Por último, después de haber terminado la electroforesis, se coloca el gel en el fotodocumentador para revelar la imagen correspondiente.

RESULTADOS

El conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Listeria monocytogenes* de la caja 1 y caja 2 se muestran en la Tabla 4 y 5 respectivamente.

CAJA 1	
SECCIÓN	CONTEO
1x10 ⁴	INCONTABLE
1x10 ³	INCONTABLE
1x10 ²	210 UFC
1x10 ¹	107 UFC

Tabla 4. Resultados de las unidades formadoras de colonias en un conteo por goteo de la Caja 1 con *L. monocytogenes*.

CAJA 2	
SECCIÓN	CONTEO
1x10 ⁴	INCONTABLE
1x10 ³	INCONTABLE
1x10 ²	198 UFC
1x10 ¹	115 UFC

Tabla 5. Resultados de las unidades formadoras de colonias en un conteo por goteo de la Caja 1 con *L. monocytogenes*.

Las concentraciones de DNA obtenidas por espectrofotometría (Nanodrop, Thermo Scientific) se describen en la Tabla 6 y la visualización de los productos de la PCR se muestran en la Figura 1.

MUESTRA	[]	PUREZA
5904	0.034 µg/µl	1.21
2207	0.031 µg/µl	1.29

Tabla 6. Concentraciones del ADN de las muestras.

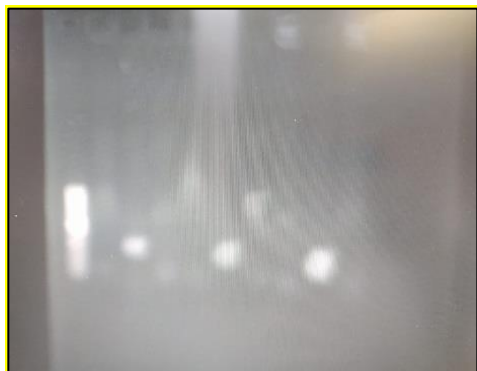


Figura 1. Visualización de productos de la PCR: carril 1 cargado con la escalera y, a partir del carril 2 se colocaron las muestras como indica la Tabla 2.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En los resultados del método de goteo de UFC (Tabla 4 y 5) se puede observar que las UFC tras haber hecho las diluciones aún es alta, lo cual pudo deberse a una toma de exceso de una colonia de la bacteria. Respecto a la concentración de DNA, el espectrofotómetro (Nanodrop) nos permite hacer una medición rápida, fiable y reproducible de pureza de ADN, ARN y proteínas, en volúmenes de microlitro, mostrando el espectro para detectar

impurezas; para el análisis se utilizó como blanco agua destilada estéril. Los resultados nos muestran que la concentración obtenida de ambas muestras es baja y que el ADN obtenido es considerado impuro, ya que la proporción 1.8 es la aceptada para ADN puro, es decir que las proporciones de 1.21 para la muestra 5904 y 1.29 para la muestra 2207 nos indican la presencia de proteínas. Se procesó el gel de agarosa en el fotodocumentador para obtener evidencia de los resultados, sin embargo, y se obtuvo la imagen 1, en donde se pueden observar las bandas en todos los carriles cargados, el ADN que tenía mayor integridad era el del control positivo de *Listeria monocytogenes* que se encontraba en los últimos tres carriles del gel agarosa, mientras que los de las muestras 5904 y 2207 mostraron poca fragmentación ya que se observaba un ligero sendero luminoso. Este resultado concuerda con la baja concentración y la impureza del ADN que se obtuvo de la extracción de ADN para ambas muestras analizadas.

Según los resultados obtenidos anteriormente podemos es posible decir que los distintos pares primers utilizados para la PCR realizada funcionaron para la detección molecular de *Listeria monocytogenes* por lo que es posible realizar análisis a distintos quesos para detectar la bacteria con éxito. También se recalca la importancia de obtener extracciones de ADN íntegras, concentradas y puras para que la visualización de la PCR sea de mejor calidad en el fotodocumentador. Con este experimento se podría evaluar la posibilidad de poner a prueba distintos productos lácteos provenientes de granjas para detectar la presencia de la bacteria y prevenir la infección tanto en animales como en humanos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado bajo la supervisión de la Dra. Andrea Margarita Olvera Ramírez y con el apoyo en el laboratorio de LM. Valeria Aline Ramírez Ramírez en el Verano de la Ciencia 2021.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Seeliger H P R, Jones, D. Genus Listeria Pirie. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, Holt J G. Baltimore, Williams, and Wilkins. 2: 1235-1245

Torres, K.; Sierra, S.; Poutou, R.; Carrascal, A. & Mercado, M. (2005). PATOGÉNESIS DE Listeria monocytogenes, MICROORGANISMO ZOONÓTICO EMERGENTE. Revista MVZ Córdoba, Vol. 10, No. 1.

Oteo, J. & Alós, J. I. Listeria y LISTERIOSIS. Control de Calidad SEIMC, Servicio de Microbiología, Hospital de Móstoles. Móstoles, Madrid.

Law JW-F, Ab Mutalib N-S, Chan K-G and Lee L-H (2015) An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of Listeria monocytogenes in food. Front. Microbiol. 6:1227. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01227

Riqueza de macromicetos en parques públicos del municipio de Querétaro

Brandon Rivera, Iván Mendoza y L. Daniela Lona.

Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.

Correspondencia:

brivera29@alumnos.uaq.mx, llona12@alumnos.uaq.mx

Resumen. Hacer un estudio de riqueza de macromicetos de en parques de la ciudad de Querétaro para determinar si existen hongos con propiedades comestibles, tóxicas, alucinógenas y medicinales. Se hizo una selección de seis parques para posteriormente hacer un muestreo de macromicetos en un lapso de tiempo del mes de junio al mes de julio. De los seis parques monitoreados, se logró rastrear 30 organismos en 16 especies. Con la alta precipitación que se presentaron en los meses de junio y julio promueven la humedad del de los suelos, provocando un ambiente adaptable para la fructificación de acrosomas y con ello la diversidad de especies en los parques de la zona conurbana de la región metropolitana del estado de Querétaro.

Palabras clave: Diversidad, macromicetos, parques, propiedades, riqueza.

Abstract. Carry out a macromycetes diversity study in parks of the Queretaro city to determine if the mushrooms are edible, medicinal, toxic or hallucinogen. A selection of six parks was made for later make a sampling of the present macromycetes on a time lapse of one month (june to july). On the six monitored parks, 30 macromycetes species were succesfully tracked. With the high precipitation percentage of the

months june and july the humidity was promoted for the soils, inducing an adaptable environment for the fructification of mushrooms and with it the diversity of species on parks of the conurban area of the metropolitan region of the state of Queretaro.

Key words: Diversity, macromycetes, parks, properties, wealth.

Introducción

Los hongos son organismos filamentosos, eucarióticos, aclorofílicos, heterótrofos, que se reproducen vegetativa, asexual y sexualmente por medio de esporas y del micelio (hifas), poseen una pared celular compuesta principalmente de quitina, celulosa o pueden no presentar una, presentan crecimiento apical y se nutren por absorción y fagocitosis. Esta definición incluye a organismos que se parecen morfológicamente entre sí, pero que no están estrechamente relacionados, por lo que los organismos llamados hongos forman un grupo polifilético y heterogéneo de seres vivos. por lo tanto, los hongos están incluidos en tres reinos de organismos distintos: Reino Fungi, Reino Protista y Reino Chromista. De estos sólo los primeros forman hongos macroscópicos llamados macromicetos, los cuales constituyen una agrupación convencional que desarrollan acrocarpos, también llamados setas o cuerpos fructíferos (esporomas).^{[1], [2]}

Se estima estima que existe de 2, 200,000 a 3, 800,000 de especies de hongos en el mundo. Por su parte, México es un país megadiverso gracias a su posición geográfica, es por eso que, al hablar de diversidad de hongos, México es uno de los mayores representantes; se estima que existen 200,000 especies de para México. Los estados con mayor riqueza en el país son Veracruz, 1,517 especies; Jalisco, 1,040 especies; Tamaulipas, 1,036 especies; Querétaro, 806 especies. Este último es un estado del centro del país, gracias a esto presenta tres provincias fisiográficas lo que provoca una gran riqueza.^[3]

Los hongos verdaderos, son los únicos que producen esporomas, los cuales pueden tener propiedades específicas como las siguientes.

Medicinales: utilizados como materia prima para generar nuevos productos que garanticen proporcionar mejoras salud y a la calidad de vida, y que reduzcan el riesgo de padecer enfermedades gracias a que presentan propiedades inmunológicas, antioxidantes, antibióticas, anticancerígenas, antihipertensivas, antiinflamatorias, antidiabéticas, antivirales, antimicrobiales y antitumorales. ^{[5] [6] [8]}.

Comestibles: Se aprovechan como una fuente de energía y mantenimiento ya que ofrecen un enorme potencial comercial para ser utilizados como materia prima capaz de generar nuevos productos que garanticen alimentos bajos en calorías, grasas, proteínas, vitaminas, fibra dietética y minerales. ^{[5] [8]}.

Alucinógenos: Presentan sustancias psicoactivas como lo son la psilocina y psilocibina que inducen sinestesia, producen cambios en la realidad alterando la percepción y conciencia de los objetos, visiones, sensaciones, pensamientos y sentimientos. ^[9].

Tóxicos: Presentan un riesgo a la salud ya que producen fuertes problemas gástricos, efectos psicotrópicos, incluso la muerte, debido a las micotóxicas que producen como lo son Aflatoxinas, Sterigmatocistina, Ocratoxina A, Tricotocenos, Zearalenonas, Fumonisinias, Fusarina, Moniliformina, Patulina, Citrinina, Ocratoxina A, Alternariol, Acido tennazónico, Alcaloides. ^[7].

Hasta el momento no existen estudios presentes que propongan un muestreo de macromicetos comestibles, medicinales, alucinógenas y tóxicas en parques de la zona conurbana y antropizada de la zona metropolitana del estado de Querétaro, es por eso que en el presente artículo se intenta hacer un estudio de riqueza de macromicetos en parques de la ciudad de Querétaro para determinar si en ambientes antropizados existen hongos con propiedades comestibles, tóxicas, alucinógenas y medicinales. ^{[1] [10] [11]}.

Materiales y métodos

Tomando como campo de estudio los parques de la zona conurbana de la región metropolitana del estado de Querétaro, se hizo una selección de seis

parques para posteriormente hacer un muestreo de macromicetos en un lapso de tiempo del mes de junio al mes de julio, los seis parques seleccionados fueron los siguientes: Lagunas Centro Sur, Parque Carretas, Parque Cerro de las Campanas, Parque el Batán, Parque el Tángano y Parque Querétaro 2000. De cada parque presentado se hizo un rastreo y colecta de macromicetos tomando en cuenta los siguientes criterios: Se rastrearon y colectaron hongos en zonas verdes, dentro de los parques, las cuales debieron presentar un frecuente tránsito de personas para estudiar mejor la interacción hongo-persona.

Al momento de coleccionar, se hizo un registro donde se anotó el tipo de sustrato en el que crecían, la vegetación presente alrededor del sitio de crecimiento del hongo, detectar si su hábito era ignícola, húmico, xilófago, fimícola o terrícola y si su estilo de crecimiento era cespitosa o gregaria. Así como anotar las características y medidas del esporoma y sus estructuras (anillo, pedúnculo, sombrero, volva).

Con el apoyo de utilización de claves dicotómicas otorgadas por el asesor, se logró identificar las especies de macromicetos colectados.

Con base a los trabajos que se han publicado sobre estudios micológicos de macromicetos en el estado de Querétaro, se revisaron los especímenes colectados para identificar las propiedades médicas, tóxicas, comestibles y alucinógenas que presentasen los mismos. ^{[1] [10] [11] [13] [14] [15] [16] [17]}

Resultados

De los seis parques monitoreados, se logró rastrear 30 organismos en 16 especies. A continuación, se muestran las estadísticas generales del estudio para cada parque.

Tabla 1: Lista de especies de macromicetos de parques del municipio de Querétaro^{[18] [19] [20] [21] [22] [23] [24]}

Parque	Especies	Vegetación	Hábito	Crecimiento	Importancia
Lagunas Centro Sur	<i>Schizophyllum commune</i>	<i>Salix alba</i> , <i>Vachellia farnesiana</i> .	Lignícola	Cespitoso	Comestible
Parque Alameda Hidalgo	<i>Phellinus</i>	<i>Salix alba</i> .	Lignícola	Gregario	Medicinal
	<i>Fuscoporia gilva</i>	<i>Jacaranda mimosofila</i> , <i>Salix alba</i> , <i>Taxodium mucronatum</i>	Lignícola	Gregario	Medicinal
Parque Carretas	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Jacaranda mimosifolia</i> , <i>Prosopis juliflora</i> , <i>Xanthosoma robustum</i> .	Humícola	Cespitoso	Comestible
	<i>Agaricus campestris</i>	<i>Crinum arenarium</i> , , <i>Schinus terebinthifolia</i>	Humícola	Cespitoso	Comestible
	<i>Fomitiporia robusta</i>	<i>Taxodium mucronatum</i> .	Lignícola	Gregario	Tóxico
	<i>Psathyrella</i>	<i>Salix alba</i> .	Humícola	Cespitoso	Tóxico
Parque Cerro de las Campanas	<i>Agaricus bisporus</i>	<i>Lantana cámara</i> , <i>Xanthosoma robustum</i> .	Humícola	Cespitoso	Comestible
	<i>Heliocybe sulcata</i>	<i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Ficus microcarpa</i> <i>Melia azedarach</i> .	Xilófago	Cespitoso	Medicinal
	<i>Inonotus rickii</i>	<i>Annona cherimola</i> , <i>Carya illinoensis</i> , <i>Salix alba</i> .	Lignícola	Gregario	Tóxico
	<i>Phallus hadriani</i>	<i>Salix alba</i> , <i>Jacaranda mimosofila</i> .	Humícola	Cespitoso	Medicinal
	<i>Pleurotus ostreus</i>	<i>Bursera fagaroides</i> , <i>Salix alba</i> .	Lignícola	Gregario	Comestible
Parque el Batán	<i>Armillaria mellea</i>	<i>Pasidium guajava</i> , <i>Salix alba</i> , <i>Schinus molle</i> , <i>Vachellia farnesiana</i> .	Humícola	Cespitoso	Comestible
	<i>Coprinellus micaceus</i>	<i>Prosopis juliflora</i> , <i>Vachellia farnesiana</i> .	Humícola	Cespitoso	Tóxico
	<i>Fomitiporia robusta</i>	<i>Vachellia farnesiana</i> , <i>Prosopis juliflora</i> .	Lignícola	Gregario	Tóxico
	<i>Geastrum</i>	<i>Bursera Fagaroides</i> , <i>Vachellia farnesiana</i> .	Humícola	Cespitoso	Tóxico
	<i>Inotus rickii</i>	<i>Carya illinoensis</i> , <i>Prosopis juliflora</i> , <i>Salix alba</i> .	Lignícola	Gregario	Tóxico
	<i>Lentinus auricularis</i>	<i>Bursera Fagaroides</i> , <i>Vachellia farnesiana</i> .	Xilófago	Cespitoso	Medicinal
Parque el Tángano	<i>Geastrum</i>	<i>Salix alba</i> , <i>Vachellia farnesiana</i> .	Humícola	Cespitoso	Tóxico
	<i>Phellinus</i>	<i>Prosopis juliflora</i> , <i>Salix alba</i> , <i>Vachellia farnesiana</i> .	Lignícola	Gregario	Medicinal
Parque Querétaro 2000	<i>Coprinus comatus</i>	<i>Caesalpinia pulcherrima</i> , <i>Jacaranda mimosifolia</i> .	Humícola	Cespitoso	Comestible (inmaduro), Tóxico (maduro)
	<i>Inotus rickii</i>	<i>Salix alba</i> , <i>Schinus molle</i> .	Lignícola	Gregario	Tóxico
	<i>Pleurotus ostreus</i>	<i>Salix alba</i>	Lignícola	Gregario	Comestible



Lámina I. 1-16. Basidiomas. 1.- *Agaricus bisporus*, 2.- *Agaricus campestris*, 3.- *Armillaria mellea*, 4.- *Coprinellus micaceus*, 5.- *Coprinus comatus*, 6.- *Fomitiporia robusta*, 7.- *Fuscoporia gilva*, 8.- *Geastrum*, 9.- *Heliocybe sulcata*, 10.- *Inonotus rickii*, 11.- *Lentinus auricularis*, 12.- *Phallus hadriani*, 13.- *Phellinus*, 14.- *Pleurotus ostreatus*, 15.- *Psathyrella*, 16.- *Schizophyllum commune*.

Discusión y conclusiones

Con la alta precipitación que se presentaron en los meses de junio y julio promueven la humedad del de los suelos, provocando un ambiente adaptable para la fructificación de esporomas y con ello la riqueza de especies. Sin embargo, esta diversidad se manifiesta de una forma variable en cada uno de los parques. Se considera que el mayor factor para la variabilidad de especies es el tipo de vegetación que presenta cada parque; al presentarse precipitación, el suelo se humidifica en más porcentaje, provocando que las plantas comiencen a hidratarse y con ello pueden hacer más fácilmente relaciones con estos organismos; por su parte las setas aprovechan esta invitación de las plantas para hacer relaciones. En la literatura se ha demostrado que especies específicas de hongos ya están codificadas para hacer relaciones simbióticas, patógenas o comensales con especies específicas de plantas. Por otro lado, y siguiendo con el factor de la vegetación, otra causa sería el tipo de plantas que presenta cada parque en cuanto a fenología de hojas; si en un parque que presente vegetación perennifolia, la presencia de hongos humícolas se vería decadente, mientras que en un parque con vegetación caducifolia la presencia de hongos humícolas se apreciaría en gran cantidad.

Otro factor importante es la contaminación del suelo que mantiene cada parque; la contaminación del suelo influye en gran parte para el crecimiento de los organismos terrícolas y fimícolas, pues con la alta cantidad de basura y heces de mascotas en los parques los hongos pueden aprovechar esta materia inorgánica para nutrirse, un subfactor podría ser el tránsito de personas por los parques ya que si comparamos un parque con un gran cruce de personas contra un parque con poca asistencia de personas, la contaminación de basura y de heces de mascotas sería diferente y por tanto la diversidad de especies se vería diferenciada.

Los datos indican la variedad de especies encontradas en los parques analizados, como en el caso en el parque de Alameda se encontraron 2 especies y si lo comparamos con el parque del Batán las cuales son 5 especies observamos que la variedad depende de la vida del ecosistema; en cuanto a la clasificación de las especies,

comparamos el número de la diversidad de especies con otro estudio que se realizó en el Estado de México y Ciudad de México los cuales ellos encontraron 32 especies diferentes en zonas urbanas y en nuestro estudio nosotros 16 especies de las cuales sus familias son *Agaricaceae* (3) en nuestro estudio son terrestres encontrado cerca de árboles de la familia *Salicaceae* mientras que en el otro estudio se encontraban en jardines con árboles *Asteraceae*, *Fabaceae* y *Fagaceae*, *Physalacriaceae* (1) hongo lignícola se encontraba en troncos en descomposición, *Psathyrellaceae* (2) se encontraba en residuos lignícolas de un tronco de *Salix Alba* comparando el otro fue encontrado en bosques de pinos y encinos, *Hymenochaetaceae* (4) es gregario el cual fue encontrado en árboles *Salix Alba* cerca de un río a diferencia del otro estudio que fue encontrado en bosque de coníferas y *Betula*, *Geastraceae* (1) es gregario encontrado en zonas alta semiáridas con alto porcentaje de humedad parecido al estudio que que también fue encontrado en regiones áridas y semiáridas, *Polyopaceae* (1) es lignícola encontrado en zonas muy húmedas cerca de ríos y lagos en árboles de *Salix Alba* que fue parecido al otro estudio solo que en vegetación tropical y templada, *Phallaceae* (1) gregario en residuos lignícolas de *Causarina Equisetifolia* en descomposición a diferencia del otro estudio encontrado en *Agave*, *Pleurotuaceae* (1) gregario a la sombra de *Salix Alba* y *Bursera Fagaroides* a diferencia de *Jacaranda mimosifolia*, *Psathyrellaceae* (1) gregario abundante en la jardinera a la sombra de *Schinus Molle* a diferencia de residuos lignícolas, *Schizophullaceae* (1) Gregario e ignícola sobre *Vachellia farnesiana* a diferencia de residuos lignícolas del otro estudio.

Agradecimientos

Cada uno de los autores agradece al Dr. Fidel Landeros Jaime por su apoyo y consejos sobre la taxonomía de los Agaricomycetes, por las referencias de claves dicotómicas y trabajos micológicos realizados en Querétaro anteriormente, a la Universidad Autónoma de Querétaro por su apoyo con material tipo e instalaciones.

Bibliografía

- [1] Adachi, K., Nanba, H., & Kuroda, H. (1987). Potentiation of host-mediated antitumor activity in mice by β -glucan obtained from *Grofofa frondosa* (Maitake). *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 35(1), 262-270.
- [2] Aranda, Y., Legister, K., Farnum-Castro, F., & Murillo G, V. (2014). DIVERSIDAD DE MACROHONGOS EN EL PARQUE NACIONAL PORTOBELLO, PROVINCIA DE COLÓN. *Colón Ciencias, Tecnología Y Negocios*, 1(1), 19-29.
- [3] Barbado, J. L. (2003). Hongos comestibles: champiñones, gírgolas, trufas.
- [4] Barradas, J. (2010). Propiedades nutricionales y medicinales de los hongos comestibles. *Revista de divulgación científica, tecnológica y humanística*, 5(4), 5–11.
- [5] Bautista, S., Raymundo, T., Aguirre, E., Contreras, M., Romero, L., & Valenzuela, R. (2017, 18 octubre). Agaricomycetes gasteroides del bosque mesófilo de montaña de la Huasteca Alta Hidalguense, México. *Acta Botánica Mexicana*. Barradas, J. (2010). Propiedades nutricionales y medicinales de los hongos comestibles. *Revista de divulgación científica, tecnológica y humanística*, 5(4), 5–11.
- [6] Bessette AE, Roody WC, Bessette AR (2007). *Setas del sureste de Estados Unidos*. Syracuse, NY: Syracuse University Press. pág. 277.
- [7] Botany Research [Botany Research Solutions]. (2020, 29 marzo). *Aphylophorales; Polyporus Part 1* [Video]. YouTube.
- [8] Burdsall Jr, H. H., & Dorworth, E. B. (1994). Preserving cultures of wood-decaying Basidiomycotina using sterile distilled water in cryovials. *Mycologia*, 86(2), 275-280.
- [9] Chacón, S., & Guzmán, G. (1997). Observaciones ecológicas y biogeográficas sobre los hongos del Jardín Botánico y del Parque Ecológico de Xalapa, Veracruz, México. *Cryptogamie. Mycologie*, 18(4), 333-348.
- [10] Demoulin, V. (1984). TYPIIFICATION OF GEASTRUM PERS.: PERS. AND ITS ORTHOGRAPHIC VARIANT GEASTER (GASTEROMYCETES). *TAXON*, 33(3), 498–501. Hibbett, D. S., & Donoghue, M. J. (2001). Analysis of Character Correlations Among Wood Decay Mechanisms, Mating Systems, and Substrate Ranges in Homobasidiomycetes. *Systematic Biology*, 50(2), 215–242.
- [11] Denchev, C. M., & Assyov, B. (2010). Checklist of the larger basidiomycetes in Bulgaria. *Mycotaxon*, 111(1), 279-282. 279denchev9-236.indd (researchgate.net)
- [12] Frank, J. L., Coffan, R. A., & Southworth, D. (2010). Aquatic gilled mushrooms: *Psathyrella* fruiting in the Rogue River in southern Oregon. *Mycologia*, 102(1), 93-107.
- [13] García Jiménez, J. (1998). *Hongos del estado de Querétaro*.
- [14] Hibbett, D. S., & Donoghue, M. J. (2001). Analysis of Character Correlations Among Wood Decay Mechanisms, Mating Systems, and Substrate Ranges in Homobasidiomycetes. *Systematic Biology*, 50(2), 215–
- [15] Jiménez Ruiz, M., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, J. J., & Torres-Aquino, M. (2013). Hongos silvestres con potencial nutricional, medicinal y biotecnológico comercializados en Valles Centrales, Oaxaca. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(2), 199-213.
- [16] Landeros, F., Castillo, J., Guzmán, G., & Cifuentes, J. (2006). Los hongos (macromicetos) conocidos en el cerro el Zamorano (Querétaro-Guanajuato), México. *Revista Mexicana de Micología*, 22, 25–31.
- [17] Lee, I., & Yun, B. (2007). Highly oxygenated and unsaturated metabolites providing a diversity of hispidin class antioxidants in the medicinal mushrooms *Inonotus* and *Phellinus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(10), 3309–3314.
- [18] Marín, B., & Amayrani, C. (2017). El uso de hongos alucinógenos en la medicina tradicional de San Pedro Tlanixco.
- [19] Miller Jr., Orson K.; Miller, Esperanza H. (2006). *Hongos de América del Norte: una guía de campo para hongos comestibles y no comestibles*. Guilford, Falcon Guides. pág. 418
- [20] Moore, D. (2019, febrero). *Fungus - Nutrition*. Encyclopedia Britannica.
- [21] Nilsson, S., & Persson, O. (1978). *Fungi of northern Europe*.
- [22] Pérez, E. (2018, junio). *Hongos de zonas urbanas: Ciudad de México y Estado de México*. Scientia fungorum.
- [23] Valenzuela, R., García, J., Raymundo, T., & Silva, I. (2016, diciembre). *Fungi: Los macromicetos de Querétaro*. Research Gate. Fungi_Los_macromicetos_de_Queretaro
- [24] Valenzuela, R., Raymundo, T., & Cifuentes, J. (2013). The genus *Inonotus* sl (Hymenochaetales: Agaricomycetes) in Mexico. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84, 70-90.

Técnicas para el diagnóstico de hígado graso no alcohólico en un modelo *in vivo*.

Salinas González Oswaldo¹, Becerril Campos Adriana Araceli², Ahumada Solorzano Santiago Marisela³.

¹ Autor: Licenciatura en Nutrición, 5to semestre, Universidad Autónoma de Querétaro; waldo2000valo@gmail.com.

² Asesora: Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana Universidad Autónoma de Querétaro; adi.becerril@gmail.com.

³ Asesora: Doctorado en Ciencias Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México; ahumada_santiago@yahoo.com.mx

Resumen.

El hígado es un órgano sumamente importante, que desde un punto de vista nutricional; podemos evaluar el metabolismo de múltiples sustancias, un gran ejemplo es el metabolismo de grasas, de ahí la importancia y necesidad de evaluar e identificar el hígado graso no alcohólico (NAFLD por sus siglas en inglés) usando un modelo *in vivo* con ratas Wistar.

Para lograr lo anterior dicho, hubo un momento en donde se organizaron las técnicas a hacerse para revisar la teoría, posteriormente se realizó una estandarización del micropipeteo junto con un Bradford a manera de evaluación del micropipeteo.

Las técnicas para realizar fueron: análisis de GSH, TBARS y TG-Folch. Cada una, con los datos que

nos arrojó, nos permitió interpretar como era el estado del tejido hepático analizado.

Abstract.

The liver is an extremely important organ that from a nutritional point of view; This helps us to evaluate the metabolism of multiple substances, a great example is the metabolism of fats and lipids, hence the importance and need to evaluate and identify NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) using an *in vivo* model with Wistar rats.

To achieve the aforementioned, there was a moment in which the techniques were organized and the theory was revised, later a standardization of the micropipetting was carried out together with a Bradford as an evaluation of the micropipetting.

The techniques to perform were: analysis of GSH, TBARS and TG-Folch. Each one, with the data it gave us, allowed us to interpret what the state of the liver tissue analyzed was like.

Palabras Clave:

Hígado, enzimas hepáticas, GPx, TBARS, TG-Folch, NAFLD

Keywords:

Liver, hepatic enzymes, GPx, TBARS, TG-Folch, NAFLD

Introducción.

Evaluar la funcionalidad hepática es una actividad multidisciplinaria, por eso es necesario evaluarlo a través de varias técnicas, puesto que es un órgano multifuncional, se requiere entonces una examinación del mismo carácter.

Para observarlo lo más preciso posible y en su plenitud es mejor trabajar con un modelo animal *in*

vivo: en ratas Wistar. Lo que nos da como ventaja la certeza en tomas de muestra, así como trabajar con técnicas terapéuticas que en humanos aún no se prueban.

En el escrito se desglosarán algunas de las técnicas útiles para la evaluación del hígado y su posterior diagnóstico.

Objetivos.

Identificar el nivel y la gravedad del daño causado en un hígado graso no alcohólico en ratas Wistar relacionado a una dieta alta en grasa saturada y fructosa, componentes poco saludables de la dieta actual, logrando una comparación con la dieta humana alta en grasa saturada y fructosa, para conocer sus consecuencias.

Metodología.

Logística y antecedentes: se realizó una investigación en el buscador PubMed de artículos del 2010 al 2021 sobre las técnicas que se llevarían a cabo.

Luego comenzamos la estancia presencial en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular en la Facultad de Ciencias Naturales Campus Juriquilla y el Laboratorio de Toxicología Molecular de la Facultad de Química en Centro Universitario, Universidad Autónoma de Querétaro.

Estandarización del micropipeteo: tomando en cuenta la densidad del agua, que es 1 g/cm^3 , se pipeteó 10 veces los volúmenes de $100\mu\text{L}$, $250\mu\text{L}$ y $1000\mu\text{L}$ de H_2O destilada, corroborando su peso a través de una balanza analítica.

Preparación de lisados de tejido hepático.

Para análisis de Enzimas GSH: Se preparó un buffer de fosfatos de 50 mM pH de 7, se pesó 1g de hígado de cada muestra, posteriormente se homogeneizaron usando el buffer (1:1, m/v). Se centrifugaron durante 15 minutos a 4°C a una velocidad de 8750g. Para tomar la fase superior del contenido del tubo, que se almacenó a -80°C hasta su siguiente proceso.

Luego se descongelaron para ultracentrifugar las muestras a 30,500 rpm durante 1 hora a 4°C , se precipitó la proteína con TCA (ácido tricloroacético) al 20% durante 5 minutos para después tomar el sobrenadante y se almacenó a -80°C para su posterior análisis.

TBARS: Se pesó 0.025g de hígado de cada muestra y se usaron $250 \mu\text{L}$ de buffer RIPA (Radioinmunoprecipitación) (1:10, m/v) y se lisaron con un politron; posteriormente fueron centrifugadas a 1600g por 10 minutos a 4°C , se obtuvo el sobrenadante y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

TG-Folch: Se preparó el reactivo de Folch cloroformo-metanol (2:1, v/v), se pesó 0.3g de hígado de cada muestra y fueron molidas sobre un soporte frío 20:1 (v/m) de reactivo de Folch. Se vortexearon 3 minutos en frío. Luego se sonicaron en frío por 25 minutos. Antes de centrifugar para favorecer la separación de la fase lipídica se agregó NaCl (0.9%) de acuerdo con el volumen de cada muestra. Se centrifugaron 2 veces a 1000g por 10 minutos, extrayendo la parte inferior del contenido en ambas ocasiones, finalmente se les dejó en la campana de extracción hasta que solo quedara un pellet de grasa, se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

Determinaciones

Cuantificación de proteína (Bradford): El colorante Coomassie Brilliant Blue G250, presente en el reactivo de Bradford, tiene estructuralmente

dos grupos de aminas terciarias (catión y anión) los cuales interactúan con residuos de aminoácidos básicos (histidina, arginina, lisina) y aromáticos (triptófano, tirosina, fenilalanina). La absorbancia medida será proporcional a la cantidad de proteína. El complejo colorante-proteína (tonalidades azules) del ensayo de Bradford nos permite un conteo de proteína rápida y sencilla en este caso de lisados tisulares (Ernst & Zor, 2010; Han et al., 2010).

Para la curva estándar se prepararon concentraciones de 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{g/ml}$ de albúmina sérica bovina (BSA). Después, en una placa de 96 pozos se depositó un triplicado de 10 μL de cada concentración. Luego se agregó a cada pozo 200 μL del reactivo de Bradford. Se dejó reposar 5 minutos para permitir la reacción descrita en el párrafo anterior, a 595nm.

El procedimiento anteriormente descrito fue realizado en tres ocasiones para seguir estandarizando el micropipeteo, y solo en la tercera vez se realizó también con una concentración de BSA de 600.

Una vez arrojados los datos por el espectrofotómetro, se capturaron los datos de las concentraciones obteniendo promedio, desviación estándar, error en la variabilidad, así como también se graficaron obteniendo la recta, la ecuación de la recta y la R (como la relación lineal entre la absorbancia y la concentración). Permite con lo anterior, interpolar los datos de absorbancias de las muestras y determinar así la concentración de proteínas.

Enzimas – GSH: El glutatión reducido (GSH) reacciona con el DTNB que produce TNB amarillo. Este principio nos permite medir indirectamente la concentración de GSH, mediante el análisis de la absorbancia de la TNB, cromóforo que se mide a 412 nm y el resultado de la absorbancia por minuto es proporcional a la concentración del glutatión total (Caito & Aschner, 2015; Schuh et al., 2018). Lo que nos permite evaluar el estado oxidativo.

Se generó una curva con las concentraciones de 0 a 50 mM de GSH con intervalos de 5 en 5. Luego a las muestras se le añadieron GSH 0.6 mM, Tris 50 μM , EDTA 0.5 μM de pH 8.2, metanol y DTNB 2.4 mM, previamente se atemperó antes de iniciar, se dejó incubar a 25°C durante 5 minutos y se leyó a una absorbancia de 412nm.

TBARS: La lipoperoxidación se puede evaluar midiendo la cantidad de formación de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Las concentraciones de TBARS se calculan utilizando malondialdehído (MDA) como estándar (Freitas et al., 2016; Hajrezaie et al., 2015; Majdinasab et al., 2018; Naqvi et al., 2019; Noeman et al., 2011).

Se descongelaron las muestras almacenadas y se les añadió TCA al 10% y reactivo de color, se vortexearon y se pusieron a hervir las muestras durante una hora, pasada la hora se colocaron en un baño de hielo por 10 minutos, luego fueron centrifugadas a 1600g por 10 minutos a 4°C para tomar el sobrenadante y leer la absorbancia a 535nm.

TG-Folch: Este método utiliza como medio de extracción lipídica el cloroformo-metanol, extracción exitosa en homogeneizados (Makkar et al., 2014; Mopuri et al., 2020). Una vez hecha la extracción de grasa se reconstituye la misma para posteriormente hacer un ensayo enzimático colorimétrico, puesto que el reactivo que se le adiciona contiene enzimas para degradar a los triglicéridos de las muestras, dando como resultado oxidativo Quinona, dando una coloración roja, la intensidad del color formado es proporcional la concentración de triglicéridos presentes en cada muestra.

A los pellets de grasa se les agregó NaCl (0.9%) según el peso de la muestra para reconstituirla, se sonicaron y homogeneizaron con un politrón hasta deshacer el pellet. Una vez bien homogeneizado, la muestra fue tomada y se le agregó el reactivo

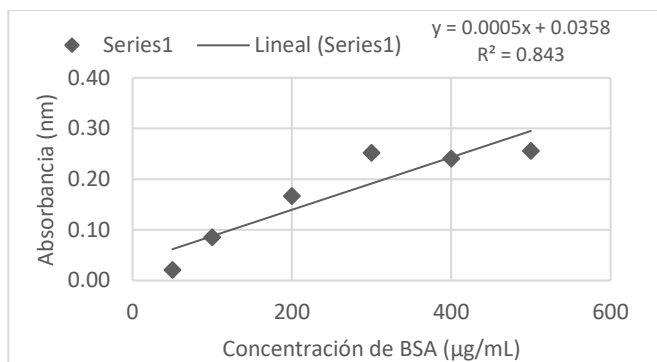
enzimático, luego se incubo durante 10 minutos a 37°C a una longitud de onda de 505nm.

Resultados y discusión

A lo largo de la experimentación el micropipeteo tuvo una evolución positiva, así como se puede observar en el cuadro 1 y en las gráficas 1, 2 y 3. Lo que podemos traducir como una correcta estandarización del micropipeteo que nos permite dar confianza y seguridad para las técnicas que se llevaron a cabo.

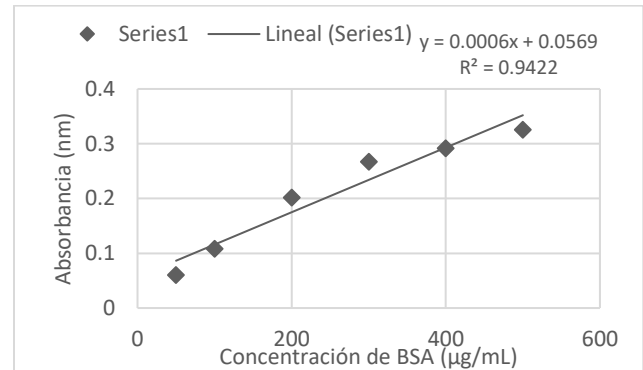
Cuadro 1. Volúmenes de los pipeteos con sus pesos del ensayo de micropipeteo.

	Volumen	100µL	250µL	1000µL
1		0.962	0.2532	0.9883
2		0.0973	0.2539	0.995
3		0.0961	0.2557	0.9983
4		0.0986	0.2539	0.9925
5		0.0976	0.2533	1.0009
6	Pesos (g)	0.098	0.2535	1.0014
7		0.0941	0.2525	0.9972
8		0.0975	0.2512	0.9936
9		0.0986	0.2543	0.9921
10		0.098	0.2499	0.9987



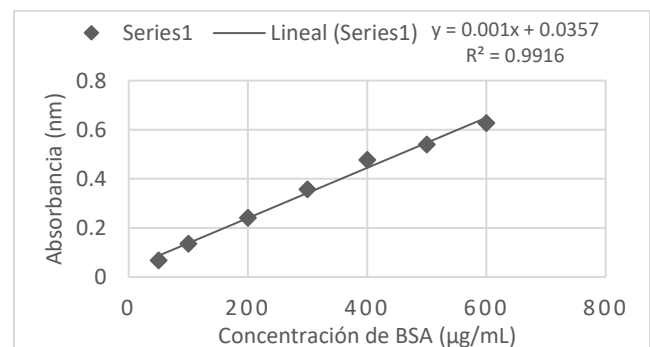
Gráfica 1. Curva de Albumina Sérica Bovina (BSA) para la determinación de proteínas por microBradford. Las concentraciones fueron de 0, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL de BSA, cada punto por triplicado, absorbancia a 595nm.

La gráfica 1 no tuvo una linealidad esperada entre la concentración de BSA y la absorbancia, razón por la que la R2 es de 0.843. la desviación estándar de no más de 0.016± µg/mL y un coeficiente de variación de 20.6%.



Gráfica 2. Curva de Albumina Sérica Bovina (BSA) para la determinación de proteínas por microBradford. las concentraciones fueron de 0, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/mL de BSA, cada punto por triplicado, absorbancia a 595nm.

La gráfica 2 muestra una evolución positiva en el micropipeteo, hay una mejor linealidad entre la concentración de BSA y la absorbancia, razón por la que R2 es de 0.9422 y una desviación estándar de no más de 0.0078± µg/mL y un coeficiente de variación de 3.35%.

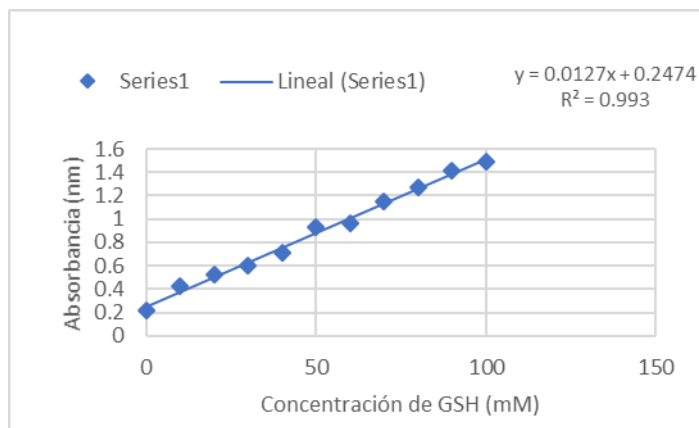


Gráfica 3. Curva de Albumina Sérica Bovina (BSA) para la determinación de proteínas por microBradford. Las concentraciones fueron de 0, 50, 100, 200, 300, 400,

500 y 600 $\mu\text{g/mL}$ de BSA, cada punto por triplicado, absorbancia a 595nm.

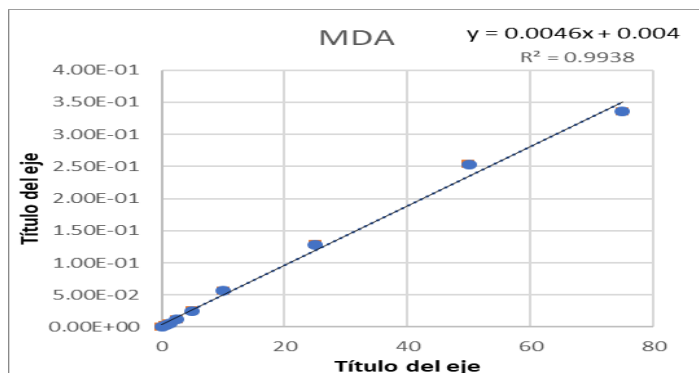
La gráfica 3 muestra una evolución positiva en el micropipeteo, hay una mejor linealidad entre la concentración de BSA y la absorbancia, razón por la que R^2 es de 0.9916 y una desviación estándar de no más de $0.195 \pm \mu\text{g/mL}$ y un coeficiente de variación de 0.12%.

La concentración promedio de proteína en lisados hepáticos fue $11.39 \pm 1.04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.



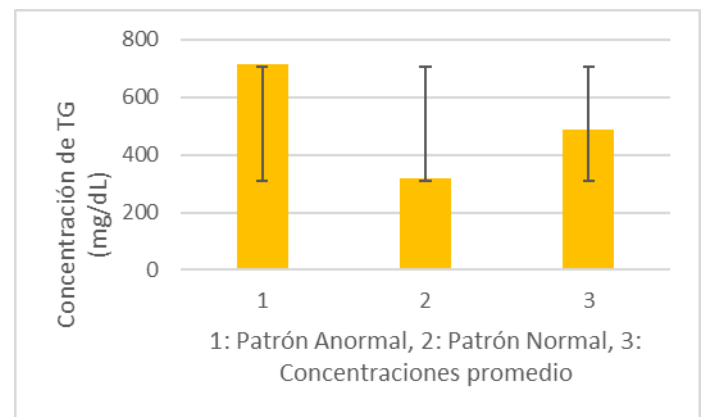
Gráfica 4. Curva estándar GSH.

Concentración promedio de GSH en lisados hepáticos $113.53 \pm 45.96 \text{ mM}$ y $19.30 \pm 11.56 \text{ mM}$ en suero



Gráfica 5. Concentración promedio de MDA $17.16 \mu\text{M}$.

Además, también los datos de las gráficas 4 y 5 nos hacen referencia al daño hepático que se pudo encontrar, respecto a la GSH mientras más aumentada se encuentre quiere decir que más daño hay por parte de la lipoperoxidación por el NAFLD, puesto que es un mecanismo antioxidante endógeno. En cuanto a las concentraciones de MDA, nos hablan que el hígado tuvo un daño debido que, como en otros estudios se ha indicado, la formación del MDA es consecuencia de la lipoperoxidación (McClatchy et al., 2020).



Gráfica 6. Cuantificación de triglicéridos (TG). Los patrones y las muestras fueron incubadas a 37°C durante 10 minutos, absorbancia de 505nm.

En la gráfica 6 podemos observar la concentración promedio de triglicéridos en el tejido hepático, la cual es de $489.5 \pm 25.3 \text{ mg/dL}$.

Se sabe que mientras la concentración hepática de triglicéridos aumenta será más riesgoso para la salud, mientras mayor sea la concentración de triglicéridos mayor será el diagnóstico de padecer NAFLD y a su vez es un importante indicador del daño que hay en este órgano y mayor probabilidad que la patología evolucione incluso a llegar a una esteatosis hepática no alcohólica (Rom et al., 2019).

Conclusiones

Podemos concluir que cuando se mantiene una dieta alta en fructosa y en grasa saturada es inminente un daño hepático que compromete de manera significativa la salud de un organismo.

El daño hepático provocado por un ambiente obesogénico es una problemática que no se puede tomar a la ligera, que de no ser controlado puede provocar pérdidas funcionales y cambios metabólicos importantes que de seguir avanzando contribuyen a un deterioro importante de la salud.

La estandarización del micropipeteo es relevante puesto que nos ayuda a establecer curvas de concentraciones estándar que nos sirven para interpolar datos.

Gracias a que las técnicas aplicadas durante esta experimentación y que se llevó a cabo en un modelo in vivo nos permite, poco a poco, pasar al terreno en humanos. Por ahora esto nos permite ver un panorama más amplio en la modificación funcional hepática en la patología del hígado graso no alcohólico.

Agradecimientos

Este escrito fue posible desarrollarlo gracias al Verano de la Ciencia 2021 por la Dirección de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Querétaro.

A la Dra. Santiago Marisela Ahumada por aceptarme dentro de su equipo de trabajo y ser mi investigadora anfitriona, además de toda la educación que me brindó.

A la Mtra. Adriana Araceli Becerril Campos por todo su apoyo durante mi estancia, que me acogió como su discípulo y por su gran ayuda en la redacción de este escrito.

A mis compañeros del Verano de la Ciencia: Valeria Sánchez, Inti Borges y a Diego Solís por su compañerismo y apoyo a lo largo de la estancia.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular y Celular y del Laboratorio de Toxicología Molecular de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Referencias

- Caito, S. W., & Aschner, M. (2015). Quantification of Glutathione in *Caenorhabditis elegans*. *Current Protocols in Toxicology / Editorial Board, Mahin D. Maines (Editor-in-Chief) ... [et Al.]*, 64(618), 6.18.1.
<https://doi.org/10.1002/0471140856.TX0618S64>
- Ernst, O., & Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford Protein Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 38.
<https://doi.org/10.3791/1918>
- Freitas, I., Boncompagni, E., Tarantola, E., Gruppi, C., Bertone, V., Ferrigno, A., Milanesi, G., Vaccarone, R., Tira, M. E., & Vairetti, M. (2016). In Situ Evaluation of Oxidative Stress in Rat Fatty Liver Induced by a Methionine-and Choline-Deficient Diet. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
<https://doi.org/10.1155/2016/9307064>
- Hajrezaie, M., Salehen, N., Karimian, H., Zahedifard, M., Shams, K., Batran, R. Al, Majid, N. A., Khalifa, S. A. M., Ali, H. M., El-Seedi, H., & Abdulla, M. A. (2015). Biochanin A Gastroprotective Effects in Ethanol-Induced Gastric Mucosal Ulceration in Rats. *PLOS ONE*, 10(3), e0121529.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0121529>
- Han, X. X., Xie, Y., Zhao, B., & Ozaki, Y. (2010). Highly sensitive protein concentration assay over a wide range via surface-enhanced raman scattering of coomassie brilliant blue. *Analytical Chemistry*, 82(11), 4325–4328.
<https://doi.org/10.1021/AC100596U>
- Majdinasab, M., Hosseini, S. M. H., Sepidname, M.,

- Negahdarifar, M., & Li, P. (2018). Development of a novel colorimetric sensor based on alginate beads for monitoring rainbow trout spoilage. *Journal of Food Science and Technology*, 55(5), 1695. <https://doi.org/10.1007/S13197-018-3082-5>
- Makkar, A., Mishima, T., Chang, G., Scifres, C., & Sadovsky, Y. (2014). Fatty Acid Binding Protein-4 is expressed in the mouse placental labyrinth, yet is dispensable for placental triglyceride accumulation and fetal growth. *Placenta*, 35(10), 802. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2014.07.008>
- McClatchy, D. B., Martínez-Bartolomé, S., Gao, Y., Lavallée-Adam, M., Yates, J. R., & III. (2020). Quantitative analysis of global protein stability rates in tissues. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-72410-Y>
- Mopuri, R., Kalyesubula, M., Rosov, A., Edery, N., Moallem, U., & Dvir, H. (2020). Improved Folch Method for Liver-Fat Quantification. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 594853. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.594853>
- Naqvi, S., Sharma, H., & Flora, S. J. (2019). Lactobionic Acid Conjugated Quercetin Loaded Organically Modified Silica Nanoparticles Mitigates Cyclophosphamide Induced Hepatocytotoxicity. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 8943–8959. <https://doi.org/10.2147/IJN.S218577>
- Noeman, S. A., Hamooda, H. E., & Baalash, A. A. (2011). Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2011 3:1, 3(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-3-17>
- Rom, O., Xu, G., Guo, Y., Zhu, Y., Wang, H., Zhang, J., Fan, Y., Liang, W., Lu, H., Liu, Y., Aviram, M., Liu, Z., Kim, S., Liu, W., Wang, X., Chen, Y. E., & Villacorta, L. (2019). Nitro-fatty acids protect against steatosis and fibrosis during development of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *EBioMedicine*, 41, 62. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2019.02.019>
- Schuh, A. K., Sheybani, B., Jortzik, E., Niemann, B., Wilhelm, J., Boening, A., & Becker, K. (2018). Redox status of patients before cardiac surgery.

Efecto de hormonas esteroides sobre la reacción acrosomal del espermatozoide humano.

Investigadoras: Ana Alicia Sánchez Tusie ^{1}, Sheini Ruturi Sánchez González ¹.*

Alumno: Javier Tello Arellano

¹ *Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro, La capilla, Santiago de Querétaro.*

^{*} *Dirección electrónica: anatusie@gmail.com; Tel: +52 777 565 6186.*

Resumen

El estudio del espermatozoide, encargado de viajar y fusionarse con el ovocito, resulta importante para procesos de fertilidad. Una vez ocurrida la eyaculación en el tracto femenino, los espermatozoides, son capaces de nadar, aunque requieren del proceso conocido como capacitación; esta respuesta no es del espermatozoide *per se*, sino que desde la espermatogénesis hasta el viaje dentro del tracto genital femenino hay participación de hormonas esteroides que modulan funciones específicas. Actualmente se presentan dos posturas sobre el efecto de algunas hormonas esteroideas en la fisiología del espermatozoide. Dicha controversia genera que el objetivo del presente trabajo es analizar el efecto que tengan estas hormonas a distintas concentraciones.

Este viaje espermático, fundamental para el ciclo de vida humano, requiere de parámetros de calidad que determinen la viabilidad de estas células. Si estos factores son negativos entonces los

espermatozoides no son aptos para la reproducción. Por ello, la calidad del semen se determinó mediante pruebas macro y microscópicas referentes a coloración, volumen, concentración de espermatozoides por mililitro entre otras características. Los conteos de células se realizaron bajo microscopio en laminillas portaobjetos o en la cámara de Neubauer. La morfología y reacción acrosomal (RA) requirieron frotis de las muestras y tinciones específicas para su visualización. Los resultados obtenidos en las pruebas con Hidrocortisona y Testosterona mostraron células reaccionadas con tendencia a bajar conforme aumentó la concentración, este efecto tuvo un mayor declive con la RA inducida. Ambas pruebas mostraron una participación antagónica sobre la activación del espermatozoide y, por ende, de la reacción acrosomal, por lo que se sustenta la postura de Mannowetz et al. (2017) en la que estas hormonas inhiben la activación de espermatozoos por progesterona.

Palabras clave Reacción acrosomal, hidrocortisona, progesterona, testosterona, capacitación.

Abstract

The study of the male's sexual cell (sperms) in charge of traveling and fuse to the oocyte results significant for fertility processes. Once occurred the ejaculation inside the vagina, sperms are capable of swimming, but they require of a process known as capacitation. This response is not all on sperm cells *per se*, instead, from spermiogenesis until the whole travel inside the vagina some steroid hormones also are active in the modulation of specific functions. Nowadays there are two postures about the effect of some steroid hormones over the sperm's physiology. Thus, the controversial postures determined the objective of the present study to be the analysis of the effect of these hormones' participation at distinct concentrations.

This spermatic travel, fundamental for human's life cycle, requires specific quality parameters which can determine viability of cells. If these factors are negative, then spermatic cells are not capable to

reproduce. Thus, quality of semen is determined by macroscopical and microscopical tests referred to color, volume, sperm concentration per milliliter, etc. Cell quantification was made in slides or the Neubauer chamber under the microscope, meanwhile morphology and Acrosomal Reaction (AR) required sample's smear dyed in slides for its visualization. Results obtained in hydrocortisone and testosterone tests showed reacted cells with a tendency to lower as concentration increased, this effect had a major slope on the induced AR. Both tests demonstrated an antagonist participation over the spermatid cells activation and, thus, over the AR, so these results sustain Mannonetz's et al. (2017) posture of inhibiting the activation of sperm cells by Progesterone.

Key words Acrosomal reaction, hydrocortisone, progesterone, testosterone.

Introducción

El estudio de la célula sexual masculina (espermatozoide) resulta importante debido a que es la encargada de viajar y fusionarse con el ovocito durante la fecundación que dará origen a un nuevo organismo. Durante la espermatogénesis, concretamente en la espermiogénesis, las espermátidas sufren una “metamorfosis” donde inicia la formación del acrosoma, ocurre la condensación de la cromatina y la eliminación del exceso de citoplasma, ya en la espermiación se liberan los espermatozoos completamente desarrollados hacia el lumen del túbulo seminífero (Darszon et al., 2011).

Una vez ocurrida la eyaculación en el tracto femenino, los espermatozoides son capaces de nadar, sin embargo, no tienen el potencial aún de fecundar al huevo, por lo que requieren de un proceso conocido como capacitación (Darszon et al., 2011).

Los espermatozoides requieren una “hiperactivación” para ser competentes en la Reacción acrosomal (RA) o exocitosis acrosomal (Puga et al., 2018). Una vez capacitados pueden

hacer uso de la vesícula acrosomal mediante inductores fisiológicos femeninos y finalmente ser competentes en términos reproductivos (Darszon et al., 2011).

Esta respuesta fisiológica no es efectuada por el espermatozoide *per se*, también participan hormonas secretadas por el ovario, como la progesterona (P4) y esteroides, que modulan funciones específicas. P4 estimula gran parte de los cambios asociados a la capacitación espermática y en concentraciones micro molares se ha visto que induce RA e igualmente afecta la motilidad de esa etapa del espermatozoide (López & Chirinos, 2016).

Algunos esteroides, como E2 (Estradiol), podrían modular negativamente los efectos de P4, mas no se tienen suficientes estudios (López & Chirinos, 2016), sin embargo, existen dos posturas controversiales sobre los efectos de diferentes hormonas esteroides que intervienen en capacitación y RA (Puga et al., 2018).

Mannonetz et al. (2017) mencionan que la testosterona, estrógenos e hidrocortisona interfieren en los efectos de P4 sobre corrientes CatSper y por ende influyen negativamente en los procesos de fertilidad masculina, en contraparte, Brenker et al. (2018) muestran que estas hormonas funcionan como agonistas en la activación de CatSper y por ende se involucran como potenciadores de fertilidad.

Objetivos

Incubar muestras de espermatozoides bajo distintas concentraciones de hidrocortisona y testosterona para analizar su efecto sobre la capacitación y reacción acrosomal de espermatozoides humanos.

Inferir si los esteroides presentes funcionan como agonistas o antagonistas de fertilidad masculina.

Metodología

Para este estudio se incluyeron 15 hombres que donaron voluntariamente muestras

Características Microscópicas y Macroscópicas

La determinación de los parámetros de calidad de semen siguió lo establecido por la normativa de la Organización Mundial de la Salud, OMS (OMS, 2001). A partir de la muestra donada se determinó el volumen y la viscosidad con ayuda de una pipeta automatizada, el color se visualizó a contraluz para definirse y el pH se analizó con tiras reactivas.

Del volumen total original ($V_{T.O}$) se conservó un mínimo para las pruebas microscópicas. La motilidad fue determinada colocando 10 μ L del $V_{T.O}$ en un portaobjetos. Esto se visualizó en el microscopio y se categorizó su movimiento en 1) Progresivo (P), 2) No Progresivo (NP) y 3) Inmóviles (I).

La concentración de espermatozoides (# espermatozoides/ml) requirió del conteo de células móviles en un campo de visión para decidir el factor de dilución y contabilizar 200 células en la cámara de Neubauer, utilizando la fórmula:

$$\frac{\# \text{ células contadas}}{\# \text{ de cuadros}} \times \frac{1}{20} \times \text{Factor de dilución} \times 10^6$$

Para las muestras morfológicas se realizó un frotis con 20 μ L del $V_{T.O}$. El barrido fue sumergido por 15s en metanol, posteriormente 10s en eosina y finalmente 5s hematoxilina. El portaobjetos se dejó en reposo para su secado y se visualizó en el microscopio (100x).

Swim-up y capacitación

Con ayuda del vórtex se diluyeron 0.075g de albumina sérica bovina en 15ml de medio HAM's F-10 (1x) para separar los espermatozoides de mejor calidad a través de su nado a la fase superior. En un tubo Falcon inclinado a 45° dentro de la gradilla se colocó la mayor parte de la muestra de semen junto con el medio HAM's suplementado en una proporción 1:1; se mantuvo en la incubadora por 1h, promoviendo el nado de los espermatozoides de mejor calidad.

De la muestra “*Post Swim-up*” (PS), sin romper las fases, se extrajo con una micropipeta la mayor cantidad del medio HAM's al que nadaron los espermatozoides. En un portaobjetos nuevo se colocaron 10 μ L de PS para realizar conteo en un campo de visión de las células móviles y determinar el factor de dilución para conocer la concentración utilizando la cámara de Neubauer. Finalmente se realizó un ajuste de volumen para tener 1×10^7 células/ml y se incubó por 3 horas.

En una gradilla para tubos Eppendorf se colocaron 16 viales, 7 marcados para Hidrocortisona (HC) y 7 para Hidrocortisona con Progesterona (HC + Pg), los 2 restantes se utilizaron como control positivo (Pg) y negativo (DMSO).

La muestra previamente capacitada se repartió en los diferentes viales y se calculó el medio HAM's suplementado que se debía colocar en cada tubo para tener mismos volúmenes (1500 μ L). Posteriormente los diferentes stocks de HC (0.1, 1, 5 y 20mM), se agitaron en el vórtex para obtener las concentraciones de interés (0.1, 1, 5, 10, 15, 30 y 100mM). A los 14 tubos con muestra capacitada se les añadieron HC o T y únicamente a 7 de ellos se les agregó la Pg con el fin de analizar RA espontánea o RA inducida, respectivamente. Una vez terminado el llenado de los viales se incubaron 30 minutos para inducir la Reacción Acrosomal (RA).

Para la determinación de RA por testosterona, se emplearon concentraciones de 0.03, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3 y 10 μ M, siguiendo el mismo procedimiento. En estas pruebas en el control negativo únicamente se colocó la muestra y el medio HAM's suplementado, necesario para completar el volumen final de 1500 μ L.

Reacción Acrosomal

Los 7 tubos a los que se les adicionó 3 μ L de la hormona Pg y marcados como “HC + Pg” o “T + Pg” producirían una RA inducida debido a la acción que tiene la Pg, al control negativo se le colocaron 7.5 μ L de DMSO y una vez listos todos los tubos se incubaron nuevamente por 30 minutos.

Tinción con Azul de Coomassie

Para fijar los espermatozoides se agregaron 100 μL de metanol a los 16 viales puestos en la gradilla, se agitaron ligeramente y se llevaron a la centrifuga. Al tenerse mismos volúmenes en todos los Eppendorf no se requirió de tubos auxiliares para nivelar el peso; se colocaron 4 tubos en cada carril y se centrifugó a 3500rpm por 4min.

Una vez terminada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante de todos los viales para únicamente conservar el pellet con los espermatozoides que por densidad se mantuvieron hasta abajo. El pellet se re-

suspendió con 400 μL de PBS y se tomaron 50 μL de cada vial para realizar los frotis.

En una jarra de tinción con capacidad máxima para 6 portaobjetos se colocó el tinte azul de Coomassie, posteriormente se sumergieron los portaobjetos durante 2min y para su secado más rápido se posaron sobre una plancha de calentamiento a temperatura baja. Las placas de RA teñidas se marcaron con etiquetas para saber la concentración

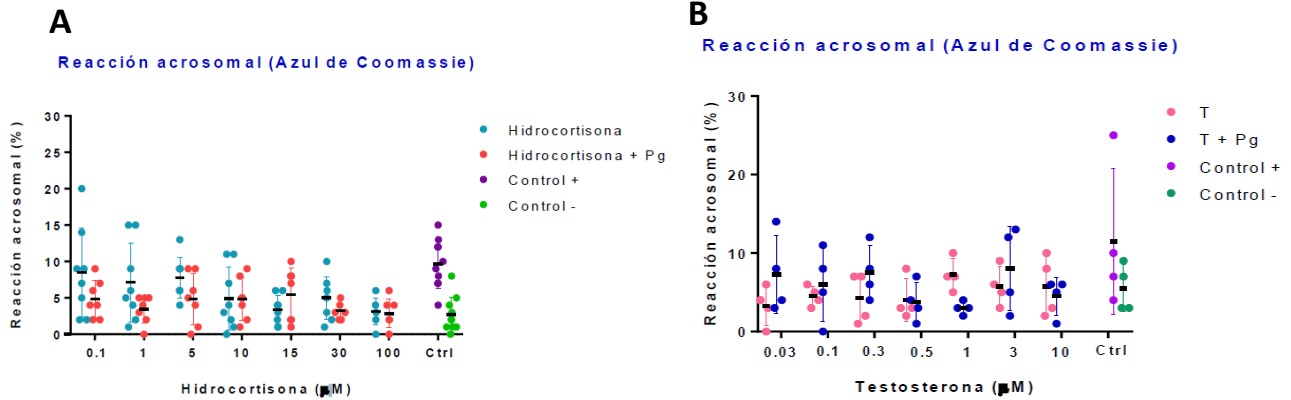


Fig. 1 Porcentajes de reacción acrosomal espermática (RA) a distintas concentraciones de las hormonas objetivo, A) representa el comparativo de porcentajes al utilizarse hormona Hidrocortisona (n=11), B) muestra los resultados en distintas concentración

y finalmente se realizó su lectura en el microscopio.

Resultados

El uso de Hidrocortisona (**Fig. 1**) *per se* muestra respuesta en la RA aproximado del 3-15% al utilizarse concentraciones bajas, sin embargo, conforme aumenta la concentración se observa un decremento no lineal del porcentaje promedio de reacción. Al utilizarse la “Hidrocortisona + Progesterona” se ve un porcentaje significativamente menor en los porcentajes de RA con respecto al control positivo.

Cuando se utilizó como inductor la Testosterona (**Fig. 1**) se observan porcentajes de 7-10% de células con potencial reproductivo, en cambio al producirse una RA inducida (T + Pg) en bajas concentraciones (0.03, 0.1, 0.3) hay un incremento a comparación de cuando se incuban las muestras únicamente con testosterona. Además, conforme se aumenta la concentración, exceptuando 3 μ M, se observa igualmente una tendencia a disminuir con respecto al control positivo.

Discusión y conclusiones

Como se observó, las hormonas esteroides presentan un impacto sobre los efectos ejercidos por P4. Su papel respecto al inductor P4 no es del 100%, aunque si ejerce inhibición de reacción acrosomal, esto puede presentar una competencia de ambas hormonas respecto al sitio activo del espermatozoide al no haber una potenciación de RA cuando se añaden ambas hormonas.

Dado que no se ha realizado ningún estudio en donde se hayan determinado los efectos de estas hormonas directamente sobre la RA, no pueden compararse del todo. Sin embargo, se pueden retomar las dos posturas mencionadas anteriormente y los resultados obtenidos sustentan un rol como antagonistas del efecto de HC sobre los canales Catsper y la activación de

espermatozoides como lo propuso Mannowetz et al. (2017).

En cuanto a la testosterona, se requiere incrementar el numero de sujetos para dilucidar que efecto tiene dicha hormona sobre la RA.

Agradecimientos

Agradezco a la doctora Ana Alicia Sánchez Tusie por aceptarme dentro de su laboratorio y permitirme una experiencia laboral en un entorno mas formal, de igual forma agradezco a Sheini Ruturi Sánchez González por asesorarme en el entorno de laboratorio además de explicar bastante bien las técnicas y el uso de material de laboratorio con mayor eficacia.

Bibliografía

- A. Darszon, T. Nishigaki, C. Beltran and C. L. Treviño, “Calcium channels in the development, maturation, and function of spermatozoa”, *Physiol Rev*, Vol. 91, pp.1305-1355, 2011.
- C. Brenker, C. Schiffer, I. V. Wagner, F. Tüttelmann, A. Röpke, A. Rennhack, et al., “Action of steroids and plant triterpenoids on CatSper Ca²⁺ channels in human sperm”, *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Vol. 115, pp. 344-346, 2018.
- L. C. Puga Molina, G. M. Luque, P. A. Balestrini, C. I. Marín-Briggiler, A. Romarowski and M. G. Buffone, “Molecular Basis of Human Sperm Capacitation”, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Vol. 6, Issue 72, pp. 1-23, Jul. 2018.
- N. Mannowetz, M. R. Miller and P. V. Lishko, “Regulation of the sperm calcium channel CatSper by endogenous steroids and plant triterpenoids”, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 114, pp. 5743-5748, 2017.
- Organización Mundial de la Salud, Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical, Cuarta Edición, Ed. Medica Panamericana, 2001.

Inducción de la reversión de color de la zarzamora (*Rubus sp.*) por altas presiones

Borja Mandaluniz-Zuzaeta¹, Ángel Ramón Flores-Sosa², Edmundo Mercado-Silva²

¹Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales, Licenciatura en Biología
bmandaluniz24@alumnos.uaq.mx

²Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos, Facultad de Química.

Resumen

La producción de la zarzamora en México es de gran importancia. Aun así, para poder llegar a la producción nacional han sido necesarias adaptaciones biotecnológicas para poder asegurar la palatabilidad del producto. Una de las tecnologías aplicables es la alta presión hidrostática, mediante la cual se causa un estrés mecánico y favorece la liberación de componentes bioactivos. Mediante este estudio se quiere explicar el mecanismo de reversión de color de las células vegetales de la fruta de la zarzamora aplicando una presión hidrostática de 200 MPa durante diferentes intervalos de tiempo y analizando los cambios en el color, contenido de antocianinas monoméricas, el contenido de polifenoles y la acidez. Al obtener los resultados de estas mediciones se confirma que al aplicar la presión hidrostática si hay una reversión de color. Se cree que la razón de esta reversión no es la variación del contenido de copigmentos y pigmentos. En cambio, se piensa que la razón podría ser la acidificación del medio celular. Esto sucedería debido a que, como respuesta al daño mecánica, se acidifica el interior de la fruta y la coloración de las antocianinas varían en función del

pH. Al conocer el mecanismo de reversión de color se podría evitar este fenómeno y así aumentar la palatabilidad del producto y como consecuencia su comercialización.

Palabras clave: Alta presión hidráulica, reversión de color, antocianinas, polifenoles, acidez.

Summary

The Blackberry fruit production is of great importance in Mexico. Even so, to reach the national production, biotechnological improvements have been necessary to ensure the palatability of the fruit. One of these technologies is the High Hydrostatic Pressure, which causes mechanical stress and favours the release of bioactive compounds. The aim of this study is to explain the mechanism of the colour reversion in the cells of the blackberry fruit by applying a 200 MPa hydrostatic pressure during different time intervals and analysing the resulting changes in colour, and the content of monomeric anthocyanin, polyphenols, and acidity. By obtaining the results of these measurements it is confirmed that hydrostatic pressure causes colour reversion. It is believed that the reason for this reversion may not be the variation in the content of co-pigments and pigments. Instead, it is thought that the reason could be the acidification of the inner cell mass. This would happen because in response to mechanical damage the inside of the fruit acidifies, and the coloration of the anthocyanins varies depending on the pH. The understanding of the colour reversion mechanism could avoid this phenomenon and thus increase the palatability of the product and consequently its commercialization.

Key words: High hydraulic pressure, colour reversion, anthocyanins, polyphenols, acidity.

Introducción

Entre los años 1995 y 2005 la superficie cultivada de zarzamora en México aumentó más de un 500%, hasta

llegar a una producción de 118,421.73 t en el año 2008. Estos datos muestran la gran importancia que ha adquirido la producción de esta frutilla en el territorio nacional. Aun así, las variedades más cultivadas, como “Tupy” o “Brazos”, son originadas en el extranjero. Lo que ha supuesto la necesidad de adaptaciones biotecnológicas para llegar a la producción obtenida (Chávez-Bárceñas *et al*, 2012).

Uno de los principales factores que limita su comercialización es la reversión de color. Este problema se caracteriza porque las drupas de la fruta cambian de color negro a rojo y provoca el rechazo de los frutos en los mercados de destino.

Este defecto se reproduce cuando se induce daño mecánico en el fruto y se produce la ruptura de la estructura celular. La alta presión hidrostática (APH) o *High Hydrostatic Pressure* es una tecnología innovadora mediante la cual se favorece la liberación de componentes bioactivos de los compartimentos celulares de las frutas y vegetales, pero provoca la ruptura celular de los frutos (Gómez-Maqueo *et al*, 2020). Bajo este contexto se hipotetiza que las altas presiones pueden provocar que se revierte el color y nos permita como método de estudio para elucidar el mecanismo molecular por el cual se presenta el cambio de color.

Objetivo

El objetivo de este estudio fue evaluar las altas presiones hidrostáticas como método para inducir la reversión de color para explicar el mecanismo del fenómeno.

Metodología

Alta presión hidrostática (APH)

Las zarzamoras fueron presurizadas mediante un equipo de altas presiones a 200 MPa durante

intervalos de tiempo de CUT o *Come-up time*, tres, cinco y diez minutos (Figura 1). El CUT se obtiene al presurizar un ejemplar hasta que se llega a la presión deseada y esta se mantiene durante un segundo antes de la descompresión. La temperatura del proceso fue de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y el ritmo de compresión fue de 7 MPa/s.



Figura 1. Zarzamoras a altas presiones. Color.

El color se determinará sobre la superficie del fruto se utilizará un espectrofotómetro CM-600D (Konica Minolta, Japón) con un iluminante D65 y un ángulo de observación de 10° , se evaluó el parámetro de color a^* que indica la coloración roja (McGuire, 1992).

Extracto acuoso.

Se homogenizaron 3 g de la fruta en 30 mililitros de agua utilizando un Ultra Turrax (T 25D) a 10,000 rpm por 1 minuto. El homogenizado se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 min y se filtró con manta de cielo recuperando el sobrenadante.

Acidez titulable, pH y Brix.

La acidez titulable se determinó empleando la metodología descrita en la AOAC (1990) con ciertas modificaciones. Diez mililitros del extracto acuoso se titularon con NaOH 0.1 N hasta alcanzar un pH de 8.2.

La acidez titulable se expresó como porcentaje de ácido cítrico en 100 g de muestra utilizando la siguiente expresión:

$$\% \text{ acidez} = \frac{V_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}} * V_{\text{Aforado}} * \text{meq}_{\text{ácido cítrico}} * 100}{V_{\text{Muestra}} * P_{\text{Muestra}} * 100}$$

En la misma disolución, se midió el pH, usando un potenciómetro (HI 2213 pH/ORP meter, HANNA instruments) y el contenido de sólidos solubles totales

(°Brix) se estimó con un refractómetro digital (A. Krüss Optronic GmbH).

Extracto metanólico.

El extracto se realizó con 3 g de drupas de zarzamora, a los cuales se les añadió 25 mililitros de metanol al 80% y se homogenizaron con un Ultra Turrax (T 25D) a 10,000 rpm por 1 minuto. El homogenizado se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 min y se filtró con manta de cielo recuperando el sobrenadante.

Polifenoles.

El contenido de fenoles totales se determinó mediante el método espectrofotométrico (Singleton y Rossi, 1965). Se tomaron 400 µl del extracto, se adicionó 1 ml de agua destilada y 200 µl de reactivo Folin-Ciocalteu 2 N, durante 5 min.

Posteriormente se colocaron 2 ml de Na₂CO₃ al 7% (p/v) y 1.4 ml de agua destilada, se agitó y se mantuvo en incubación por 1 h a temperatura ambiente. Terminando el tiempo de incubación se leyó a una absorbancia de 750 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer). La cuantificación se realizó con una curva estándar de ácido gálico (0.02 a 0.165 mg ml⁻¹) y se reportó como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de zarzamora (mg EAG g⁻¹).

Antocianinas monoméricas.

La cuantificación de antocianinas se llevó a cabo mediante el método de pH diferencial (Giusti and Wrolstad, 2001). Se utilizaron cloruro de potasio ajustado a un pH=1 y acetato de sodio a pH=4.5, los cuales fueron adicionados a 600 µl de los extractos, llevándolos a un volumen final de 3 ml. Posteriormente se leyó a una absorbancia de 510 nm para cianidina como absorbancia máxima en el rango visible de 420-700 nm con un blanco de metanol al 80%. El contenido de antocianinas se calculó utilizando las siguientes expresiones:

$$\text{Antocianinas (mg/L)} = (A * PM * FD * 1000) / (\epsilon * l)$$

Dónde: **A**: absorbancia total de antocianinas; **PM**: peso molecular para cianidina (449.2 g/mol); **FD**:

factor de dilución; **ε**: absorptividad molar (Cyd=26900 g/mol cm).

El valor final de absorbancia se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$A = (A_{\text{max}} - A_{700 \text{ nm}}) \text{ pH } 1 - (A_{\text{max}} - A_{700 \text{ nm}}) \text{ pH } 4.5$$

Dónde: **A_{max}** es la máxima absorbancia, mientras que **A₇₀₀** es la lectura dada a esa absorbancia.

Resultados

Color.

Tras medir la intensidad del color rojo con un espectrofotómetro CM-600D se ha visto que, cuanto más tiempo se le aplica una presión de 200 MPa a la zarzamora, mayor va a ser la intensidad del color rojo de esta (Figura 2). Por lo tanto, se ve una reversión de color por altas presiones. Este resultado demuestra que las altas presiones son un método adecuado para inducir el fenómeno de reversión de color.

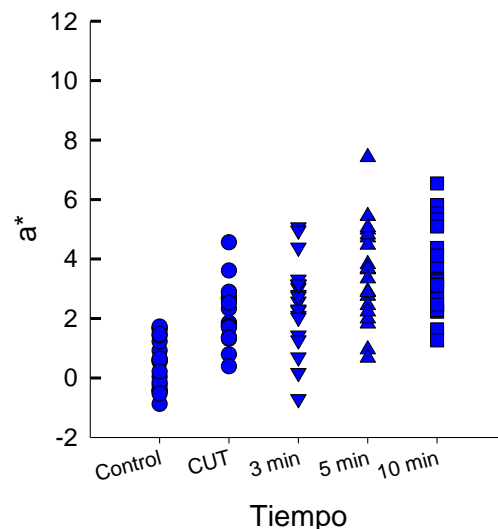


Figura 2. Medición de color en las diferentes muestras. Valor de a* indica la intensidad de color rojo.

Acidez titulable, pH y Brix.

Por una parte, vemos que los grados Brix decrecen a medida que el intervalo en la que se aplica la presión aumenta (Figura 3). Los grados Brix especifican el contenido de sacarosa en una solución. De manera que un grado Brix equivale a un gramo de sacarosa en 100

gramos de solución. En consecuencia, la cantidad de sacarosa decrece si el tiempo de presión aumenta.

	°Brix	pH	% de Acidez
Control	0.73	2.94	7.40
CUT	0.73	3.22	8.30
3 min	0.70	2.73	7.80
5 min	0.63	2.89	9.40
10 min	0.60	3.09	9.60

Figura 3. Medición de Acidez titulable, pH y °Brix en las diferentes muestras.

Por otra parte, vemos que a mayor tiempo de presión más se acidifica el medio celular. Es decir, como respuesta al daño que sufre la fruta acidifica su interior. Esta podría ser la razón por la cual sucede el cambio de color, ya que las antocianinas dan una coloración diferente en función del pH en el que se encuentren.

Polifenoles.

El contenido más alto de polifenoles es en la muestra CUT. El contenido al aplicar presión durante 3 minutos es igual al de la muestra de control. Al aumentar el tiempo de presión, la cantidad de polifenoles va aumentando. No hay correlación entre la reversión de color y los polifenoles.

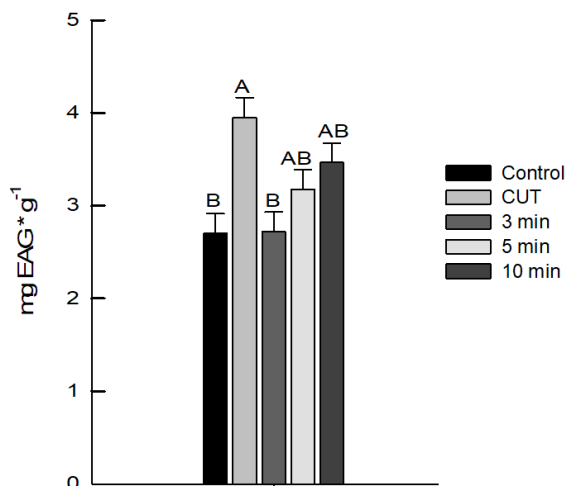


Figura 4. Contenido de polifenoles en las diferentes muestras.

Antocianinas monoméricas.

Como en el caso de los polifenoles, el contenido más alto es en la muestra CUT. El contenido al aplicar presión durante 3 minutos es incluso menos que la de la muestra de control. Al aumentar el tiempo de presión, la cantidad de antocianinas monoméricas va aumentando. Por lo tanto, el contenido de pigmentos y copigmentos no explica la reversión de color en zarzamora sometida a altas presiones.

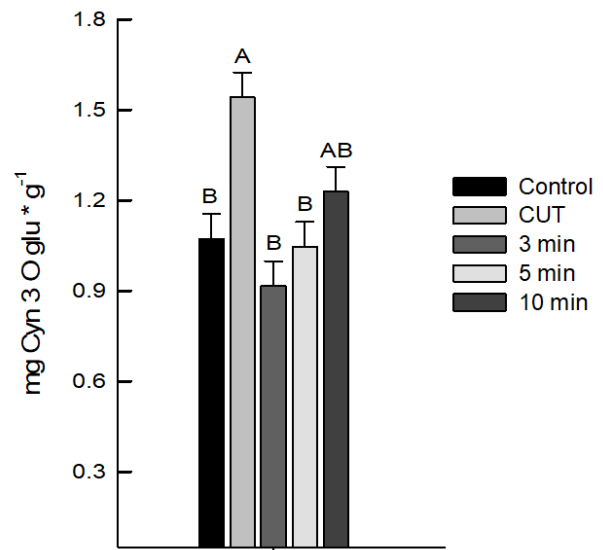


Figura 5. Contenido de antocianinas monoméricas en las diferentes muestras.

Discusión y conclusiones

Los resultados confirman que las altas presiones hidrostáticas aplicadas en la zarzamora producen en estas una reversión de color. También se ha visto que hay un efecto tanto en la acidez, en el contenido de sacarosa, y el contenido de polifenoles y antocianinas. Aun así, el contenido de pigmentos y copigmentos no explica la reversión de color en zarzamora sometida a altas presiones. La razón por la cual se da esta reversión de color podría ser que a mayor tiempo de presión más se acidifica el medio celular. Es decir, como respuesta al daño que sufre la fruta acidifica su interior. Esto sería debido a que las antocianinas dan una coloración diferente en función del pH en el que se encuentren.

De esta manera, podemos llegar a entender el mecanismo mediante el cual el fruto de la zarzamora sufra una reversión de color. Al poder explicar este fenómeno, se va a poder evitar que suceda alterando los estímulos externos e internos a la hora de almacenarla o transportarla. Así, si se consiguen mejorar los cambios de textura, pigmentación, tasa respiratoria, contenido de agua o sabor, se van a reducir las limitaciones a la hora de comercializarla Debido a que estos factores afectan a la palatabilidad del producto.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a Ángel Ramón Flores el haber tenido la paciencia para explicarme el funcionamiento del equipo de laboratorio. En segundo lugar, a mis compañeros de laboratorio Aldo Cárdenas y Estefanía Arellano por su apoyo.

Referencias bibliográficas

Chávez-Bárcenas, A. T., Alonso-Ojeda, C., & García-Saucedo, P. A. (2012). Proteómica de la maduración de frutos de zarzamora (*Rubus* sp.) cultivados en México, una primera aproximación. *Ra Ximhai*, 8(3), 143-157.

Gómez-Maqueo, A., Welti-Chanes, J., & Cano, M. P. (2020). Release mechanisms of bioactive

compounds in fruits submitted to high hydrostatic pressure: A dynamic microstructural analysis based on prickly pear cells. *Food Research International*, 130, 108909.

McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27(12), 1254-1255.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, (1), F1-2.

Con un poco de ayuda: Calidad de los gobiernos locales e impacto económico en México.

Carlos Armando Salas Benítez (FCA, UAQ,
csalas18@alumnos.uaq.mx)

Dr. Enrique Leonardo Kato Vidal (FCA, UAQ,
enriquekato@uaq.mx)

Resumen.

La evaluación de la calidad gubernamental en la actualidad permite a los gobiernos estatales como al gobierno federal tener una amplia perspectiva de la situación económica de las zonas gobernadas. El Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) revela a través de su Encuesta Nacional de Calidad e Impacto Gubernamental (ENCIG) la percepción ciudadana de diversos problemas que embargan a la sociedad mexicana, como corrupción, calidad de los servicios públicos, eficiencia de las instituciones, entre otros que podremos comparar con datos de CONEVAL como el salario, el Indicador Trimestral de la Actividad Económica Estatal y el ingreso. El análisis está basado en el periodo del 2012 al 2019. Mediante una segmentación de los estados del país en cuartiles, según su actividad económica y posición geográfica será posible realizar los cálculos que evalúen entre otros factores la calidad gubernamental, el crecimiento, el salario, la percepción de la corrupción, la pobreza y la actividad económica por entidad federativa.

Palabras clave.

Corrupción, calidad gubernamental, pobreza, salarios.

Abstract.

The evaluation of government quality today allows state governments as well as the federal government to have a broad perspective of the economic situation of the governed areas. El Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) reveals through its Encuesta Nacional de Calidad e Impacto Gubernamental (ENCIG) the public perception of various problems that plague Mexican society, such as corruption, quality of public services, efficiency of the institutions, among others that we can compare with data from CONEVAL such as salary, the Quarterly Indicator of State Economic Activity and income. The analysis is based on the period from 2012 to 2019. Through a segmentation of the country's states into quartiles, according to their economic activity and geographical position, it will be possible to perform calculations that evaluate, among other factors, government quality, growth, salary, perception of corruption, poverty and economic activity. by federal entity.

Key Words.

Corruption, government quality, poverty, wages.

Introducción.

Desde su concepción el Índice Europeo de Calidad de Gobierno ha tenido un amplio impacto en la investigación sobre la geografía económica de la UE, el espíritu empresarial y la innovación a nivel subnacional y ha sido incluido como parte de múltiples rondas de publicación del Informe sobre Cohesión Económica, Social y Territorial

Según la teoría económica, el crecimiento económico es el resultado de una combinación de tres factores: capital físico, capital humano o trabajo e innovación, más un factor residual o término de error, que representa lo que no sabemos o no podemos explicar.

La calidad del gobierno está definida como la capacidad del gobierno para sostener e incrementar el bienestar de la población. Para ello se recurre al

diseño, implementación y evaluación de políticas públicas caracterizadas por la imparcialidad y efectividad en un marco libre de corrupción.

La gran mayoría de estos estudios han llegado a la conclusión de que en el gobierno la calidad es importante para el desempeño económico y que un gobierno deficiente en áreas rezagadas representa una barrera importante para el desarrollo.

El análisis de la calidad gubernamental se centra en el análisis de variables macroeconómicas como el Producto Interno Bruto, nacional y *per cápita*, la inversión, el crecimiento de la población además de los índices de percepción de la corrupción, la evolución de los servicios públicos, la calidad de la educación, la eficiencia en el sistema de salud. Aun cuando los resultados pueden variar dependiendo la región del país, nos permitirá homologar la información para tener una percepción clara del fenómeno.

En México cada año aumentan los niveles en la percepción de corrupción en las distintas instancias gubernamentales, el PIB crece anualmente en el periodo estudiado, algunos rubros como el educativo se encuentran bien evaluados en distintos ámbitos como el cumplimiento de los temarios y la gratuidad de la educación.

Nuestro país a través de INEGI, presenta la Encuesta Nacional de Calidad e Impacto Gubernamental (ENCIG) la cual permite generar estimaciones con representatividad nacional sobre la calidad de los servicios públicos, tramites, pagos y otros contratos con el gobierno y así aportar elementos que ayuden a la toma de decisiones de política pública en materia de calidad en los tres niveles de gobierno.

En México la aplicación de encuestas con representatividad estadística para medir la calidad de servicios públicos es muy limitada. Por lo que uno de los grandes retos que enfrentan los gobiernos y la administración pública consiste en tener información que permita atender las diversas demandas de la población que día a día se incrementan.

Esto ha dejado de manifiesto la necesidad de realizar y continuar la medición del desempeño como algo

básico para una planeación, programación y control objetivo de la administración pública.

Esto nos permitirá el desarrollo de un modelo simple que permita tener amplia información sobre el tema y este de lugar a un análisis de los diversos puntos donde el gobierno debe poner atención para la mejora de la calidad gubernamental y detonar el desarrollo en las zonas más marginadas de nuestro país, así como el de las grandes zonas metropolitanas.

Objetivo.

Analizar la calidad gubernamental teniendo como base el índice de Calidad Gubernamental (QoG) para la Unión Europea, midiendo las principales variables que evalúa el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) sobre impacto gubernamental, para así sugerir algunas áreas de oportunidad que tiene el estado mexicano para ser más eficiente y aumentar el potencial de México en el tema económico.

Metodología.

Para la realización de un análisis profundo pero que permita fácilmente procesar la información, se dividieron las entidades federativas en cuartiles estadísticos, cada uno contiene igual número de datos y comparten entre ellos características económicas quedando de la siguiente manera.

Cuartil 1: Chiapas, Guerrero, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Tabasco y Veracruz.

Cuartil 2: Aguascalientes, Campeche, Ciudad de México, México, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Tlaxcala.

Cuartil 3: Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit y Zacatecas

Cuartil 4: Colima, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Nuevo León, Sinaloa, Sonora y Yucatán.

La información se concentra en gráficos de barras los cuales nos permiten observar la diferencia entre regiones de las diversas variables estudiadas, dentro de ellas, el salario, el índice ITAEE y la pobreza. A través de la estadística presente en la ENCIG se busca obtener la variable explicativa X para poder cotejarla más adelante con la información que brinda CONEVAL y obtener de ella la variable explicada que en nuestra nomenclatura será Y.

Las fuentes de información fueron tres: (1) El Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática a través de su Encuesta Nacional de Calidad e Impacto Gubernamental de donde se obtiene en general todas las variables de estudio, especialmente las de percepción de la corrupción en distintas áreas del gobierno; policías, instituciones educativas, institutos electorales y hospitales; (2) el Consejo Nacional de la Política de Desarrollo Social de donde se obtuvo la información necesaria para evaluar la pobreza, el salario, el índice ITAEE y el ingreso, y (3) El modelo QoG para la Unión Europea a fin de obtener las variables necesarias para replicar el modelo en el caso mexicano.

Resultados.

Una vez aplicado el modelo europeo de calidad gubernamental en el caso mexicano, con las variables disponibles que se evalúan en nuestro país se pueden obtener los siguientes resultados. A partir de la información disponible donde se discute el tema como calidad de gobierno es preciso que lo en el caso mexicano sea utilizado el término del Percepción de la Calidad Gubernamental dado que nuestro trabajo se basa en los resultados de la ENCIG donde se pregunta a los ciudadanos las percepciones de corrupción en su estado.

A pesar de que el concepto de calidad es difícil por generar polémica al no ser una unidad de medida, es un término apropiado para el tema que se aborda, dado que nos referimos a calidad cuando hablamos de lo que el cliente espera de quien le provee, en este caso los ciudadanos reciben de los gobiernos. Un gobierno

de calidad será sin duda aquel que los ciudadanos respalden.

Para construir el índice tomamos como base el modelo europeo sin embargo es necesario invertir las escalas para medir la calidad gubernamental. Para el caso de la corrupción usaremos la siguiente lógica: Más corrupción = Mal gobierno.

Al invertir la escala de corrupción al 100% entonces queda en sentido positivo: A menor corrupción = Más calidad de gobierno.

Es importante no combinar las variables de en un índice o pilar de los utilizados en el modelo además de verificar si tienen correlación o consistencia interna a través del cálculo del alfa Cronbach.

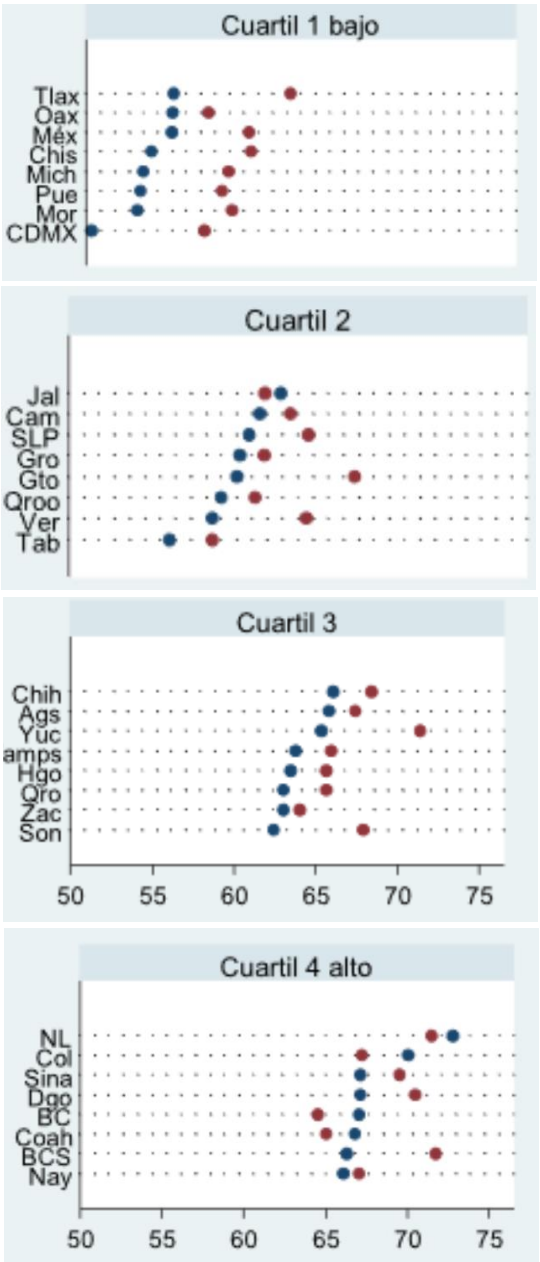
Dado lo anterior, tenemos cuatro índices, el segundo que pertenece a experiencia de corrupción tiene dos variables, el resultado de promediar dichas variables no genera un resultado alto. Por lo tanto, el índice de calidad de gobierno solo tendrá tres pilares.

Por año el alfa de Cronbach del componente “percepción de la corrupción” en el año 2013 fue de 0.39 y en el 2019 fue de 0.63. Esta información fue añadida al componente de experiencia de corrupción a través de un promedio simple, lo cual es la manera más sencilla de agregar una cifra.

En tanto, el Alfa Cronbach, tanto en 2013 como 2019 fue de 0.8 es decir fue bueno. Para la obtención de este resultado fueron utilizadas las siguientes variables: No experiencia de haber escuchado actos de corrupción, no haber experimentado actos de corrupción, no corrupción (muy frecuente) en la entidad federativa en una escala de 100%, no corrupción en policías, no corrupción en hospitales, no corrupción en educación básica, no corrupción en institutos electorales.

El tercer componente evaluado fue es la imparcialidad, en el modelo mexicano lo llamaremos “confianza en las instituciones”, para este rubro la ENCIG otorga información del periodo 2017 y 2019,

la variable es medida en una escala de 0 a 100 según la confianza que los adultos tienen en las siguientes instituciones gubernamentales: Universidades públicas, escuelas públicas de nivel básico, hospitales públicos, medios de comunicación, institutos electorales y policías. El alfa de Cronbach en 2017 y 2019 es cercano a 0.88, es decir, muy alto.



Los puntos señalados de color azul corresponden al periodo 2013 y los puntos de color al 2019.

El último pilar que evalúa nuestro modelo es la calidad gubernamental, mide el grado de satisfacción de las personas usuarias de educación pública básica, educación pública universitaria, salud estatal y policía. El alfa de Cronbach en 2013 fue 0.79 y en 2019 de 0.87.

Una vez teniendo los tres componentes, de calidad, confiabilidad y no corrupción, el siguiente paso será la construcción del Índice de Percepción de la calidad de gobierno, el cual es un promedio simple de los tres componentes.

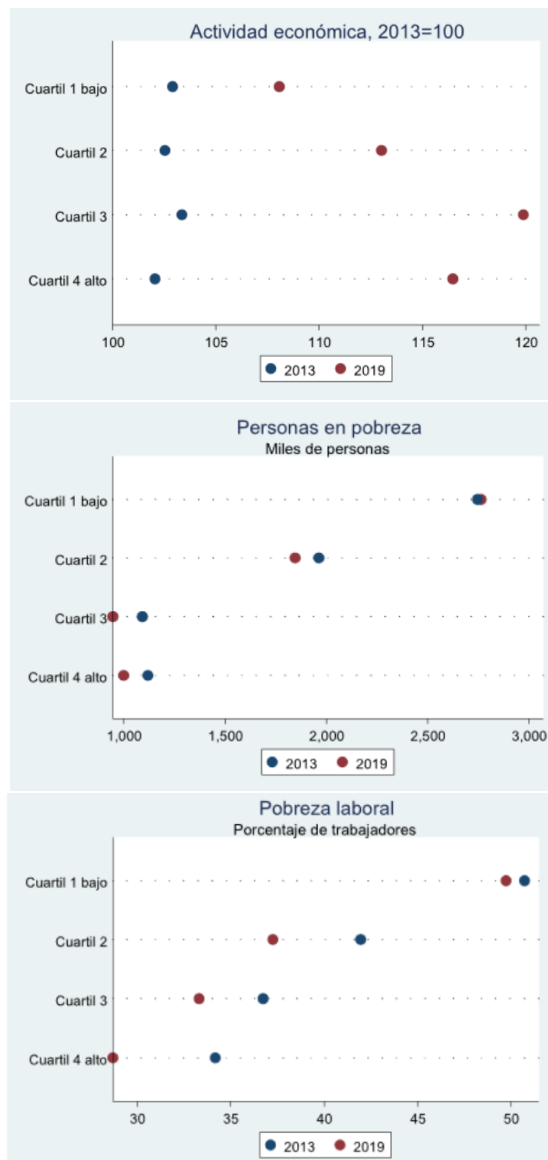
	ITAAE		TCMA
	2014	2018	
Cuartil 1 bajo	102.9	108.1	1.2%
Cuartil 2	102.5	113.0	2.5%
Cuartil 3	103.4	119.9	3.8%
Cuartil 4 alto	102.1	116.5	3.4%
Total	102.7	114.4	2.7%

Nota. TCMA = Tasa de crecimiento promedio anual

Tabla 3. Elaboración Propia

Para su cálculo se utilizaron cuartiles, cada uno con ocho entidades federativas, agrupadas según la variable “Percepción de calidad de gobierno en el 2013”.

En el Cuartil uno los puntos son bajos respecto al 2, 3 y 4 se van desplazando a la derecha. Los cuartiles 1, 2 y 3 en general tienen datos superiores en el año 2019 que, en el 2013, esto a diferencia del cuartil número 4 donde solo algunos estados aumentaron su percepción en la calidad de gobierno. Posteriormente se evalúa la pobreza, la pobreza laboral, la actividad económica y el ITAAE.



Gráficos 5-7 Elaboración Propia.

Los cuartiles 1 y 2 son los que tienen mayor nivel o porcentaje de pobreza, en general la pobreza en el 2019 es menor a la del año 2013. En los cuartiles 1 y 2, los que tienen menor percepción de calidad de gobierno, es en donde se observa el menor crecimiento, esto es, la distancia entre 2013 y 2019. En los cuartiles altos 3 y 4 hay mayor crecimiento que en los cuartiles inferiores, sin embargo, no es una relación directa (monotónica), esto es, más percepción de calidad de gobierno igual a más crecimiento

Discusión y conclusiones.

La falta de calidad de los gobiernos locales puede tener repercusiones en el ámbito económico, por ello es preciso el estudio de estos temas que permiten a las autoridades gubernamentales conocer las áreas donde pueden mejorar.

Hablamos de calidad gubernamental cuando hacemos referencia a la capacidad del gobierno para sostener e incrementar el bienestar de la población, ayudándose del diseño, implementación y evaluación de políticas públicas imparciales y efectivas libres de corrupción.

Es importante decir que una vez calculado el alfa de Cronbach del componente “percepción de la corrupción” en el año 2013 fue de 0.39 y en el 2019 fue de 0.63. Al segmentar en cuartiles como estrategia para procesar la información se tuvieron resultados predecibles, la mayoría de los estados, no todos, han aumentado su calidad de gobierno, en general en todo el país y la pobreza ha disminuido, y podemos concluir en que la actividad económica no depende solo de la variable de calidad gubernamental sino también de la especialización de los estados en diversas actividades económicas, como el turismo y la actividad industrial.

Es muy importante continuar la investigación de estos temas importantes para la planeación de las políticas públicas y planes de desarrollo, se podría esperar que el estudio de este tema conduzca a los gobiernos a la buena toma de decisiones que propicien el crecimiento y el desarrollo económicos.

Agradecimientos.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por la oportunidad de participar en el XXIII Verano de Introducción a la Ciencia 2021, a nuestro investigador anfitrión por el apoyo otorgado.

Bibliografía.

Barbero, J., Giovanni Mandras, Ernesto Rodríguez-Crespo, Andrés Rodríguez-Pose. (2021) Quality of government and regional trade: evidence from European Union regions. *Regional Studies* 55:7, 1240-1251

Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (2019). Evolución de la pobreza y pobreza extrema nacional y en entidades federativas [Datos] Coneval. México

Charron, N, Lapuente, V, Annoni, P. Measuring quality of government in EU regions across space and time. *Pap Reg Sci.* 2019; 98: 1925– 1953. <https://doi.org/10.1111/pirs.12437>

Kato Vidal, E. (2021). La gobernanza de un México más metropolitano. Sistema de Información Ciudadana. Disponible en <https://sicmx.org/2021/05/11/la-gobernanza-de-un-mexico-mas-metropolitano/>

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (2019). Encuesta Nacional de Calidad e Impacto Gubernamental. Inegi. México.

INTERACCIÓN DE LA TESTOSTERONA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

Eft. Norma Mariana Cabrera¹, Dra. Sheini Sánchez², Dra. Ana Sánchez Tusie³

1. Fisioterapia, UAQ. ncabrera26@alumnos.uaq.mx
2. Ciencias Biomédicas, UAQ. sheiniruturi006@gmail.com
3. Facultad de Medicina, UAQ. anatusie@gmail.com

Resumen:

Los espermatozoides humanos son células especializadas que aún en la actualidad han sido difíciles de describir en su totalidad. La capacitación y reacción acrosomal son eventos cruciales para que la fertilización se lleve a cabo, estos pueden ser afectados por las características en el ambiente gonadal. El presente estudio evalúa el papel de la testosterona en la reacción acrosomal humana inducida.

Abstract:

Human sperm are specialized cells that have still been difficult to fully describe today. Capacitation and acrosomal reaction are crucial events for fertilization to take place, these can be affected by characteristics in the gonadal environment. The present study evaluates the role of testosterone in the induced human acrosome reaction.

Palabras clave:

Espermatozoides. Semen. Fertilidad. Capacitación. Hormonas.

Key Words:

Sperm. Semen. Fertility. Capacitation. Hormones.

Introducción:

Para comenzar, es importante recalcar que el espermatozoide es una célula sumamente compleja, que, hasta la actualidad, ha sido difícil describirla en su totalidad, por ello, antes de entrar al tema, debemos recordar las partes básicas que conforman a esta unidad (Figura 1.1)

Estructura básica del espermatozoide:

Cabeza: Aquí se encuentra el núcleo con la información genética enrollada gracias a proteínas llamadas protaminas. El citoesqueleto da soporte a las membranas plasmática y acrosomal, así mismo, cuenta con un elemento importante llamado “Teca perinuclear” que no es más que una cápsula rígida encargada de proteger al núcleo. La Teca perinuclear se divide en dos regiones: a) capa subacrosomal y b) capa postacrosomal.

Flagelo: Estructura que permite que el espermatozoide se mueva con libertad, se divide en cuatro regiones; a) la pieza de conexión, b) la pieza media, c) la pieza principal y d) la vaina fibrosa o terminal.



Figura 1.1 Estructura básica del espermatozoide.

La capacitación espermática humana es “un proceso que comprende una serie de cambios previos a la fecundación, se desarrolla en el aparato reproductor femenino y requiere de la comunicación entre el espermatozoide y el ambiente que recorre en su tránsito hacia el sitio de fertilización” (Arenas Ríos, 2010). (Fig 1.2)

sin embargo, también es producida en los ovarios, aunque en cantidades bajas (Tabla 1.3)

Hombre	300 a 1,000 (ng/dL) o 10 a 35 (nmol/L)
Mujer	15 a 70 ng/dL o 0.5 a 2.4 nmol/L.

Tabla 1.3 Valores normales de testosterona en hombre y en mujer.

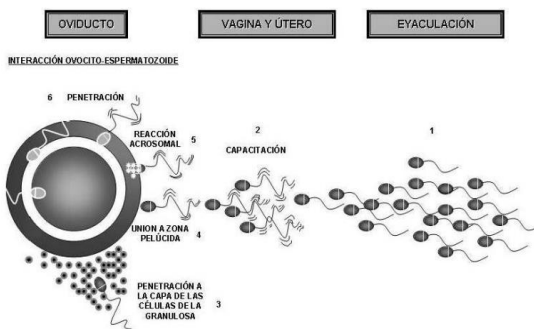


Figura 1.2 Eventos previos a la fertilización.

Al encontrarse por fin, el espermatozoide con el ovocito, se desencadena un proceso extraordinario donde la membrana citoplasmática del gameto masculino se une a la zona pelúcida del gameto femenino, gracias a la liberación de enzimas almacenadas en el acrosoma. Este proceso se llama Reacción Acrosomal.

Dichos procesos descritos con anterioridad están unidos y son secuenciales. Es importante que el ambiente en el que ocurren sea el adecuado para que se puedan llevar a cabo con éxito (tanto en las gónadas masculinas como femeninas). Cuando existen cambios bioquímicos, estructurales y hormonales (este último es en el que se enfocará el estudio) pueden no llevarse a cabo, trayendo consigo problemas para la concepción y desencadenando infertilidad.

La Testosterona (C₁₉H₂₈O₂) es una hormona esteroidea segregada especialmente en los testículos,

Un incremento en los valores de Testosterona producida en los ovarios, como ocurre en el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP), podría desencadenar alteraciones en el ambiente uterino impidiendo que la reacción acrosomal se lleve a cabo de manera efectiva.

Objetivos:

El objetivo de este proyecto fue evaluar el papel de la Testosterona en la capacitación e inducción de reacción acrosomal en los espermatozoides humanos.

Metodología:

Para el estudio se recolectaron muestras de semen de individuos que contaran con las características siguientes:

- Tener entre 18- 45 años.
- Presentar de 2 a 7 días de abstinencia sexual en el momento de la recolección de la muestra.
- No consumir alcohol en exceso y/o drogas.
- No padecer enfermedades de transmisión sexual ni haber presentado alguna infección en los últimos 3 meses.
- No haberse realizado la vasectomía.

Para cada muestra recolectada se evaluaron los siguientes aspectos: parámetros macroscópicos y microscópicos, morfología y reacción acrosomal.

Parámetros macroscópicos:

En principio se determinó el color del semen levantando el frasco a contraluz para poder observar si presentaba una coloración blanco opalescente, café rojizo o amarillo (Tabla 2.1). Posteriormente con una pipeta serológica colocada en una pipeta automatizada, se midió el volumen de la muestra procurando que quedara una pequeña gota en el interior para evaluar la viscosidad levantando una hebra para determinar su altura. Luego, con la punta una pipeta dispensadora, se colocó una gota en una tira de papel tornasol para obtener el ph. Enseguida se preparó la muestra aspirando con la pipeta dispensadora 10 veces para mezclar, para finalmente ser desechada.

Blanco opalescente.	Una muestra normal posee esta característica además de ser homogénea.
Café rojizo.	Presencia de glóbulos rojos.
Amarillo.	Indicador de ictericia o consumo de vitaminas

Tabla 2.1 Coloración del semen y sus posibles causas (OMS, 2010)

Swim Up⁴:

Se dejaron 500 µl de la muestra de semen y el resto se introdujo en un tubo Falcon a 45° de inclinación sobre una gradilla (en las muestras de mayor cantidad se repartía en dos tubos).

Posteriormente se agregó la misma cantidad de volumen de medio HAM's F-10 suplementado (1:1) Figura 2.2 se recomienda añadirlo lentamente por las paredes del tubo para no romper las fases, hecho todo esto, se lleva la gradilla a la incubadora, donde permanecerá como mínimo 1 hora para su capacitación.

0.0025 gr de BSA en 500 microlitros de medio HAM's F-10.
Para preparar 15 ml: 0.075 gr de BSA + 15 ml de HAM's F-10.

Figura 2.2. Medio HAM'S F-10 suplementado de 2 mm de Ca²⁺ y 5 mg/ml de BSA.

Una vez pasado el tiempo de incubación, se extrajo la fase superior y se colocó en un tubo nuevo, a esta muestra se le llamó "muestra post-swing". A continuación, se colocaron 10 µl de muestra "post-swim" en un portaobjetos con su correspondiente cubreobjetos y se llevó a cabo el conteo de células móviles en un solo campo.

Dependiendo del número de espermatozoides, se realizó la dilución correspondiente en una pequeña charola y esta dilución se colocó en la cámara de Neubauer y se contaron 200 espermatozoides en filas. (Tabla 2.3)

< 101 = 1:20	(50 µl de muestra (origina) + 950 µl de fijativo)
16 – 100 = 1:5	(50 µl de muestra (original) + 200 µl de fijativo)
2 – 15 = 1:2	(50 µl de muestra (original) + 50 µl de fijativo)

Tabla 2.3 Dilución correspondiente al número de espermatozoides contabilizados.

Una vez contabilizados los espermatozoides, se aplicó la fórmula siguiente:

$$\frac{\# \text{ de espermatozoides}}{\# \text{ de filas}} \times \frac{1}{20}$$

x factor de dilución x 1x10⁶

El propósito fue obtener 1x10⁷ millones de espermatozoides,

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

para lo que se aplicó la siguiente fórmula:

Donde:

- **C1**= Número de espermatozoides obtenidos con la primera fórmula.
- **V1**= Cantidad de ml de la muestra swing.
- **C2**= 1×10^7
- **V2**= ¿?

Se agregó HAM's suplementado para completar el volumen que se requiere para el V2 y se incubó durante 3 horas.

Parámetros microscópicos y morfología:

Para determinar la motilidad se colocaron 10 µl en el centro de un portaobjetos y se colocó encima un cubreobjetos de 22mm x 22mm y se llevó al microscopio para su análisis (Figura 3.1).

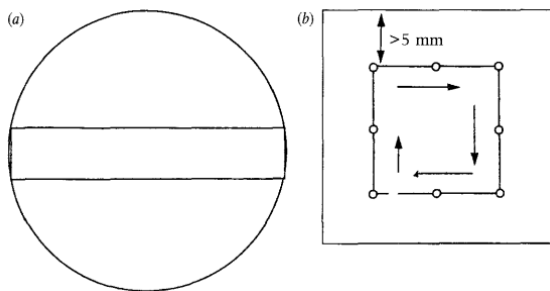


Fig. 1.2 a) Líneas paralelas en el campo de visión de un microscopio para asistir en el análisis de la motilidad. b) Selección sistemática de los ocho campos para analizar la motilidad a por lo menos 5mm de los bordes del cubreobjetos.

Se determinó la motilidad en 200 espermatozoides y el tipo:

- Motilidad progresiva.
- Motilidad no progresiva.

- Inmovilidad.

La concentración fue determinada contando los espermatozoides observables en un solo campo del microscopio. Después, dependiendo del número de espermatozoides contabilizados, se realizó la dilución correspondiente y se resuspendió con la pipeta 10 veces. (ver Tabla 2.3)

Se aspiró y colocó en una cámara de Neubauer (previamente sanitizada con alcohol al 70% y con su respectivo cubreobjetos) 10 µl de la dilución colocada anteriormente en la charolita y se observó al microscopio en 40x para contar 200 espermatozoides en filas y se realizaron las notas respectivas respecto a cuántas filas se tuvieron que contar para completar los 200 espermatozoides y una vez contabilizados, se aplicó la siguiente fórmula correspondiente al total de espermatozoides.

$$\frac{\# \text{ de espermatozoides}}{\# \text{ de filas}} \times \frac{1}{20} \times \text{factor de dilución} \times 1 \times 10^6$$

x ml obtenidos de la muestra.

Morfología:

Se llevó a cabo un frotis con 20 µl de la muestra original y se dejó secar para sumergirse en las soluciones descritas a continuación en el siguiente orden y se dejó secar a temperatura ambiente.

1. Metanol por 15 segundos para fijar la muestra.
2. Eosina por 10 segundos.
3. Hematoxilina por 5 segundos.

Inducción de reacción acrosomal:

De ser necesario, antes de repartir la muestra, se redondeó el volumen con medio HAM'S suplementado en caso de que la muestra fuera insuficiente para 9 tubos, posteriormente se repartió el

total de la muestra capacitada en dicha cantidad de tubos para un volumen total de 1500 μl y se agregó la testosterona correspondiente (Figura 4.1)

Tubos	Testosterona.
1	[0.03 μM]
2	[0.1 μM]
3	[0.3 μM]
4	[0.5 μM]
5	[1 μM]
6	[3 μM]
7	[10 μM]
Control +	Pg
Control -	---

Figura 4.1. Cantidad de testosterona correspondiente

Después se colocaron los tubos eppendorf por 30 minutos en la incubadora y se le agregó a cada uno 100 μl de metanol para posteriormente centrifugarse a 3500 rpm durante 4 minutos, se eliminó el sobrante y se resuspendió en 400 ml de PBS. Finalmente se realizó un frotis con 50 μl en cada portaobjeto (rotulado anteriormente), se incubó por 2 minutos en la tinción de Azul de Coomassie y se dejó secar.

Resultados:

El azul de Coomassie es un pigmento del tipo trifenilmetano aniónico que tiene la capacidad de unirse a las proteínas. La técnica con este compuesto es de las más aceptadas según autores, ya que resulta fácil observar a los espermatozoides reaccionados gracias a su mecanismo. “La intensidad de la coloración es relativamente y hasta cierto punto independiente de la concentración y de la naturaleza química de las proteínas; de esta forma, cuando se tiene que cuantificar una proteína, es el colorante más recomendado” (Del Valle, 2005)

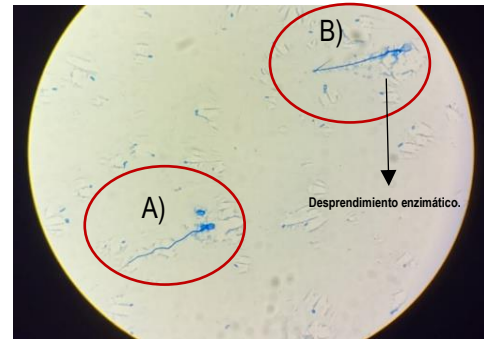
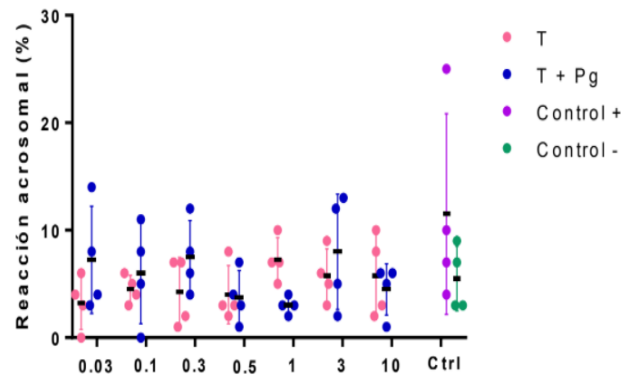


Figura 5.1. a) Espermatozoide no reaccionado y b) espermatozoide reaccionado con la técnica Azul de Coomassie.

Resultados de reacción acrosomal (Azul de Coomassie):



- De color rosa se observa que la Testosterona induce reacción acrosomal con un porcentaje del 7-10% (bajo).
- De color azul se observan concentraciones de 0.03, 0.1, 0.3 y 0.5 μM de testosterona, cuando se induce reacción acrosomal existe un incremento en el porcentaje de esta a diferencia de concentraciones altas (0.5, 1, 3 y 10 μM) en donde existe una tendencia a la disminución su porcentaje.

Discusión y conclusiones:

El presente estudio evaluó el papel de la testosterona en la reacción acrosomal inducida en espermatozoides humanos previamente capacitados. Los resultados arrojaron que al incrementar las concentraciones de testosterona (0.5, 1, 3 y 10 μ M) se presentó una tendencia a la disminución de la RA (reacción acrosomal) en comparación de concentraciones más bajas (0.03, 0.1, 0.3 y 0.5 μ M) por lo que se puede determinar que la Testosterona no es un buen inductor de la RA, sin embargo, lo antes mencionado no puede atribuirse solamente a la testosterona administrada, es necesario analizar a profundidad los parámetros microscópicos, macroscópicos y morfológicos de los espermatozoides recuperados en las muestras.

Los resultados arrojados por las gráficas podrían explicar, lo que sucede a nivel uterino cuando los valores de testosterona son más altos de lo normal y

porque la infertilidad es de las manifestaciones clínicas principales en las patologías relacionadas con sus valores anormales.

Agradecimientos:

Mi más sincero agradecimiento a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarnos la oportunidad de permanecer en las instalaciones y laboratorios durante nuestra estancia, pero, sobre todo, quiero agradecer profundamente a la

Dra. Ana Sánchez Tusie y a la Dra. Sheini Sánchez por su excelente labor docente y su amor por transmitir sus conocimientos, gracias por brindarme la oportunidad de formar parte del Verano de Ciencia UAQ 2021, me llevo un bello recuerdo de esta experiencia y mucho aprendizaje, gracias por ser una inspiración para los jóvenes que queremos dedicar nuestra vida a la ciencia e investigación.

Referencias:

- Edith Arenas Rios, Á. C. (2010). Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal. ContactoS, 5-11.*
- González, S. R. (Marzo 2021). Procedimiento para Análisis de Muestra de Semen. Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Reproducción, FMUAQ.*
- Organización Mundial de la Salud. (2001). Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. Madrid: Médica Panamericana.*
- Valle Mendoza, L. J. (Noviembre 1999). Carencia de nucleoplasmina en los ovocitos de *Holothuria tubulosa*. Otra posible actividad que remodela la cromatina del espermatozoide. Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya. Departament d'Enginyeria Química.*
- W.D. Cardona-Maya, A. C. (Julio 2005). Evaluación de la reacción cromosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. Actas Urológicas Españolas, 676-684.*

Evaluación de fluorescencia antocianinas con diversos copigmentos

Estefanía Arellano-Ordoñez¹, Angel Ramón Flores-Sosa²
* Edmundo Mercado-Silva²

¹Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería, Ingeniería Agroindustrial, Campus Amazcala, El Marqués.

²Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química.

Autor de correspondencia: angel_ramon08@hotmail.com

Resumen

La reversión de color en zarzamora ocurre cuando las drupas pasan de color negro a rojo característico de un estado de madurez anterior. Una de las causas que modifican el color de las antocianinas son las interacciones moleculares. Por tal motivo, en el presente estudio se evaluó el efecto de la copigmentación en la fluorescencia que emiten las antocianinas. El análisis por HPLC permitió observar que en las antocianinas purificadas no se encontraron residuos de otros compuestos fenólicos. En cuanto a las interacciones inter e intra moleculares, se observó que las antocianinas de zarzamora tienen la capacidad de auto asociarse, y que además interaccionan con copigmentos, ácido cítrico y gálico, incrementando su espectro de emisión de fluorescencia. Distintos estudios deberán de realizarse para confirmar que la copigmentación es la causa de la reversión de color, pero de manera preliminar este estudio demostró que es posible que estas interacciones intervengan en el cambio de color de la zarzamora.

Palabras clave: reversión, interacciones, fenoles, espectro, zarzamora.

Abstract

Color reversion in blackberry occurs when the drupes change from black to red, characteristic of a previous stage of maturity. One of the causes that modify the color of anthocyanins is molecular interactions. For this reason, the effect of pigmentation on the fluorescence emitted by anthocyanins was evaluated in the present study. HPLC analysis showed that no residues of other phenolic compounds were found in the purified anthocyanins. Regarding inter-and intra-molecular interactions, it was observed that blackberry anthocyanins have the ability to self-associate, and also interact with pigments, citric and gallic acid, increasing their fluorescence emission spectrum. Further studies are needed to confirm that pigmentation is the cause of color reversion, but preliminarily this study showed that these interactions may be involved in the color change of blackberry.

Keywords: reversion, interactions, phenols, spectrum, blackberry

Introducción

La producción y exportación de zarzamoras tiene un alto impacto económico en nuestro país, es por esto que su estudio es de relevancia e impacto en el sector agrícola. [1]Uno de los principales problemas pos cosecha que presenta el fruto de zarzamora es la reversión de color. Este defecto se caracteriza por el cambio de color negro a un color rojo lo cual es característico en estadios previos[2], lo cual genera pérdidas monetarias en el sector encargado de su producción, distribución y venta para mercados de exportación

En el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la UAQ se ha establecido que distintos factores poscosecha que dañan la estructura celular de la zarzamora pueden generar la reversión de color, siendo el método de vibración, que simula las condiciones del transporte, el que más frecuentemente se ha utilizado. Niveles de vibración de 10 Hz y aceleración de 0,5 g se ha comprobado que causan la reversión de color, asimismo este modelo ha permitido descartar que la

disminución en el contenido de antocianinas es la causa que genera la reversión de color; sin embargo, ha permitido sugerir que posiblemente los cambios en las interacciones intermoleculares de las antocianinas, ya sea de auto asociación (interacción con otras antocianinas) o copigmentación (interacción con compuestos fenólicos o ácidos orgánicos), podrían estar involucrados con el cambio de color que presenta la zarzamora [4].

Objetivo

Evaluar el efecto de la copigmentación en el espectro de emisión de fluorescencia de las antocianinas de zarzamora.

Metodología

- Extracto de antocianinas

Para la elaboración de los extractos se utilizaron 3 g de zarzamora (*Rubus spp*, variedad Tupi). Se colocaron en tubos falcón con 25 mL de metanol al 80%, se homogeneizaron con ayuda de un ultra turrax (T 25 D) y se centrifugaron por 15 min a 13,500 rpm. El sobrenadante se filtró y se almacenó en refrigeración.

- Concentración de antocianinas

Para retirar el metanol del extracto resultante, se utilizó un rotaevaporador. La temperatura del baño se mantuvo a 44 °C, y cada muestra permaneció por alrededor de 30 min.

- Purificación de antocianinas

La purificación se realizó con columnas sep –pak cartridge c-18. El proceso comienza con la activación de los cartuchos pasando 6 mL de metanol 100% y posteriormente 9 mL de agua acidificada con ácido clorhídrico al 0.01%. Una vez activados se añadieron 4 mL de los extractos previamente rotaevaporados.

Como siguiente paso, para retirar los ácidos orgánicos y azúcares, se adicionaron 6 mL de agua acidificada; después para retirar los fenoles de la muestra, se hicieron pasar por la columna 6 mL de acetato de etilo; y para finalizar 2 mL de metanol acidificado al 0.01%. El líquido obtenido serían nuestras antocianinas purificadas. Al finalizar se obtuvo solo un tubo falcón con 30 mL (2 mL por cada muestra) de antocianinas purificadas, las cuales nuevamente se rotaevaporaron hasta sequedad y se reconstituyeron con 2 mL de agua destilada.

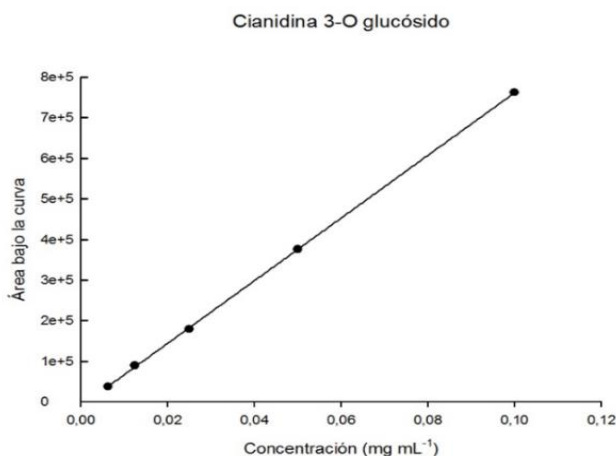


Figura 2. Curva estándar

Análisis por HPLC

El análisis se realizó en un equipo Waters (Waters, USA), compuesto por una bomba cuaternaria Alliance e2695 y un detector de arreglo de diodos 2998. El control del equipo, la adquisición de datos y su procesamiento se realizó con el software Empower3 (Waters, USA). Se inyectaron treinta microlitros del extracto purificado de antocianinas y la separación de los compuestos se llevó a cabo con una columna symmetry C-18 (5 µm, 150 mm x 4.6 mm) a 35 °C. La fase móvil consistió en: solvente A [agua/ ácido fórmico (99.9:0.1, v/v)] y solvente B (acetonitrilo); con un flujo de 0.5 mL min⁻¹. El gradiente utilizado fue el siguiente: 0 min, 5 % B; 0-

20 min, 20 % B; 20–25 min, 40 % B; and 25–30 min, 5 % B.

La detección de antocianinas se realizó a 520 nm y la identificación se realizó comparando el tiempo de retención de los picos de la muestra con un estándar comercial de cianidina 3-glucósido. El contenido de antocianinas se estimó con una curva de calibración (cianidina 3-glucósido en un intervalo de 0.006 a 0.10 mg min⁻¹).

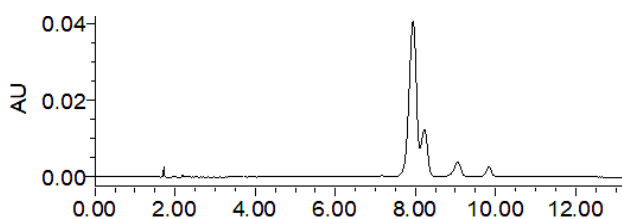


Figura 1. Cromatograma de antocianinas de zarzamora.

Lectura in vitro de fluorescencia

Se colocaron en una placa de 96 pozos de fondo negro 50 μ L de antocianinas purificadas en diluciones en agua de 1:50, 1:100 y 1:200, a la cual se añadieron, de manera independiente, 50 μ L de ácidos orgánicos (ácido cítrico y málico), ácidos fenólicos (ferúlico, cumárico y gálico) y flavonoides (catequina y quercetina) en concentración de 0.1 mg/mL. La placa se leyó la fluorescencia en un Varioskan (Thermo scientific), excitando las moléculas a una longitud de onda de 350 nm.

Resultados y discusión

Purificación de antocianinas

Para comprobar que la purificación de antocianinas fue adecuada, se revisó el perfil de antocianinas en el HPLC. A una longitud de onda de 520 nm, se observaron 4 picos los cuales se han reportado previamente en un trabajo previo del mismo grupo de trabajo (Pérez-Pérez, 2016). Estos picos, de acuerdo

con este reporte, corresponden a las antocianinas: Cianidin 3-O glucósido, cianidin 3-O xilósido, cianidin 3-O malonilglucósido y cianidin 3-O dioxalilglucósido. Adicionalmente se analizó el perfil de fenoles a 380 y 420 nm y no se observaron picos, lo que indica que el proceso de purificación fue adecuado, ya que no quedaron residuos de otros compuestos fenólicos, y si los había la cantidad fue escasa de tal manera que no fue posible detectarla con el equipo de HPLC.

Cuantificación de antocianinas

Una vez que se comprobó la pureza de las antocianinas, se cuantificó su contenido. Para realizar la cuantificación se realizó una curva estándar con cianidina 3-O glucósido ya que es la que se encuentra en mayor proporción (> 70%) (Siriwoharn et al., 2004). La inyección de 5 concentraciones distintas del estándar de antocianinas nos permitió construir la curva de calibración (Fig. 2), la cual nos dio la ecuación $8 \times 10^6 X - 9885.6$, con un coeficiente $R^2 = 0.9999$. A partir del despeje de dicha ecuación fue posible calcular el contenido de antocianinas purificadas. Se cuantificaron 29.5 mg de antocianinas por mL de solución.

Evaluación de la fluorescencia de las antocianinas

Una vez que conocimos la concentración de antocianinas que purificamos, se decidió hacer las diluciones de 1:50, 1:100 y 1:200 para entrar en los límites de detección del equipo. Se puede observar que, de manera general, las soluciones con la menor dilución (1:50) presentó la mayor intensidad de fluorescencia, lo cual es evidente ya que es la muestra más concentrada, no obstante, cabe destacar, que el aumento no fue proporcional con respecto a la dilución, es decir, las muestras en dilución 1:100, presentaron una fluorescencia entre 0.2 y 0.25, por lo que era de esperarse que las diluciones 1:50 presentaron el doble de fluorescencia, en cambio

presentaron intensidad de fluorescencia entre 0.6 y 0.8, mayor a lo previsto. Esto se puede atribuir a que las antocianinas cuando se encuentran en alta concentración pueden interactuar entre sí, lo que se conoce como auto asociación. La auto asociación

provoca incremento en el espectro de absorción y de emisión de las antocianinas, y, en consecuencia, producen una coloración con mayor intensidad. En la zarzamora el fenómeno de reversión de color podría deberse a que en el fruto revertido se pierdan estas interacciones de auto asociación de las antocianinas produciendo disminución en la coloración tornándose rojas.

Otra de las interacciones intermoleculares que modifican el color de las antocianinas es la copigmentación. En esta las antocianinas interaccionan con compuestos que son incoloros (ácidos orgánicos y fenólicos) y flavonoides. En este estudio se añadieron a las antocianinas purificadas los principales copigmentos que se ha reportado presenta la zarzamora (Siriwoharn et al., 2004; Kafkas et al., 2006). De los cuáles, el ácido cítrico y el ácido gálico en la dilución 1:50 de antocianinas (cianidina 3-glúcosido) emiten una intensidad de fluorescencia de alrededor de 0.6-0.8. Esto nos indica que es posible que en el fruto no revertido (de color negro), las antocianinas se encuentren dentro de la célula interactuando con estos copigmentos, y que al someterse al tratamiento de vibración se pierde la interacción con estos compuestos produciendo el cambio de color.

Conclusión

El método de purificación realizado permitió obtener antocianinas sin residuos de otros fenoles, a partir de las cuales se observó que, a alta concentración, las antocianinas de zarzamora presentan interacciones de auto asociación; asimismo es posible que interaccionen con copigmentos, particularmente ácido cítrico y gálico. Debido a esto es necesario realizar estudios focalizados en establecer si estas interacciones se presentan en las células de zarzamora y comprobar si son responsables del fenómeno de la reversión de color.

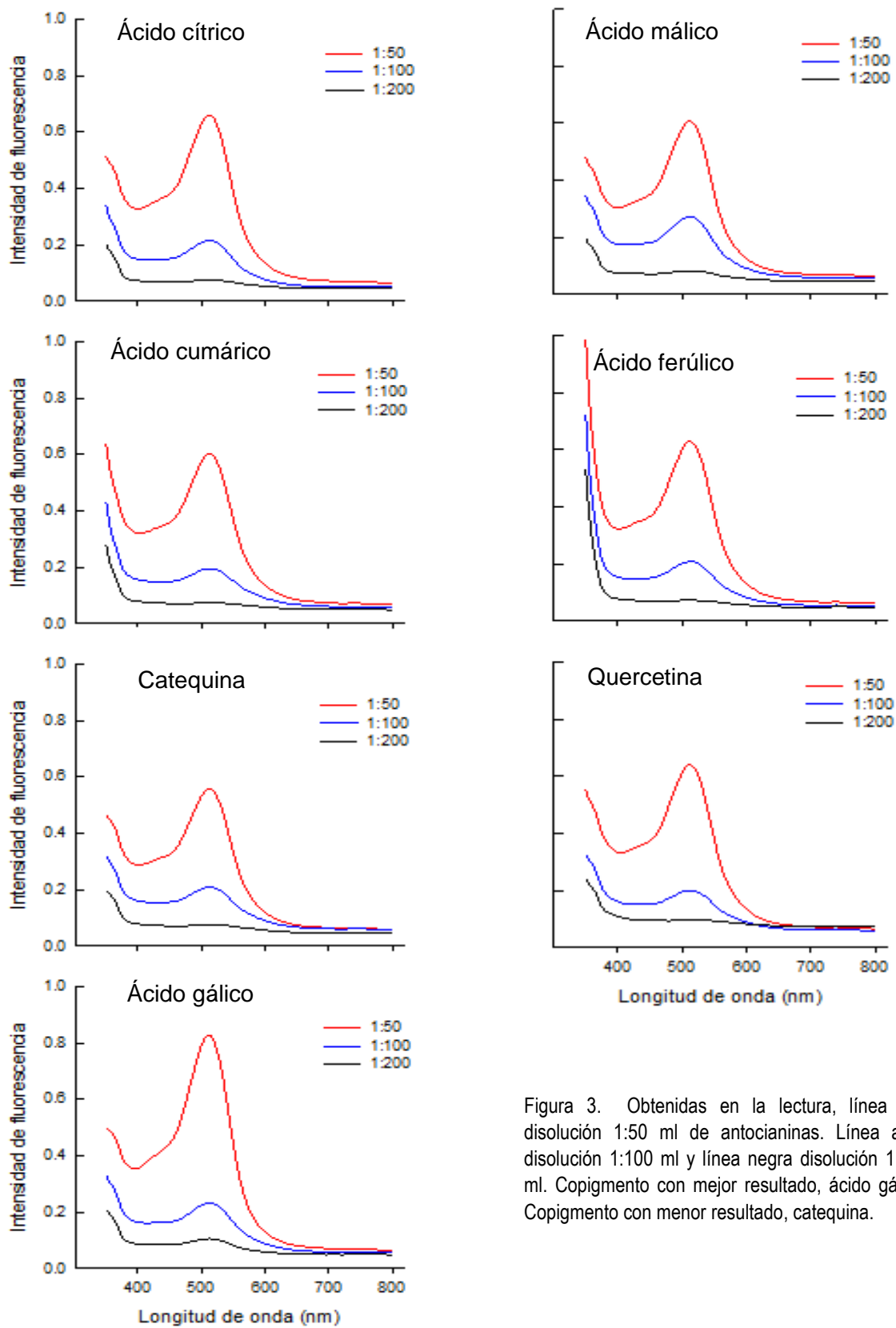


Figura 3. Obtenidas en la lectura, línea roja disolución 1:50 ml de antocianinas. Línea azul, disolución 1:100 ml y línea negra disolución 1:200 ml. Copigmento con mejor resultado, ácido gálico. Copigmento con menor resultado, catequina.

Agradecimientos

Mi agradecimiento a la dirección Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Querétaro por la oportunidad de participar en la Introducción al verano de Ciencia. Al cuerpo académico del Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Poscosecha de Frutas y Hortalizas de la facultad de Química. Al futuro Dr. Angel Ramón Flores Sosa por su paciencia y dedicación, dentro y fuera del laboratorio. Y a mis compañeros de verano, Borja Mandaluniz y Aldo Cárdenas.

Referencias

- A. R. Flores-Sosa *et al.*, “Red drupelet reversion in blackberries caused by mechanical damage is not linked to a reduction in anthocyanin content,” *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 180, no. May, 2021, doi: 10.1016/j.postharvbio.2021.111618.
- CEDRSSA, “La producción y comercio de las berries en México,” p. 14, 2017.
- I. Fernando, J. Fei, R. Stanley, and H. Enshaei, “Measurement and evaluation of the effect of vibration on fruits in transit—Review,” *Packag. Technol. Sci.*, vol. 31, no. 11, pp. 723–738, 2018, doi: 10.1002/pts.2409.
- Kafkas, E., Koşar, M., Türemiş, N., & Başer, K. H. C. (2006). Analysis of sugars, organic acids and vitamin C contents of blackberry genotypes from Turkey. *Food chemistry*, 97(4), 732-736
- N. Viquez, “Factores que afectan los extractos vegetales,” *Medicina (B. Aires)*, 1999, [Online]. Available: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/sordo_s_jp/capitulo3.pdf.
- Pérez-Pérez, G. A., Fabela-Gallegos, M. J., Vázquez-Barríos, M. E., Rivera-Pastrana, D. M., Palma-Tirado, L., Mercado-Silva, E., & Escalona, V. (2016, June). Effect of the transport vibration on the generation of the color reversion in blackberry fruit. In *VIII International Postharvest Symposium: Enhancing Supply Chain and Consumer Benefits-Ethical and Technological Issues 1194* (pp. 1329-1336).
- Siriwoharn, T., Wrolstad, R. E., Finn, C. E., & Pereira, C. B. (2004). Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus L. Hybrids*) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 8021-803

Síntesis de hidroxiapatita mediante el método hidrotermal asistido por microondas

Arredondo Munguía Luis Emilio
Asesores: Calderón de la Rosa Juan Carlos
Dr. Velázquez Castillo Rodrigo Rafael

Resumen

Se llevo a cabo la síntesis de hidroxiapatita (HAp) mediante una metodología hidrotermal asistida por microondas. Se utilizó un Monowave 300 de Anton Para para alcanzar una presión de 8 bares y una temperatura de 170°C. Como precursores de las soluciones se utilizaron: Acido glutámico ($C_5H_9NO_4$), Nitrato de calcio ($Ca(NO_3)_2$), Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) e Hidróxido de potasio (KOH) Se obtuvieron nano fibras de hidroxiapatita con orientación preferencial. Posteriormente se repitió la síntesis con las mismas condiciones y los mismos precursores a excepción del ácido glutámico, con eso se obtuvo hidroxiapatita sin ninguna orientación específica. Los resultados de difracción de rayos X fueron los esperados para la estructura cristalina de la hidroxiapatita. Adicionalmente se utilizó una mufla para calcinar la hidroxiapatita a 600°C por dos horas. Después se dopó con quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$) para su posible suministro posterior de manera controlada. Para agilizar este proceso se utilizó una centrifugadora a 6500 revoluciones por minuto durante 15 minutos. Finalmente, se dejó en un horno a 65°C por 72 horas para quitar cualquier rastro de agua. **Palabras clave:** Hidroxiapatita, Ácido glutámico, Quercetina, Nano fibras.

Abstract

The synthesis of hydroxyapatite (HAp) was carried out using a microwave-assisted hydrothermal methodology. An Anton Para Monowave 300 was used to reach a pressure of 8 bar and a temperature of 170°C. Glutamic acid ($C_5H_9NO_4$), calcium nitrate ($Ca(NO_3)_2$), monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4), and potassium hydroxide (KOH) were used as precursors for the solutions. Subsequently, the synthesis was repeated with the same precursors, and conditions with the exception of glutamic acid, thus hydroxyapatite was obtained without any specific orientation. The X-ray diffraction results were as expected for the crystalline structure of hydroxyapatite. Additionally, a muffle was used to calcine the hydroxyapatite at 600°C for two hours. It was then doped with quercetin ($C_{15}H_{10}O_7$) for possible subsequent controlled delivery. To speed up this process a centrifuge was used at 6500 revolutions per minute for 15 minutes. Finally, it was left in an oven at 65°C for 72 hours to remove any trace of water. **Keywords:** Hydroxyapatite, Glutamic acid, Quercetin, Nanofibers.

Introducción

En los últimos años la hidroxiapatita (HAp) ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) se ha convertido en un material de mucho interés a nivel mundial. Las razones son diversas, entre ellas resaltan su gran rendimiento como un material piezoeléctrico y su alta compatibilidad con el tejido óseo. El tejido óseo se clasifica como un composite, en el cual, la parte mineral soporta casi la totalidad de las cargas mecánicas, mientras que la parte orgánica funciona como material de enlace. En promedio el tejido óseo se compone de dos terceras partes de mineral inorgánico y una tercera parte de material orgánico. La matriz orgánica se compone de casi un 90% de colágeno, una proteína esencial en el cuerpo humano, formada por fibras, flexible pero difícil de tensar. Consiste en tres cadenas polipeptídicas cada una de las cuales contiene al aminoácido no polar glicina, situado cada tres posiciones. Su estructura

regular permite que se enrollen entre sí para formar esa triple hélice. La fase mineral se compone de cristales microscópicos de fosfato de calcio, dentro de la hidroxiapatita. También están presentes otras fases minerales y algunos iones, pero todos ellos considerablemente en menor cantidad. La hidroxiapatita y el fosfato de calcio dibásico son las únicas fases de fosfato de calcio que son químicamente estables a la temperatura y pH del cuerpo humano.

La quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$) es un flavonoide que se encuentra en muchas frutas y verduras, suele ser responsable por su coloración. Desde hace algunos años se conocen sus propiedades como antiinflamatorio, antidiabético y antibacteriana, además de su gran capacidad de eliminar radicales libres. En la actualidad ha ganado interés su estudio como un posible medicamento anticancerígeno. Sin embargo, su uso clínico sigue muy limitado debido a su poca solubilidad en el agua y su mala biodisponibilidad. Para solucionar estos obstáculos, se planea usar la hidroxiapatita como transporte.

Objetivos

Sintetizar nano y microfibras de hidroxiapatita hexagonal. Caracterizar fisicoquímicamente por medio de difracción de rayos X para cerciorarse de que se haya obtenido de la manera deseada. La hidroxiapatita posteriormente será dopada con iones metálicos para su potencial aplicación en nanomedicina regenerativa y para el transporte de fármacos.

Metodología

Síntesis de HAp orientada

Se prepararon dos soluciones por separado. En la primera se utilizaron 2.23 gramos de ácido glutámico con .6 gramos de nitrato de calcio. Los reactivos se disuelven en 150 mL de agua tridestilada y se deja en agitación magnética durante 2 horas a 40°C. La solución presentó un pH de 3.

Para la segunda solución se utilizaron .38 gramos de hidróxido de potasio y .6 gramos de fosfato de potasio. Ambos reactivos se disuelven en 50 mL de agua tridestilada y se deja en agitación magnética durante 15 minutos a 45°C. La solución presentó un pH de 12.

Al mezclar ambas soluciones, se obtiene una tercera que tiene una temperatura de 38°C y un pH de aproximadamente 4.

Esta solución se mantuvo en agitación magnética por 10 minutos. Posteriormente se colocan 23 mL de la solución en un tubo de vidrio adecuado para el microondas Monowave 300. El cual se programa a 170°C durante 45 minutos y otros 15 de enfriado. Se repite este procedimiento con más tubos hasta obtener cantidad suficiente del producto. Se obtuvo un sólido cristalino blanco como precipitado. Se deja filtrar todas las soluciones durante 24 horas. Posteriormente se recolectó el sólido y fue analizado por difracción de rayos X, donde se verificó que fuese hidroxiapatita

Síntesis de HAp sin orientación

De igual manera que en la síntesis anterior, se prepararon dos soluciones. En la primera se diluyó .58 gramos de nitrato de calcio en 150 mL de agua tridestilada. Se calentó a 40°C durante 10 minutos. El tiempo es considerablemente menor que en la síntesis anterior debido a la ausencia de ácido glutámico. La solución presentó un pH de 5.

Para la segunda solución se utilizaron .38 gramos de hidróxido de potasio y .6 gramos de fosfato de calcio. Ambos se disolvieron en 50 mL de agua tridestilada y se dejó en agitación magnética durante 10 minutos a 40°C. La solución presentó un pH de 12.

Al mezclar ambas soluciones, se obtuvo una tercera que tiene una temperatura de 42°C y un pH de aproximadamente 7. Se pudo observar una suspensión en la solución, algo que no era observable en la síntesis anterior.

Esta solución se mantuvo en agitación magnética por 10 minutos. Posteriormente se colocan 24 mL de la solución en un tubo de vidrio adecuado para el microondas Monowave 300. El cual se programa a 170°C durante 45 minutos y otros 15 de enfriado. Se obtuvo menor cantidad del sólido blanco como precipitado, además aún se observaron suspensiones en la solución. Se repite este procedimiento con más tubos hasta obtener cantidad suficiente del producto. Se deja filtrar todas las soluciones durante 24 horas. Posteriormente se recolectó el sólido y fue analizado por difracción de rayos X.

Difracción de rayos X

Se realizó la difracción de rayos X para verificar la obtención de hidroxiapatita.

Tratamiento adicional

Una parte de la hidroxiapatita hexagonal obtenida fue destinada para su investigación en el transporte de fármacos.

Primero la hidroxiapatita se llevó a una mufla donde se calentó a 600°C durante 3 horas. Y se dejó enfriar a 25°C durante 25 minutos.

Se diluyó .0197 gramos de hidroxiapatita en 7.5 mL de etanol y .00197 gramos de quercetina en 7.5 mL de agua destilada. Cada una de las soluciones se mantuvo en agitación magnética a 35°C. Posteriormente se mezclan ambas soluciones, aumentando la temperatura a 40°C y se deja en agitación constante por 24 horas. Una vez concluido ese tiempo la solución es trasvasada a un tubo de centrifugadora de 15 mL. Se introduce a la centrifugadora a 6500 revoluciones por minuto durante 15 minutos. Al terminar se obtiene una solución con cantidad considerable de precipitado. Se utilizó una micropipeta para quitar todo el líquido posible sin retirar nada del precipitado. Más adelante el restante se mantiene en un Vortex en el nivel siete de potencia durante 20 segundos. Pasado ese tiempo se vuelve a centrifugar a 6500 revoluciones por

minuto durante 15 minutos adicionales. Una vez más se utilizó una micropipeta para retirar el líquido sobrante y la hidroxiapatita dopada con quercetina se introduce en un horno a 65°C durante 72 horas para retirar cualquier rastro de agua.

Resultados

La difracción de rayos X demostró que se obtuvo hidroxiapatita perfectamente cristalina. Otros estudios previos de esta misma técnica por medio de microscopía electrónica de barrido demuestran que las nano fibras se obtuvieron de forma hexagonal. La primera síntesis, con ácido glutámico, mostro una orientación preferencial de la hidroxiapatita. La segunda síntesis, sin ácido glutámico no mostro una orientación preferencial. Su estructura cristalina era parecida a la hidroxiapatita común en el mercado.

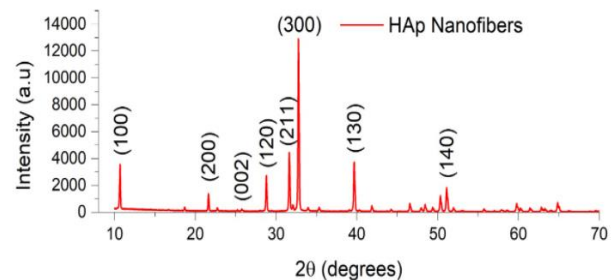


Fig. 1 Difractograma de hidroxiapatita comercial

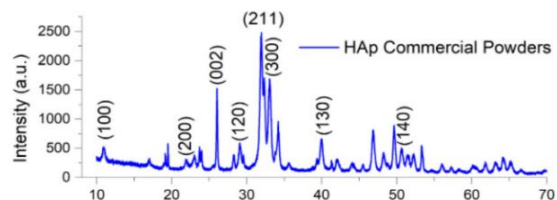


Fig. 2 Difractograma de hidroxiapatita obtenida mediante el método hidrotérmal asistido por microondas

Posterior a su tratamiento, la hidroxiapatita dopada con quercetina lucía como un polvo grisáceo un tanto amarillento, tal como se esperaba. Se realizarán análisis posteriores para determinar si la quercetina

se encuentra en el interior de la hidroxiapatita o únicamente esta adsorbida en su superficie.

Discusión y conclusiones

El método hidrotermal asistido por microondas es efectivo para la obtención de hidroxiapatita. Se consiguieron las nano fibras esperadas de forma hexagonal. La orientación preferencial solo se obtuvo en la hidroxiapatita sintetizada con ácido glutámico, por lo que se puede concluir que es crucial para este fin.

La cantidad ideal de quercetina para un correcto dopaje es una décima parte en masa de la hidroxiapatita.

A pesar de las múltiples utilidades de la hidroxiapatita hexagonal, no es su única forma cristalográfica de interés. En investigaciones recientes, la hidroxiapatita monoclinica ha demostrado ser un gran material piezoeléctrico debido a la combinación de su composición química y su estructura cristalina. Sin embargo, su síntesis no puede llevarse a cabo con el mismo método y bajo las mismas condiciones.

Agradecimientos

Se agradece a la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) por brindar las instalaciones y el presupuesto necesario para la investigación. También a la Dirección de Investigación y Posgrado de la UAQ por presentar el programa “Verano de la ciencia” en el cual se nos brindo la oportunidad de participar. Al Dr. Rodrigo Velázquez Castillo por brindar su apoyo y asesoramiento a lo largo de toda la investigación

Referencias Bibliográficas

Alanís-Gómez, J. R., Rivera-Muñoz, E. M., Cervantes-Medina, J. S., Almanza-Reyes, H., Nava-Mendoza, R., Cortes-Romero, C., & Velázquez-Castillo, R. “Synthesis of Micro and Nano-Sized Hydroxyapatite Fibers Through the Microwave Assisted Hydrothermal Method.” *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol 16 no. 7,, pp. 7557-7566, 2016.

J. Campa, G. Ulloa, L. Bucio, I. Belío, R. Velazquez, E. Rivera Biomateriales. Fundamentos, técnicas y aplicaciones 1 Ed. Universidad de Guadalajara. Jalisco, México 2007.

N. Méndez-Lozano, R. Velázquez-Castillo, E. M. Rivera-Muñoz, L. Bucio-Galindo, G. Mondragón-Galicia, A. Manzano-Ramírez, M. Á. Ocampo, and L. M. Apátiga-Castro, “Crystal growth and structural analysis of hydroxyapatite nanofibers synthesized by the hydrothermal microwave-assisted method,” *Ceramics International*, vol. 43, no. 1, pp. 451–457, 2017.

R. Khursheed, S. Kumar, S. Wadhwa, M. Gulati and A. Awasthi “Enhancing the potential preclinical and clinical benefits of quercetin through novel drug delivery systems” *Drug Discovery Today*, vol. 25, no., pp. 209-222, 2020.

Efecto de fructosa en la lipogénesis de células hepáticas

MCNH. Francisco Campos Maldonado;
ln.fco.campos@outlook.com, Arline Montserrat
Castillejos Alfaro; *arline.casti@gmail.com*, José
Emilio Godoy Alamos;
jgodoy29@alumnos.uaq.mx, Joseph Eliezer
Castruita Amaro; *jcastruita28@alumnos.uaq.mx*.

Resumen

La fructosa, un azúcar natural que se encuentra en muchas frutas. En cantidades iguales, es más dulce que la glucosa o la sacarosa y, por lo tanto, se usa comúnmente como edulcorante. El consumo de fructosa está asociado con un incremento en la producción de glucosa endógena, de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, lactato en ayuno, postprandiales y de las concentraciones de lípidos intrahepatocelulares. Esta revisión describirá la relación entre el consumo de fructosa en altas concentraciones y el riesgo de desarrollar lipogénesis de novo, obesidad, entre otras enfermedades, a partir de diferentes concentraciones tanto de fructosa como de glucosa en células hepáticas HepG2, esto con el objetivo de observar y posteriormente, analizar su efecto.

Palabras clave

Obesidad, fructosa, glucosa, lipogénesis de novo, tejido adiposo, células hepáticas HepG2.

Abstract

Fructose, a natural sugar found in many fruits. In equal amounts, it is sweeter than glucose or sucrose and is therefore used as a sweetener. Fructose consumption is associated with an increase in

endogenous glucose production, plasma triglyceride concentrations, fasting lactate, postprandial, and intrahepatocellular lipid concentrations. This review will describe the relationship between the consumption of fructose in high concentrations and the risk of developing de novo lipogenesis, obesity, among other diseases, starting from different concentrations of both fructose and glucose in hepatic HepG2 cells, this in order to observe and later analyze its effect.

Keywords

Obesity, fructose, glucose, de novo lipogenesis, adipose tissue, HepG2 liver cells.

Introducción

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, la obesidad es una enfermedad crónica, caracterizada por el aumento de la grasa corporal, asociada a mayor riesgo para la salud (Organización Mundial de la Salud).

Las causas de la obesidad son múltiples y complejas. Estudios epidemiológicos han detectado en la población una serie de factores asociados con la obesidad: edad, sexo femenino, raza, alimentación poco saludable, sedentarismo, factores socioculturales, factores conductuales, factores genéticos y ciertos medicamentos.

Los hábitos alimenticios poco saludables y la falta de ejercicio ocasionan el 32% de las muertes de mujeres y el 20% de hombres en el país. Gran parte de estos alimentos contienen fructosa, la cual se ha incrementado considerablemente en los últimos años, especialmente bajo la forma de jarabe de maíz alto en fructosa, debido a su gran poder edulcorante. Varios estudios, han relacionado su alto consumo con alteraciones metabólicas, hígado graso no alcohólico y malabsorción de fructosa, entre otras.

La fructosa es un monosacárido presente en forma natural en frutas, verduras, miel y en forma agregada

en alimentos etiquetados como light, bebidas y néctares. La fructosa se metaboliza casi completamente en el hígado y se utiliza en la reposición del glucógeno hepático y síntesis de ácidos grasos, mientras que una gran parte de la glucosa de la dieta atraviesa el hígado y se dirige al músculo esquelético donde se degrada a CO₂, H₂O y ATP, y al tejido adiposo donde se convierte en glicerol fosfato para la síntesis de triglicéridos y producción de energía. Los productos del metabolismo de la fructosa son el glucógeno hepático, los ácidos grasos y los triglicéridos. El metabolismo de la fructosa se divide en dos fases: la primera, la síntesis de triosas: dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehido-3P (Ga3P), y la segunda es la que convierte estas triosas en glucógeno o en piruvato, que entra en el ciclo tricarboxílico, se convierte en citrato y se dirige hacia la síntesis de novo de los ácidos grasos (palmitato) (Stanhope; Stanhope et al., 2009)

Un estudio describió que la fructosa podría contribuir a la obesidad al estimular la proteína de unión al elemento receptor de esteroles 1c (SREBP-1c) independiente de la insulina, que activa los genes involucrados en lipogénesis de novo (Matsuzaka et al., 2004) y genera ácidos grasos para la producción de triglicéridos en el hígado.

Por otro lado, la glucosa llega a todas las células del organismo a través de transportadores específicos.

Sin embargo, la fructosa utiliza transportadores GLUT5 y únicamente puede formar glucógeno hepático y ácidos grasos. Por ello, tiene una menor oportunidad de uso y una mayor tendencia a la acumulación de grasa corporal.

Gran porcentaje de fructosa se dirige al hígado, mientras que la mayor parte del porcentaje de glucosa se orienta a la sangre, por lo tanto, si hay diferencias en cuanto a las enfermedades que éstas puedan causar.

En el caso de la fructosa (nuestro enfoque principal), el exceso de su consumo más allá de sus calorías puede tener en el desarrollo del síndrome metabólico, la esteatosis hepática no alcohólica y su asociación con la obesidad (como bien se mencionaba al principio). Sin embargo, tiene una amplia cantidad de impacto en nuestro cuerpo: metabolismo (como bien se mencionaba), sistema cardiovascular, riñón, sistema gastrointestinal, sistema nervioso y fertilidad.

En esta investigación las células HepG2 tienen un papel fundamental, debido a que el efecto que se pretende conocer será analizado en ellas.

Desde su introducción en 1979, un sin número de investigaciones han utilizado este modelo y una alta proporción de las proteínas específicas del hígado han sido identificadas en los estudios iniciales con estas células, lo que generó expectativas con relación

METABOLISMO DE LA FRUCTOSA EN EL HÍGADO

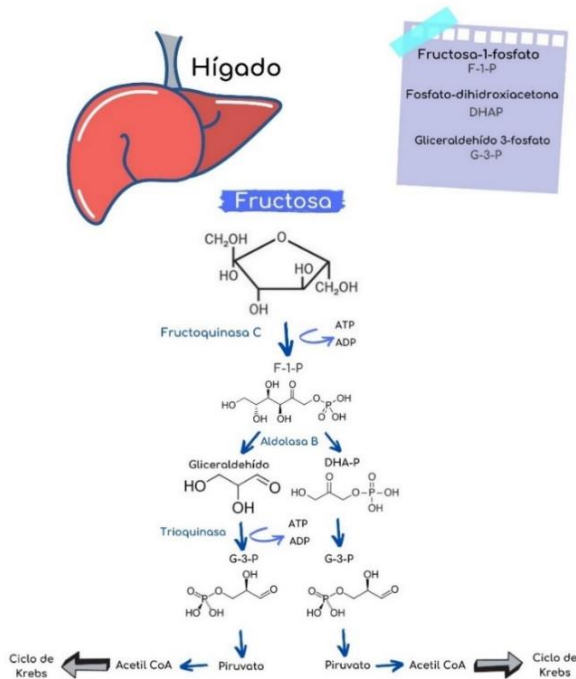


Figura 1 “Metabolismo de la fructosa en el hígado”

a que esta línea celular se convirtiera en un modelo celular de hígado humano bastante consistente para investigación. Entre los procesos metabólicos que han sido estudiados hasta ahora, se destacan estudios del metabolismo de lipoproteínas, síntesis de ácidos biliares, metabolismo del colesterol, metabolismo de medicamentos, enzimas hepáticas, transporte de glucosa, entre otros; estas vías han sido evaluadas procurando mantener el ambiente de los hepatocitos normales y, por lo tanto, favoreciendo problemas biológicos, en los cuales está involucrado el funcionamiento hepático (Green, Johnson, Amin, Sivathondan, Silva, Wang, 2015; Javitt, 1990).

Metodología

Materiales

- Línea celular HepG2
- Medio de cultivo DMEM (Gibco, D6429) con 4.5 g/L
- Suero fetal bovino (Gibco, 26140079)
- Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich, P4333)
- Cajas de Petri Fructosa (Sigma-Aldrich, F3510-100G)
- Glucosa (Sigma-Aldrich, G721-100G)
- Formalina 3.7%
- Rojo oleoso (Sigma-Aldrich, O0625-100G)
- Agua destilada
- Micropipetas

Método

Como bien se planteó anteriormente, lo que se pretende es conocer el efecto de distintas concentraciones en la lipogénesis de células hepáticas HepG2, por lo tanto, primero se debe examinar la relación que existe entre la lipogénesis y el metabolismo de la fructosa. Partiendo de esto, es claro que la línea celular utilizada es HepG2 y el medio de cultivo DMEM (Gibco, D6429) con 4.5 g/L; suero fetal bovino (Gibco, 26140079); Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich, P4333); Cajas de Petri (Santa Cruz). Una vez teniendo esto,

se agregaron los diferentes tratamientos con fructosa (Sigma-Aldrich, F3510-100G) y glucosa (Sigma-Aldrich, G721-100G) por distintos periodos de tiempo (24 h y 72 h). Una vez transcurrido el tiempo para cada uno de los tratamientos, fue retirado el medio, posteriormente, se añadió formalina al 3.7% -esto para fijar las células-, al igual que el medio, la formalina también se retira. Seguidamente, se agrega el rojo oleoso (Sigma-Aldrich, O0625-100G), una vez pasando 20 minutos, éste ya puede ser retirado haciendo un lavado con agua destilada y finalmente, dejándose secar.

Resultados

En las imágenes se observan los cuatro tratamientos aplicados (conteniendo tres imágenes cada uno, debido a los pocillos), con la diferencia de que los primeros cuatro corresponden a un periodo de tiempo de 24 h y la segunda parte a uno de 72 h.

Los tratamientos fueron: 25 mM de glucosa, 25 mM de fructosa, 5.5 mM de glucosa y 5.5 mM de fructosa.

Primero se presentarán los cuatro tratamientos de 24h y seguidamente los cuatro de 72h, siendo un total de ocho.

Tratamiento 1; 25 mM de glucosa, 24h



Figura 2. HepG2, pocillo 1

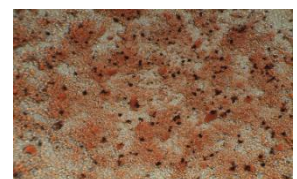


Figura 3. HepG2, pocillo 2

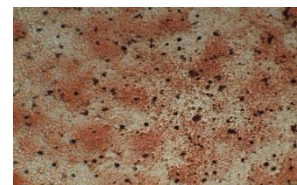


Figura 4. HepG2, pocillo 3

Tratamiento 2; 25 mM de fructosa, 24h

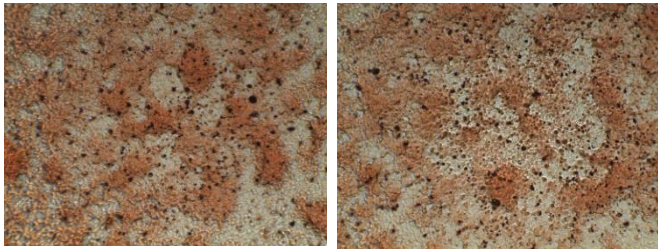


Figura 5. HepG2, pocillo 1

Figura 6. HepG2, pocillo 2

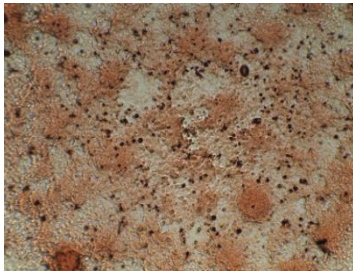


Figura 7. HepG2, pocillo 3

Primeramente, se presentan los resultados obtenidos del periodo de tiempo de 24h, la presencia de grasa entre el primer y segundo tratamiento es muy parecida, con la diferencia de que en este último se pueden observar poros y el exceso de esta acumulación de grasa hacen que se vea en un peor estado. La **Figura 2** es muy singular en comparación con las **Figuras 3** y **4**, debido a que la distribución de grasa es menor.

Tratamiento 3; 5.5 mM de glucosa, 24h

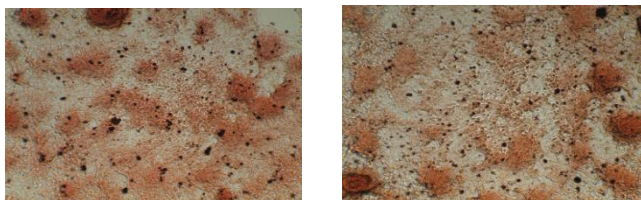


Figura 8. HepG2, pocillo 1

Figura 9. HepG2, pocillo 2

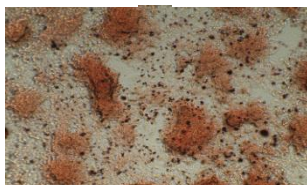


Figura 10. HepG2, pocillo 3

Tratamiento 4; 5.5 mM de fructosa, 24h

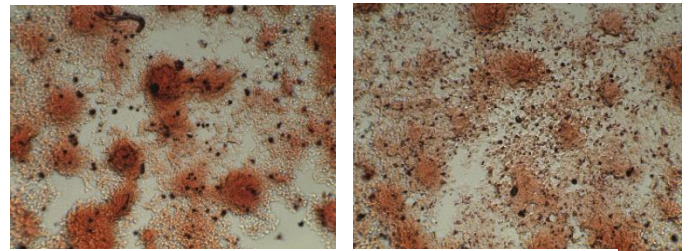


Figura 11. HepG2, pocillo 1

Figura 12. HepG2, pocillo 2

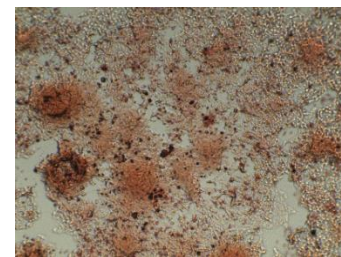


Figura 13. HepG2, pocillo 3

Tratamiento 1; 25 mM de glucosa, 72h

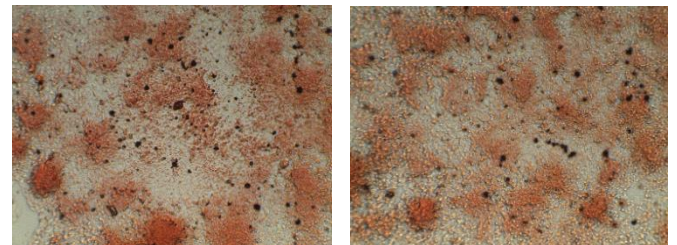


Figura 14. HepG2, pocillo 1

Figura 15. HepG2, pocillo 2

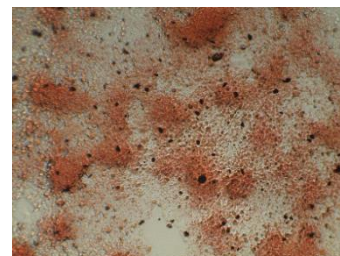


Figura 16. HepG2, pocillo 3

Tratamiento 2; 25 mM de fructosa, 72h

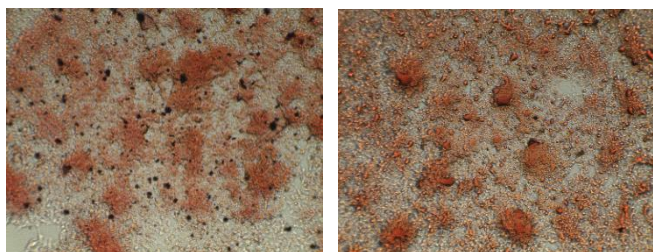


Figura 17. HepG2, pocillo 1

Figura 18. HepG2, pocillo 2



Figura 19. HepG2, pocillo 1

La grasa presente en ambos tratamientos es claramente notoria, a diferencia del segundo tratamiento de 24h en éste segundo tratamiento de 72h se observa una mayor presencia de brillo, el color es menos opaco y no se perciben estos poros que en el de 24h sí son notorios. En éste primer tratamiento de 72h, la concentración y distribución de grasa es muy similar en las Figuras 14, 15 y 16 a diferencia del segundo tratamiento que presenta mayor variación en cuanto a la concentración y distribución de grasa entre las Figuras 17, 18 y 19.

Tratamiento 3; 5.5 mM de glucosa, 72h

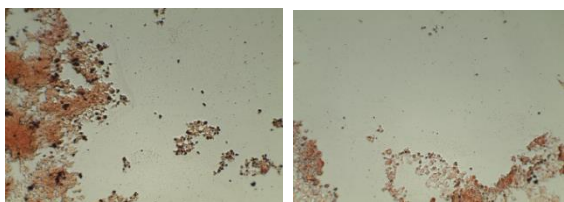


Figura 20. HepG2, pocillo 1

Figura 21. HepG2, pocillo 2



Figura 22. HepG2, pocillo 3

Tratamiento 4; 5.5 mM de fructosa, 72h

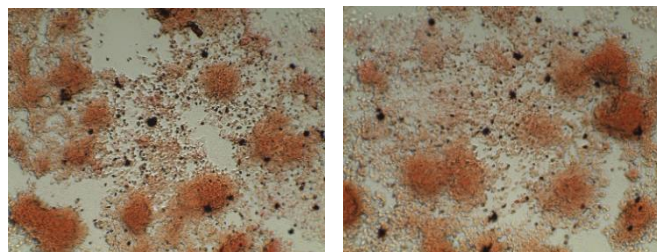


Figura 23. HepG2, pocillo 1

Figura 24. HepG2, pocillo 2

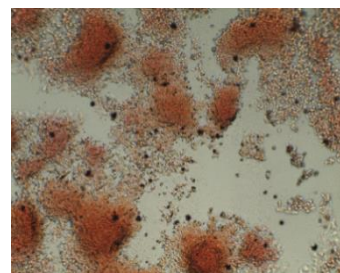


Figura 25. HepG2, pocillo 1

En este tercer tratamiento la presencia de grasa si varía en comparación con los demás tratamientos, incluso entre los tres pocillos, se puede observar como difiere la concentración de grasa de la Figura 21 con las Figuras 20 y 21, debido a que la primera es mucho menor. En este último y cuarto tratamiento, la concentración no difiere tanto entre las Figuras 23, 24 y 25. Cabe destacar que este tercer y cuarto tratamiento posee una superficie gris característica, que en todos los demás tratamientos (tanto de 24h, como de 72h) no es posible apreciar como en estos dos últimos.

Discusión y conclusiones

La alimentación con alto contenido de fructosa añadida, puede causar varios efectos adversos, la fructosa estimula la lipogénesis de novo más que otras fuentes de carbohidratos. Sin embargo, en caso de alimentación rica en grasas, la conversión de carbohidratos en ácidos grasos disminuye por inhibición de la lipogénesis de novo en tejido adiposo.

Con los resultados obtenidos se puede observar, lo peligroso que es para nuestra salud la ingesta de la fructosa en exceso y como ésta puede ser la causa de múltiples enfermedades. El consumo de fructosa es proporcional al daño que causa en nuestra salud, es decir, entre mayor cantidad de fructosa se consume, mayor es el riesgo a que afecte nuestra salud; que es justo lo que nos arrojan los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones, tanto de glucosa como de fructosa en células hepáticas HepG2.

Agradecimientos

Este artículo fue desarrollado gracias al apoyo que brindó la Universidad Autónoma de Querétaro mediante la estrategia de apoyo al Verano de Introducción a la Ciencia, particularmente a la Facultad de Medicina que permitió llevar a cabo esta investigación en sus instalaciones -específicamente, en su laboratorio- y por facilitar el uso de sus equipos para la realización de la misma. Gracias al Dr. Pablo García Solís por la inclusión en el Verano de la Región Centro, a mi asesor el MCNH. Francisco Campos Maldonado, quien fue parte fundamental de todo este proceso, por su apoyo en la redacción del artículo.

Referencias bibliográficas

C. J. Green, D. Johnson, H. D. Amin, P. Sivathondan, M. A. Silva, L. M. Wang, et al. "Characterization of lipid metabolism in a novel immortalized human hepatocyte cell line". *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 309(6): E511-22, 2015. Disponible en <http://doi.org/f7r8sb>.

K. L. Stanhope and P. J. Havel, "Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance", *Curr. Opin. Lipidol.*, 19(1):16-24, 2008.

Organización Mundial de la Salud

T. Matsuzaka, H. Shimano, N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, H. Okazaki, Y. Tamura, Y. Iizuka, K. Ohashi, S. Tomita, M. Sekiya, "Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice", *Diabetes*, 53(3):560-9, 2004

“Efecto de la Hidrocortisona sobre la reacción acrosomal del espermatozoide humano”

Investigadores: M. en C. Sheini Ruturi Sánchez
González, Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie.
Alumno: Salvador Garcia Guzman

Facultad de Ingeniería
Universidad Autónoma de Querétaro

Introducción:

La fecundación es la fusión de los 2 gametos que son el óvulo y el espermatozoide, esto se produce dentro del cuerpo de la mujer, en las trompas de Falopio, para llegar hasta ese punto, los espermatozoides deben de ser eyaculados dentro de la vagina de la mujer e ir abriéndose paso hacia el óvulo, dentro del tracto femenino que sufre de ciertos cambios como la capacitación, que son los cambios fisiológicos que sufre el espermatozoide de forma natural dentro del tracto femenino para poder llevar a cabo la fecundación.

Para llevar a cabo este proceso es importante la inhibición del colesterol de se encuentra en la membrana acrosomal que se caracteriza por tener islas de composición ordenada de

colesterol y esfingolípidos, es bien sabido que el fluido oviductal es rico en albúminas que son capaces de retirar el colesterol de la membrana espermática, la inhibición de este permite el ingreso del calcio lo cual es de gran importancia para activar y mantener la movilidad de los espermatozoides capacitados; la ausencia del colesterol además favorece a la translocación de algunas proteínas.

En este proyecto se hablará sobre los efectos de la hidrocortisona o cortisol sobre la reacción acrosomal, para entender esto tenemos que saber que el cortisol es una sustancia química que es segregada por las glándulas suprarrenales la cual está encargada de ciertos procesos metabólicos que actúan sobre lípidos, proteínas y carbohidratos, y además está relacionada con el estrés y ciertas actividades que producen incremento de glucosa en la sangre.

Los niveles de cortisol y los niveles de serotonina en la sangre varían durante el día según las actividades diarias, estos pueden verse alterados por diversas situaciones los cuales pueden originar pérdida o aumento de peso, el nivel de cortisol alto puede afectar directamente a la masa muscular, aumento de sed o disminución de la libido, mientras que los niveles bajos pueden indicar depresión, cansancio, dolor de músculos y articulaciones.

Estos efectos son estudiados a nivel celular, específicamente en la reacción acrosomal para determinar si el aumento de esta hormona en el organismo es indicador de infertilidad, ya que las implicaciones del aumento de esta hormona en el hombre afectan a la concentración del semen, además de su morfología, motilidad y su capacidad de llevar a cabo la reacción acrosomal.

Antecedentes:

La espermatogénesis es el proceso por el cual a partir de una espermatogonia se producen los espermatozoides, este proceso ocurre en las gónadas y tiene una duración aproximada de 62 a 75 días; La formación de los espermatozoides comienza con el desarrollo embrionario en el saco vitelino, desde este momento del desarrollo se producen alrededor de 100 células germinales que migran a los órganos genitales del feto.

El proceso de la espermatogénesis se inicia cuando se alcanza la pubertad y comienza cuando las células germinales de los túbulos seminíferos de los testículos se multiplican y se forman las espermatogonias, durante la madurez sexual las espermatogonias aumentan de tamaño y se inicia el proceso de meiosis I que dará a primer lugar 2

espermatozoides de segundo orden y después en la meiosis II se producen 4 espermátidas que ya cuentan con un pequeño flagelo, después de este proceso las espermátidas entrarán en la última etapa de formación que es la espermiogénesis en la cual la cola aumenta de tamaño y se forma el flagelo, además de que la cabeza del espermatozoides se hace puntiaguda y se forma el acrosoma; los espermatozoides maduros se liberan a los tubos seminíferos y en ese momento el espermatozoides ya está listo para ser eyaculado pero tendrá que pasar por un proceso de capacitación que normalmente se da en el tracto reproductivo femenino hasta que llega al óvulo para fecundarlo.

“La capacitación se lleva a cabo específicamente en el istmo y en los plegamientos oviductales en los cuales se retienen los espermatozoides y pierden proteínas y mucopolisacáridos para después ser liberados hacia el ámpula donde se llevará a cabo el proceso de reconocimiento y adherencia del espermatozoides al ovocito donde se llevará a cabo la reacción acrosomal para atravesar la zona pelúcida.”¹

La reacción acrosomal es un proceso especializado en el cual se liberan enzimas hidrolíticas que son requeridas para que el

1 (Olivera et al., 2021)

espermatozoide pueda penetrar en la zona pelúcida del ovocito para poder fecundarlo; para esto se necesitan de varios factores y moléculas que ayudaran al esperma a llegar el sitio del ovocito para fecundarlo, tal como el paso del calcio que es de suma importancia para que se lleve a cabo esta reacción.

Objetivo:

Analizar el tipo de efectos que tiene las diferentes concentraciones de hidrocortisona y progesterona en la reacción acrosomal.

Metodología:

Para procesar las muestras de semen se utilizaron los siguientes pasos ya estandarizados por la M. en C. Sheini Ruturi Sánchez González.²

5. Preparar la muestra

Mezclar aspirando la muestra 10 veces.
--

6. Desechar la pipeta

PARÁMETROS MACROSCÓPICOS

1. Determinar el color de la muestra

Se levanta el frasco hacia la luz. (blanco opalescente, café rojizo, amarillo).

2. Determinar el volumen de la muestra (pipeta serológica + automatizada)

3. Determinar la viscosidad de la muestra La hebra deberá de ser máximo de 2 cm.
--

4. Determinar el pH.

Se medirá colocando una gota con la punta de la pipeta dispensadora.
--

² M. en C. González S, (2021), Procesamiento de muestras de semen,22/06/2021.

SWIM UP (DURACIÓN: 1 HORA)

1. Tomar toda la muestra de semen (dejando 500 µl) y colocarlo en una gradilla dentro de un tubo Falcon a 45° de inclinación. Si es mucha muestra, se deberá repartir en dos tubos.

2. Agregar la misma cantidad de volumen de medio HAM's F-10 suplementado que de muestra. (Relación 1:1). El medio se debe añadir con cuidado de no romper las fases. De preferencia, añadirlo por las paredes del tubo.

3. El tubo se tapa dejando la rosca un poco floja y se lleva la gradilla a la incubadora.

4. **Incubar durante 1 hora.**

ANALIZAR LOS PARAMETROS MACROSCOPICOS Y DE MORFOLOGIA

5. Extraer la fase superior y colocarla en un tubo nuevo (**ésta es la muestra que sirve**). Se llamará **muestra post-swim**.

6. Colocar 10 µl de **muestra post-swim** en un portaobjetos con su correspondiente cubre. Se deberá hacer conteo de células motiles en un solo campo.

7. Dependiendo del número de espermatozoides, se realizará la dilución correspondiente en una pequeña charolita. Esto se realiza como un segundo filtro para ajustar la concentración de los espermatozoides que presentan un buen nado.

- < 101 = 1:20 (50 µl de **muestra post-swim** + 950 µl de fijativo)
- 16 – 100 = 1:5 (50 µl de **muestra post-swim** + 200 µl de fijativo)
- 2 – 15 = 1:2 (50 µl de **muestra post-swim** + 50 µl de fijativo) Esta dilución se colocará en la cámara de Neubauer.

8. Se cuentan 200 espermatozoides en filas.

Anotar cuántas filas se tuvieron que contar para completar los 200 espermatozoides. Si ya se comenzó una fila, se deberá terminar de contar.

9. Una vez que se han contado los espermatozoides, se deberá aplicar la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ de espermatozoides}}{\# \text{ de filas}} \times \frac{1}{20} \times \text{Factor de dilución} \times 1 \times 10^6 \times \text{ml obtenidos de la muestra}$$

El propósito es tener 1x10⁷ millones de espermatozoides por lo que se deberá aplicar la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

C1: # de espermatozoides obtenidos con la fórmula de arriba. **V1: Cantidad de ml de la muestra swim.**

C2: 1x10⁷

V2: ¿?

Únicamente, se agregará HAM's suplementado para completar el volumen que se requiere para el V2

10. Incubar durante 3 horas para capacitar.

INDUCCIÓN DE REACCIÓN ACROSOMAL

De ser necesario, ANTES DE REPARTIR LA MUESTRA, redondear el volumen con medio HAMS suplementado (si no se completa muestra para los 9 tubos).

11. Se deberá **repartir el total de la muestra** capacitada en 9 tubos para un volumen total de 1500 µl

Tubos	Hidrocortisona	Testosterona
Tubo 1	[0.1 µM]	[0.03 µM]
Tubo 2	[1 µM]	[0.1 µM]
Tubo 3	[5 µM]	[0.3 µM]
Tubo 4	[10 µM]	[0.5 µM]
Tubo 5	[15 µM]	[1 µM]
Tubo 6	[30 µM]	[3 µM]
Tubo 7	[100 µM]	[10 µM]
Control +	Pg	Pg
Control -	DMSO	--

1. Muestra + HAM's suplementado = Vol total.

2. Hacer cálculo de cuánto DMSO se puede agregar a cada tubo:

Vol total μl ---- 100% DMSO
 $x=?$ ---- 0.5% DMSO
 $x=\text{máximo que puedo poner de DMSO}$

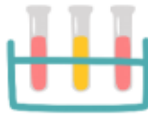
3. Hacer cálculos para cada tubo: $C_1V_1=C_2V_2$

C_1 : stocks

V_1 : agregar

C_2 : [] de los tubos

V_2 : vol total.



4. Control + (Pg): $(10 \text{ mM})(x=?)=(20 \mu\text{M})(\text{vol total})$.

5. Control - (DMSO): Lo máximo que se agregó de

- Inmovilidad

Se puede cambiar de campo hasta completar el conteo.

5. Determinar la **concentración** de espermatozoides.

Con el mismo portaobjetos del paso 1, se contarán el número de **espermatozoides en un solo campo (TODOS LOS ESPERMATOZOIDEOS QUE SE OBSERVEN)**.

6. Limpiar la cámara de Neubauer con alcohol al 70% y un kimwipes.

7. Humedecer la superficie de la cámara de Neubauer respirando en ella (ayuda a la capilaridad)

8. Colocar el cubreobjetos correspondiente.

9. Dependiendo del número de espermatozoides, se realizará la dilución correspondiente.

- $< 101 = 1:20$ (50 μl de muestra (ORIGINAL) + 950 μl de fijativo)

- $16 - 100 = 1:5$ (50 μl de muestra (ORIGINAL) + 200 μl de fijativo)
- $2 - 15 = 1:2$ (50 μl de muestra (ORIGINAL) + 50 μl de fijativo)

10. Resuspender con la pipeta mínimo 10 veces.

11. Aspirar y colocar 10 μl de la dilución colocada anteriormente en la charolita en la cámara de Neubauer.

12. Observar al microscopio en 40x y contar 200 espermatozoides en filas. Anotar cuántas filas se tuvieron que contar para completar los 200 espermatozoides. Si ya se comenzó una fila, se deberá terminar de contar.

12. Colocar los tubos eppendorf en la incubadora durante 30 minutos.

13. Agregar 100 μl de metanol a todos los tubos. Este volumen se agrega para el mililitro de muestra que se tenía.

14. Centrifugar a 3500 rpm durante 4 minutos.

15. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 400 ml de PBS.

17. Rotular los portaobjetos necesarios.

18. Colocar 50 μl en cada portaobjeto y extender la muestra con ayuda de un cubreobjetos.

19. Incubar en la tinción de Azul de Coomassie durante 2 minutos.

20. Eliminar exceso con agua por la parte de atrás del portaobjetos y dejar secar.

PARÁMETROS MICROSCÓPICOS

1. Determinar **motilidad**

Colocar 10 μl de **muestra original** en el centro de un portaobjetos.

2. Colocar su cubreobjetos correspondiente (22mm x 22mm)

3. Trasladar el portaobjetos al microscopio.

4. Determinar el tipo de motilidad en 200 espermatozoides conforme se van observando, se va anotando el tipo de movilidad:

- Motilidad progresiva
- Motilidad no progresiva

Parámetros de calidad del semen. Referencias de la Organización Mundial de la Salud

Volumen	$\geq 1.5 \text{ ml}$
pH	≥ 7.2
Concentración espermática	$\geq 15 \text{ millones/ml}$
Conteo total de espermatozoides	$\geq 39 \text{ millones}$
Motilidad total	$\geq 40\%$
Motilidad progresiva	$\geq 32\%$
Vitalidad	$\geq 58\%$
Morfología normal	$\geq 4\%$
Leucocitos	$< 1.0 \times 10^6/\text{ml}$

MORFOLOGÍA

1. Se colocan 20 μl de la **muestra original** en una orilla para hacer un frotis.
2. Arrastrar la gota de muestra sobre el portaobjetos con ayuda de uncubreobjetos en un ángulo de 45° .
3. Esperar a que se seque.
4. Agitar las siguientes soluciones: metanol, eosina y hematoxilina.
5. Sumergir el portaobjetos en metanol durante 15 segundos para fijar la muestra.
6. Sumergir el portaobjetos en eosina durante 10 segundos.
7. Sumergir el portaobjetos en hematoxilina durante 5 segundos.
8. Eliminar el exceso de tinción con un chorro de agua.
9. Dejar secar a temperatura ambiente.

Resultados:

Parámetros Macroscópicos:

Color: Blanco Opalescente.

Volumen: 0.8 ml

Viscosidad: normal

pH: 8

SWIM UP:

Se tomó toda la muestra y se dejaron 500 microlitros, la muestra se colocó en un tubo Falcon a 45° de inclinación en una gradilla para agregarle 800 μl de medio HAM's suplementado antes preparado y se colocó pegado al tubo para no romper las fases, el tubo se tapa y se le deja la tapa floja para después colocarla en la incubadora durante una hora.

Parámetros Microscópicos:

Se colocó 10 μl de la muestra en un portaobjetos para hacer un frotis y determinar su movilidad

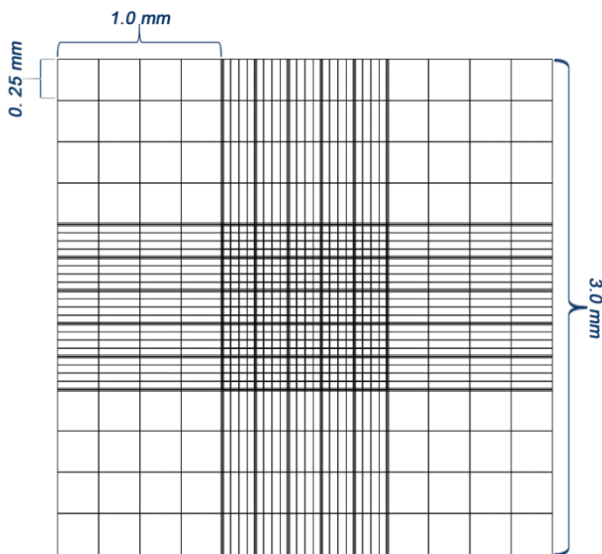
MOTILIDAD		
MP (Motilidad progresiva)	MNP (Motilidad NO progresiva)	I (Inmóviles)
59%	11.5%	28.5%

Después se colocaron otros 10 μl en la cámara de Neubauer para determinar la concentración espermática de la muestra original y se contaron 402 espermatozoides en un solo campo, con esto pudimos determinar la relación que teníamos que usar para preparar la muestra con fijativo.

Después de preparar nuestra solución con 50 μl de muestra y 950 μl de fijativo se colocó 10 μl de la solución ya preparada en la cámara de Neubauer para llevarla al microscopio en 40x para contar 200 espermatozoides.

Para hacer el conteo se empieza desde el punto señalado y se cuenta por filas, una vez que se empieza a contar la fila se acaba de contar, aunque ya hayamos completado el conteo de 200, en este caso en la primera fila se contaron 402 espermatozoides.

El siguiente paso fue usar la siguiente fórmula para calcular la concentración total de los espermatozoides



$$\frac{402}{1} \times \frac{1}{20} \times \frac{20}{1} \times 1 \times 10^6$$

= 402,875,000 millones de espermias en 1ml

$$402,875,000 \times 800 \mu l$$

= 321,600,000 millones de espermias en .8ml

En la parte de la metodología del documento podemos ver las referencias en parámetros de calidad de semen según la OMS.

Morfología:

Se colocaron 20 μl de la muestra original en un porta objetos para hacer un frotis, se espera a que se seque y después de agita en las siguientes soluciones :

Hay que tener en cuenta y fijarse para que lado del portaobjetos se tiene la muestra ya que hay que limpiar la parte de atrás del portaobjetos para quitarle el exceso de solución.

SOLUCION	TIEMPO
Metanol	15 segundos
Eosina	10 segundos
Hematoxilina	5 segundos

Se deja secar a temperatura ambiente y se rotula para después verla en el microscopio.

POST-SWIM UP:

Ya pasada la hora se saca a gradilla de la incubadora con la muestra y se extrae con mucho cuidado la fase superior, esto para tener los espermias con mayor motilidad y trabajar con ellos en este caso se extrajeron 600 μl .

Se coloca en un portaobjetos 10 μl de la muestra post-swim up con su cubreobjetos y se hace el conteo de las células motiles en un solo campo, en este caso se contaron 77 lo cual nos indica que usaremos la relación 1:5 con 50 μl de muestra post-swim up y 200 μl de fijativo.

A esta solución se le retiran 10 μl para hacer el conteo por filas en la cámara de Neubauer , una vez que se empieza a contar la fila se acaba de contar, aunque ya hayamos completado el conteo de 200, en este caso se contaron 327 espermias en dos filas ya que en la primera fila

no se alcanzaron a contar los 200, después de esto se repite la fórmula con el nuevo conteo para saber cuántos espermias tienen motilidad progresiva.

$$\frac{327}{2} \times \frac{1}{20} \times \frac{5}{1} \times 1 \times 10^6$$

$$= 40,875,000 \text{ millones de espermias con MP}$$

Después de esto se aplica la siguiente fórmula para conocer el volumen que se necesitara de medio HAM's suplementado para ir llenando los tubos Falcon pequeños, los cuales irán rotulados para ponerles diferentes concentraciones de la hormona indicada, en este caso se hizo con Hidrocortisona y con Progesterona.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$\frac{(40,875,000)(600\mu\text{l})}{1 \times 10^7} = V_2$$

$$V_2 = 2452.5\mu\text{l} - 600\mu\text{l}$$

$$= 1852.5\mu\text{l de medio HAM's suplementado}$$

$$\frac{2452.5\mu\text{l}}{16} = 153.125\mu\text{l de muestra post}$$

– swim up para cada tubo

Se agregaron el volumen correspondiente a los tubos ya rotulados con sus diferentes concentraciones de hormona que vienen en el recuadro de la metodología; después de esto

se deja capacitar la muestra durante 3 horas en la incubadora.

Pasadas las 3 horas se sacaron los tubos y se quitó el sobrenadante para después agregarle 100µl de metanol y llevarlo a centrifugar por 4 minutos a 3500 rpm.

Cuando sacamos los tubos pudimos observar cómo se formaba un pequeño pellet en la parte de abajo, de nuevo se retiró el sobrenadante y se resuspende en 400µl de PBS, se rotulan 18 portaobjetos para cada tubo.

Se hizo un frotis de cada concentración y de los 2 controles para después dejarlos secar y teñirlos en Azul de Coomasie durante 2 minutos; se dejó secar y después se guardaron para observarlos en el microscopio.

Fotos del procedimiento:

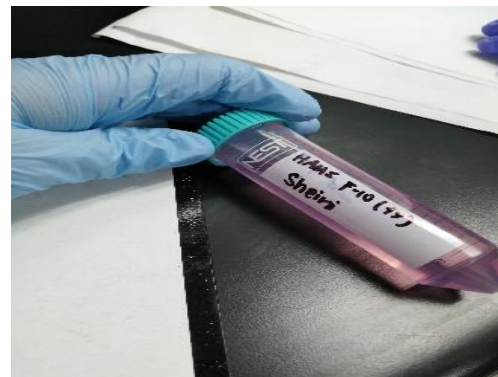


Foto 1 Preparación de medio HAMMS suplementado.



Foto 2 Separación de fases después del Post-Swim Up.



Foto 5 Secado de láminas en placa calefactora para después sumergirla en la tinción Azul de Coomasie



Foto 3 Aplicación de hormonas en los tubos Eppendorf.

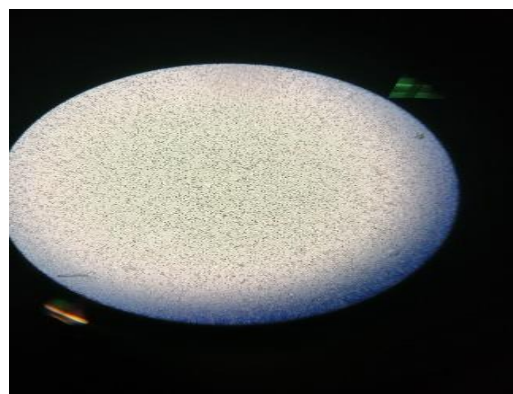


Foto 6 Vista de muestra de espermatozoides original para el primer conteo.



Foto 4 Rotulado de placas después de sumergirlas en la tinción de Azul de

Discusión:

Observamos que al principio se inducía la reacción acrosomal a bajas y a medias concentraciones, pero con la recolección de más pruebas, nos dimos cuenta que a bajas concentraciones de Hidrocortisona sí se inducía la RA y con el aumento de estas concentraciones va disminuyendo la inducción de la RA, se observó también que la

testosterona y la progesterona también indujeron la RA, hubo cierta polémica con otros investigadores que aseguraban que estas hormonas no inducían la RA, pero las pruebas que llevamos a cabo indican lo contrario.

Este estudio nos aportó información valiosa para saber si las altas concentraciones en hombres son indicadores de infertilidad y en este caso podemos ver que a concentraciones bajas provoca que la RA se lleve a cabo antes de tiempo; a concentraciones altas podemos ver que no se induce la RA.

Conclusiones:

Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Reproducción.
Sheini Ruturí Sánchez González. JUNIO 2021.

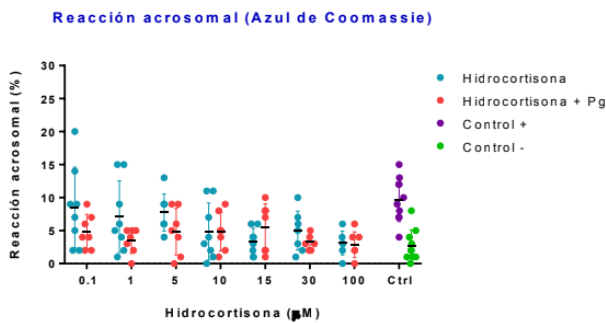
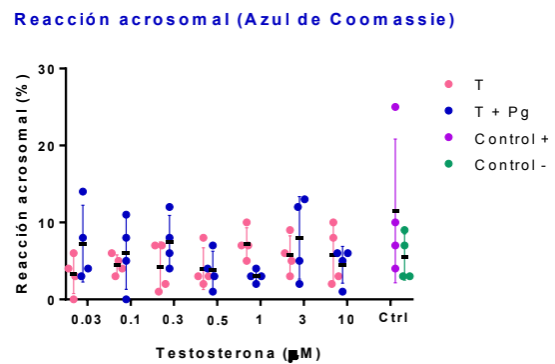


Figura 9: Gráfica de puntos de reacción acrosomal por hidrocortisona (n=11).

Podemos observar que en los resultados representados en la gráfica que a partir de la concentración de 10 µM de Hidrocortisona se ve una disminución de la RA inducida, esto confirma

que a bajas concentraciones de Hidrocortisona se induce la RA, también se observa una disminución significativa al incubar los espermias con progesterona e hidrocortisona, con esto se confirma que la liberación de progesterona en el tracto genital femenino puede inducir la RA con pequeñas cantidades de Hidrocortisona

Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Reproducción.
Sheini Ruturí Sánchez González. JUNIO 2021.



Porcentajes de reacción acrosomal (n=4).

En esta otra grafica podemos observar como la testosterona si induce la RA pero en bajos niveles (puntos rosas), podemos ver como en las concentraciones bajas de 0.03 µM a 0.3 µM hay un incremento de inducción de la RA que a diferencia de las concentraciones más altas esta va en decremento (puntos azules), esto nos indica que la testosterona si induce la RA pero a niveles bajos (entre 7%-10%), y a altas concentraciones va en decremento el porcentaje de inducción; podemos deducir que la Testosterona no induce la RA a gran escala como la Hidrocortisona ya que esta mostro más inducción a concentraciones bajas.

Bibliografía:

- *ESPERMATOGÉNESIS. (n.d.).*
<http://www.edu.xunta.gal/centros/ieschapela/gl/system/files/ESPERMATOG%C3%89NESIS.pdf>
- *Reproducción Asistida ORG. (2018, September 7). Reproducción Asistida ORG. Reproducción Asistida ORG.*
<https://www.reproduccionasistida.org/espermatogenesis/>
- *Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2021). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 19(4), 426–436. https://doi.org/*
- *La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. Revista Internacional de Andrología, 5(4), 368–373 | 10.1016/S1698-031X(07)74086-4. (2021).*
- *M. en C. González S, (2021), Procesamiento de muestras de semen, fecha de consulta:22/06/2021, file:///C:/Users/salva/Downloads/Procesamiento%20de%20muestras_Sheini%20S%C3%A1nchez%20.pdf*
- *M. en C. González S, (2021), Procesamiento de muestras de semen, fecha de consulta:20/07/2021, file:///C:/Users/salva/Downloads/Resultados_SGG.pdf*
- *M. en C. González S, (2021), Procesamiento de muestras de semen, fecha de consulta:15/08/2021, file:///C:/Users/salva/Downloads/Azul%20de%20Coomassie_Hidrocorona_Sheini%20S%C3%A1nchez%20(1).pdf*
- *M. en C. González S, (2021), Procesamiento de muestras de semen, fecha de consulta:15/08/2021, file:///C:/Users/salva/Downloads/Azul%20de%20Coomassie_Testosterona_Sheini%20S%C3%A1nchez%20(1).pdf*
- *Hormona cortisol. (2021). Fisioterapia-Online.com. https://www.fisioterapia-online.com/glosario/hormona-cortisol*
- *El espermatozoide: cómo se forma y desarrolla. (2017). Natalben. https://www.natalben.com/espermatozoide*
- *Cardona-Maya, W. D., & Cadavid, A. P. (2021). Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. Actas Urológicas Españolas, 29(7), 676–684. https://doi.org/*
- *El estrés puede perjudicar la fertilidad masculina - MiradorSalud. (2014, June 10). MiradorSalud. https://miradorsalud.com/el-estres-puede-perjudicar-la-fertilidad-masculina/*

El cortisol afecta al espermatozoide durante su viaje por el tracto genital femenino.

Asesoras: Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie
anatusie@gmail.com

Mtra. Sheini Ruturi Sánchez González
sheiniruturi_006@hotmail.com

Autora: Solís Reséndiz Paula Noemí
Exp: 268451
psolis03@alumnos.uaq.mx
Facultad de Ingeniería de la Universidad
Autónoma de Querétaro
Ingeniería Biomédica de la UAQ

ABSTRACT

Cortisol is a steroid hormone that controls various physiological functions such as metabolic, immune and stress responses, however its functions are well known but very few studies have conducted formal research on the effect of cortisol on the acrosomal reaction. The objective of this research was to determine the effect of different concentrations of cortisol on the acrosomal reaction of human sperm. men aged 18-45 years who met the sperm quality parameters according to were included. Macroscopic, microscopic and morphological parameters were determined. Afterwards, the percentages of spontaneous and induced acrosomal reactions were determined with the Coomassie Blue technique. Our results indicate that at low concentrations of hydrocortisone, the percentage of spontaneous acrosomal reaction rises and as the concentration increases, the percentage of acrosomal reaction is lower. On the other hand, the percentages

of induced acrosomal reaction decreased regardless of the concentration of hydrocortisone used.

Key words: Acrosomal reaction, hydrocortisone, cortisol, spermatozoa.

RESUMEN

El cortisol es una hormona esteroidea que controla diversas funciones fisiológicas como respuestas metabólicas, inmunes y de estrés, sin embargo, son sumamente conocidas sus funciones, pero muy pocos estudios han realizado una investigación formal sobre el efecto del cortisol sobre la reacción acrosomal. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de diferentes concentraciones de cortisol sobre la reacción acrosomal del espermatozoide humano. Se incluyeron hombres de 18-45 años que cumplieran con los parámetros de calidad espermática de acuerdo con la OMS. Se determinaron parámetros macroscópicos, microscópicos y morfológicos. Después, se determinaron los porcentajes de reacción acrosomal espontánea e inducida con la técnica de Azul de Coomassie. Nuestros resultados indican que, a bajas concentraciones de hidrocortisona, el porcentaje de reacción acrosomal espontánea se eleva y a medida que la concentración aumenta, el porcentaje de reacción acrosomal es menor. Por otra parte, los porcentajes de reacción acrosomal inducida, disminuyeron independientemente de la concentración de hidrocortisona empleada.

Palabras claves: Reacción acrosomal, hidrocortisona, cortisol, espermatozoide.

INTRODUCCIÓN

Todos y cada uno de nosotros secretamos cortisol, la cual es una de las varias hormonas esteroideas

producida por las glándulas suprarrenales tanto en hombres como en mujeres (M. P., 2020).

Cada cuerpo humano es diferente y de igual manera se expone a diversas situaciones por lo cual el cortisol se secreta en diferentes cantidades, como en un estudio que llevó a cabo la Universidad de Oviedo en donde se comprobó que el estrés es un gran detonador de esta hormona (De La Banda, G. G., Abascal, M. Á. M., Riesco, M., & Pérez, G., 2004) En esta investigación se empleó el cortisol sintético (hidrocortisona) para analizar los efectos que tienen diferentes concentraciones sobre el espermatozoide humano.

Tenemos que hacer énfasis en que la pregunta importante no radica en a que se debe esa cantidad excedente de cortisol en nuestro cuerpo sino más bien en cómo esas diferentes concentraciones de cortisol afectan al espermatozoide cuando éste trata de fecundar al óvulo, puesto que

Muchas veces damos por hecho de que, por tener relaciones sexuales, como consecuencia se va a dar un embarazo. Sin embargo, diversas investigaciones han reportado que cuando existen grandes cantidades de cortisol tanto en el hombre como en la mujer, el espermatozoide podría tener algunas dificultades. Por ejemplo, podría afectar procesos como la capacitación o la reacción acrosomal. como por ejemplo si se da la reacción acrosomal, que se lleve a cabo de manera temprana o en dado caso no se lleve a cabo, en este momento debemos de pensar en que sin que se lleve a cabo la reacción acrosomal en el momento indicado el espermatozoide soltara las enzimas hidrolíticas y se podría decir que ese espermatozoide no tiene forma de fecundar puesto que ya soltó su herramienta más indispensable.

Por dichas razones radica la importancia de la presente investigación para comprender mejor que existen diversos factores que pueden afectar al espermatozoide.

OBJETIVOS

- Determinar los efectos de diferentes concentraciones de hidrocortisona sobre la reacción acrosomal del espermatozoide humano.

METODOLOGÍA

Dicha parte se explicará de acuerdo con los horarios aproximados en los cuales nos basamos para la realización de las pruebas.

1. 8:00 am → Licuefacción de la muestra: Se introdujo la muestra durante 30 min en el horno de secado a 37.5°C para mantener la temperatura corporal. Durante este proceso, la muestra se vuelve más líquida la muestra puesto que en algunos casos es más espesa lo cual dificulta la manejabilidad para elaborar los diferentes procedimientos.
2. 8:30 am - 9:30 am → Swim up: Se sacó la muestra del horno y se depositó en el fondo de un tubo Falcon (sin contacto con las paredes) el cual se colocó en una gradilla a 45° de inclinación. Únicamente se apartaron 500 µl de la muestra original para la determinación de los parámetros macroscópicos los cuales se muestran en la siguiente tabla:

PARÁMETRO	LÍMITE DE REFERENCIA	ANOMALÍA
Aspecto (color)	Normal (blanco opalescente)	Translúcido, rojizo, rosado, etc.
Volumen	1.5 ml < volumen < 6 ml	1.5 ml > volumen > 6 ml ó ausencia
Viscosidad	Normal	Alta
pH	pH > 7.1	pH < 7.1

Tabla 1: Parámetros macroscópicos y sus valores de referencia (*World Health Organization, 2010*).

Dichos parámetros se determinaron de la siguiente forma:

- **Color:** Colocando la muestra frente a la luz, se clasificó entre blanco opalescente, café rojizo y amarillo).
- **Volumen:** Con ayuda de una pipeta serológica o automatizada (dependiendo de la muestra se decide con cual trabajar para este rubro) se determinó el volumen.
- **Viscosidad:** Se determina mediante la longitud de la hebra que se forme. Si una muestra es viscosa, la hebra es mayor de 2 cm. De lo contrario (si es menor de 2 cm), se clasifica como viscosidad normal.
- **pH:** Colocando la muestra original en tiras reactivas de pH.

Después se agregó la misma cantidad de volumen de medio HAM'S F-10 suplementado (BSA + HAM's F-10); es decir, en relación 1:1. Dicho medio se añadió suavemente por las paredes del tubo para impedir la ruptura de las fases. Posteriormente, se introdujo en la incubadora durante una hora.

3. 9:30 am - 10:30 am → Determinación de los parámetros microscópicos:

PARÁMETRO	LÍMITE DE REFERENCIA	ANOMALÍA
Concentración	15 millones/ml < concentración	15 millones/ml > concentración
Movilidad progresiva	MP > 32%	MP < 32%
Morfología	Normales > 4%	Normales < 4%

Tabla 2: Parámetros microscópicos y sus valores de referencia (*World Health Organization, 2010*).

La determinación de estos parámetros se evaluó de la siguiente manera:

- **Motilidad:** Se colocaron 10 µl de muestra original (de los 500 µl que se separaron) en el centro de un portaobjetos, se colocó un

cubreobjetos y se observó al microscopio en 40x.

- **Tipo de motilidad:** En 200 espermatozoides conforme se fueron observando se clasificaron de acuerdo al tipo de movilidad: (motilidad progresiva “MP”, motilidad no progresiva “MNP”, inmovilidad “I”).
- **Concentración espermática:** Con el mismo portaobjetos utilizado previamente se realizó un conteo en un solo campo de todos los espermatozoides que se observaron sin importar su tipo de motilidad. Dependiendo del número de espermatozoides se realizó la dilución correspondiente.

< 101 = Dil 1:20 (50 µl de muestra original + 950 µl de fijativo)

16-100 = Dil 1:5 (50 µl de muestra original + 200 µl de fijativo)

2-15 = Dil 1:2 (50 µl de muestra original + 50 µl de fijativo).

Después se limpió la cámara de Neubauer, se colocó su cubreobjetos y se añadieron 10 µl de la dilución previamente preparada en la cámara de Neubauer (Fig. 1).



Fig. 1 Colocación de dilución en cámara de Neubauer.

Posteriormente, se observó en el microscopio con el objetivo de 40x y se contaron 200 espermatozoides en filas. Aunque se completaran los 200 espermatozoides, forzosamente se terminó de contar la fila que se empezó. Con estos datos, se calculó la concentración espermática y el total de espermatozoides según la siguiente ecuación:

$$(1) \frac{\# \text{ de espermatozoides}}{\# \text{ de filas}} \times \frac{1}{20} \times \text{Factor de dilución} \times 1 \times 10^6 \times \text{ml muestra}$$

Finalmente, para determinar los parámetros morfológicos se realizó lo siguiente:

- Se colocaron 20 µl de la muestra original en un portaobjetos y se realizó un frotis.
 - Se sumergió el portaobjetos en las siguientes soluciones:
 - Metanol durante 15 segundos.
 - Eosina durante 10 segundos.
 - Hematoxilina durante 5 segundos.
 - Se dejó secar a temperatura ambiente para observarse en el microscopio a 100x.
4. 10:30 am - 12:30 pm → La muestra se sacó de la incubadora y se extrajo la fase superior la cual se colocó en un tubo nuevo. Esta muestra se llamó muestra post-swim.

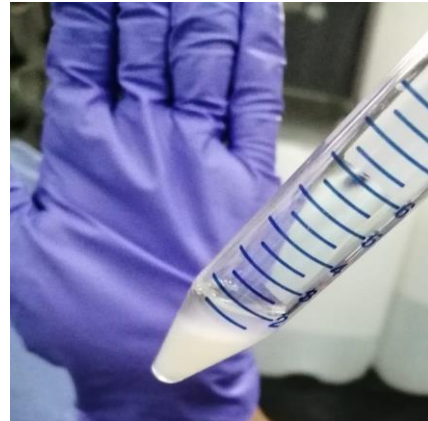


Fig. 2 Fases formadas en el swim up

Se realizó el mismo procedimiento que con la concentración de espermatozoides, lo único que varió fue la fórmula empleada, la cual es:

(2)

$$\frac{\# \text{ de espermatozoides}}{\# \text{ de filas}} \times \frac{1}{20} \times \text{Factor de dilución} \times 1 \times 10^6$$

Después se empleó la ecuación:

(3)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Con dicha ecuación 3 obtenemos la cantidad de HAM's suplementado para completar el V_2 .

5. 12:30 pm - 15:30 pm → Incubación durante 3 horas para capacitar.
6. 15:30 pm - 16:30 pm → Se repartió el total de la muestra capacitada en 16 tubos de los cuales 7 se emplearon para observar reacción acrosomal espontánea (sin progesterona), 7 para reacción acrosomal inducida (con progesterona) y 2 controles (positivo: progesterona y negativo: DMSO). En cada tubo se añadió medio HAM's suplementado para obtener un volumen final de 1500 µl. Finalmente, se agregaron los distintos volúmenes de hidrocortisona como se muestra en la Tabla 3.

Tubos	Hidro cortisona
Tubo 1	[0.1 μ M]
Tubo 2	[1 μ M]
Tubo 3	[5 μ M]
Tubo 4	[10 μ M]
Tubo 5	[15 μ M]
Tubo 6	[30 μ M]
Tubo 7	[100 μ M]
Control +	Pg
Control -	DMSO

Tabla 3: Elaboración de asesora Mtra. Sheini en el protocolo de investigación.

Se incubaron los diferentes tubos durante 30 minutos para hacer inducción de la reacción acrosomal, se centrifugó a 3500 rpm durante 4 minutos, se eliminó el sobrenadante y cada tubo se resuspendió en 400 μ l de PBS.

Posteriormente, se colocaron 50 μ l de cada tubo en un portaobjetos extendiendo la muestra con ayuda de un cubreobjetos.

Para finalizar, se incubó con el colorante Azul de Coomassie durante 2 minutos y se dejó secar.

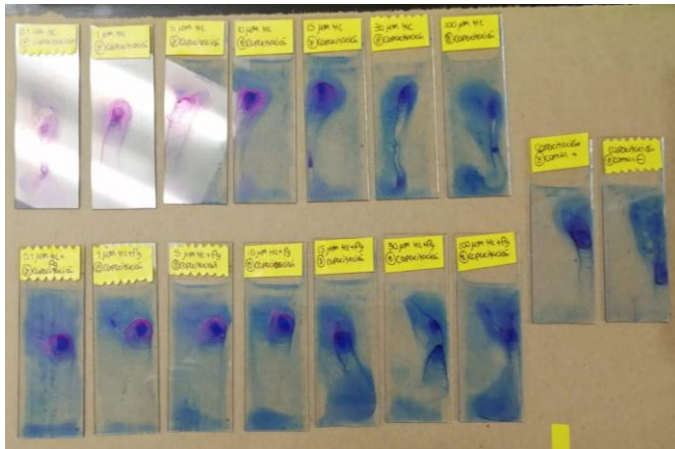


Fig. 3 Placas con Azul de Coomassie

Se observa que las 7 placas superiores con las 7 diferentes concentraciones de hidrocortisona sin progesterona (reacción espontánea), las 7 placas

inferiores son las mismas concentraciones que las placas superiores solo que ahora se agregó progesterona (inductor de la reacción acrosomal, es decir, reacción no espontánea). Placas teñidas con Azul de Coomassie. En la fila superior (reacción acrosomal espontánea) e inferior (reacción acrosomal inducida) se observan los frotis con las diferentes concentraciones de hidrocortisona.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

● Parámetros Macroscópicos

1. Color: Blanco opalescente
2. Volumen: 800 μ l
3. Viscosidad: Normal
4. pH: 8

Con respecto a los resultados, el color, la viscosidad y el pH se encuentran dentro de los parámetros de calidad tal y como se puede apreciar en la Tabla 1. Sin embargo, el volumen presentado fue menor de acuerdo con la OMS ya que los parámetros deseados van de 1.5 a 6 ml.

● Parámetros Microscópicos

1. Motilidad:
 - a) Motilidad Progresiva: 59 %
 - b) Motilidad No Progresiva: 11.5 %
 - c) Inmovilidad: 29.5 %



Fig. 4 Conteo de Espermatozoides

Los resultados obtenidos en el rubro de motilidad son óptimos con respecto a la Tabla 2.

2. Concentración de espermatozoides:

En un solo campo se obtuvo un conteo de 592 espermatozoides a lo cual le correspondió una dilución de 1:20. Con respecto al conteo de espermatozoides en la cámara de Neubauer se obtuvieron 402 en una sola fila. Las cálculos realizados según la ecuación 1 muestran que la muestra de 800 μ l tuvo una concentración espermática total de 321,600,000 dentro de los parámetros deseados (Tabla 2) . En este caso, la concentración espermática estimada para un mililitro de dicha muestra sería de 402,000,000.

● **Parámetros Morfológicos**

Se observó que más del 4% de los espermatozoides analizados en la muestra presentaron una morfología normal(World Health Organization, 2010).

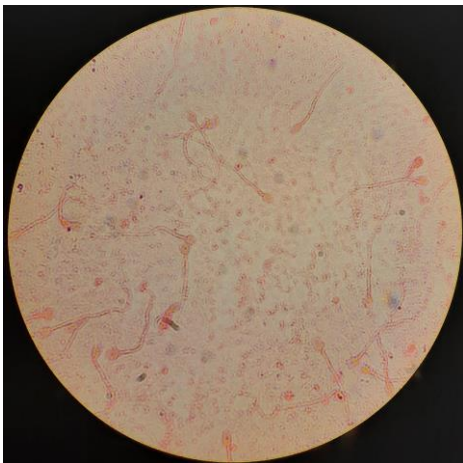


Fig. 5 Morfología

● **Reacción Acrosomal**

En la Figura 6 se puede apreciar un espermatozoide reaccionado en la parte superior el cual presenta una coloración blanca de la mitad de la cabeza hacia la parte anterior de la misma. En el espermatozoide

inferior se puede observar un espermatozoide que no sufrió reacción acrosomal puesto que la cabeza tiene una coloración completamente azul.

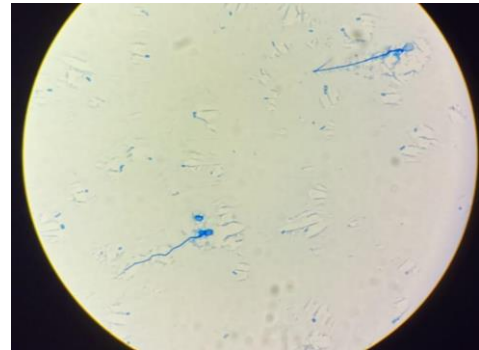


Fig. 6 Reacción Acrosomal con Azul de Coomassie

Una vez revisadas las placas se obtuvieron los datos presentados en la Fig. 7. Tomando como punto de referencia el control positivo, se observó que existe un elevado porcentaje de reacción acrosomal en aquellas muestras que fueron incubadas únicamente con hidrocortisona a bajas concentraciones (0.1 μ M, 1 μ M, 5 μ M), mientras que las 4 concentraciones mayores (10, 15, 30 y 100 μ M) provocan una disminución en los porcentajes de reacción acrosomal los cuales van desde el 12% hasta el 6%. Finalmente, haciendo una comparación de las muestras con y sin progesterona, se puede observar en la Fig. 7 que se reduce el porcentaje de reacción acrosomal en la gran mayoría de las 7 diferentes concentraciones empleadas.

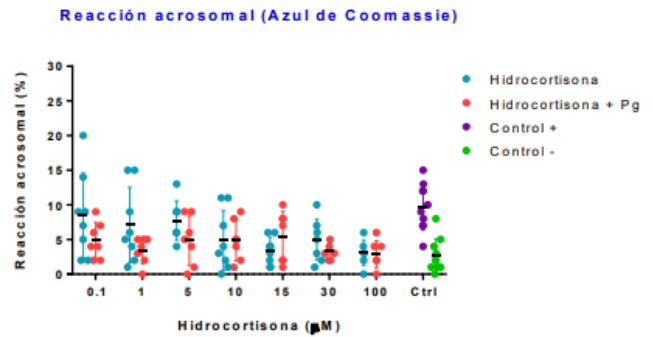


Fig. 7 Gráfica de reacción acrosomal con hidrocortisona, procesadas con azul de coomassie.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La reacción acrosomal se lleva a cabo en concentraciones bajas de hidrocortisona sin progesterona, es decir, el espermatozoide tiene una alta probabilidad que el espermatozoide pueda fecundar el óvulo (el espermatozoide pueda penetrar la zona pelúcida) a través de la liberación de enzimas hidrolíticas, sin embargo conforme se van incrementando las concentraciones de hidrocortisona disminuye ese porcentaje, pero al momento de agregarle progesterona a las diferentes concentraciones, éstas bajan casi en la totalidad de las placas expuestas a ella, lo cual quiere decir que ambas hormonas (progesterona e hidrocortisona) comparten algún sitio de unión en común y de igual manera que cuando hay cortisol, la progesterona al parecer ya no se une con tanta afinidad al receptor. Es decir, hay una competencia entre las hormonas. Por esta razón al momento de agregar progesterona la reacción acrosomal no aumenta si no que ocurre lo contrario.

Lo cual nos indica que una mujer que está expuesta a diferentes circunstancias de estrés que detonen la producción de cortisol en el cuerpo resultará más complicado que el espermatozoide logre fecundar el óvulo debido a tan bajo porcentaje de espermatozoides que indujeron la reacción acrosomal.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primera instancia a la Mtra. Sheini Ruturi Sánchez González por ser mi asesora puesto que gracias a ella logré comprender todos los factores que implica una investigación formal y por tener la dedicación que todo profesor debe de tener para transmitir todo ese conocimiento que posee a sus estudiantes. En segunda instancia a todos los diferentes donadores puesto que, gracias a ellos, esta

investigación avanzó de manera significativa y se obtuvieron resultados muy interesantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

World Health Organization. «WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen» Cambridge: Cambridge University. fifth Edition (2010).

De La Banda, G. G., Abascal, M. Á. M., Riesco, M., & Pérez, G. (2004). La respuesta de cortisol ante un examen y su relación con otros acontecimientos estresantes y con algunas características de personalidad. *Psicothema*, 16(2), 294-298.

Aguilar Cordero, M. J., Sánchez López, A. M., Mur Villar, N., García García, I., López, R., Ortegón Piñero, A., & Cortés Castell, E. (2014). Cortisol salival como indicador de estrés fisiológico en niños y adultos: revisión sistemática. *Nutrición hospitalaria*, 29(5), 960-968.

M.P. (2020, 24 febrero). *Prueba de cortisol*. Medline Plus.

EFEECTO DE LA HIDROCORTISONA SOBRE LA REACCIÓN ACROSOMAL DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO

VERANO DE LA CIENCIA 2021
DRA. ANA ALICIA SÁNCHEZ TUSIE
M. EN C. SHEINI RUTURI SÁNCHEZ GONZÁLEZ
RAÚL EMILIO VARGAS PEÑA

Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la
Reproducción de la Facultad de Medicina de la UAQ

Resumen

El estrés es una respuesta por parte de nuestro cuerpo ante situaciones demandantes o amenazantes, y libera adrenalina y cortisol entre otras cosas. El estrés crónico es más común de lo que uno cree, según la Asociación de Especialistas en Prevención y Salud Laboral las causas más comunes del estrés son: cambios grandes en la vida, trabajo, escuela, relaciones, problemas financieros, estar demasiado ocupado, niños y familia, preocupación crónica, pesimismo, perfeccionismo/expectativas surrealistas, pensamiento rígido, actitud de todo o nada.⁵

Esto de por sí, afecta nuestra fertilidad debido a que todos poseemos diferentes niveles de estrés y afrontamos diversas situaciones a lo largo de nuestros días.

Además, estos últimos meses debido a la pandemia por SARS-CoV-2 hemos tenido que cambiar nuestra manera de vivir, de manera radical, el contacto social ha disminuido, los lugares públicos limitados, las interacciones interpersonales son diferentes.

Por lo que el estrés, la depresión, la ansiedad y la preocupación han incrementado de manera

exponencial en los habitantes del mundo. Y a causa de esto, nuestros cuerpos han funcionado de manera diferente debido al radical cambio de vida que tuvimos que llevar a cabo.

El cortisol es una hormona esteroidea que se libera como respuesta al estrés y a un nivel bajo de glucocorticoides en la sangre. Y debido a lo antes mencionado, estamos sometidos a un estrés más constante y mas

impactante por lo que estos niveles también incrementan.¹

Y es eso lo que analizaremos, de qué manera afecta el cortisol en uno de los campos más importantes de cualquier ser vivo, la reproducción, específicamente, como se ve afectada la reacción acrosomal en los espermatozoides humanos.

Introducción

La reacción acrosomal es un proceso especializado de fusión de la membrana citoplasmática con la membrana acrosomal externa en la zona apical de la cabeza del espermatozoide, originando la liberación de enzimas que se encuentran en el acrosoma y la exposición de la membrana acrosomal interna. La importancia de esta reacción radica en la liberación de enzimas hidrolíticas que son necesarias para que el espermatozoide pueda atravesar la zona pelúcida.³

Para que esto pueda suceder, el espermatozoide debe de pasar por un proceso de capacitación, que se da durante el paso del mismo a través del tracto reproductor femenino, para así poder adquirir la capacidad de fecundar un óvulo.

Ahora bien, estos procesos se ven afectados debido a los niveles hormonales del entorno en el que se encuentran, en este caso, el cuerpo femenino, y como mencionamos, el punto principal es el conocer los efectos del cortisol sobre este proceso.

El cortisol es una hormona también conocida como “la hormona del estrés”, debido a que su liberación depende del estrés presentado en una persona, como

respuesta de las glándulas suprarrenales, y en algunos casos, cuando esta hormona se encuentra en grandes cantidades se deriva una alteración endocrina conocida como “hipercortisolismo”, que produce efectos negativos en las funciones de cada una de las células de nuestro cuerpo.1

Las funciones primarias del cortisol intervienen en el metabolismo, niveles de inflamación del cuerpo, presión sanguínea, niveles de azúcar en sangre, ciclo de sueño, equilibra los minerales en tu cuerpo (especialmente el sodio), reproducción, memoria y concentración.

Antecedentes

Un alto nivel de cortisol puede ocasionar disfunción eréctil, así como interrupciones en el ciclo ovulatorio y menstrual. Las hormonas sexuales se producen en las mismas glándulas que el cortisol, por lo que el exceso de este puede hacer que sea difícil la producción de hormonas sexuales y en ciertos casos provocar infertilidad.1

Además, el estrés y ansiedad pueden provocar una disminución en la ovulación hasta un 20% menos y las posibilidades de que sus óvulos sean fecundados disminuye en un 30%. Y en caso de que un óvulo sea fecundado, deben mantenerse buenos niveles de estrógeno y progesterona para que se dé la implantación y el embarazo pueda continuar de manera correcta y natural.

Ahora bien, la reacción acrosomal se ve inducida por la progesterona, hormona que se concentra en el fluido folicular preovulatorio y así, al momento de ovular se liberan altas concentraciones del mismo hacia las trompas de Falopio, lo cual inducirá una reacción acrosomal en los espermatozoides para poder asegurar una fecundación exitosa. 3

Sin embargo, esta reacción no puede llevarse a cabo si el espermatozoide no ha pasado por el proceso de

capacitación, es un proceso que consiste en una serie de modificaciones entre las que se encuentran: aumento de fluidez en la membrana, disminución del contenido de colesterol plasmático, motilidad quimio táctil del espermatozoide, cambio de patrones de movimiento (pasan de ser movimientos rectilíneos a movimientos curvilíneos), fosforilación de residuos, entre otras. 2

Estos movimientos antes mencionados permiten al espermatozoide adquirir un movimiento asimétrico y amplio del flagelo, que lo llevará a moverse en círculos, para avanzar y alcanzar el ámpula, lugar donde ocurrirá la fecundación.2

Objetivos

Incubar espermatozoides con diferentes concentraciones de hidrocortisona y analizar sus efectos sobre capacitación y reacción acrosomal del gameto masculino humano.

Metodología

Preparación de las soluciones utilizamos:

Medio HAM'S suplementado:

0.0025 g de BSA en 500 microlitros de medio HAM'S F-10 o Para preparar 15 ml: 0.075 g de BSA+ 15 ml de HAM'S F-10 □ Formalina al 35%:

Para preparar 1 ml: 350 microlitros de formol y 650 microlitros de agua.

Fijativo para dilución del semen:

Para preparar 50 ml: 2.5 g de NaHCO₃ + 0.5 ml de formalina al 10% + 50 ml de agua destilada.

Azul de Coomassie o Para preparar 50 ml: 0.11 g de Coomassie + 2.5 ml de metanol + 5 ml de ácido acético glacial.

Stocks:

STOCK 20 mM: 0.00724 g de HC + 1 ml de DMSO
o STOCK 5 mM: 0.00181 g de HC + 1 ml de DMSO
o STOCK 1 mM: (20 mM) (x= 50 μ l) = (1 mM)
(1000 μ l) 50 μ l de stock 20 mM + 1 ml de DMSO.

STOCK 0.1 mM: (20 mM) (x= 5 μ l) = (0.1 mM)
(1000 μ l) 5 μ l de stock 20 mM + 1 ml de DMSO.

1. Parámetros macroscópicos

Para iniciar los parámetros determinamos el color de la muestra, su volumen, viscosidad (la hebra que haga debe ser máximo de 2 cm), su pH (con ayuda de papel pH) y anotar los resultados. Posterior, mezclamos la muestra aspirando entre 10-12 veces y después desecharmos la pipeta.

2. Swim up

Para esta parte, tomamos la muestra de semen, dejando unos 500 microlitros para estudios posteriores, y colocamos el resto en una gradilla en un tubo falcon a 45° de inclinación. Después agregamos la misma cantidad de volumen de medio HAM's F-10 suplementado, recordamos añadir el medio con cuidado de no romper las fases, a través de la pared del tubo.

Posterior a la preparación dejamos tapado el tubo, con la tapa un poco floja, la metimos a la incubadora durante una hora y mientras se encontraba dentro de la incubadora, realizamos la parte de parámetros microscópicos y morfología.

Luego, con ayuda de una pipeta, extrajimos la fase superior del tubo y la colocamos en un tubo nuevo y le colocamos el nombre de muestra postswim. Al terminar de realizar esto, colocamos 10 μ l de esta muestra en un portaobjetos y pusimos su cubre encima, la llevamos al microscopio y se hizo un conteo de células motiles en un solo campo.

Ahora bien, dependiendo del número de espermatozoides, se realiza la dilución

correspondiente, en nuestro caso el conteo fue de 1680 espermatozoides en un solo campo y se realizó una dilución 1:20 de fijativo, por lo que colocamos 50 μ l de muestra post-swim + 950 μ l de fijativo lo que nos da un total de 1,000 μ l de muestra diluida, la cual fue llevada a la cámara de Neubauer.

Posterior a eso contamos espermatozoides por filas, el objetivo era obtener 200 espermatozoides, en tantas filas necesarias fueran, terminando de contar siempre las filas, sin embargo, en la primera fila nosotros realizamos un conteo de 480 espermatozoides y posterior aplicamos la siguiente fórmula:

La cual en nuestro caso fue:

$$\frac{\#espermatozoides}{\#filas} * \frac{1}{20} * 20 * 1x10^6$$

$$480 * \frac{1}{20} * 20 * 1x10^6 = 480,000,000$$

Esto es en 1 ml, en nuestro caso fue de 1.1 ml por lo que:

$$480,000,000 * 1.1 = 528,000,000$$

El propósito de este es tener 10 millones de espermatozoides y se deberá aplicar la siguiente fórmula:

$$C1V1 = C2V2$$

C1=Lo obtenido con la primera fórmula

V1=La cantidad de muestra en ml C2=1x10⁷

Aplicándolo para nuestro caso fue:

$$V_2 = \frac{(528,000,000)(1.1)}{1x10^7} = 58.08$$

Por lo que de acuerdo a lo que vimos, agregamos el medio HAM'S necesario para complementar el cual fue 58.08 ml y lo dejamos incubando 3 h.

3) Parámetros microscópicos

Determinamos la motilidad, esto colocando 10 microlitros de nuestra muestra original en el centro de un portaobjetos, le colocamos el cubreobjetos y lo llevamos al microscopio. Posterior comenzamos a contar 200 espermatozoides de manera aleatoria, clasificándolos en: motiles progresivos, motiles no progresivos y no motiles.

Después debemos determinamos la concentración de gametos, esto contando todos los espermatozoides que puedas ver en un solo campo. Y nos dirigimos a la cámara de Neubauer, la limpiamos con alcohol al 70% y un kimwipes. En nuestro caso fue de 57 motiles progresivos, 72 motiles no progresivos y 43 no motiles. Ahora bien, realizamos la dilución correspondiente del conteo que hicimos de la muestra post-swim, para esto primero re suspendimos con ayuda de una pipeta, 10 veces el contenido del tubo, luego tomamos 10 µl de la dilución que colocamos nuevamente en la cámara de Neubauer y contamos nuevamente hasta obtener 200, terminando las filas que iniciamos, en nuestro caso fue de 1003 espermatozoides en 1 fila.

$$V_2 = \frac{1003 * \frac{1}{20} * 5 * 1 \times 10^6}{1 \times 10^7} = 250,750,000 \text{ con esto:}$$

$$V_2 = 15,045 \mu\text{l} - 600 \mu\text{l} = 14,445 \mu\text{l}$$

Esto lo tuvimos que dividir entre los 16 recipientes que utilizamos para el estudio, por lo que:

$$\frac{14,445 \mu\text{l}}{16} = 902.8125 \mu\text{l por tubo}$$

4) Morfología

Colocamos 20 microlitros de la muestra original en la orilla de un portaobjetos y con ayuda de un cubreobjetos, arrastramos una gota por encima, asegurándonos de que pase por todo el portaobjetos.

Posterior a eso lo metimos en solución de metanol, lo tapamos y agitamos durante 15 segundos, lo sacamos, asegurándonos de saber cuál es el lado de la muestra, después realizamos exactamente lo mismo en solución de eosina durante 10 segundos y finalmente realizamos lo mismo en solución de hematoxilina durante 5 segundos. Y lo colocamos encima de una superficie con la muestra boca arriba para que se seque a temperatura ambiente. Este proceso completo lo realizamos un total de 16 veces.

5) Inducción de reacción acrosomal

Ahora los 902 microlitros por tubo fueron utilizados en esta parte, como debíamos tener 1500 microlitros de solución por tubo, tomamos 900 microlitros de muestra por tubo y 600 de medio de HAM'S. Lo dejamos en capacitación durante 3 h en incubadora.

De los 16 tubos tomamos 2 grupos de 7 tubos y 2 tubos de control.

A ambos grupos de 7 tubos les agregamos 0.1 micro molar, 1 micro molar, 5 micro molar, 10 micro molar, 15 micro molar, 30 micro molar y 100 micro molar respectivamente de hidrocortisona.

Luego a uno de los grupos de 7 tubos les agregamos a cada uno, 3 microlitros a 20 micro molar de Progesterona.

De esta manera, tuvimos dos grupos de 7 tubos con la misma cantidad de hidrocortisona en cada uno, sin embargo, solo uno de ellos tenía progesterona.

Los dos tubos restantes fueron los controles, para el control positivo agregamos 3 microlitros de stock 10 micro molar para así obtener una concentración de 20 micro molar de progesterona. Para el control negativo agregamos la misma cantidad que en el positivo, pero de DMSO 7.5 micro molar.

Teniendo esto listo, colocamos los tubos eppendorf en la incubadora durante 30 minutos. Al terminar agregamos 100 microlitros de metanol a cada tubo, los llevamos a la centrifugadora, los colocamos

dentro y los centrifugamos a 3500 rpm durante 4 minutos.

Después eliminamos el sobrenadante y re suspendimos a 400 ml de PBS, rotulamos los portaobjetos necesarios y colocamos 50 microlitros en cada portaobjeto y extendimos la muestra con ayuda de un cubreobjeto, de la misma manera en la que hicimos la parte de morfología.

Luego incubamos en la tinción de Azul de Coomasie durante 2 minutos; al terminar eliminamos el exceso con agua por la parte de atrás y lo dejamos secar.

Resultados

La muestra presentada en niveles macroscópicos posee 1.1 ml de volumen, un color blanco opalescente, pH de 8, viscosidad normal.

Se dio un 82.5% de motilidad progresiva, 9% de motilidad no progresiva y 8.5% de inmovilidad. En el conteo por campo, obtuvimos 1680 espermatozoides en un solo campo y se realizó una dilución 1:20 de fijativo, posterior a todo el proceso, el conteo de una sola fila 480 espermatozoides de la cámara de Neubauer.

Y en total de conteo de espermatozoides de la muestra, 1.1 ml nos dan 528,000,000 espermatozoides de concentración.

Después agregamos el medio HAM'S y se colocó a 45°, para iniciar el swim up (Figura 1)



Figura 1. Incubación de los tubos en la técnica swim up. En la imagen podemos ver los tubos a 45° que contienen dos fases, en la parte inferior se encuentra la muestra y en la superior medio HAM'S suplementado. Posterior a la incubación, los espermatozoides motiles, nadaran hacia la parte superior, así separaremos los espermatozoides de buena calidad.

Posterior al swim up, espermatozoides con mejor calidad, el conteo nos dio 57, 72 y 43 de motiles en campos distintos y el promedio nos da 57.3, y utilizamos la dilución de 1:5. El conteo final nos dio 1003 en una sola fila post swim up. Y la concentración nos dio 250,750,000 de espermatozoides de buena calidad (Figura 2).

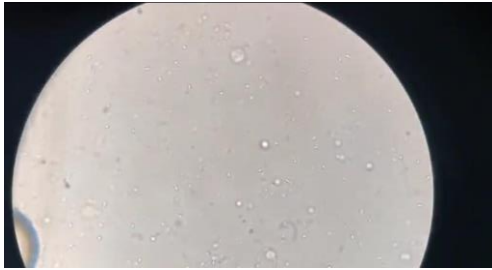


Figura 2. Aquí podemos observar la vista que tenemos de un cuadrante de muestra bajo un microscopio óptico con 40x, podemos observar las cabezas de los espermatozoides en color blanco brillante, esto nos fue útil para realizar el conteo de espermatozoides por cuadrantes y filas.

Realizando nuestros cálculos:

$$V_2 = \frac{(250,750,000)(600 \text{ microlitros})}{1 \times 10^7} = 15,045 - 600$$

$$= 14,445 \text{ microlitros}$$

Entonces tenemos que agregar esa cantidad, para obtener 10 millones de concentración de espermatozoides.

Como el volumen en cada tubo eppendorf deben ser 1500 microlitros:

Para cada uno pondremos 900 microlitros de la muestra de volumen 2, anteriormente calculada y agregaremos 600 microlitros de HAM'S para completar los 1,500 microlitros por cada tubo eppendorf.

Y comenzamos a agregar la hidrocortisona y progesterona en cada uno, como lo indica la metodología, todo está estandarizado, y lo dejamos capacitar 3 h. (Figura 3).

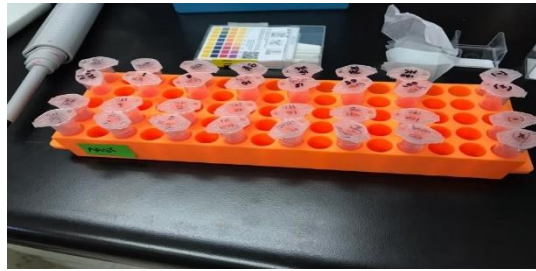


Figura 3. Podemos ver los 16 tubos eppendorf, la fila superior podremos encontrar los tubos con hidrocortisona. Mientras que en fila inferior a esa podremos encontrar los tubos con hidrocortisona y progesterona; y los dos separados de la derecha son los controles.

Posteriormente centrifugamos, suspendimos y comenzamos a hacer las placas para morfología (Figura 4).

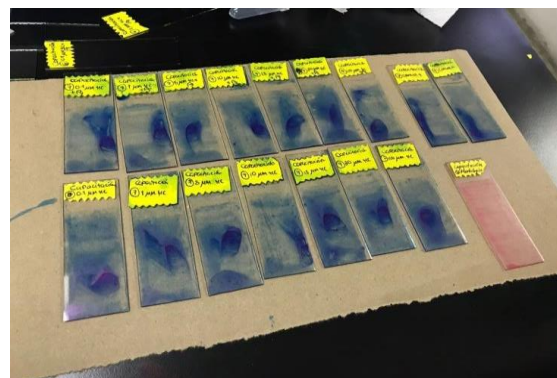


Figura 4.

Podremos observar 17 placas que utilizamos para realizar los estudios de morfología, que realizamos con Azul de Commasie.

Todos los resultados del estudio de morfología fueron buenos y presentaron niveles promedio a lo que señala la OMS (4%).

Discusión

El donante mostro tener niveles muy buenos en todos los estudios.

De los 14 tubos eppendorf tenemos 7 tubos que son de reacción acrosomal inducida y 7 tubos de reacción acrosomal espontánea, al dejarlos en la incubadora y luego centrifugarlos se busca concentrar todo al fondo del tubo eppendorf.

A continuación, estará la gráfica de las RA de todas las muestras (Imagen 5).

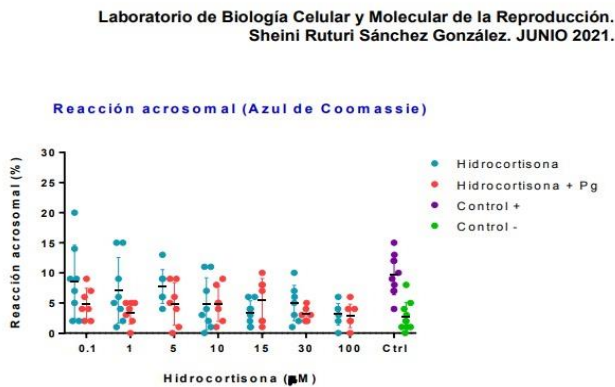


Imagen 5

Podemos observar como la parte azul (hidrocortisona) al inicio de la gráfica se encuentra más alto que la parte rosa (hidrocortisona + progesterona), sin embargo, a medida que las concentraciones van elevándose, la azul comienza a decaer mientras que la rosa muestra resultados variables.

Conclusión

Tomando en cuenta los resultados globales del estudio, podemos concluir que la hidrocortisona en cantidad menores a 5 microlitros induce reacción acrosomal en los espermatozoides, sin embargo, a medida que aumentan las concentraciones, va disminuyendo.

Si observamos la hidrocortisona con la progesterona en comparación con el control positivo podemos ver una significativa decadencia en la inducción de reacción acrosomal.

Podemos concluir que mientras el nivel de hidrocortisona va elevándose, el porcentaje de

probabilidad de que ocurra la reacción acrosomal, va descendiendo. Por lo que podemos concluir que el estrés, entre mayor sea, menor será la posibilidad de generar reacción acrosomal.

Referencias

1. Dra. Maritza Fuentes. (2021). ¿Qué le pasa a tu cuerpo cuando tienes exceso de cortisol? 22 junio del 2021, de AARP Sitio web: <https://www.aarp.org/espanol/salud/vida-saludable/info-2019/exceso-de-cortisol-en-el-cuerpo.html>
2. María José del Río, Ana Godoy, Alejandra Toro, Renán Orellana, Manuel E. Cortés, Ricardo D. Moreno y Pilar Vigil. (2007). La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. 23 de Junio del 2021, de Revista Int Androl Sitio web: [https://scihub.se/10.1016/S1698-031X\(07\)74086-4](https://scihub.se/10.1016/S1698-031X(07)74086-4)
3. W.D. Cardona-Maya, A.P. Cadavid. (2005). Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y Nacetilglucosamina. 25 de Junio del 2021, de SCIELO Sitio web: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062005000700007
4. Joaquín Conesa. (2017). Los altos niveles de estrés y ansiedad nos hacen ovular hasta un 20 % menos. 25 de Junio del 2021, de Quirón Salud Sitio web: <https://www.quironsalud.es/blogs/es/aventura-madre/altos-niveles-estresansiedad-hacen-ovular-20-menos>
5. Desconocido. (2016). ¿Qué es el estrés? Causas y síntomas. 30 de Julio del 2021, de AEPSAL (Asociación de Especialistas en Prevención y Salud Laboral) Sitio web: <https://www.aepsal.com/estres-causas-y-sintomas/>

Entonación del español en Jalpan de Serra Querétaro

Vanesa Bárcenas Trejo

Universidad Autónoma de Querétaro
Anillo Vial Fray Junípero Serra S/N Campus aeropuerto
vbarcen04@alumnos.uaq.mx

Eva Patricia Velásquez Upegui

Universidad Autónoma de Querétaro
Anillo Vial Fray Junípero Serra S/N Campus aeropuerto
evapvelaszquez@gmail.com

Resumen — En el presente documento se hace un análisis prosódico sobre la entonación de enunciados declarativos neutros y enumeraciones en hombres con un rango de edades de entre 20 a 55 años, habitantes de Jalpan de Serra, municipio perteneciente a la Sierra queretana. Para esto, se realizó un cuestionario de situaciones a dichos hablantes (Velásquez & Velásquez, 2014), se analizaron las respuestas por medio del software de Praat versión 6.1 (Boersma & Weenink 2006) y se etiquetaron con base en el sistema de Sp_ToBI (Aguilar, De-la-Mota & Prieto, 2009).

Al igual que en el estudio comparativo del habla queretana entre bilingües y monolingües (Velásquez, 2021), se presentó el uso constante de la juntura M% tanto en los enunciados declarativos neutros, como en las enumeraciones. Así mismo, coincidió la preferencia por el uso del acento nuclear L+H* en los enunciados declarativos neutros, mientras que, en las enumeraciones

se presentaron los acentos nucleares L*, H* y L+H* con la misma frecuencia.

Palabras clave — Entonación, hombres, enunciados declarativos, Jalpan de Serra, Querétaro.

Abstract — In this document, a prosodic analysis is made on intonation in men with an age range between 20 to 55 years, inhabitants of Jalpan de Serra, a municipality belonging to the Sierra Queretana. For this, a questionnaire was made to said speakers (Velásquez & Velásquez, 2014), the responses were analyzed using the Praat software version 6.1 (Boersma & Weenink 2006) and they were labeled based on the Sp_ToBI system (Aguilar, De-la-Mota & Prieto, 2009).

As in the comparative study of Queretaro speech between bilinguals and monolinguals (Velásquez, 2021), the constant use of the M% juncture was presented both in neutral declarative sentences and in enumerations. Likewise, the preference for the use of the nuclear accent L + H * coincided in the neutral declarative sentences, while, in the enumerations, the nuclear accents L *, H * and L + H * were presented with the same frequency.

Keywords — Intonation, men, declarative sentences, Jalpan de Serra, Querétaro

I. INTRODUCCIÓN

En este trabajo se pretende profundizar en los rasgos prosódicos pertenecientes a Querétaro, específicamente a la región de Jalpan de Serra, para así encontrar indicadores característicos de este dialecto que puedan diferenciarse del resto del estado.

Jalpan es uno de los 18 municipios conformantes del estado de Querétaro, se encuentra en la parte norte y colinda con Arroyo Seco, Landa de Matamoros, Pinal de Amoles y San Joaquín (Figura 1). Es un municipio rural con un alto nivel de marginación. Está situado en la Sierra Gorda queretana y se encuentra alrededor de una reserva de biosfera protegida. Según el censo realizado por el INEGI en el 2020, cuenta con un aproximado de 27,343 habitantes, de los cuales un 47.7% son hombres y 52.3% mujeres, una extensión territorial de 1189.45 Km² y una densidad poblacional de 22.98 habitantes por kilómetro cuadrado. Sus principales actividades económicas son la agricultura, la ganadería y el comercio. Las personas de dicha comunidad se mantienen en contacto con lenguas indígenas como lo son el mazahua, otomí, náhuatl y zapoteca pame.



Figura 1. Ubicación Jalpan de Serra.

1 Antecedentes

Aunque la entonación queretana ha sido poco estudiada, se han hecho diversas investigaciones, entre las cuales, se encuentra un estudio comparativo entre bilingües y monolingües en enunciados declarativos neutros (Velásquez, 2021). En dicha

investigación se compara la entonación de hablantes bilingües de español y otomí, hablantes monolingües de Amealco y hablantes monolingües de Santiago de Querétaro. Los resultados obtenidos arrojaron que los hablantes bilingües de San Ildefonso utilizaron una mayor cantidad de veces los acentos L+H* y H* con una juntura final descendente de L%, mientras que, los hablantes monolingües de Amealco, también tendieron al uso de L+H* y H*. Por su parte, los hablantes monolingües de Santiago de Querétaro mostraron un mayor uso del acento L+H* con una juntura de M%.

II. MARCO TEÓRICO

Como se mencionó anteriormente, en este documento se pretende ahondar en los rasgos prosódicos característicos de los hablantes de Jalpan de Serra, para esto se deben de tener claros los conceptos de prosodia y entonación. La prosodia es una rama dentro de la fonología encargada de estudiar los rasgos suprasegmentales del habla, o, dicho de otra manera, estudia aquellos aspectos del habla que contienen una mayor relación con rasgos como la melodía, las pausas o el ritmo, que con características intrínsecas a la lengua con la que se habla, es a lo que coloquialmente se le llamaría “acento”.

La entonación se considera un rasgo prosódico resultante de 4 elementos principales: tono, tonema, acento oracional y ritmo. El tono es la sucesión de acentos tonales que se encuentran dentro del habla. Por tonema Hidalgo (2019) define “la inflexión melódica o dirección que sigue la curva entonativa a partir de la última sílaba tónica de un grupo fónico”. (p.30). Por acento oracional, se entiende el acento

colocado al principio o final del habla que marca cuando el hablante ha empezado o terminado. Finalmente, el ritmo es considerado como el tempo que el hablante sigue al momento del habla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente reporte se han realizado entrevistas en la comunidad de Jalpan de Serra a hombres de edades entre 20 a 55 años. Las preguntas realizadas fueron retomadas de un cuestionario de situaciones adaptado de Prieto y Rosseano (2009-2010) por Velásquez y Velásquez (2014). Las grabaciones obtenidas se analizaron a través del software de Praat versión 6.1 (Boersma & Weenink, 2006) y se etiquetaron con base a los estándares del sistema de entonación de *Sp_ToBI* (Aguilar, De-la-Mota & Prieto, 2009).

1 Metodología

El procedimiento seguido para realizar esta investigación fue el siguiente. En primer lugar se crearon 7 tiers en el textgrid de Praat, los cuales, se llenaron de la siguiente manera: En el primero se colocó la transcripción ortográfica en el segundo la oración dividida silábicamente, señalando las siguientes sílabas; la S0 como la sílaba inicial átona, la SN, o última sílaba tónica en el enunciado, la SP sílaba antecedente de la SN, la SF como la última sílaba y todas las sílabas tónicas como S y el número que corresponda a su aparición, en el tercero se segmentaron las vocales, en el cuarto se señala la cesura o pausas y divisiones dentro de la oración, en el quinto se colocaron los acentos tonales con base al sistema ya mencionado *Sp-ToBI*, en el siguiente tier se colocó la estructura silábica conformante de la

S0, sílabas tónicas, SN, SP y SF. Por último, se señalaron el máximo y mínimo dentro de la curvatura del pitch.

RESULTADOS

1. Declarativas neutras

Se analizaron cuatro oraciones declarativas neutras enunciadas por tres hablantes varones distintos. Uno de los enunciados quedó fuera del análisis debido a su poca claridad. Como muestran los resultados en la figura 2, el acento tonal en la sílaba nuclear que apareció con mayor frecuencia en el habla fue L+H* con un porcentaje de 36.36% de frecuencia en su uso, en contraparte el acento con un menor uso fue H*, con tan sólo una aparición. Por su parte la juntura que resultó con un mayor número de repeticiones fue M% con un 36.36% de apariciones.

A.N/ Juntura	HH %	H-	HL%	M%	L%	Total
H+L*	0	0	0	3	0	3
L+H*	1	0	1	0	2	4
L*	0	1	1	1	0	3
H*	1	0	0	0	0	1
Total:	2	1	2	4	2	11

Figura 2. Acentos nucleares y junturas en enunciados declarativos neutros.

En la siguiente imagen (figura 3) se puede visualizar como en la sílaba nuclear –dan-, la curvatura del pitch desciende después de un pico en donde se posiciona el acento L+H* y, después de esto retoma con un gran ascenso al llegar a la sílaba final -do, para terminar con el tono M%.

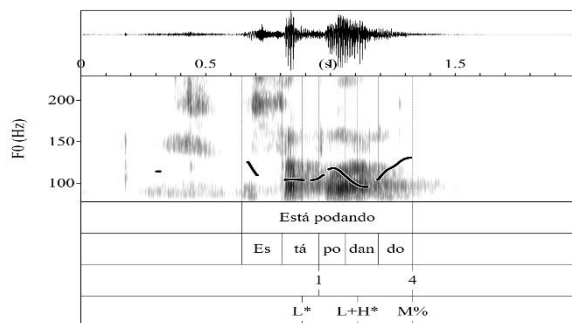


Figura 3. Enunciado declarativo neutro “Está podando”.

2. Enumeraciones

A su vez se analizaron tres oraciones en donde tres hablantes tuvieron que enumerar diversos objetos. Tres de los audios presentaron daños y por ello no fueron tomados en cuenta. La figura 4 enseña los resultados de dichos enunciados, en donde L*, H* y L+H*

Fueron los acentos tonales usados con igual frecuencia en las sílabas nucleares, cada uno con un 33.33% de apariciones en los hablantes. Por su parte la juntura que mostró un mayor número de repeticiones fue, al igual que en los enunciados declarativos, el tono M% el cual apareció en el 50% de los enunciados.

A.N/ Juntura	L%	LH%	HH%	M%	Total
L*		1		1	2
H*	1		1		2
L+H*				2	2
Total:	1	1	1	3	6

Figura 4. Acentos nucleares y junturas en enumeraciones.

En la figura 5 se aprecia cómo se presenta el acento tonal H* en la sílaba nuclear <vier-> al presentar un punto alto en la sílaba. También se puede observar la juntura final HH% al tener un final ascendente el enunciado.

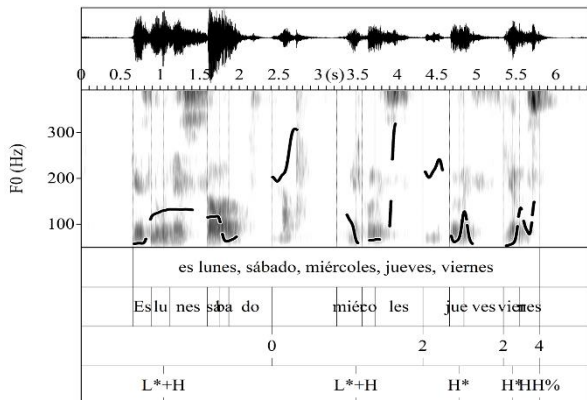


Figura 5. Enumeraciones “Es lunes, sábado, domingo, miércoles, jueves, viernes”.

III. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Al comparar los resultados de este trabajo con el realizado anteriormente sobre la entonación bilingüe en Querétaro (Velásquez, 2021), podemos encontrar una gran similitud entre los acentos nucleares de las frases declarativas neutras, ya que, al igual que los hablantes bilingües de San Ildefonso, quienes utilizaron una mayor cantidad de veces los acentos L+H* y H* con una juntura final descendente de L%, y los hablantes monolingües de Amealco, que también tendieron al uso de L+H* y H*, los hablantes de Jalpan usaron en una mayor cantidad de ocasiones el acento L+H*, sólo difiriendo en el poco uso del acento H*. Sumado a lo anterior, se puede hallar otra gran similitud entre los hablantes monolingües de Amealco y los hablantes de Jalpan de Serra, ya que ambos usaron con frecuencia la juntura M%.

En el caso de los hablantes de Santiago de Querétaro (Velásquez, 2021) también se

encontró el acento L+H* y la juntura final de M% como el resultado de mayor preferencia en los enunciados declarativos, coincidiendo con los resultados de Jalpan.

En las enumeraciones podemos observar la constante repetición de uso en los acentos nucleares L*, H* y L+H*, al igual que la persistencia de la juntura M%.

CONCLUSIONES

En conclusión, se pudo encontrar la persistencia de la juntura M% tanto en los enunciados declarativos neutros como en las enumeraciones, y, este resultado es consistente con el estudio de bilingües y monolingües realizado (Velásquez, 2021), planteando la teoría de la tendencia del uso frecuente de esta juntura en el estado de Querétaro.

Al igual, se encontró el uso repetitivo del acento nuclear L+H* en oraciones declarativas neutras.

AGRADECIMIENTOS

Por último, este trabajo fue posible gracias a la doctora Eva Patricia Velásquez Upegui y a la licenciada Jennifer Tovar González quienes asesoraron todo el procedimiento que implicó este texto. También debo agradecer la colaboración de mis compañeras estudiantes de la licenciatura Fátima Díaz Gutiérrez, Yamilet Lara Martínez, Rosario Gallardo, Ana Karen y Ana Paula Calderón.

REFERENCIAS

Aguilar, L., De la Mota, C., & Prieto, P. (2009). *Sp_ToBI Training Materials*. Recuperado de:

http://prosodia.upf.edu/sp_tobi/en/

Boersma, P., & Weenik, D. (2019). Praat. Doing phonetics by computer. Recuperado de: <http://www.praat.org/>

Enciso, J.(2018).*Jalpan de Serra Querétaro, un pueblo mágico en la sierra gorda*. Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. Recuperado de; <https://cidur.org/wp-content/uploads/2018/12/10.-Jalpan-de-Serra-Queretaro.pdf>

González, H.(2009).*Jalpan de Serra*. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Recuperado de; <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM22queretaro/municipios/22009a.html>

Navarro, A.(2019). *En torno a los suprasegmentos: delimitación conceptual y jerarquía. en el Sistema y uso de la entonación en el español hablado*.

Velásquez, E. (2021). *Entonación de enunciados declarativos en el español hablado en Querétaro: una comparación entre hablantes bilingües y monolingües*. *Revista de Filología y Lingüística de la Universidad de Costa Rica*, 47(2), 25. Recuperado de: <https://doi.org/10.15517/rfl.v47i2.46756>

Velázquez, E., & Velásquez, E.(2014). *Cuestionario de Situaciones para la Elicitación de la Entonación del Español*. Universidad autónoma de Querétaro, Querétaro.

Prosodia en la Sierra Gorda queretana: Pinal de Amoles

Díaz Gutiérrez Fátima
Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro,
México
fatimadiazgutierrez527@gmail.com

Eva Patricia Velásquez Upegui
Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro,
México
evapvelasquez@gmail.com

Resumen

Trabajo de investigación descriptivo sobre la entonación lingüística, cuyo objetivo principal es generar un primer contacto con las características prosódicas del español de la Sierra Gorda queretana, específicamente del municipio de Pinal de Amoles. La metodología del trabajo se divide en tres partes: primeramente, los hablantes son mujeres del municipio de Pinal de Amoles que se encuentran en un rango de edad de los 20 años en adelante y que, además, pertenecen a uno los tres niveles de instrucción; por otra parte, el instrumento utilizado fue un cuestionario de 50 oraciones (Velásquez & Velásquez, 2014); finalmente, con respecto a las herramientas de trabajo se dio uso al software *Praat* versión 6.1.39 (Boersma y Weenink, 2006) para el análisis acústico, *Microsoft Excel* (2016) para el registro de datos y *Sp_ToBI* (Aguilar, De-la-Mota & Prieto, 2009) para el etiquetado. Los resultados de la investigación fueron organizados en tablas y cada una de ellas lleva su respectiva explicación; el análisis de los resultados va implícito en esa sección y se presenta a través de imágenes recuperadas del software *Praat*, donde se ejemplifica con base en los patrones de los datos predominantes en los resultados. A manera de conclusión, se expone que en las oraciones declarativas neutras los resultados

son L+¡H* como acento nuclear y M% como juntura terminal, mientras que en las enumerativas se cierra con H* como acento nuclear y M% como juntura terminal.

Palabras clave: entonación, prosodia, aseveraciones, declarativas neutras, Sierra Gorda de Querétaro.

Abstract

Descriptive research work on linguistic intonation, whose main objective is to generate a first contact with the prosodic characteristics of Spanish in the Sierra Gorda queretana, specifically in the municipality of Pinal de Amoles. The work methodology is divided into three parts: firstly, the speakers are women from the municipality of Pinal de Amoles who are in an age range of 20 years and older and who, in addition, belong to one of the three levels of instruction; on the other hand, the instrument used was a questionnaire of 50 sentences (Velásquez & Velásquez, 2014); finally, regarding the work tools, the *Praat* software version 6.1.39 (Boersma and Weenink, 2006) was used for acoustic analysis, *Microsoft Excel* (2016) for data recording and *Sp_ToBI* (Aguilar, De-la-Mota & Prieto, 2009) for labeling. The results of the investigation were organized in tables and each one of them carries its respective explanation; the analysis of the results is implicit in this section and is presented through images recovered from the *Praat* software, where it is exemplified based on the patterns of the predominant data in the results. As a conclusion, it is stated that in neutral declarative sentences the results are L + ¡H * as the nuclear accent and M% as the terminal joint, while in the enumerative sentences it is closed with H* as the nuclear accent and M% as the terminal joint.

Keywords: intonation, prosody, assertions, neutral declarations, Sierra Gorda de Querétaro.

1. Introducción

En lingüística, la entonación se refiere al uso del tono en el habla, con propósitos pragmáticos y gramaticales. No obstante, es preciso señalar que la duración y la intensidad también son factores importantes que intervienen en las propiedades de los distintos tipos de enunciados; todos estos rasgos acústicos conforman la prosodia (Hualde, 2013), dado que forman parte del conjunto de características suprasegmentales de una lengua (Hidalgo, 2019).

La importancia de enfatizar en la realización de estudios prosódicos, radica en la posibilidad de darle su respectiva caracterización en cada una de las regiones de habla de una determinada lengua, de manera que, desde el punto de vista lingüístico, se aporte en el ámbito cultural.

El presente trabajo de investigación tiene fines enfocados meramente a una descripción prosódica de la lengua española en hablantes pertenecientes al municipio serrano Pinal de Amoles, ubicado en el estado de Querétaro, México (Figura 1).

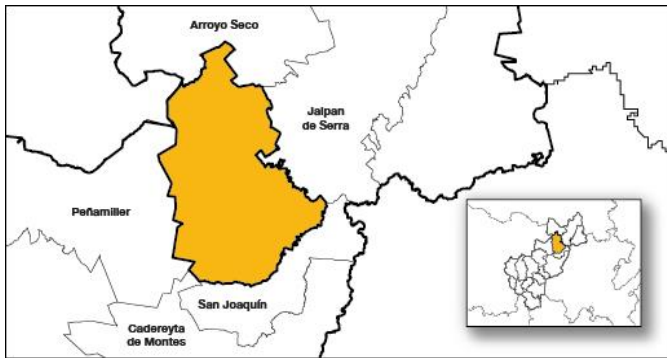


Figura 1. Ubicación de Pinal de Amoles (INEGI, 2020).

De manera muy general, se expone que el municipio de Pinal de Amoles cuenta con una población total de 27,365 habitantes, dentro de los cuales 48.6% son hombres y 51.4% son mujeres (INEGI, 2020). Cabe mencionar que el presente estudio se centrará en el análisis acústico de hablantes pertenecientes únicamente al género femenino.

El español del estado de Querétaro ha sido poco estudiado, puesto que al día de hoy se tiene

conocimiento únicamente de dos trabajos de investigación.

Velásquez Upegui (2021), realizó una comparación prosódica entre hablantes bilingües de otomí-español y hablantes monolingües de español en los municipios de Santiago de Querétaro y de Amealco de Bonfil. Es importante precisar que en este estudio participaron 15 mujeres divididas en tres grupos, donde los parámetros de clasificación fueron los siguientes: i. San Ildefonso Tultepec con una población bilingüe otomí-español, ii. Amealco con una población monolingüe español, y iii. Santiago de Querétaro con una población monolingüe español. Como objeto de estudio se tomaron enunciados declarativos, de los cuales se obtuvo que: i. en San Ildefonso Tultepec predominó el movimiento L+H* en posición nuclear, y en juntura los tonos L% y M%; ii. en Amealco predominaron los movimientos H* y L+H* en posición nuclear, y en juntura el tono M%; y iii. en Santiago de Querétaro predominó el movimiento L+H* en posición nuclear y en juntura el tono M%.

Por su parte, Tovar González (manus.), realizó una investigación prosódica con el objetivo de generar una aproximación a las características prosódicas del habla rural y urbana en los municipios de Santiago de Querétaro y de San Joaquín. Con respecto a la cantidad de participantes, se sabe que fueron 16 hombres y mujeres en la misma proporción y, como objeto de estudio se tomaron enunciados declarativos neutros, cuyos resultados arrojaron que: i. en mujeres de Santiago de Querétaro, destacó un movimiento L* en posición nuclear y una juntura de tono M%, mientras que en los hombres predominó un movimiento H* en posición nuclear y una juntura de tono HM%; ii. en el municipio de San Joaquín, el habla de las mujeres se caracterizó por un movimiento L* en posición nuclear y en los hombres un movimiento L+H*, mientras que en la juntura ambas coinciden en un tono M%.

Estas investigaciones permiten que futuros estudios prosódicos en el estado de Querétaro se puedan suscitar, dado que tienen como base herramientas sólidas de comparación. Dicho esto, se espera que el

presente trabajo pueda tener el potencial de desarrollar una funcionalidad similar.

2. Objetivos

Objetivo general:

Generar un primer acercamiento a la entonación de la lengua española en el municipio serrano Pinal de Amoles.

Objetivos específicos:

- Cumplir con todos los elementos requeridos en el análisis de grabaciones de voz bajo el apoyo del software *Praat*.
- Realizar observaciones y comentarios descriptivos de tipo acústico a cada una de las grabaciones analizadas.
- Relacionar las observaciones de los análisis en la teoría con los datos emitidos por los hablantes.

3. Metodología

3.1 Participantes

El conjunto de hablantes está constituido por tres mujeres en total, todas habitantes del municipio de Pinal de Amoles del estado de Querétaro.

Las participantes son pertenecientes a tres niveles de edad por generaciones: la primera se encuentra entre los 20 y 34 años, la segunda entre los 35 y 50 años y la tercera de 55 años en adelante; además, los hablantes proporcionan mayor riqueza a la investigación, pues cuenta cada una con un diferente nivel de instrucción, entre básica y media-preparatoria. Entre sus ocupaciones más destacables se encuentran las labores del hogar y el comercio en pequeños y medianos negocios (principalmente como prestadores de servicios).

3.2 Instrumento

Para la obtención de los enunciados, se aplicó como estrategia un *Cuestionario de Situaciones para la Elicitación de la Entonación de Español* (Velázquez y Velásquez, 2014), constituido por 50 oraciones aseverativas clasificadas bajo los siguientes parámetros: declarativas, interrogativas absolutas, interrogativas parciales, interrogativas reiterativas y oraciones imperativas. Para este trabajo únicamente se consideraron las declarativas; concretamente cuatro enunciados declarativos neutros y tres enumerativos.

El formato del cuestionario implicaba de manera considerable la participación del entrevistador, pues consistía en la estipulación de una situación hipotética, de manera que, al responder, la voz de la participante fuera lo más natural posible en cuanto a la entonación (habla semi-espontánea). Un ejemplo de la solicitud hipotética es la siguiente: “le preguntan qué preferiría comer de postre, naranja o mandarina. Usted responde que mandarina”, y entonces, el hablante respondía “mandarina”.

3.3 Procedimiento

Para la realización del análisis acústico se dio uso al software *Praat* (Boersma & Weenink, 2006). En él, se habilitaron siete espacios (tres tiers y cuatro point tiers), cada uno para su respectivo análisis: transcripción ortográfica, segmentación silábica, segmentación vocálica, cesura, acentos tonales y tonos de juntura, estructura silábica y puntos máximo y mínimo.

El registro de datos y observaciones se realizó a través de un registro de datos organizados en tablas en el programa de *Microsoft Excel* (2016).

En cuanto al etiquetado de los acentos tonales y tonos de juntura, se dio uso al sistema de notación para el español *Sp_ToBi* (Aguilar, De-la-Mota & Prieto, 2009). En esta parte se hicieron varias consideraciones según la diferencia en semitonos

(st) entre el ascenso y el descenso de la sílaba tónica en la F0: si la diferencia era menor a 1.5 st, se consideraban los monotonos (H*, L*); si el movimiento radicaba entre los 1.5 y 3 st, se colocaban los bitonos (H+L*, L*+H, L+H*); si sobrepasaba los 3 st, se establecía L+_iH*, o bien, L+>H*. También hubo consideraciones a los tonos de juntura en nivel intermedio (L-, M-, H-, HH-, LH-) y en nivel terminal (L%, M%, HH%, LH%, LM%).

4. Resultados y análisis de resultados

Todos los enunciados recopilados y analizados pertenecen a la clasificación de actos de habla aseverativos, a través de los cuales los hablantes afirman o aseguran lo que dicen (RAE, 2021). Para la realización del análisis de resultados, se tomaron en cuenta dos tipos de esas aseveraciones: las oraciones declarativas neutras y las enumeraciones.

Considérese que el total de datos que se esperaba obtener era N = 21; no obstante, a causa de algunas problemáticas en las grabaciones, cuatro de ellos resultaron defectuosos e imposibles de analizar, por lo que se tiene un total de N = 17.

4.1 Declarativas neutras

Las oraciones declarativas neutras son aquellas donde todo el contenido proposicional es información nueva (Hualde, 2013).

En la Tabla 1 se presentan de manera organizada todos los acentos tonales nucleares y los tonos de juntura intermedia y terminal obtenidos en esta sección de cuatro enunciados. Cabe destacar que de los 17 datos totales solamente 10 pertenecen al grupo de oraciones declarativas neutras; sin embargo, también es importante mencionar que de los 10 datos uno fue omitido, puesto que no fue posible colocarle su sílaba nuclear a causa de la ausencia de la curva melódica en ese segmento del espectrograma.

Tabla 1. Acentos tonales nucleares y juntura intermedia y terminal en las declarativas neutras. Hablantes mujeres de Pinal de Amoles.

Acento nuclear	M%	L%	LM%	LH%	Total	M-	Total
Juntura							
L*	2	1	0	0	3	0	0
H*	1	0	0	0	1	0	0
L+(i)H*	2	0	1	2	5	1	1
Total	5	1	1	2	9	1	1

Los datos generados en la Tabla 1 poseen un amplio espectro de acentos tonales nucleares, puesto que contiene de los dos tipos considerados: monotonos, cuyo rango tonal se encuentra entre los 0 st. y 1.5 st., y bitonos, cuyo rango tonal se encuentra de 1.5 st. en adelante. Además, con respecto a la juntura terminal se observan cuatro tonos: M%, L%, LM% y LH%; y, en cuanto a la juntura intermedia solamente un tono: M-.

Contrastando lo más significativo, se sabe que el patrón de acento nuclear y de juntura terminal predominante en los resultados es L+_iH* M% (Figura 2). Considérese que, en la curva melódica, el bitono L+_iH* tiende a realizarse con un movimiento de tono ascendente durante la sílaba acentuada, mientras que M% se ejecuta con un tono sostenido.

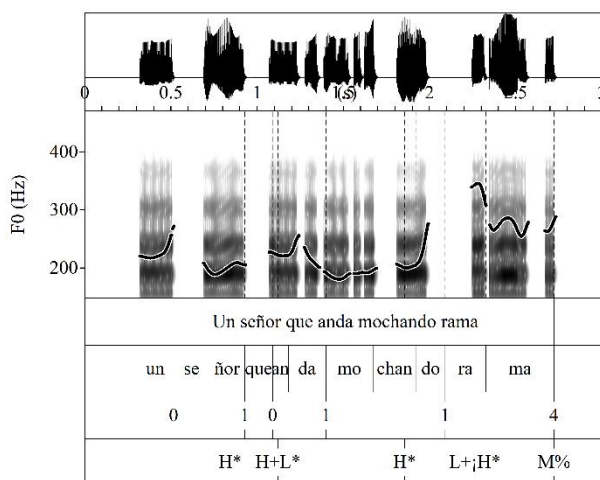


Figura 2. Un señor que anda mochando rama.

En la Figura 2 puede apreciarse que la primera mitad de la sílaba prenuclear lleva una meseta baja, seguida de un movimiento ascendente (cuyo rango de tono es considerablemente amplio), para posteriormente llevar un segmento sin curva melódica que se extiende hasta el inicio de la segunda mitad de la sílaba nuclear, la cual, culminará con un movimiento de tono ascendente que en la sílaba final descenderá; todo ello, apunta a las descripciones del acento tonal $L_{+};H^{*}$. Por su parte, la juntura terminal $M\%$ indica en la curva melódica un movimiento sostenido que es precedido por un tono alto.

4.2 Enumeraciones

Como segundo grupo de datos, se tienen las oraciones enumerativas, cuya característica principal es que están constituidas por elementos seriados, pues gramaticalmente son equivalentes (Gramáticas.net, 2016).

En la Tabla 2 se presentan de manera organizada todos los acentos tonales nucleares y los tonos de juntura intermedia y terminal obtenidos en esta sección de tres enunciados. Es preciso enfatizar que de los 17 datos totales solamente 7 pertenecen al grupo de enunciados enumerativos.

Tabla 2. Acentos tonales nucleares y juntura intermedia y terminal en las enumerativas. Hablantes mujeres de Pinal de Amoles.

Acento nuclear	M%	LM%	Total	M-	H-	L-	Total
Juntura							
L*	3	0	3	2	1	0	3
H*	3	1	4	2	2	1	5
Total	6	1	7	4	3	1	8

Los datos generados en la Tabla 2 poseen un espectro más reducido de acentos tonales nucleares comparado con la sección previa de datos, puesto

que de los dos tipos considerados solamente contiene uno: monotonos, cuyo rango tonal se encuentra entre los 0 y 1.5 st. Además, con respecto a la juntura terminal se observan exclusivamente los tonos $M\%$ y $LM\%$, mientras que en la juntura intermedia aumenta la cantidad a los tres tonos $M-$, $H-$ y $L-$.

Con el objetivo de contrastar lo más significativo, se sabe que el patrón de acento nuclear y de juntura terminal predominante en los resultados es $H^{*} M\%$. Considérese que, en la curva melódica, el monotono H^{*} se ejecuta como una meseta alta y sin caída inicial; por su parte, se documenta que $M\%$ se realiza con una meseta de nivel medio, o bien, con un movimiento ligeramente descendente.

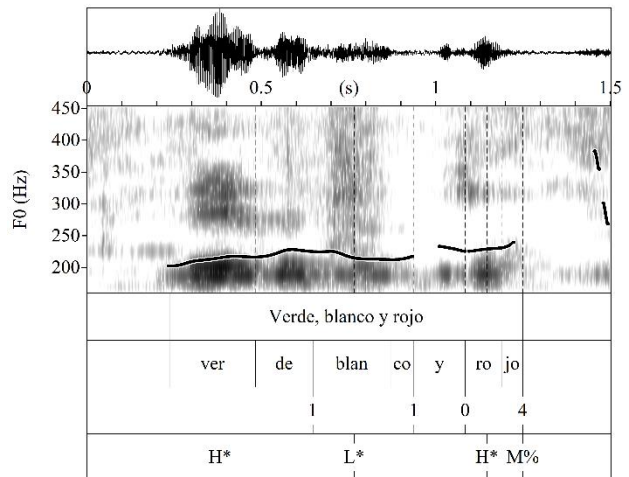


Figura 3. Verde, blanco y rojo.

Para el análisis de la Figura 3 se retomó el patrón $H^{*} M\%$, donde logra apreciarse que la última parte visible en la curva melódica de la sílaba prenuclear lleva una meseta con un ligero ascenso, de manera que la sílaba nuclear se caracteriza por tener una meseta sostenida a una altura considerable. Por su parte, para finalizar se tiene que la juntura terminal $M\%$ indica en la curva melódica un movimiento de tono sostenido.

5. Discusión y conclusiones

La finalidad del presente trabajo fue dar descripción a la entonación de la lengua española en hablantes

mujeres del municipio de Pinal de Amoles de la Sierra Gorda queretana, esto, a través de dos tipos de actos de habla aseverativos: oraciones declarativas neutras y oraciones enumerativas.

A continuación, se exponen las generalidades obtenidas tras el respectivo análisis de enunciados.

Para las oraciones declarativas neutras, se propuso hacer una comparación con los resultados expuestos en un estudio acerca del español rural y urbano en los municipios de San Joaquín y Santiago de Querétaro, Querétaro (Tovar, manus.). Para mostrar esta discrepancia, se tomaron en cuenta los resultados de ambos municipios en hablantes mujeres (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación entre Querétaro y Pinal de Amoles en las oraciones declarativas neutras. Hablantes mujeres.

Municipio	Acento nuclear	Juntura
Santiago de Querétaro	L*	M%
San Joaquín	L*	M%
Pinal de Amoles	L+ _i H*	M%

Como se observa en la Tabla 3, es importante destacar la desigualdad que logra hacerse evidente en los resultados de la posición nuclear: mientras los municipios de Santiago de Querétaro y San Joaquín muestra una mayor inclinación a los movimientos descendentes o sostenidos bajos, Pinal de Amoles se decanta por los movimientos ascendentes cuyo rango de tono es considerablemente alto en posición nuclear.

Por otra parte, en la juntura terminal hay grandes similitudes, puesto que los tonos coincidieron con un M%, donde el movimiento tiende a ser sostenido o, incluso, ligeramente descendente.

Con respecto a las oraciones enumerativas, resultó complicado hallar algún estudio con cual compararlo dada la ausencia de ellos; no obstante, a continuación, se enuncian los resultados obtenidos a manera de conclusión:

- i. En el tonema predomina un movimiento sostenido alto H*, y
- ii. La juntura terminal tiende a ser sostenida M%.

Agradecimientos

Primeramente, me gustaría dar un enorme agradecimiento a mi grupo de trabajo:

A la doctora Eva Patricia Velásquez Upegui, por la oportunidad de trabajar en conjunto en este proyecto de investigación, así como por haber brindado todas las herramientas necesarias para realizar el trabajo de la manera más óptima.

A la licenciada Jennifer Tovar González, por la paciencia brindando apoyo en cuanto a herramientas de trabajo.

A mis compañeras de equipo Rosario Gallardo, Vanesa Bárcenas, Yamilet Lara, Ana Paula Calderón y Ana Karen Quintanar, por el apoyo incondicional durante la estancia.

Además, agradezco a mi familia y amigos por la motivación brindada para poder culminar de la mejor manera este trabajo.

Referencias

- Aguilar, L., De-la-Mota, C., & Prieto, P. (2009). *Sp_ToBI Training Materials*. Recuperado de: http://prosodia.upf.edu/sp_tobi/
- Boersma, P., & Weenik, D. (2019). *Praat. Doing phonetics by computer*. Recuperado de: <http://www.praat.org/>
- Gramáticas.net. (2016). *Ejemplos de coma enumerativa*. Agosto 12, 2021, de Gramáticas.net. Recuperado de: <https://www.gramaticas.net/2012/05/ejemplos-de-coma-enumerativa.html>

Hidalgo, A. (2019). *Sistema y uso de la entonación en español hablado*, Universidad Alberto Hurtado, Santiago de Chile

Hualde, I. (2014). *Los sonidos del español*, Cambridge University Press, New York

INEGI. (2020). *Censo de población y vivienda*. Recuperado de: <https://www.inegi.org.mx/app/indicadores/?ag=22002#divFV1002000001>

Real Academia Española. (2021). *Aseverar*. Agosto 12, 2021, de Diccionario de la lengua española, 23.^a ed., [versión 23.4 en línea]. Recuperado de: <https://dle.rae.es/aseverar>

Tovar, J. (manus). *Entonación del español rural y urbano: el caso de San Joaquín y Santiago de Querétaro*, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro

Velásquez, E., & Velázquez, E. (2014). *Cuestionario de Situaciones para la Elicitación de la Entonación en Español*, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro

Velásquez, E. (2021). *Entonación de enunciados declarativos en el español hablado en Querétaro: una comparación entre hablantes bilingües y monolingües*, Revista de Filología y Lingüística de la Universidad de Costa Rica, 47(2), e46756. Recuperado de: <https://doi.org/10.15517/rfl.v47i2.46756>

El trabajo del editor en la teoría literaria

Montoya Torres Verónica,
vmontoya19@alumnos.uaq.mx

Dr. Gerardo Argüelles Fernández,
gerardo.arguelles67@gmail.com

Resumen

Este artículo presenta dos vertientes un tanto diferentes, pero no por eso ajenas una de la otra.

La primera es mostrar cuál es marco de estudio para el concepto de “realismo” dentro de los estudios literarios, esto con la finalidad de lograr nuevas líneas de investigación a partir de este artículo. Para eso se ha revisado el uso anterior del “realismo” como subgénero, que ahora se verá como una propuesta para acercarse desde otra perspectiva a los textos literarios. La segunda es comentar sobre el nivel de involucramiento que tiene el editor dentro de este tipo de textos y cuál es proceso que se lleva a cabo para “pulir” el texto.

Palabras clave: Teoría literaria, hermenéutica, realismo, edición, lector.

Summary

This article presents two aspects, somehow different, but not for that are unrelated one from another.

The first one will show, which is the framework of the study for the concept of “realism”, inside of the

literary studies, in order to achieve new lines of research from this article. For this, the previous use of “realism” as a subgenre has been revised, and now will be seen as a new proposal to approach the literary text from another perspective.

The second is to comment on the level of involvement that the editor has inside of this kind of text and which is the process that is used to “polish” the text.

Key words: Literary theory, hermeneutics, realism, edition. reader.

Introducción

Dentro del campo de los estudios literarios existe una constante línea de investigación sobre la teoría y crítica literaria, la cual es posible estudiar a través de diferentes corrientes, ideologías e incluso se puede incursionar en determinadas líneas del pensamiento.

El resultado de dichas investigaciones nos compete a los estudiosos de la literatura, ya que nos ofrece nuevas visiones hacia los textos literarios; y con lo anteriormente dicho, se abre la posibilidad de explorar nuevas propuestas hermenéuticas que permitan acercarnos a los textos literarios de acuerdo a las aportaciones que el campo de investigación trae consigo.

Esta investigación se abordará desde un concepto poco explorado en los estudios literarios, pero fundamental en cuanto a la teoría literaria compete: el “realismo”: y se trabajará con algunos términos derivados, tales como “real” y “realista”.

Comúnmente se utilizan estos términos para hacer una cierta distinción entre textos. Se han estudiado y analizado no como conceptos en sí, sino como parte de una categorización perteneciente a un subgénero literario. Aquí los lectores y críticos emiten un juicio para determinar si un texto pertenece o no a la etiqueta del “realismo”.

Por ejemplo, es muy frecuente identificar en el “realismo” aquellos textos que hablan de tópicos históricos, es decir, que apela a una cuestión referencial. Se expone un grado de realidad del mundo y de cómo creemos percibirlo, de todo lo que es “real” o “existe” bajo un marco de estudio —que también será explorado— en el “mundo-de-la-vida”.

Mientras que aquellos textos de ficción, no son basados en la referencialidad, son tomados como alejados de la “realidad”. Lo interesante aquí es cuestionarse si realmente pertenecen a esa etiqueta o si se habla más bien de un subgénero que, dentro de lo conceptual podrían también considerarse en el marco de estudio del “realismo”.

Es importante acotar que mi aportación en este proyecto de investigación ha sido revisada y comprendida no desde el punto de vista autoral, sino como lectora de acompañamiento en el proceso, así como en la revisión de textos; y de igual modo comentaré algunos aspectos respecto a lo que implica ser parte de un proceso editorial, que lleva artículos de investigación como este a su publicación.

Objetivos

Cuestionar el “realismo” como concepto en lugar de subgénero, para que tenga una aplicación diferente a la lectura, así como explorar el futuro de la aplicación de este concepto y marcos de estudio del “mundo-de-la-vida”.

Generar un nuevo interés nuevo en los textos literarios, a partir de lecturas con diferente perspectiva, para que, más adelante puedan surgir otros proyectos de investigación con base en este, como ya lo es la tesis ‘Sobre el concepto de “realismo” en la teoría literaria bajo un enfoque fenomenológico’ de María Teresa Vergara Téllez.

Conocer y participar directamente en el proceso editorial de un texto, desde verificar bibliografía

hasta la maquetación previa a la publicación del texto.

Metodología

Se recaba la bibliografía pertinente para trabajar dentro de la investigación, con el concepto de “realismo”, tanto de lo que ya conoce, como de todo aquello que permita ahondar en las posibilidades de esta idea.

Posteriormente, dentro de las lecturas se hace una revisión minuciosa del uso de la bibliografía, es decir, que todas las referencias del texto estén de acuerdo a los lineamientos de citación, según el sistema elegido.

Así como me di a la tarea de hacer otra lectura más a fondo y detenida, para revisar los conceptos, y observar dentro de ellos cómo es que se hace una serie de recuperación de ideas que, a su vez, van formando nuevas propuestas.

Al realizar la lectura del texto, también se hacen revisiones de este en cuanto corrección de estilo, tanto para evitar erratas, como para, finalmente, hacer un acompañamiento a la corrección de forma del texto ya previo a su publicación.

Resultados

A grandes rasgos, a lo que se ha llegado en esta investigación es que el “realismo” se revisa ya desde una distinción entre lo que significa que un texto sea “realista” como un subgénero, al referirse a que esté basado en la referencialidad como los textos periodísticos.

En la actualidad, se revisa como concepto para indagar sobre los aspectos “realistas” dentro de los textos de ficción, se habla de cuestionar qué tanto de “realismo” tienen las narrativas y cómo es que los autores logran esta distinción de “realidad” dentro de la ficción.

Para explicar lo dicho anteriormente, se recuperan ideas de teóricos como Gerigk y uno de los ejemplos que María Teresa Vergara recaba en su tesis de grado: *El capote* de Gógol, donde se desarrolla la distinción entre el texto mismo tanto “realista” como “romántico”. Aquí ya se advierte sobre lo “realista” dentro de un texto que es ficticio y se hace una acotación desde las herramientas narrativas que Gógol utiliza para crear una historia bastante verosímil dentro del marco de su narración.

Lo que hace Gógol es crear el mundo de su relato, en el cual inserta tintes narrativos de “realidad” que provocan que el lector confunda un poco la lógica del texto, el cual duda si es basado en una cotidianidad que es posible en el mundo real donde nos encontramos o si es “real” dentro de la construcción narrativa que hace el autor.

Dentro de la tesis se hace una revisión de cómo los autores se encargan de “...crear un mundo autorreferencial, congruente consigo mismo, accesible intersubjetivamente y, por lo tanto, verosímil, aun si se trata de un mundo sumamente alejado de las leyes que rigen la lógica de nuestra realidad.” [1].

Por otro lado, dentro de este mundo de las “letras” se encuentra una figura que revisa el texto y conversa con el autor para que ambos colaboren y construyan la mejor versión terminada del texto: el Editor. Es importante mencionar, que el nivel de involucramiento debe ser muy sutil, pues es fundamental que no se confunda con algún tipo de co-autoría.

Este fue un poco el papel que tomé dentro de esta investigación, Primero entré al texto como una lectora y estudiante de Literatura con la intención de comprender los conceptos que se me estaban planteando.

Cuando logré adentrarme más detenidamente como editora fue cuando me surgieron más dudas, pues

iniciar a cumplir esta función de edición puede ser un poco intimidante para una estudiante que está acostumbrada a ser la que “revisen”. Fue en esta parte que logré reconocer cuáles son los detalles en donde uno puede entrar y modificar; de igual manera, observé cómo hay algunos detalles que pueden parecer errores, pero que realmente son parte del proceso.

En cuanto a publicaciones, esta investigación ha dado como resultado una serie de proyectos colaborativos con otras alumnas, como lo es la tesis para el grado de licenciatura de María Teresa Vergara Téllez, mencionada anteriormente.

Así como artículos publicados en revistas tanto nacionales como internacionales, como es el caso de: “Sobre el arribo del concepto del mundo-de-la-vida (*Lebenswelt*) a los estudios literarios” publicada en *Open Insight*.

Discusiones y conclusiones

Lo que aquí se presentó es solamente una pequeña parte de todo el tiempo y trabajo que se le ha dedicado a esta investigación, y que ya es posible ver cómo se está abriendo un camino en esta línea sobre el concepto de “realismo”; aún queda mucho por explorar y hablar acerca del tema.

En cuanto al trabajo que realiza el editor, es posible concluir que he aprendido que este —como muchos— es un trabajo para el que no se está listo a menos que se practique mucho, al igual que en la escritura es algo a lo que se debe acostumbrar para agarrar cierta confianza con los textos, y con uno mismo.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Gerardo Argüelles, quien me ha permitido ver de cerca y ser parte de todas las etapas de este proyecto de investigación en el y otras

compañeras le han puesto tanto esfuerzo. Le agradezco por todo lo que he aprendido hasta ahora, y por adelantado de todo lo que me falta de aprender de él.

Referencias

[1] M. Vergara Téllez, “Sobre el concepto de “realismo” en la teoría literaria bajo un enfoque fenomenológico” [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro. 2021.

G. Argüelles Fernández, “Contra el realismo mimético: Sobre una hermenéutica literaria con sustento fenomenológico y poetológico”, *AN*, n.º 4, pp. 324-355, dic. 2020.

G. Argüelles Fernández, “Sobre el arribo del concepto del mundo-de-la-vida (*Lebenswelt*) a los estudios literarios”, *OI*, vol. 12, n.º 25, abr. 2021.

G. Argüelles Fernández; M. Vergara Téllez, “Aproximaciones críticas al realismo literario”, *ETL*, vol. 10, n.º 22, pp. 7-20, jul. 2021.

H.-J. Gerigk, “Ciencia Literaria ¿Qué es eso?”, *S*, vol. 12, n.º 24, pp. 9-43, 2016.

M. Vergara Téllez, “Sobre el concepto de “realismo” en la teoría literaria bajo un enfoque fenomenológico” [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro. 2021.

N, Gógol, *El capote*. Editorial del Cardo.

Disposición de antocianinas en zarzamoras y reversión de color.

Cárdenas Alvarado Aldo Alan (Autor, UAQ)

aldo222401@gmail.com

M en C Flores Sosa Ángel Ramon (Asesor, UAQ)

angel_ramon08@hotmail.com

Dr. Mercado Silva Edmundo

mercado501120@gmail.com

Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Universitario S/N, Cerro de las Campanas, C.P. 76010, Querétaro, México

Resumen

La reversión de color en la zarzamora es un desorden fisiológico que provoca el rechazo del fruto en los mercados de exportación. El mecanismo por el cual se presenta el cambio de color de la zarzamora de negro a rojo se desconoce, pero la literatura indica que la estructura intracelular en la que se almacenan las antocianinas podría estar relacionada. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue evaluar la asociación de la pérdida de los aglomerados de antocianinas con la reversión de color. En los frutos no revertidos se observó que las antocianinas se encuentran formando aglomerados esféricos, mientras que en los frutos revertidos las antocianinas se encuentran dispersas en el medio celular y los aglomerados observados fueron escasos. La fluorescencia que presentaron los aglomerados de antocianinas de los frutos no revertidos fue mayor en comparación con la fluorescencia mostrada en las antocianinas dispersas de los frutos revertidos. Asimismo, al inducir la ruptura de los aglomerados

de antocianinas por medio de la sonicación, se observó una disminución en su espectro de emisión de fluorescencia. Los resultados obtenidos sugieren que el cambio de color que se observa en los frutos de zarzamora revertidos está asociado con la pérdida de aglomerados de antocianinas.

Abstract

Blackberry color reversion is a physiological disorder that causes rejection of the fruit in export markets. The mechanism by which the blackberry color change occurs from black to red is unknown, but the literature indicates that the intracellular structure in which anthocyanins are stored could be related. For this reason, the objective of the present study was to evaluate the association of the loss of anthocyanin agglomerates with color reversion. In non-reverted fruits, anthocyanins are found to form spherical agglomerates, while in reverted fruits, anthocyanins are dispersed in the cell medium and the observed agglomerates are scarce. The fluorescence presented by the anthocyanin agglomerates of the non-reverted fruits was higher compared to the fluorescence shown in the dispersed anthocyanins of the reverted fruits. Likewise, by inducing the breakdown of anthocyanin agglomerates by means of sonication, there is a decrease in their fluorescence emission spectrum. The results suggest that the color change seen in reversed blackberry fruits is associated with the loss of anthocyanin clumps.

Palabras clave.

Protoplastos, antocianinas, microfotografía, espectroscopia.

Keywords.

Protoplasts, anthocyanins, photomicrograph, spectroscopy.

1. Introducción.

México es el principal productor y exportador de zarzamora a nivel mundial, siendo Michoacán el estado que produce alrededor del 95% del volumen

total, lo cual representa el 98% del valor de la producción. Las zarzamoras son plantas fructíferas del género *Rubus*, cuyo fruto consiste en un receptáculo con una agrupación de drupas (Clark et al., 2007). El fruto durante su desarrollo en planta presenta distintos cambios de color. Inicialmente es de color verde, posteriormente, conforme va madurando, adquiere una coloración roja y finalmente es de color negro. El momento de su cosecha ocurre cuando presenta una coloración completamente negra, no obstante, durante el manejo postcosecha se torna nuevamente rojo, a este efecto se le conoce como reversión de color que se identifica como un defecto que provoca el rechazo de los frutos en los mercados de exportación. Este fenómeno se ha asociado con una disminución en la concentración de antocianina, pérdida de la integridad celular, disminución de la firmeza y del pH (Edgley et al., 2019); sin embargo, se desconocen los mecanismos específicos que lo causan, aunque en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Postcosecha de Frutas y Hortalizas de la UAQ en investigaciones previas se ha determinado que el cambio de color de negro a rojo no se debe a la disminución del contenido de antocianinas, sino que probablemente se debe a la ruptura de la estructura celular en la cual se almacenan dichos pigmentos.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la disposición celular de las antocianinas en la coloración que proporcionan.

Objetivos

Objetivo general.

Evaluar el efecto de la disposición de las antocianinas como un factor de la reversión de color de las zarzamoras.

Objetivos específicos.

- Estandarizar una metodología para la obtención de protoplastos de zarzamora.

- Observar por microscopía óptica las estructuras de antocianinas en zarzamoras revertidas y no revertidas.
- Evaluar la fluorescencia de los protoplastos obtenidos de zarzamoras revertidas y no revertidas.
- Confirmar que la ruptura de los aglomerados de antocianinas modifica su coloración.

2. Metodología

2.1 Obtención de protoplastos de la zarzamora

A 1 g de drupas de zarzamora (sin semilla) se agregó 4 mL de medio de digestión [manitol 0.7 M, Mes-NaOH 50 mM (pH 5.5), MgCl₂ 5 mM, celulasa al 2 % (m/v) y pectinasa al 1 % (m/v)] y se incubó en un agitador orbital durante 2 h a 30 °C. Posterior del tiempo de incubación, el tejido digerido se filtró con manta de cielo y se lavó con aproximadamente 25 mL de solución amortiguadora de resuspensión [manitol 0.5 M, Tris-HCl 25 mM y EGTA 5 mM (pH 8.0)]. La solución se dejó reposar durante 24 h a temperatura de refrigeración para la sedimentación de los protoplastos.

2.2 Análisis microestructural de los aglomerados de antocianinas

Para evaluar si la disposición de las antocianinas cambia en los frutos revertidos en comparación con los no revertidos se analizaron los protoplastos obtenidos por microscopía óptica. Una alícuota de los protoplastos se colocó en un portaobjetos y se observaron con un microscopio óptico (VELAB, Microscopes INC) a 10 y 40X.

2.2 Evaluación de fluorescencia de protoplastos

2.2.1 Identificación de la longitud de onda de excitación

Ciento cincuenta microlitros de protoplastos se colocaron en una placa de 96 pozos (Greiner CELLSTARS®, bottom black); se excitaron a 300, 350, 400, 450 y 500 nm, y se realizó un barrido de

emisión de fluorescencia en un intervalo de 300 a 800 nm en un varioskan (Thermo Scientific®).

2.2.2 Cambios en la emisión de fluorescencia de antocianinas en frutos con reversión de color

Los protoplastos obtenidos de frutos revertidos y no revertidos (150 μ L) se colocaron por triplicado en una placa de 96 pozos. Se excitaron a la longitud de onda en donde se encontró la mayor emisión, y se realizó un barrido de fluorescencia de 400 a 800 nm en un Varioskan.

2.2.3 Efecto de la ruptura de protoplastos en la fluorescencia de las antocianinas

Los protoplastos de los frutos no revertidos se colocaron en un baño en sonicación durante 3 min. Posterior a este tratamiento se analizó la fluorescencia de los protoplastos siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 2.2.2.

3. Resultados

3.1 Obtención de protoplastos

Para estandarizar la metodología para la obtención de protoplastos se probaron distintos tiempos de incubación de la digestión enzimática. Con la digestión durante 1 h no se observó el precipitado característico de los protoplastos; sin embargo, cuando la digestión enzimática se realizó por 2 h se obtuvo un precipitado con características visuales comparables a lo reportado en la literatura



Figura 1. Protoplastos obtenidos.

3.2 Observaciones microscópicas de los protoplastos

Para comprobar que con el método empleado se obtuvieron protoplastos, se realizaron observaciones en microscopía óptica de los precipitados de la digestión enzimática. Con base en la morfología descrita en la literatura se sugiere que con la digestión enzimática durante 2 h se obtuvieron protoplastos.

Los protoplastos de los frutos no revertidos (Fig.2A) presentan abundantes cuerpos esféricos morados-negros, que debido a su coloración probablemente estén formados por antocianinas; por el contrario, los protoplastos de los frutos revertidos presentaron una coloración roja-café homogénea, en los cuales no se observan los aglomerados de antocianinas o la cantidad de estos fue escasa (Fig. 2B). Estas observaciones sugieren que en la reversión de color la ruptura o pérdida de aglomerados de antocianinas es un factor que podría causar el cambio de color.

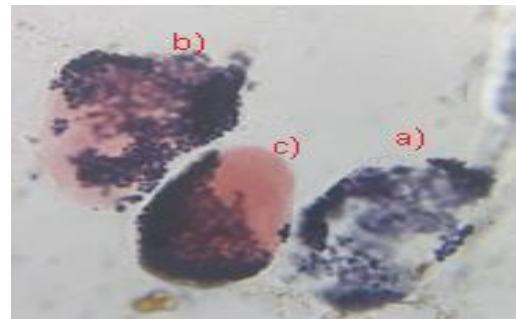


Figura 2A. Microfotografía de protoplastos de zarzamoras.

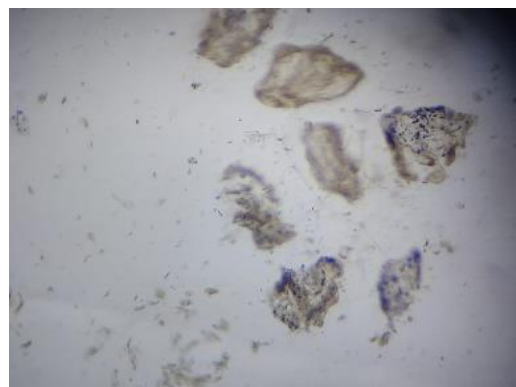


Figura 2B. Microfotografía de protoplastos de zarzamoras revertidas

Análisis de fluorescencia de protoplastos

Para evaluar que la ruptura de los aglomerados genera cambios de color en las antocianinas se analizó la fluorescencia de los protoplastos. Primeramente, se determinó la longitud de onda de excitación para obtener la máxima emisión de fluorescencia de las antocianinas.

Se analizó la emisión aplicando longitudes de onda de 300 a 500 nm, con intervalos de 50 nm entre cada análisis.

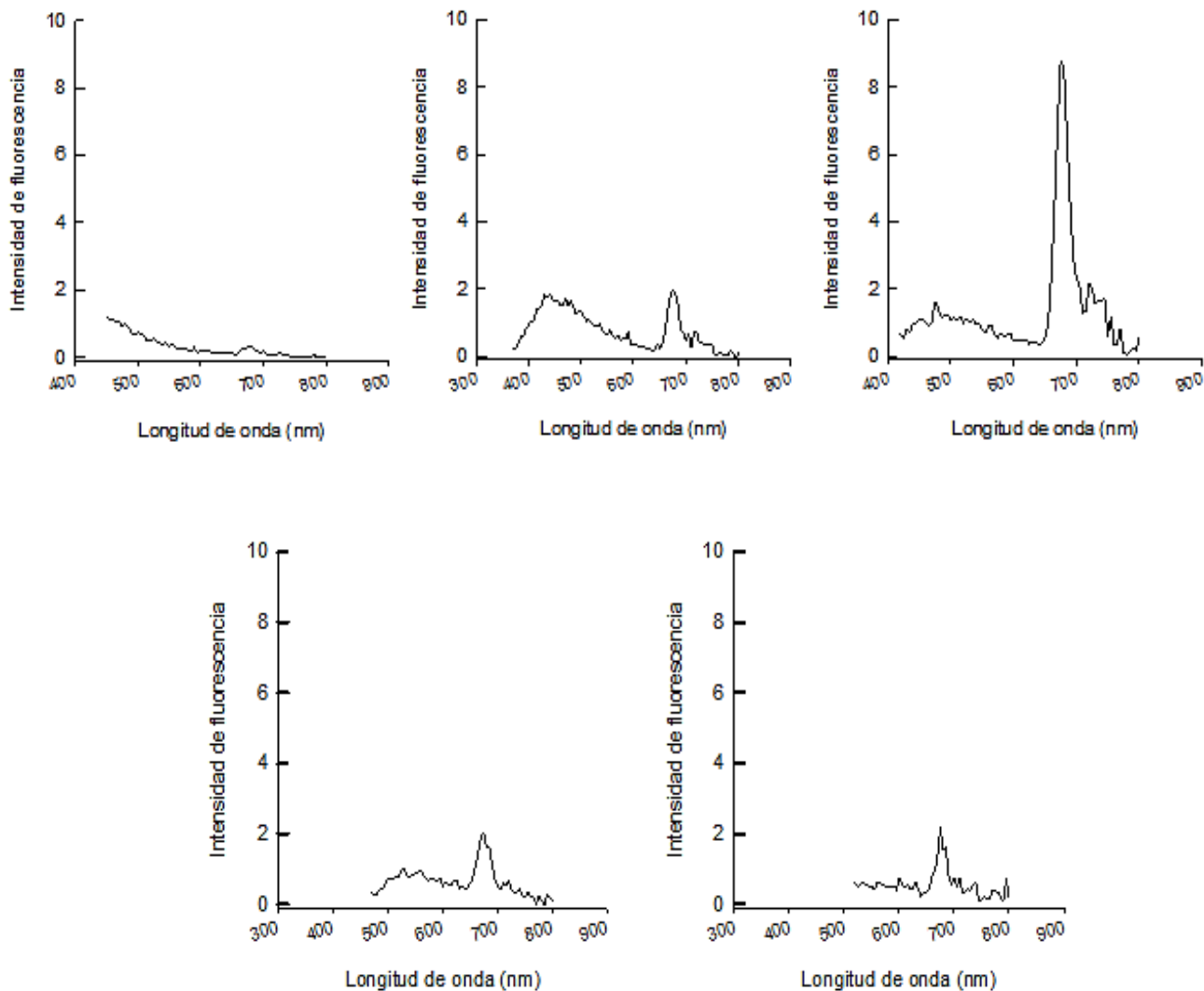


Figura 3. Análisis espectroscópico de fluorescencia con diferentes energías de excitación.

Con la excitación a 400 nm se observó la máxima emisión de las antocianinas, observándose un pico máximo de emisión a 680 nm (Fig. 3). Debido a esto, esta longitud de onda de excitación se seleccionó en los siguientes análisis. El análisis comparativo de la fluorescencia de los protoplastos reveló que los protoplastos obtenidos de frutos no revertidos

mostraron mayor intensidad en la emisión de fluorescencia que los obtenidos de frutos revertidos. Para comprobar que la ruptura de los aglomerados de antocianinas causa esta reducción en la intensidad de la fluorescencia se sonicaron los protoplastos de frutos no revertidos. Se observó que el espectro de emisión de los protoplastos sonicados fue comparable

con el de los frutos revertidos. Esto confirma que al romper la estructura intracelular de la zarzamora se modifica la fluorescencia de emisión de las antocianinas, y por tanto se altera la coloración que aportan al tejido del fruto.

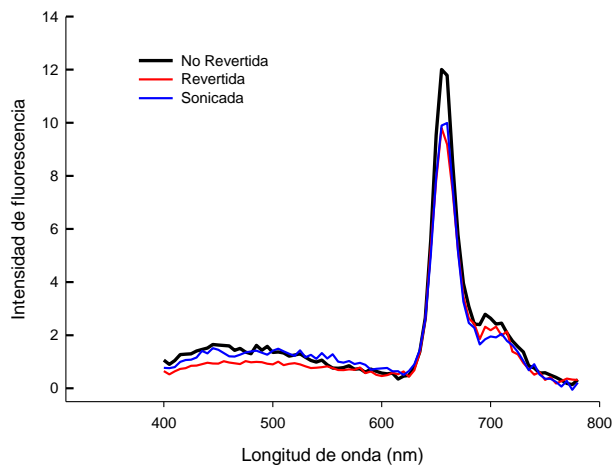


Figura 4. Análisis espectroscópico de fluorescencia de la disposición de antocianinas.

Discusión y conclusiones

La reversión de color (RDR) es un defecto poscosecha generalmente asociado a una disminución en contenido de antocianinas, no obstante, estudios recientes han revelado que probablemente este fenómeno se debe a cambios en la estructura intracelular donde el fruto almacena las antocianinas. En el presente estudio la evidencia de las observaciones en microscopía óptica mostró que las zarzadoras almacenan las antocianinas en pequeños cuerpos esféricos con una coloración morado-negro intensa. En la literatura estas aglomeraciones son conocidos como Inclusiones Vacuolares de Antocianinas (IVA) o antocianoplastos (Pecket y Small, 1980; Markham et al., 2000). En los protoplastos de los frutos revertidos estas aglomeraciones no fueron observadas, o estaban presentes en escasa cantidad.

En la literatura se ha reportado que células de maíz cambian de color rojo a negro conforme incrementa la formación de aglomerados de antocianinas (Irani & Grotewold, 2005). Esto se debe a que las antocianinas

en estas estructuras se encuentran interaccionando entre sí (autoasociación) o con otros compuestos (copigmentación) lo que provoca un efecto batocrómico y/o hiperocrómico en su espectro de absorción y emisión, y por lo tanto modifica la coloración que proporcionan al tejido donde se encuentran (Trouillas et al., 2016). Esto indica que el cambio de color de negro a rojo presente en la reversión de color posiblemente es debido a la pérdida de las estructuras donde se almacenan las antocianinas.

Lo anterior se confirmó al observar disminución de la fluorescencia en los protoplastos de frutos revertidos y en los sometidos al tratamiento de sonicación, en comparación con los de frutos no revertidos. Se ha reportado que al perderse los aglomerados de antocianinas se modifican las interacciones intermoleculares de las antocianinas, provocando decremento en la emisión de las antocianinas (Chanoca et al., 2015; Kallam et al., 2017). Por lo que la reversión de color podría presentarse como consecuencias de dichas interacciones intermoleculares.

Los resultados del presente estudio nos permiten asociar que la disposición celular de las antocianinas de la zarzamora son un factor determinante en el desorden de reversión de color.

Agradecimientos

Agradecimientos especiales a los integrantes del laboratorio de poscosecha de la facultad de química de la Universidad Autónoma de Querétaro por abrirme las puertas para aprender y acercarme a las ciencias químicas de alimentos de una manera diferente a la enseñanza convencional a un laboratorio académico.

Referencias bibliográficas

Chanoca, A., Kovinich, N., Burkel, B., Stecha, S., Bohorquez-Restrepo, A., Ueda, T., Eliceiri, K. W., Grotewold, E., & Otegui, M. S. 2015. Anthocyanin Vacuolar Inclusions Form by a Microautophagy

- Mechanism. *The Plant Cell*, 27(9), 2545–2559. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00589> [consultado en julio 2021].
- Clark, J. R., Stafne, E. T., Hall, H. K., & Finn, C. E. (2007). Blackberry Breeding and Genetics. *Plant Breeding Reviews*, pp 119–144. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/9780470168035.ch2> [consultado en julio 2021].
- Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B., & Lowe, K. C. (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 23(2), pp 131–171. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.09.008> [consultado en julio 2021].
- Fan-Chiang, H.-J., & Wrolstad, R. E. (2006). Anthocyanin Pigment Composition of Blackberries. *Journal of Food Science*, 70(3), pp 198–202. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07125.x> [consultado en julio 2021].
- Flores-Sosa, A. R., Soto-Magaña, D., Gonzalez-de la Vara, L. E., Sanchez-Segura, L., Bah, M., Rivera-Pastrana, D. M., Nava, G. M., & Mercado-Silva, E. M. (2021). Red drupelet reversion in blackberries caused by mechanical damage is not linked to a reduction in anthocyanin content. *Postharvest Biology and Technology*, 180, pp 111–118. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111618> [consultado en Julio 2021].
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (1), pp 1–12. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00> [consultado en Julio 2021].
- Irani, N. G., & Grotewold, E. 2005. *BMC Plant Biology*, 5(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-7> [consultado en julio 2021].
- Kallam, K., Appelhagen, I., Luo, J., Albert, N., Zhang, H., Derolles, S., Hill, L., Findlay, K., Andersen, Ø. M., Davies, K., & Martin, C. 2017. Aromatic Decoration Determines the Formation of Anthocyanic Vacuolar Inclusions. *Current Biology*, 27(7), 945–957. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.027> [consultado en julio 2021].
- Kim, M.J., Lee, M.Y., Shon, J.C., Kwon, Y.S., Liu, K.-H., Lee, C.H., Ku, K.-M., 2019. Untargeted and targeted metabolomics analyses of blackberries – understanding postharvest red drupelet disorder. *Food Chem.* 300, pp 125-169. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125169> [consultado en julio 2021].
- Markham, K. R., Gould, K. S., Winefield, C. S., Mitchell, K. A., Bloor, S. J., & Boase, M. R. 2000. Anthocyanic vacuolar inclusions — their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry*, 55(4), 327–336. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00246-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00246-6) [consultado en julio 2021].
- Pecket, R. C., & Small, C. J. 1980. Occurrence, location and development of anthocyanoplasts. *Phytochemistry*, 19(12), 2571–2576. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)83921-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)83921-7) [consultado en julio 2021].
- Pérez - Pérez, G.A., Fabela-Gallegos, M.J., Vázquez-Barrios, M.E., Rivera-Pastrana, D.M., Palma-Tirado, L., Mercado-Silva, E., Escalona, V., 2018. Effect of the transport vibration on the generation of the color reversion in blackberry fruit. *Acta Hort.* pp 129–136. Disponible en: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2018.1194.187>. [consultado en julio 2021].
- Perkins-Veazie, P., 2017. Postharvest storage and transport of blackberries. In: Hall, H., Funt, R. (Eds.), *Blackberries and Their Hybrids*. CABI, United Kingdom, pp. 266–282. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1079/9781780646688.0266> [consultado en julio 2021].
- Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. 2016. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chemical Reviews*, 116(9), 4937–4982. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00507> [consultado en julio 2021].

Efecto de diferentes concentraciones fisiológicas de fructosa en la lipogénesis de células hepáticas HepG2.

Francisco Campos³, Arline Castillejos⁴, José E. Godoy⁵, Joseph Castruita^{3*}.

1 Doctorado en ciencias biomédicas, facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro.

1 Facultad de ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro.

1 Facultad de química, Universidad Autónoma de Querétaro.

*Correspondencia: jcastruita28@alumnos.uaq.mx; Tel. 4428317886.

Resumen

En la actualidad ha habido un incremento en el consumo de fructosa, lo que se relaciona a un incremento en enfermedades como lo son el trastorno metabólico, obesidad, hígado graso no alcohólico, entre otras. El consumo de fructosa se relaciona con el aumento de lípidos atribuidos a la lipogénesis *de Novo*. El proyecto tiene como objetivo visualizar de manera gráfica como es que el consumo de fructosa tiene relación con la lipogénesis *de Novo*, utilizando cultivos de HepG2 y la técnica Rojo Oleoso para así teñir los lípidos generados después tratar al cultivo con glucosa o fructosa, sometiéndolas a diferentes concentraciones y en tratamientos de 24 y 72 horas.

En los resultados pudimos observar cómo es que en los cultivos tratados con fructosa había un mayor aumento de coloración roja en las células, comparado con los cultivos que fueron tratados con glucosa, mostrando así una relación entre el consumo de fructosa y la síntesis de lípidos.

Palabras clave. Fructosa, lipogénesis *de Novo*, rojo oleoso, lípidos.

Abstract

Currently there has been an increase in fructose consumption, which is related to an increase in diseases such as metabolic disorders, obesity, non-alcoholic fatty liver disease, among others. Fructose consumption is related to the increase of lipids attributed to *de Novo* lipogenesis. The project aims to visualize graphically how fructose consumption is related to *de Novo* lipogenesis, using HepG2 cultures and the Oil Red technique to stain the lipids generated after treating the culture with glucose or fructose, subjecting them to different concentrations and in treatments of 24 and 72 hours. In the results we could observe that in the cultures treated with fructose there was a greater increase of red coloration in the cells, compared to the cultures that were treated with glucose, showing a relationship between fructose consumption and lipid synthesis.

Keywords. Fructose, *de Novo* lipogenesis, oil red, lipids

Introducción

Los carbohidratos son parte importante de nuestra dieta diaria, pues tienen como función primordial proporcionarnos energía para nuestras tareas a lo

largo del día, esto a través de la glucosa y otros monosacáridos. Un carbohidrato es una molécula orgánica conformado principalmente por carbono, hidrogeno y oxígeno. El principal carbohidrato en la dieta es la glucosa, y en menor medida la fructosa. (Mollinedo, M., & Benavides, G., 2014).

En los últimos años el consumo de azúcares ha aumentado, la producción de los alimentos endulzados con edulcorantes distintos a las Sacarosa (la cual se compone de una molécula de glucosa y otra de fructosa) o azúcar blanca ha aumentado, por lo tanto, su consumo ha crecido del mismo modo, ya sea por motivos de salud o mejorar la dieta.

Una de las alternativas más usadas es el jarabe de maíz alto en fructosa, pues tiene un costo más bajo y un menor efecto sobre las concentraciones de la glucosa en la sangre, sin embargo, investigaciones recientes han encontrado que relaciona el jarabe de maíz alto en fructosa con diferentes enfermedades, como la obesidad, diabetes, síndrome metabólico, entre otras (Mollinedo, M. & Benavides, G., 2014).

La introducción de la fructosa como sustituto del azúcar fue en los años 70, bajo la premisa de tener un bajo efecto en el azúcar de la sangre e insulina, añadiendo también que no tenía impacto sobre la síntesis de ácidos grasos y triacilglicéridos. La principal fuente de fructosa en los alimentos procesados es el ya mencionado jarabe de maíz alto en fructosa, el cual es preparado a base de almidón de maíz. (Esquivel, V., & Gómez, G, 2007).

La fructosa consumida en la dieta se absorbe en la última parte del duodeno, entre el intestino delgado y el estómago, donde se absorbe mediante el transportador membranar GLUT5, para después pasar a la sangre por el mismo transportador GLUT5. A diferencia de la glucosa, la fructosa no necesita de moléculas intermedias como ATP o sodio para poder ser transportada, además de que la absorción de la fructosa es más lenta que la glucosa. La fructosa puede ser metabolizada en el tejido muscular y en el riñón, sin embargo, a diferencia de la glucosa que es metabolizada por diversos organismos. (Riveros, M., et Al 2014). Después de la absorción y la difusión de la fructosa por la sangre, el hígado capta la fructosa a

través del transportador GLUT2, dentro del hígado la enzima fructoquinasa la convierte en fructosa-1-fosfato, a continuación, esta molécula se rompe en dos gracias a una aldolasa B, dando resultado una molécula de gliceraldehído y otra de dihidroxiacetona-fosfato, convirtiéndose los dos metabolitos por vías diferentes a gliceraldehído-3-fosfato, así entrando a la vía de la glucolisis, teniendo el gliceraldehído-3-fosfato tres alternativas, convertirse en piruvato y después a acetil-CoA, la cual a su vez, puede según el estado energético puede ser oxidada por el ciclo de Krebs o puede ser almacenada junto con triacilglicerole mediante la lipogénesis *de Novo* (Radax, J., 2019. Zago. L., et Al. 2017., Esquivel, V., et Al., 2007., Riveros, M., et Al 2014). La mayor diferencia entre la metabolización de la fructosa y la glucosa es que la metabolización de la fructosa es realizada sin ningún control. La glucosa sigue la vía del glucolisis, la cual es controlada por la glucoquinasa, esta es inhibida cuando el citrato se acumula ya que una enzima intermediaria del ciclo de Krebs es inhibida por la acumulación de ATP generado por la fosforilación oxidativa. Es por eso que la glucosa tiene un punto de regulación, la fructosa al pasar directamente a la ruta glucolítica es regulada por ninguna enzima (Esquivel, V., & Gómez, G, 2007., Loza-Medrano, S., et Al., 2018., Riveros, M., et Al 2014)

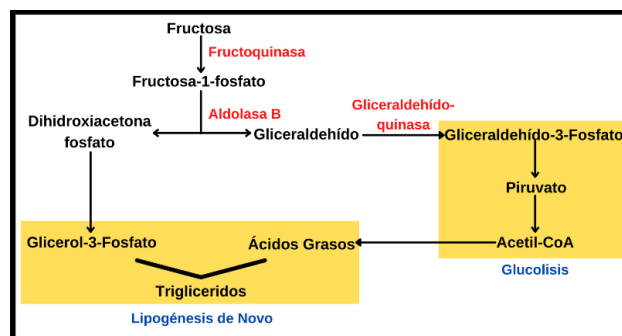


Figura 1. Metabolismo de la Fructosa. Modificado de Esquivel, V., & Gómez, G., 2007.

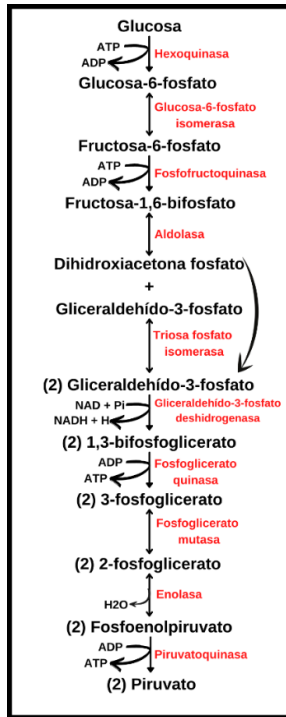


Figura 2. Metabolismo de la Glucosa. Modificado de Nelson, D. L., et. Al. 1970.

Como se nombró con anterioridad, la fructosa consumida contribuye a la generación de ácidos grasos, por medio de la lipogénesis *de Novo*. El acetil-CoA obtenido de la fructosa nos proporciona los carbonos para la síntesis *de Novo* de ácidos grasos de cadena larga, que luego serán esterificados para formar triacilglicéridos. Al no tener regulación a la fructosa en la vía glucolítica podemos decir que entre más consumo de fructosa haya en el organismo mayor será la generación de lípidos en el hígado. (Esquivel, V., & Gómez, G, 2007)

Objetivo

Visualizar de manera gráfica la producción de lípidos en medios de cultivo tratados con glucosa y fructosa, para establecer una relación entre el consumo de fructosa y la lipogénesis *de Novo*.

Metodología

Para poder observar la relación entre la metabolización de la fructosa y la lipogénesis usaremos la línea celular HepG2. Donde utilizamos

un medio de cultivo con 4.5 g/L de DMEM (Gibco, D6429); suero fetal bovino (Gibco, 26140079); penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich, P4333); cajas de Petri (Santa Cruz). Posteriormente se añadieron diferentes tratamientos con diferentes concentraciones de fructosa (Sigma-Aldrich, F3510-100G), 25 y 5.5 mM, y glucosa (Sigma-Aldrich, G721-100G), colocando los tratamientos por 24 h y 72 h. Pasado el tiempo de tratamiento retiramos el medio y añadimos formalina al 3.7%, seguido de 1 mL de colorante rojo oleoso (Sigma-Aldrich, O0625-100G) por 20 minutos, para después retirar el rojo oleoso haciendo un lavado con agua destilada y por último se deja secar.

Resultados

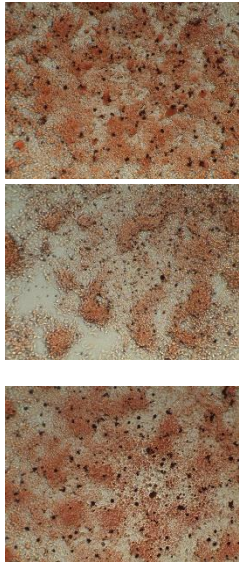
Al dejar reposar cada tratamiento se retiró el medio, añadiendo formalina al 3.7% y 1 mL de colorante rojo oleoso preparado previamente. Se observó que el cultivo tratado con fructosa tuvo una mayor tinción en los tratamientos.

Nuestros resultados concuerdan con lo dicho en Todoric, J., Et. Al. (2020), pues la fructosa estimula la lipogénesis *de Novo*, donde además mencionan que induce hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica y la generación de hepatocarcinoma.

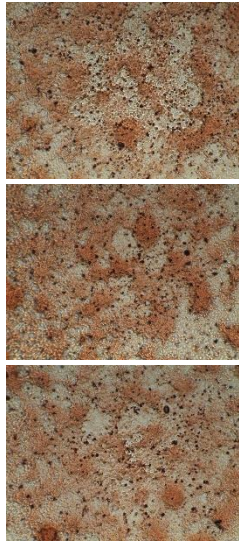
Cómo se menciona en Horst, K. & Serlie, M. (2017), el metabolismo de la fructosa genera metabolitos que son usados con sustrato en la lipogénesis *de Novo*, sin embargo, el porcentaje de fructosa convertida en lípidos es bajo entre 4-6 h, habiendo consecuencias a largo plazo.

En el tratamiento de 5.5 mM de glucosa y fructosa tratado por 72 h se nota una diferencia muy grande de tinción, donde el tratamiento de glucosa tiene muy pocas zonas teñidas a comparación del tratamiento de fructosa, mostrando así que con poca glucosa a largo plazo se estimula muy poco la lipogénesis *de Novo*, por el contrario, poca cantidad de fructosa a largo plazo si estimula la lipogénesis *de Novo*.

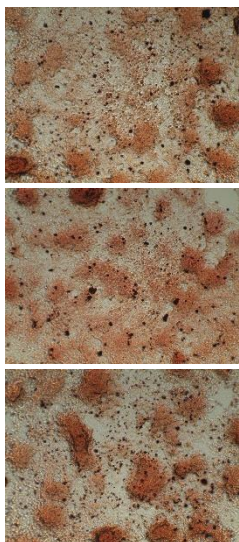
Tratamiento 1 (25 mM de glucosa)



Tratamiento 2 (25 mM de fructosa)



Tratamiento 3 (5.5 mM de glucosa)



Tratamiento 4 (5.5 mM de fructosa)

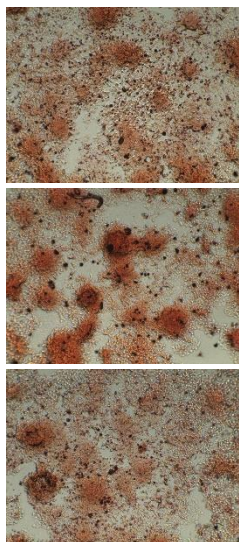
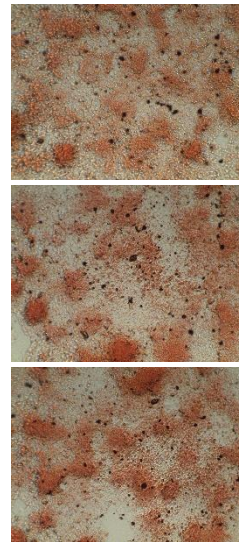
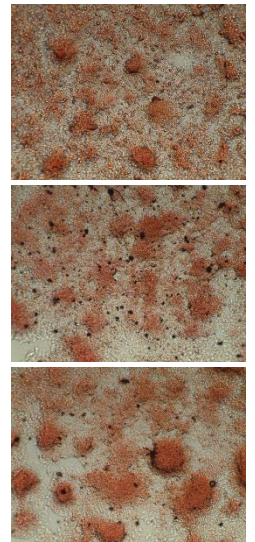


Figura 3. Cultivos de células tratados por 24 h.

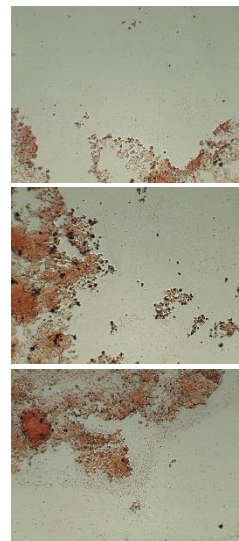
Tratamiento 1 (25 mM de glucosa)



Tratamiento 2 (25 mM de fructosa)



Tratamiento 3 (5.5 mM de glucosa)



Tratamiento 4 (5.5 mM de fructosa)

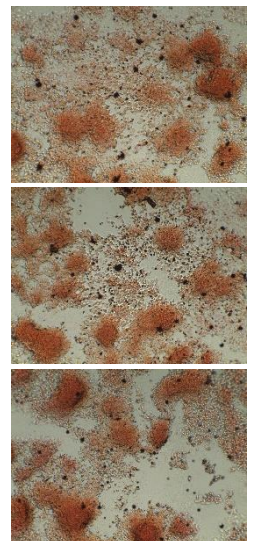


Figura 4. Cultivos de células tratados por 72 h.

Discusión y conclusión

El efecto de la fructosa en el organismo es a largo plazo poco benéfico a la salud, pues a comparación de la glucosa, a concentraciones bajas genera más lípidos, pues el consumo de la fructosa estimula a la

lipogénesis *de Novo*, aportándole metabolitos intermediarios de la fructolisis usados para la síntesis de ácidos grasos en la lipogénesis *de Novo*, convirtiéndose después en lipoproteínas de muy baja densidad, las cuales a concentraciones muy altas pueden ocasionar diversas enfermedades, además de que el consumo de fructosa se asocia a otras enfermedades como trastorno metabólico, hígado graso no alcohólico, cáncer, diabetes, entre otras. La fructolisis a diferencia de la glucolisis, no es medida por ningún inhibidor enzimático, por lo que nunca se deja de metabolizar a la fructosa, trayendo a largo plazo pocos beneficios.

Agradecimientos

Agradezco a la Dirección de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Querétaro, por abrir programas como estos, los cuales nos incentivan a entrar en el mundo de la investigación y nos ayudan a conocer las diferentes áreas de estas mismas, también quiero agradecer al doctorante Francisco Campos Maldonado, quien fue nuestro anfitrión y nos brindó todos los conocimientos necesarios para llevar a cabo este trabajo de investigación, además de guiarnos y acompañarnos en el proceso.

Referencias bibliográficas

M. A. Mollinedo, G. L. Benavides. "Carbohidratos". Rev. Act. Clin. Med. Vol. 41, pp. 2133-2136. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014000200002&lng=es&nrm=iso [Consultado en 2021].

V. Esquivel-Solís and G. Gómez-Salas. "Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa" Acta médica costarricense. Vol. 49, Issue 4, pp. 198-202. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-60022007000400005&lng=en&nrm=iso [Consultado en 2021].

M. J. Riveros, A. Parada, P. Pettinelli. "Fructose consumption and its health implications: fructose malabsorption and nonalcoholic fatty liver disease" Nutrición Hospitalaria. Vol. 29, Issue 3, pp. 491-499. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.3305/NH.2014.29.3.7178> [Consultado en 2021].

J. Radax. "Dulce veneno Contribución de la fructosa a los niveles plasmáticos del ácido úrico y su importancia para el desarrollo del síndrome metabólico". ATENEO, vol. 18, Issue 2, pp. 61-72. Disponible en: <https://www.colegiomedicosazuay.ec/ojs/index.php/ateneo/article/view/49> [Consultado en 2021].

L. Zago, B. Zugasti, A. Zuleta, et. Al. "Análisis crítico del consumo de fructosa parte 1. La fructosa en la alimentación. aspectos metabólicos". Nutrición. Vol. 18, Issue 1, pp. 26-36. Disponible en: http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_18/num_1/RSAN_18_1_26.pdf [Consultado en 2021].

S. S. Loza-Medrano, L. A. Baiza-Gutman, M. A. Ibáñez-Hernández, et. Al. "Alteraciones moleculares inducidas por fructosa y su impacto en las enfermedades metabólicas". Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social. Vol. 56, Issue 5, pp. 491-509. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=457758201010> [Consultado en 2021]

D.L. Nelson, C.M. Cuchillo, A. L. Lehninger, and M. M. Cox. Lehninger: Principios de Bioquímica. Ed. Omega. Barcelona, 2005.

J. Todoric, G. Di Caro, S. Reibe, et. Al. "Fructose stimulated de novo lipogenesis is promoted by inflammation". Nature Metabolism 2, pp. 1034-1045. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0261-2> [Consultado en 2021].

Ter Horst KW, Serlie MJ. Fructose Consumption, Lipogenesis, and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Nutrients. Vol. 9, Issue 9, pp. 981. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28878197/> [Consultado en 2021].

Análisis del perfil de compuestos de orujo de uva tratado con DIC y su efecto antiobesogénico

Chávez-Arias, J.^{1,*}, Martínez-Meza, Y², Reynoso-Camacho R^{2,1}
Universidad Autónoma de Querétaro / Ingeniería en Biotecnología, ² Universidad Autónoma de Querétaro / Posgrado en Ciencias de los Alimentos. *joaquin.ray128@gmail.com

Abstract

The grape pomace is a by-product rich in extractable (EPP) and non-extractable (NEPP) polyphenols, both related to antiobesogenic effects and their complications. However, these compounds have low bioavailability due to their structures and interaction with the matrix. Therefore, the objective of this work was to increase the bioavailability of phenolic compounds using instant controlled pressure drop (DIC) to improve the beneficial effect on health. According to the results, the application of DIC increased the fraction of EPP, attributed to the direct release of the matrix or to the degradation products of more complex structures such as proanthocyanidins. Animals fed with grape pomace treated or untreated with DIC showed similar effects to healthy animals, despite the increase in total phenolic compounds and hydrolysis of complex structures such as NEPPs. Therefore, grape pomace is an alternative for the control of obesity and insulin resistance. However, the application of DIC, at 0.2 and 0.4 MPa with 60 and 120 s respectively, is not a strategy to improve the benefits of this by-product.

Keywords

Grape pomace, extractable polyphenols, controlled instantaneous decompression (DIC), anti-obesogenic effects.

Resumen

El orujo es un subproducto rico en polifenoles extraíbles (EPP) y no extraíbles (NEPP), ambos relacionados con efectos antiobesogénicos y sus complicaciones. Sin embargo, estos compuestos presentan una baja biodisponibilidad debido a sus estructuras y la interacción con la matriz. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue incrementar la biodisponibilidad de compuestos fenólicos utilizando la descompresión instantánea controlada (DIC) para mejorar el efecto benéfico en la salud. De acuerdo a los resultados, la aplicación de DIC incrementó la fracción de EPP, atribuido a la liberación directa de la matriz o a los productos de degradación de estructuras más complejas como las proantocianidinas. Los animales alimentados con orujo de uva tratado o sin tratar con DIC presentaron efectos similares a los animales sanos, a pesar del aumento de compuestos fenólicos totales e hidrólisis de estructuras complejas como los NEPP. Por lo tanto, el orujo de uva es una alternativa para el control de obesidad y la resistencia a insulina. Sin embargo, la aplicación de DIC, a 0.2 y 0.4 MPa con 60 y 120 s respectivamente, no es una estrategia para mejorar los beneficios de este subproducto.

Palabras clave

Orujo de uva, polifenoles extraíbles, descompresión instantánea controlada, efectos antiobesogénicos.

Introducción

La metabolómica es una disciplina enfocada en el análisis y estudio de metabolitos. El análisis de éstos tiene como objetivo obtener una visión completa de un fenotipo metabólico de la muestra, células u órganos a analizar (Begou, et al., 2017). En combinación con la nutrición, la metabolómica pretende integrar los resultados para obtener una visión global que permita mejorar la salud (Capozzi, & Bordoni, 2013). En los últimos años, se ha incrementado el tema de “El vino y la relación con la

Salud”, donde cada vez son más los estudios y las contribuciones científicas que se realizan sobre su consumo o con el aprovechamiento del orujo de uva, el cual es uno de los subproductos generados por la industria vitivinícola (Diamantidou, et al., 2018).

Los componentes más importantes del orujo de uva, debido a sus efectos a la salud, son los compuestos fenólicos. Dentro de los compuestos fenólicos extraíbles (EPP) destacan los ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos, flavonoides como flavonoles y flavanoles y antocianinas pertenecientes a los estilbenos (Beres, et al., 2017). De manera adicional también contiene una alta cantidad de polifenoles no extraíbles (NEPP). La combinación de ambas clases de polifenoles en una sola matriz y la aportación de fibra dietética, son características particulares del orujo de uva (Pérez-Jiménez et al., 2013). Se ha reportado que los EPP previenen diabetes y esteatosis hepática (Van Hul et al., 2018). Por otro lado, los NEPP no han sido evaluados de forma independiente, sin embargo, se ha reportado que la matriz completa del orujo de uva incluida la fracción de NEPP, mejora la resistencia a insulina, el peso corporal y la esteatosis hepática. Muñoz-González y colaboradores (2019), han sugerido que los efectos benéficos de los polifenoles, pueden provenir principalmente de los productos generados por la microbiota del organismo, por lo que, el consumo de orujo de uva podría presentar más ventajas en comparación con la administración de extractos de compuestos.

Estudios han demostrado que la biodisponibilidad de estos compuestos es baja, por lo que se han propuesto alternativas que mejoren las actividades de estos para su aprovechamiento más eficiente. Una de ellas es la utilización de la descompresión instantánea controlada (DIC) la cual es una tecnología capaz de modificar la estructura de las matrices alimentarias permitiendo el mejoramiento de la liberación de los compuestos bioactivos debido al incremento de la porosidad de la matriz permitiendo la liberación de estos (Hamoud-Agha et al., 2019) y, por ende, la

bioaccesibilidad de los NEPP y su posible fermentación en el colón (Alexandre et al., 2017) y, por lo tanto, sus beneficios a la salud. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es el de incrementar la bioaccesibilidad de los EPP y NEPP utilizando DIC como tecnología alternativa para mejorar su efecto benéfico a la salud.

Objetivos Generales/Específicos

Incrementar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos de orujo de uva. Determinar los efectos de orujo de uva tratado con DIC en modelos de ratas.

Metodología

Material Vegetal

Se obtuvo orujo de uva de la variedad Malbec de viñedos la Redonda, ubicado en Querétaro, México. Una vez recolectado se guardó en recipientes herméticos a -20 °C hasta su análisis.

Aplicación de DIC en orujo de uva

Se aplicó DIC en el orujo de uva a 0.2 y 0.4 MPa con una aplicación de 60 y 120 s respectivamente. Posteriormente, las muestras se secaron a 45 °C y se molieron (tamaño de partícula <400 µm).

Perfil de compuestos fenólicos para muestras tratadas con DIC mediante UHPLC-QqQ-ESI-MS

El perfil de compuestos fenólicos se analizó utilizando la mezcla de los sobrenadantes de dos extracciones secuenciales; metanol/agua (50:50) a pH 2 y acetona/agua (70:30). Se identificaron los compuestos utilizando un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (UHPLC-QqQ-ESI-MS).

La cuantificación se llevó a cabo utilizando estándares de ácidos fenólicos y flavonoides. Los resultados se expresaron como $\mu\text{g/g}$.

Efecto del orujo de uva tratado con DIC en ratas con una dieta alta en grasas y fructosa

Se utilizaron 40 ratas Wistar macho (180 ± 20 g) obtenidas del Instituto de Neurobiología de la UNAM (Querétaro, México). Después de una semana de aclimatación, se distribuyeron al azar en cinco grupos ($n=8$). El grupo control sano fue alimentado con una dieta estándar (Rodent Lab chow 5001); el grupo control obeso fue alimentado con una dieta alta en grasas y fructosa (DAGF) (con 20% de grasa y 20% de fructosa); los grupos de tratamiento se alimentaron con DAGF adicionada con orujo de uva control o tratado con DIC (1 g/kg de peso de rata). Los animales se pesaron semanalmente. Después de 16 semanas de tratamiento, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa y se sacrificaron después de un período de ayuno de 12 h. Se recolectaron muestras de sangre. La glucosa sérica se determinó con un kit enzimático comercial (Spinreact, S.A./S.A.U. Santa Coloma, SP) e insulina se midió con un kit de ELISA (Millipore, MA, USA). Se calculó la resistencia a insulina utilizando el índice HOMA. El estado oxidativo se evaluó en suero determinando el contenido total de polifenoles mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, (Roura et al., 2006), mientras que las capacidades antioxidantes se estimaron mediante el barrido de radicales ABTS (Re et al., 1999).

Resultados

Identificación de compuestos de la fracción EPP con UHPLC-QqQ-ESI-MS

Se realizó una identificación de los compuestos de la fracción EPP de orujo de uva. Como se muestra en el cuadro 1, la concentración de los ácidos fenólicos incrementó a mayor presión y mayor tiempo (DIC-2)

más del doble en comparación con la muestra control. Tal es el caso del ácido gálico, desde $55.44 \mu\text{g/g}$ (muestra control) hasta $150.11 \mu\text{g/g}$ (DIC-2) y caftárico desde $1212.66 \mu\text{g/g}$ (muestra control) hasta $2874.54 \mu\text{g/g}$ (DIC-2). Con respecto a flavonoides, se observó un aumento de catequina (hasta 33 veces), epicatequina (hasta 27 veces) y galato de epicatequina (hasta 10 veces) en los tratamientos con DIC.

Cuadro 1. Identificación de compuestos de la fracción EPP por UPLC-MS en orujo de uva sometida a la descompresión instantánea controlada

Código	Control	DIC-1	DIC-2
Ácidos hidroxibenzoicos⁴			
Ácido benzoico	1.28 ± 0.15	2.20 ± 0.24	1.04 ± 0.18
Trans-cinámico	0.57 ± 0.30	0.94 ± 0.18	1.25 ± 0.26
2,4,6-trihidroxibenzaldehído	2.04 ± 0.11	4.38 ± 0.02	4.8 ± 0.6
Protocatecuico	6.75 ± 0.95	11.08 ± 0.39	19.7 ± 2.7
Vanílico	12.43 ± 2.90	29.84 ± 0.69	27.2 ± 5.6
Gálico	55.44 ± 10.24	136.5 ± 2.56	150.1 ± 15
Siringico	24.79 ± 1.80	25.15 ± 0.43	58.4 ± 8.4
Ácidos hidroxicinámicos			
Cafeico	4.19 ± 0.45	7.69 ± 0.02	8.44 ± 1.50
Caftárico	1212.66 ± 92.05	2771 ± 151	2874 ± 382
Cumárico	5.15 ± 0.37	11.98 ± 0.46	8.60 ± 0.7
Elágico	89.98 ± 6.80	167.6 ± 21.0	116.1 ± 4
Ferúlico	1.17 ± 0.21	2.42 ± 0.10	1.89 ± 0.17
Quínico	7.87 ± 0.31	6.11 ± 0.79	6.86 ± 0.04
Shikímico	55.77 ± 7.90	95.58 ± 12.1	103 ± 1.5
Sinapico	3.81 ± 0.64	4.06 ± 0.69	4.44 ± 0.75
Flavonoides			
Catequina	78.97 ± 4.70	197.4 ± 6.4	182.9 ± 7.1
Epicatequina	87.75 ± 3.70	201.4 ± 6.2	170.8 ± 1.9
Galato de epicatequina	11.24 ± 0.40	28.19 ± 7.37	81.8 ± 9.3
Kaempferol	24.40 ± 2.22	16.40 ± 1.03	17.83 ± 0.67
Kaempferol 3-O-glucósido	24.51 ± 2.12	12.35 ± 0.77	12.25 ± 0.7
Luteolina	9.05 ± 1.21	8.20 ± 0.78	8.64 ± 0.08
Miricetina	2.44 ± 0.01	3.56 ± 0.52	4.66 ± 0.54
Procianidina B2	64.26 ± 5.67	172.24 ± 3.9	119.6 ± 3
Quercetina	33.17 ± 3.63	49.86 ± 6.55	67.33 ± 2.3
Quercetina 3-O-glucósido	15.14 ± 0.08	38.59 ± 3.40	30.38 ± 1.2
Resveratrol	4.41 ± 0.37	4.75 ± 0.07	11.02 ± 0.9
Rutina	14.34 ± 0.31	13.52 ± 0.55	13.64 ± 0.8

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar ($n = 3$).

Efecto del orujo de uva tratado con DIC en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y fructosa (DAGF)

Los resultados obtenidos de la capacidad antioxidante y determinación de compuestos fenólicos se muestran en el cuadro 2. Se observó un incremento de los compuestos fenólicos de hasta un 16% y capacidad antioxidante de hasta un 32%.

Cuadro 2. Compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en suero de ratas alimentadas con DAGF y suplementado con orujo de uva sometido a DIC.

	Dieta estandar	DAGF	DAGF + OC	DAGF + DIC-1	DAGF + DIC-2
TPC ¹	51.9±7	56.7±4	54.7±6	58.1±4	66.2±7
ABTS ²	31.2±4	32.6±5	40.8±3	40.1±1	43.2±2

Datos expresados como media ± DE (n=8). ¹GAE mg/mL, ²mmol TE/mL. TPC; compuestos fenólicos totales; OC, orujo control sin DIC.

Respecto a la ganancia de peso (figura 1), hubo un incremento de peso del 49% del grupo alimentado con DAGF, mientras que el grupo con la dieta suplementada con orujo de uva presentó una menor ganancia de peso en un 15% con respecto al grupo control con dieta estándar.

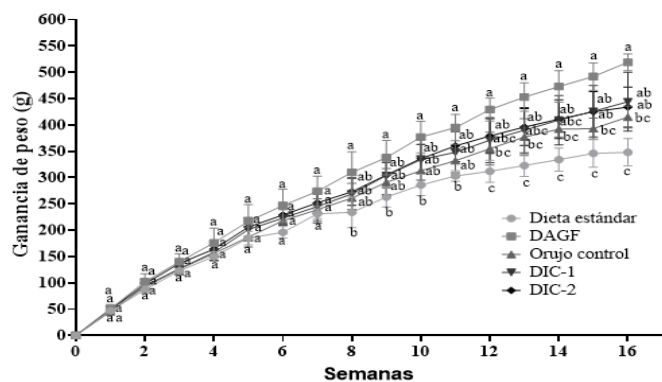


Figura 1. Ganancia de peso de los animales alimentados con DAGF y suplementados con orujo de uva sometido a DIC. Datos expresados como media ± DE (n=8).

Respecto a la curva de tolerancia a la glucosa (figura 2), los tres grupos de tratamiento (orujo control, DIC-1 y DIC-2) disminuyó la intolerancia observada en los animales alimentados con DAGF, mostrando un comportamiento similar a los animales alimentados con una dieta estándar.

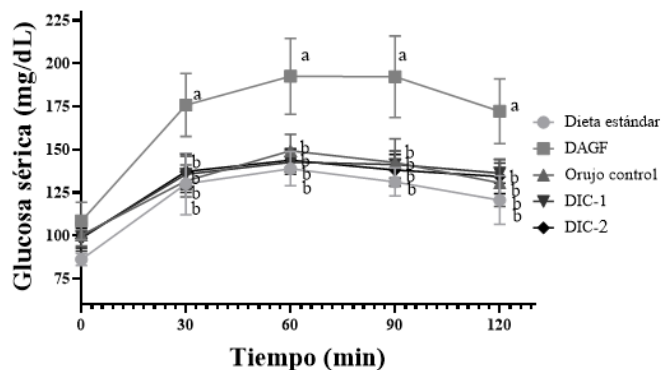


Figura 2. Curva de tolerancia a la glucosa en animales alimentados con DAGF y suplementados con orujo de uva sometido a DIC. Datos expresados como media ± DE (n=8).

En cuanto al índice HOMA-IR (figura 3), los tres tratamientos (orujo control, DIC-1 y DIC-2) presentaron una disminución significativa en comparación con las ratas alimentadas con DAGF hasta de un 65%, y fueron estadísticamente igual al grupo alimentado con dieta estándar.

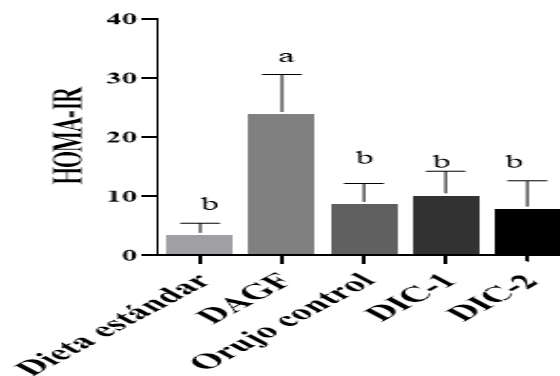


Figura 3. Índice HOMA-IR de los animales alimentados con DAGF y suplementados con orujo de uva sometido a DIC. Datos expresados como media ± DE (n=8).

De un primer análisis de mínimos cuadrados parciales se observó que los flavonoides son las estructuras con mayor asociación al incremento de compuestos fenólicos totales (TPC) y ABTS en suero (datos no mostrados). Por lo que se realizó un segundo análisis para evaluar el perfil de flavonoides de manera individual con TPC y ABTS en suero (figura 4).

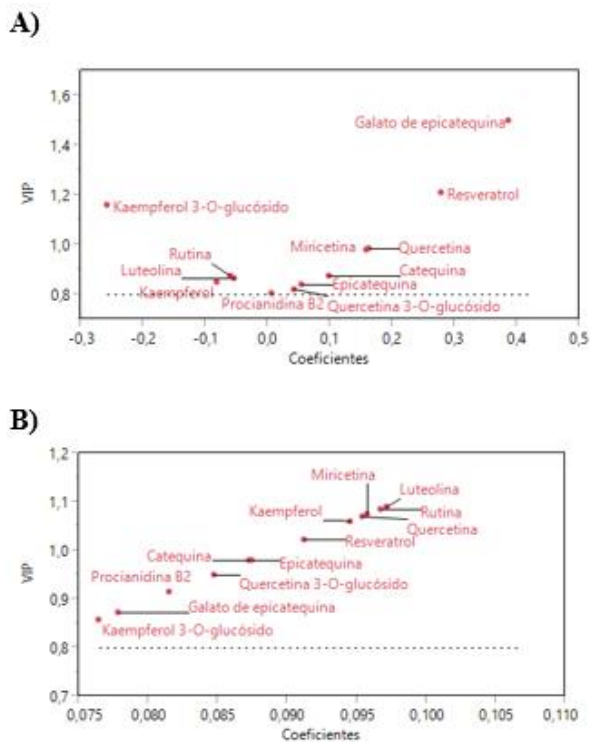


Figura 4. Análisis de mínimos cuadrados parciales para asociar los flavonoides de orujo de uva sometido a proceso DIC con su efecto sobre los compuestos fenólicos totales (A) y ABTS en suero (B).

Discusión

De acuerdo con resultados previos, DIC generó un incremento en compuestos fenólicos extraíbles. El incremento en la concentración de ácidos fenólicos se relacionó a la formación de productos de degradación de las antocianinas, y el incremento en flavanoles a la hidrólisis de estructuras complejas como las proantocianidinas, reflejado en la disminución del grado medio de polimerización (DP) y el incremento de sus unidades estructurales como catequina, epicatequina y galato de epicatequina (Martínez-

Meza y col., 2021). Por lo tanto, la liberación e hidrólisis de las proantocianidinas en orujo de uva por DIC podría favorecer su absorción o su fermentación por la microbiota colónica.

De acuerdo a los resultados de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en suero (ABTS), se observó que las formaciones de estructuras sencillas por efecto de DIC podrían estar asociadas al incremento de dichos parámetros. De acuerdo a Tao et al., (2019), el DP de las proantocianidinas es uno de los principales factores que afectan su biodisponibilidad, donde las proantocianidinas con $DP < 3$ se pueden absorber en el intestino delgado. Además, la aplicación de DIC favoreció el incremento de compuestos como quercetina 3-O-glucósido, de acuerdo con Magar y Sohng, (2020) los glucósidos de la quercetina se absorben más eficazmente que la propia quercetina.

De acuerdo al análisis de mínimos cuadrados parciales los compuestos como, galato de epicatequina, resveratrol, quercetina y miricetina, en ABTS, y luteoina, miricetina, rutina, quercetina y kaempferol en suero, son los principales compuestos derivados de los flavonoides, que pueden estar asociados a los efectos benéficos estudiados en los modelos de ratas. Su estructura química determina la velocidad de absorción, la naturaleza de los metabolitos circulantes y su eliminación. Los flavonoides suelen ser transformados durante su absorción (metilación, sulfatación y/o glucuronidación), lo que los hace más solubles y, por tanto, más propensos a ser liberados en la circulación sistémica y a ser distribuidos a los tejidos y órganos. Se han reportado diversos flavonoides de rápida absorción como es la catequina, epicatequina, catequinsulfato, epicatequinsulfato y galato de epicatequina (Muñoz-González. I, et al., 2019). Dicho lo anterior, los resultados obtenidos de los parámetros evaluados en las ratas alimentadas con DAGF, mostraron que no hubo una modificación en el efecto benéfico a pesar de que DIC generó estructuras más sencillas, lo cual puede estar asociado a una mayor absorción de los mismos y por ende un incremento en

compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en suero. El efecto benéfico siguió siendo el mismo, ya que, la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina medida por el índice HOMA-IR, resultó estadísticamente similar a los animales sanos (alimentados con dieta estándar) En cuanto al peso corporal, se observó una disminución del 15% lo cual tiene importancia fisiológica, ya que se ha reportado que una reducción del 8-10% del peso corporal puede prevenir alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad (Ryan y Yockey, 2017).

De acuerdo a lo reportado en este trabajo, se demostró que tanto la muestra de orujo control y las tratadas con DIC son capaces de mejorar la intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en un modelo de obesidad inducido por la dieta. De acuerdo con Rodríguez-Lanzi et al., (2016) el efecto protector del orujo de uva está asociado principalmente a sus flavonoides mayoritarios; catequina, epicatequina y quercetina. Los cuales mejoran la resistencia a la insulina a través de la modulación de la señalización proinflamatoria y redox, mejorando la cascada de señalización de la insulina.

Conclusión

En este trabajo se estudió el efecto de la aplicación de DIC sobre fracciones de NEPP y EPP, donde se observó un incremento de EPP relacionada con una mayor liberación de compuestos de la matriz, o bien la generación de estructuras más sencillas por la hidrólisis de polímeros de flavanoles, como las proantocianidinas. Las modificaciones que se obtuvieron en el perfil de los compuestos bioactivos utilizando DIC no potenciaron el efecto del orujo de uva en sus beneficios relacionados a la salud. Por lo tanto, se sugiere que la aplicación de DIC se puede utilizar como estrategia para una modificación selectiva de las fracciones de EPP y NEPP sin afectar sus propiedades benéficas relacionadas a la salud.

Referencias

- C. Beres, et al. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste management*, 68, 581-594. 2017.
- C. Rodríguez-Lanzi, D. J. Perdicaro, et al. Grape pomace and grape pomace extract improve insulin signaling in high-fat-fructose fed rat-induced metabolic syndrome. *Food & function*, 7(3), 1544-1553. 2016.
- D. Diamantidou, A. Zotou, & G. Theodoridis. Wine and grape marc spirits metabolomics. *Metabolomics*, 14(12), 1-27. 2018.
- D. H. Ryan, & S. R. Yockey. Weight loss and improvement in comorbidity: differences at 5%, 10%, 15%, and over. *Current obesity reports*, 6(2), 187-194. 2017.
- E. M. C. Alexandre, S. A. Moreira, et al. Emerging technologies to extract high added value compounds from fruit residues: Sub/supercritical, ultrasound-, and enzyme-assisted extractions. *Food Reviews International*, 9129, 1-32. 2017.
- E. Roura, C. Andres-Lacueva, R. Estruch, R.M. Lamuela-Raventos, Total polyphenol intake estimated by a modified Folin-Ciocalteu assay of urine, *Clinical Chemistry*. 52 (2006) 749-752
- F. Capozzi, & A. Bordoni. Foodomics: a new comprehensive approach to food and nutrition. *Genes & nutrition*, 8(1), 1-4. 2013.
- I. Muñoz-González, S. Chamorro, et al. Phenolic metabolites in plasma and thigh meat of chickens supplemented with grape byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(16), 4463-4471. 2019.
- J. Pérez-Jiménez, M. E. Díaz-Rubio. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: Occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition research reviews*, 26(2), 118-129. 2013.
- M. M. Hamoud-Agha, & K. Allaf. Instant Controlled Pressure Drop (DIC) Technology in Food Preservation: Fundamental and Industrial Applications. In *Food Preservation-From Basics to Advanced Technologies*. IntechOpen. 2019.
- M. Van Hul, L. Geurts, et al. Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 314(4), E334-E352. 2018.
- O. Begou, H. G. Gika, et al. Hyphenated MS-based targeted approaches in metabolomics. *Analyst*, 142(17), 3079-3100. 2017.
- R. Re, N. Pellegrini, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237. 1999.
- R. T. Magar, & J. K. Sohng. A review on structure, modifications and structure-activity relation of quercetin and its derivatives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 11-20. 2020

W. Tao, Y. Zhang, et al. Rethinking the mechanism of the health benefits of proanthocyanidins: Absorption, metabolism, and interaction with gut microbiota. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 971-985. 2019.

Y. Martínez-Meza, J. Pérez-Jiménez, N. E. Rocha-Guzmán, M. E. Rodríguez-García, M. Alonzo-Macias, R. Reynoso-Camacho. Modification on the polyphenols and dietary fiber content of grape pomace by instant controlled pressure drop. *Food Chemistry*, 360, 130035. 2021

Efecto de glucosa y fructosa elevada en células HepG2

Campos-Maldonado Francisco¹, Godoy-Álamos José E.

¹ Laboratorio de Endocrinología y Nutrición, departamento de Investigación Biomédica, Facultad de medicina, Universidad Autónoma de Querétaro.

Abstract

Epidemiological as well as microbiological studies show link of excess sugar consumption with metabolic diseases such as type 2 diabetes and hyperlipidemia. The mechanisms behind fructose remain debated, however, it is known that this sugar is mostly processed by the liver. Consumption in large quantities leads to an increase in lipogenetic pathways and their enzymes such as fatty acids synthase (FAS), Acetyl-CoA carboxylase (ACC-1) in the liver as well as the amount of triglycerides in the system. Analysis of metabolic profiles has led to the differences in the use of fructose from glucose, demonstrating the metabolic imbalance that fructose causes in the liver. In the present study, the use of the HepG2 cell line from liver carcinoma was used to study much higher amounts than those used in other studies, which caused excessive fatty acid synthesis (lipogenesis) in all wells.

Resumen

Estudios epidemiológicos, así como microbiológicos muestran enlace de consumo exceso de azúcares con enfermedades metabólicas tales como diabetes tipo 2 e hiperlipidemia. Los mecanismos detrás de la

fructosa siguen siendo debatidos, sin embargo, se sabe que esta azúcar es procesada en su mayoría por el hígado. Consumo en grandes cantidades lleva a un aumento en rutas lipogénicas y sus enzimas como ácidos grasos sintasa (FAS), Acetil-CoA carboxilasa (ACC-1) en el hígado, así como la cantidad de triglicéridos en el sistema. Análisis de perfiles metabólicos ha llevado a dar con las diferencias en el uso de fructosa de glucosa, demostrando el desbalanceo metabólico que causa la fructosa en el hígado. En el presente estudio se usó la línea celular HepG2 procedente de carcinoma de hígado para el estudio de cantidades mucho más altas que aquellas usadas en otros estudios, lo que originó una síntesis de ácidos grasos (lipogénesis) excesiva en todos los pocillos.

Introducción

Los alimentos dulces, contienen agregados de azúcares simples.

El aumento en el consumo de estos aditivos; entre los que destacan el jarabe de maíz alto en fructosa (HFCS) y la sacarosa, contienen una alta cantidad de fructosa (Walker et al., 2014).

La importancia del hígado en el procesamiento de la fructosa es evidente debido a que esta misma se encarga de la mayoría de este azúcar (Fig. 1) (Keim & Havel, 2013), de misma forma que de aquí es dónde inicia la lipogénesis, relacionada a hígado graso no alcohólico y a la resistencia a la insulina (Mai & Yan, 2019). El uso de células HepG2 resulta eficaz debido a su origen y a su facilidad de cultivo que le otorga las propiedades de su naturaleza (Moscatto et al., 2015).

El efecto negativo que conlleva la conversión de una buena parte de la fructosa a triglicéridos es debido a la falta de un control, especialmente de la fosforilación de fructosa a fructosa-1-fosfato (F-1-P) por la enzima fructoquinasa (KHK), en vez de un control como la fosfofructoquinasa (PFK) en la glucólisis (Havel, 2005). También, se ha visto que el

aumento en consumo de fructosa incrementa la expresión y activación de enzimas de la ruta lipogénica del hígado, tales como el ácido graso sintasa (FAS) y acetil-CoA carboxilasa (ACC-1 o ACC α) (Bruckdorfer, 1972).

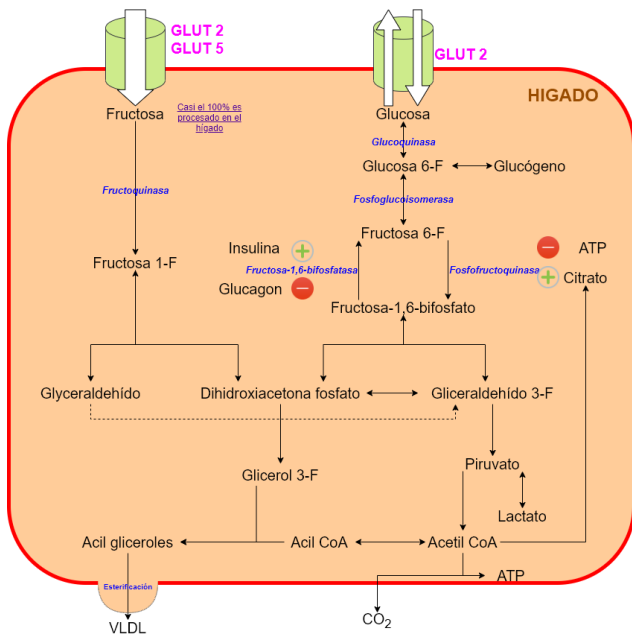


Figura 1: Comparación de regulación metabólica de fructosa con glucosa. Como se puede ver en el siguiente esquema, la ruta metabólica de la fructosa no tiene los mismos puntos de control, sin embargo éste tiene efecto en la creación de ácidos grasos y en la ruta metabólica de la glucosa.

Esto es de suma relevancia para el sector salud, debido a la relación que tienen con la obesidad, la diabetes tipo 2 y la hiperlipidemia. Estas enfermedades a su vez están relacionadas con la morbilidad y la mortalidad. Estudios como el de este proyecto han sido realizados para ver la relación y causas de éstas mismas (Fig. 2), en este caso de la fructosa con la glucosa, ya sea en células de hígado o en otros lugares como en adipocitos.

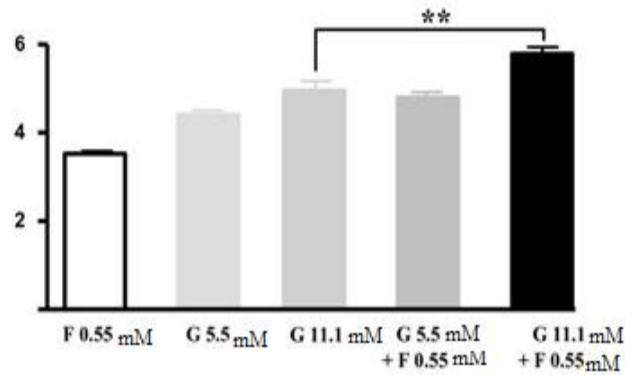
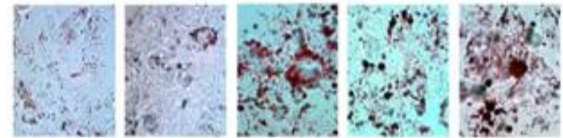


Figura 2: Densidad del rojo oleoso utilizado para medir la acumulación de gotitas de lípidos neutros células in vitro en las células HepG2. Reflejan síntesis, elongación y desaturación de nuevas fracciones lipídicas. Este estudio analizó que al agregar fructosa o intercambiar glucosa por fructosa, se veía una concentración del doble de palmitato, un ácido graso saturado que induce lipotoxicidad (D. Huang et al., 2011).

En el presente proyecto se estudió el efecto de concentraciones de fructosa o de glucosa en cantidades más altas que otros estudios, en la línea celular HepG2 para visualizar la acumulación de triglicéridos y ácidos grasos usando tinción de rojo oleoso.

Metodología

Cultivo de células HepG2

Para el cultivo celular se utilizaron las células HepG2 las cuales son una línea de hepatocarcinoma humano. Para su cultivo se utilizó Medio modificado por Dulbecco de Eagle (DMEM) de glucosa, suero fetal

bovino y penicilina estreptomycin. Se mantuvieron durante una semana para favorecer una mayor proliferación celular.

Exposición a diferentes concentraciones de glucosa y fructosa

Se utilizaron cajas de 12 pozos para evaluar diferentes concentraciones de glucosa y fructosa desde 5.5mM a 25mM

Tinción de Rojo Oleoso

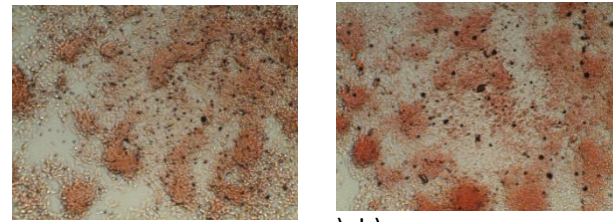
Se pesaron 2 viales con 120 mg de Rojo oleoso, posteriormente se diluyeron en 40 mL de alcohol isopropílico. Se mezclaron 3 partes (30 mL) de solución madre con 2 partes (20 mL) de agua desionizada y se dejó reposar por 10 min. La solución de trabajo es estable por no más de 2 horas.

Después de fijar las células con un lavado de tampón fosfato salino y formalina al 3.7%, se cubrió con solución de rojo oleoso.

Después de varios ciclos de lavado con agua y rojo oleoso, se agregó hematoxilina a las células y se finalizó agregando agua para ver a través del microscopio.

Resultados

Resultados cualitativos se obtuvieron a partir de la tinción de rojo oleoso en tratamientos a 24 y 72 horas con glucosa y fructosa (Fig. 3 y Fig. 4) en concentraciones máximas que se podrían ver en sangre y más altas de eso.



a) b)

c) d)

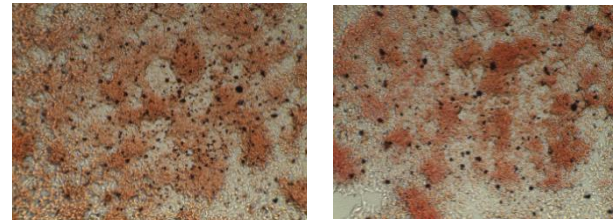
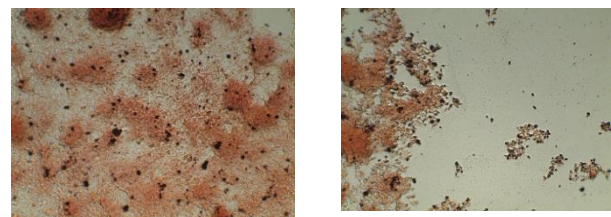
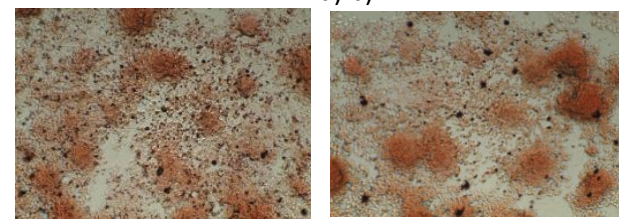


Figura 3: Tinción de rojo oleoso en concentraciones excesivas de fructosa y glucosa en células HepG2. Imágenes mostrando el antes y después del rojo oleoso. Las secciones rojas y negras son depósitos de ácidos grasos, siendo los puntos negros una concentración excesiva. Las concentraciones son de 25 mM de glucosa a 24 horas (a) y a 72 horas (b), al igual que 25 mM de fructosa a 24 horas (c) y a 72 horas (d)



a) b)



c) d)

Figura 4: Tinción de rojo oleoso en concentraciones altas de fructosa y glucosa en células HepG2. Aunque las concentraciones sean menores, se puede ver como aun así sigue habiendo una gran cantidad de depósitos de ácidos grasos. Las concentraciones son de 5.5 mM de glucosa a 24

horas (a) y a 72 horas (b), al igual que 5.5 mM de fructosa a 24 horas (c) y a 72 horas (d)

Discusión y conclusiones

Varios estudios en humanos y animales han demostrado que la ingesta de fructosa en la dieta aumenta los niveles de triglicéridos. En los seres humanos, estas alteraciones de los lípidos ocurren con bastante rapidez, como lo demuestra un estudio de 10 semanas en 32 hombres y mujeres que consumieron una dieta de 15% de proteínas, 30% de grasas y 55% de carbohidratos, en la que el 25% de las calorías fueron reemplazadas por glucosa o fructosa. que contiene bebida. La lipogénesis hepática de novo, los marcadores de alteración del metabolismo de los lípidos y la remodelación de las lipoproteínas, incluida la apoB en ayunas, las LDL (lipoproteínas de baja densidad), las LDL pequeñas y densas y las LDL oxidadas, aumentaron.

Los mecanismos moleculares detrás de estos estudios han sido bastante estudiados. Del metabolismo hepático de la fructosa se dice que la fructosa se metaboliza fácilmente en el hígado a F-1-P a través de la acción de KHK (fructoquinasa) y esto conduce a la entrada de carbono lipogénico en el ciclo glucolítico por debajo del punto clave de regulación de la glucólisis PFK, estudios de perfiles metabolitos han demostrado esto debido que el incremento de fructosa da como resultado concentraciones de F-1-P en células HepG2 (Hirahatake et al., 2011), además estudios in vitro demuestran que que la adición de fructosa a las células hepáticas tratadas con glucosa conduce a una reducción de ACC, HSL y ATGL serina fosforilado (Zimmermann et al., 2004). Por lo tanto, además de servir como sustrato para la síntesis mejorada de ácidos grasos de novo, la fructosa o sus metabolitos intermedios también pueden alterar la expresión de varias enzimas involucradas en la síntesis de lípidos hepáticos y las vías de hidrólisis.

Sin embargo, como se puede ver a través de la tinción de rojo oleoso de los experimentos realizados (Fig 3

y Fig 4), una concentración alta de azúcares produce resultados similares y aunque esto llevaría a problemas graves también, no se puede llegar a una conclusión referente a cuál azúcar es “menos mala” para las células en hígado.

Se puede finalizar diciendo también acerca de la falta de un método cuantitativo, ya que eso también nos podría dar más información y datos empíricos relacionados a la reacción de éstas células. Tal cual, un exceso siempre será contraproducente para el cuerpo humano.

Agradecimientos

Se le agradece a la Universidad Autónoma de Querétaro, a la facultad de Química y a la de Medicina por proporcionar financiamiento y oportunidad para realizar este Verano. De igual forma se agradece al Dr. Pablo García Solís por asesoramiento y apoyo para la terminación correcta del proyecto.

Referencias

- B. H. Mai y L.-J. Yan, “The negative and detrimental effects of high fructose on the liver, with special reference to metabolic disorders”, *DMSO*, vol. Volume 12, pp. 821–826, may 2019, doi: 10.2147/dms0.s198968.
- D. Huang, T. Dhawan, S. Young, W. H. Yong, L. G. Boros, y A. P. Heaney, “Fructose impairs glucose-induced hepatic triglyceride - synthesis”, *Lipids Health Dis*, vol. 10, núm. 1, p. 20, 2011, doi: 10.1186/1476-511x-10-20.
- K. L. Stanhope et al., “Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans”, *J. Clin. Invest.*, vol. 119, núm. 5, pp. 1322–1334, may 2009, doi: 10.1172/jci37385.
- K. M. Hirahatake, J. K. Meissen, O. Fiehn, y S. H. Adams, “Comparative Effects of Fructose and Glucose on Lipogenic Gene Expression and Intermediary Metabolism in HepG2 Liver Cells”, *PLoS ONE*, vol. 6, núm. 11, p. e26583, nov. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0026583.
- K. R. Bruckdorfer, I. H. Khan, y J. Yudkin, “Fatty acid synthetase activity in the liver and adipose tissue of rats fed with various

carbohydrates”, *Biochemical Journal*, vol. 129, núm. 2, pp. 439–446, sep. 1972, doi: 10.1042/bj1290439.

N. L. Keim y P. J. Havel, “Fructose: Absorption and Metabolism”, en *Encyclopedia of Human Nutrition*, Elsevier, 2013, pp. 361–365
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00128-8>

P. J. Havel, “Dietary Fructose: Implications for Dysregulation of Energy Homeostasis and Lipid/Carbohydrate Metabolism”, *Nutrition Reviews*, vol. 63, núm. 5, pp. 133–157, may 2005, doi: 10.1111/j.1753-4887.2005.tb00132.x.

R. W. Walker, K. A. Dumke, y M. I. Goran, “Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup”, *Nutrition*, vol. 30, núm. 7–8, pp. 928–935, jul. 2014, doi: 10.1016/j.nut.2014.04.003.

R. Zimmermann, “Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase”, *Science*, vol. 306, núm. 5700, pp. 1383–1386, nov. 2004, doi: 10.1126/science.1100747.

S. Moscato, F. Ronca, D. Campani, y S. Danti, “Poly(vinyl alcohol)/gelatin Hydrogels Cultured with HepG2 Cells as a 3D Model of Hepatocellular Carcinoma: A Morphological Study”, *JFB*, vol. 6, núm. 1, pp. 16–32, ene. 2015, doi: 10.3390/jfb6010016.

Hongos en granos que consumimos: la importancia de hervirlos antes de su consumo.

Isidoro-Escamilla B. Alexis^{1,2}, Malagón-Chávez Enrique A.^{1,2}, Vera-Pérez R. Balam^{1,2}, Landeros Fidel Jaime^{1,3}

Universidad Autónoma de Querétaro¹, Ingeniería en Biotecnología, Facultad de Química², Sistemática de Micromicetos y Etnomicología, Facultad de Ciencias Naturales³

Resumen

En el área alimenticia el almacenamiento de granos y semillas es un factor importante en la producción y economía de los agricultores y vendedores de alimentos. Por lo que uno de los elementos que afecta esta industria es el crecimiento de hongos los cuales aprovechan la humedad relativa, la temperatura de almacenamiento, así como el tiempo de almacenaje antes de su uso en la proliferación o consumo. Los hongos que se presentan en almacenamiento son microorganismos de entre los que destacan especies del género *Aspergillus*, *Penicillium*, entre otros. Muchos de estos microorganismos producen micotoxinas que pueden ser perjudiciales para la salud por lo que la finalidad de este trabajo es observar el crecimiento de microorganismos y los riesgos que se pueden encontrar en la compra de granos de los mercados locales de la ciudad de Querétaro. Donde se encontró que los hongos más comunes fueron del género *Penicillium* spp. y *Rhizopus* spp., algunos de los micromicetos encontrados sí son capaces de producir micotoxinas, es por esto que surge la necesidad de lavar y cocer bien los granos antes de su consumo e informar a la comunidad para hacerlo.

Abstract

In the food area, the storage of grains and seeds is an important factor in the production and economy of farmers and food sellers. Therefore, one of the factors that affect this industry is the growth of fungi, which take advantage of the relative humidity, the storage temperature, as well as the time while is stored before its use in proliferation or consumption. The fungi that occur in storage are microorganisms among which species of the genus *Aspergillus*, *Penicillium*, among others, stand out. Many of these microorganisms produce mycotoxins that can be harmful to health, so the purpose of this work is to observe the growth of microorganisms and the risks that can be found in the purchase of grains in the local markets of the city of Querétaro where it was found that the most common fungi were of the genus *Penicillium* spp. and *Rhizopus* spp., some of the micromycetes found are capable of producing mycotoxins, which is why the importance of washing and cooking the grains well before consumption arises and informing the community to do so.

Palabras clave: hongos microscópicos, micotoxina, granos, *Rhizopus* spp. *Penicillium* spp.

Key words: microscopic fungi, mycotoxin, grains, *Rhizopus* spp, *Penicillium* spp.

Introducción

Según datos recabados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), dice que México cuenta con alrededor de 900 cultivos, los cuales son fundamentales para la supervivencia básica; entre estos se encuentran el arroz, la avena, el camote, la cebada, el haba, el maíz, el mijo, la soya, el sorgo, el trigo y la caña de azúcar. (SADER, 2017). Mientras que la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), establece que los granos básicos en México son aquellos que se consideran alimentos imprescindibles en la dieta de las familias mexicanas por su alto nivel nutricional y los aportes que les

brindan; el maíz, frijol, trigo y arroz son las consideradas semillas importantes para garantizar la salud alimentaria. (Arabuko News, 2017)

El almacenamiento de granos es un factor importante en la producción y en la economía de los agricultores. En la actualidad este ha sido un problema técnico que afecta la industria, debido a problemas relacionados con la cosecha, el transporte y la exportación de los productos del campo. En nuestro país existe una disparidad en la infraestructura y los sistemas de almacenamiento, problemas de almacenes sin modernizar, unidades insuficientes, mala distribución, condiciones de almacenamiento deficientes para la conservación de granos, entre otros. (Vázquez-Badillo & Moreno-Martínez, 2016).

El proceso de la cosecha es un punto clave en el correcto almacenamiento de los granos, ya que estos tienen que tener un porcentaje de humedad de entre 13 – 18% para tener la menor pérdida del producto. A nivel internacional, las pérdidas después de la cosecha en condiciones de almacenamiento son de 5%, para nuestro país, la FAO reporta porcentajes de pérdidas entre 10-25%, estos porcentajes varían de acuerdo a la región y a los ciclos agrícolas, los cuales pueden costar energía y recursos para los agricultores (García-Lara & Bergvinson, 2007). Para México, un volumen de 32 millones de toneladas de maíz tiene como pérdida estimada, representando en un 10%, la pérdida de miles de millones de pesos en un solo cultivo. (Vázquez-Badillo & Moreno-Martínez, 2016)

Las pérdidas han llegado a ser ocasionadas por agentes bióticos como roedores, insectos, hongos, aves, entre otros. (Arahon-Hernández & Carballo-Carballo, 2014). Los principales factores que favorecen el crecimiento de hongos sobre estos granos son la humedad relativa y la temperatura de almacenamiento, al igual que el tiempo de almacenaje antes de su utilización. Los hongos pueden crecer sobre varios productos agrícolas, estos fueron clasificados en 1969 por Christensen y Kauffman en tres categorías: hongos de campo, hongos de almacén y hongos de deterioro avanzado. Los hongos de almacén, son microorganismos que contaminan a los granos después de su cosecha, aquí podemos encontrar especies como *Aspergillus* y *Penicillium*.

Las especies de campo se logran cuando las condiciones ambientales favorecen el desarrollo del microorganismo. Los hongos de deterioro avanzado, pueden infectar granos que han sido almacenados en condiciones inadecuadas de humedad relativa, especies de *Chaetomium*, *Rhizopus*, *Mucor*, algunas especies de *Aspergillus*, entre otras, son las especies que llegan a contaminar los granos durante su almacenamiento. (Vázquez-Badillo & Moreno-Martínez, 2016).

Los hongos tienen una característica muy importante, la producción de metabolitos secundarios que tienen propiedades tanto benéficas como dañinas para la salud. Durante su crecimiento los hongos producen y secretan sustancias tóxicas llamadas micotoxinas. (WHO, 2018). La producción de micotoxina en granos depende de las condiciones ambientales pre y post cosecha, principalmente por la temperatura y la humedad, de la disponibilidad micronutricional, la acción dañina de insectos sobre la planta, entre otras causas que afectan al cultivo. Se conocen más de 400 micotoxinas clasificadas en 25 tipos según sus propiedades químicas, estas se producen por géneros como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Claviceps*. Estas micotoxinas son muy perjudiciales para la salud humana y animal, toxinas como la aflatoxina producida por *Aspergillus flavus* son altamente cancerígenas con acción en el hígado. Esta toxina se da en cultivos de maíz y cacahuete, que es detectada en diferentes etapas pre y post cosecha. (Roskopf, 2017). Después de la ingestión de un alimento contaminado, su inhalación o el contacto con la piel, se causa una reacción llamada micotoxicosis, caracterizada por ser una enfermedad no transmisible que no se puede tratar con fármacos o algún antibiótico, la toxina se llega a alojar y acumularse en tejidos y órganos tras su ingesta. (Zain, 2011).

Los granos pueden tener una gran cantidad de micotoxinas, que son las causantes de múltiples enfermedades agudas y crónicas en el humano y animal. Es por ello que se debe tener cuidado con la cosecha, traslado y almacenamiento del producto antes de su venta. El resultado de una determinada especie de hongo en las muestras de grano puede indicar las malas condiciones en las que se han

encontrado los granos antes y durante su venta. El análisis realizado en las muestras de los granos, fue con la finalidad de observar el crecimiento de micromicetos y los riesgos que se pueden encontrar en el consumo de granos de los mercados locales para concientizar a la población de la importancia de su limpieza y tratamiento correcto antes de su consumo.

Metodología

La investigación consistió en la compra de semillas de frijol negro, frijol amarillo, chia, maíz y garbanzo en seis mercados diferentes de la ciudad de Santiago de Queretaro, México.

Posteriormente se prepararon tres medios de cultivo; agar papa dextrosa (PDA), extracto de malta agar (EMA) y cámara húmeda (CH) que fueron vertidos en cajas Petri en condiciones de esterilidad. Cada muestra de grano fue inoculada por duplicado en cada uno de los medios para identificar qué hongos se presentaban en la cutícula del grano. Una vez realizado esto se incubaron a 25 °C durante un periodo de 5 días.

Pasado el periodo de incubación se tomaron muestras del crecimiento micológico en los granos y se analizaron en microscopio con lente óptica de hasta 100x. Para la observación se utilizó KOH al 3%. Las cepas se identificaron según sus características morfológicas; estructura de hifas, fiálides y conidios usando como guía el libro “Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados” de Ernesto Moreno Martínez.

Resultados y Discusión

El cultivo de las semillas en diferentes medios favoreció el crecimiento de diferentes especies de micromicetos, entre estos el género *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Verticillium* spp., *Mucor* spp. (Figura 1). Debido a que se usaron métodos tradicionales de comparación morfológica no fue posible clasificar algunas

muestras por lo que se catalogaron como *Mycelia Sterilia*; en muestras donde no se presentó crecimiento de organismos se catalogaron como SC. El crecimiento de microorganismos de acuerdo a cada medio de cultivo se presenta en la tabla 1.

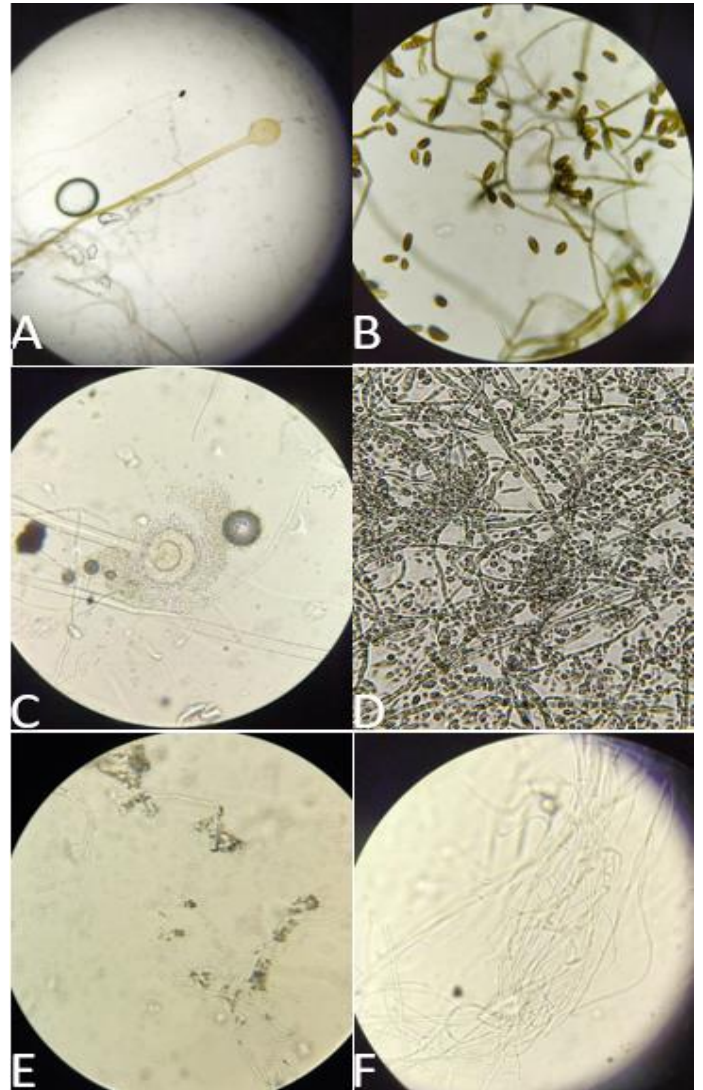


Figura 1. Hongos vistos al microscopio 40x encontrados en las muestras de semillas A) *Rhizopus* spp., B) *Alternaria* spp., C) *Aspergillus* spp., D) *Cladosporium* spp., E) *Penicillium* spp., F) *Fusarium* spp.

La identificación taxonómica arrojó que los hongos del género *Rhizopus* spp. y *Penicillium* spp. fueron los hongos más comunes encontrados en las semillas

cultivadas (Figura 2), seguido de los géneros *Aspergillus* spp. y *Cladosporium* spp.

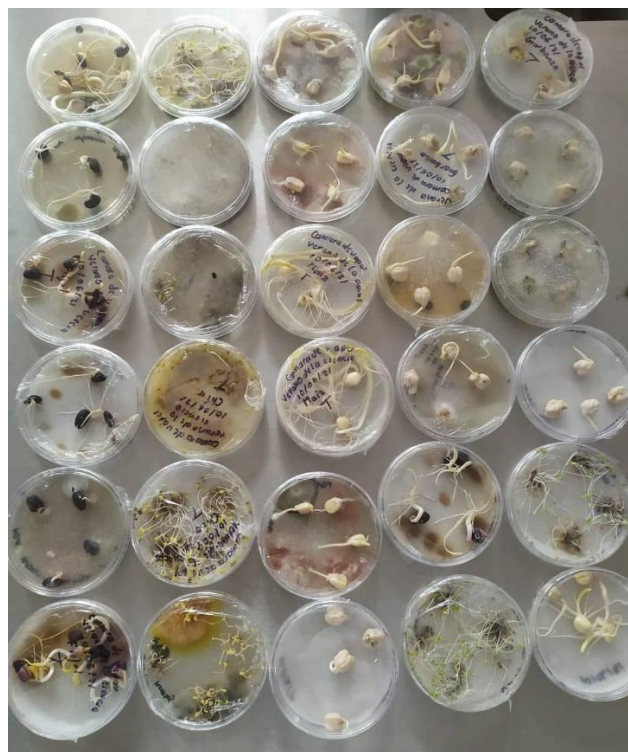


Figura 2. Crecimiento de hongos en semillas cultivadas en diferentes medios (PDA, EMA, CH) de diferentes mercados.

Las muestras de garbanzo y frijol amarillo cultivadas en medio PDA de los mercados 4 y 5 respectivamente, presentaron una mayor diversidad de crecimiento de micromicetos, ya que se presentaron más de cinco generos diferentes de hongos.

Las condiciones del medio y las ambientales tienen un papel importante en el crecimiento de hongos y la biosíntesis de micotoxinas. (Wilman 2014) Se observó que en el método de cámara húmeda no permitió el crecimiento en algunas muestras, como fue el caso del frijol negro de cualquier mercado; también se observó que el hongo del género *Fusarium* spp. se encontraba ausente en la mayoría de los medios de cultivo.

Solo en las muestras de maíz de los mercados 1 y 6 que fueron cultivadas en medios PDA y EMA mostraron la presencia de *Fusarium* spp., este es un hongo que varias de sus especies son fitopatógenas y llegan a infectar a una amplia gama de cultivos, como cereales (maíz, trigo y cebada). (Leyva-Mir, 2017) También se observó la clara presencia de *Penicillium* spp. en la mayoría de las muestras de frijol amarillo sin importar el tipo de medio de cultivo, además de que se observó la única presencia del género *Verticillium* spp. en el medio PDA del mercado 5.

Tabla 1. Micromicetos encontrados en las semillas de los diferentes mercados

Mercado	Semilla	PDA	EMA	CH	Mercado	Semilla	PDA	EMA	CH
Mercado 1	Frijol negro	sc	sc	sc	Mercado 2	Frijol negro	Rhizopus	sc	sc
	Frijol amarillo	sc	sc	sc		Frijol amarillo	sc	sc	sc
	Maíz	Rhizopus, Penicillium, Fusarium	Aspergillus, Penicillium, Fusarium	Fusarium, Alternaria, Penicillium		Maíz	Rhizopus, Penicillium	Penicillium	Rhizopus, Aspergillus
	Garbanzo	Rhizopus	Rhizopus	Penicillium, Alternaria, Cladosporium		Garbanzo	Rhizopus	Rhizopus	Penicillium, Cladosporium
	Chía	Mycelia Sterilia	Alternaria, Penicillium, Cladosporium	Penicillium		Chía	Rhizopus	Rhizopus, Aspergillus, Penicillium	Rhizopus, Alternaria
Mercado 3	Frijol negro	Penicillium, Mycelia Sterilia	Penicillium	sc	Mercado 4	Frijol negro	Rhizopus, Penicillium, Aspergillus	Rhizopus, Penicillium	sc

	Frijol amarillo	<i>Rhizopus, Penicillium</i>	<i>Penicillium, Cladosporium</i>	sc		Frijol amarillo	<i>Rhizopus, Penicillium, Alternaria</i>	<i>Rhizopus, Penicillium, Aspergillus</i>	<i>Alternaria</i>
	Maíz	<i>Penicillium</i>	<i>Rhizopus, Penicillium, Cladosporium</i>	<i>Rhizopus, Penicillium, Mycelia Sterilia</i>		Maíz	<i>Rhizopus, Penicillium</i>	<i>Rhizopus, Penicillium, Aspergillus</i>	<i>Rhizopus, Penicillium</i>
	Garbanzo	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus, Penicillium</i>		Garbanzo	<i>Rhizopus, Penicillium, Cladosporium, Aspergillus, Trichoderma</i>	<i>Rhizopus, Penicillium</i>	<i>Aspergillus, Cladosporium, Mycelia Sterilia</i>
	Chía	<i>Rhizopus, Aspergillus, Alternaria</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus</i>		Chía	<i>Rhizopus, Cladosporium, Mycelia Sterilia</i>	<i>Rhizopus, Alternaria, Cladosporium, Penicillium</i>	sc
Mercado 5	Frijol negro	<i>Penicillium, Mycelia Sterilia</i>	<i>Penicillium, Alternaria, Cladosporium</i>	sc	Mercado 6	Frijol negro	<i>Rhizopus, Mycelia Sterilia, Penicillium</i>	<i>Cladosporium, Mycelia Sterilia, Alternaria</i>	sc
	Frijol amarillo	<i>Penicillium, Cladosporium, Aspergillus, Rhizopus, Trichoderma, Verticillium</i>	<i>Penicillium, Cladosporium, Aspergillus</i>	<i>Alternaria, Rhizopus</i>		Frijol amarillo	<i>Rhizopus, Penicillium, Cladosporium, Mycelia Sterilia</i>	<i>Rhizopus, Cladosporium, Penicillium</i>	<i>Aspergillus, Penicillium, Cladosporium</i>
	Maíz	<i>Mycelia Sterilia, Aspergillus, Rhizopus</i>	<i>Mycelia Sterilia, Rhizopus</i>	<i>Mycelia Sterilia, Rhizopus, Penicillium</i>		Maíz	<i>Aspergillus, Penicillium, Fusarium</i>	<i>Alternaria, Penicillium, Fusarium, Aspergillus</i>	<i>Aspergillus, Alternaria</i>
	Garbanzo	<i>Rhizopus, Penicillium, Plasmodium</i>	<i>Penicillium, Rhizopus, Aspergillus</i>	<i>Rhizopus, Penicillium, Aspergillus</i>		Garbanzo	<i>Rhizopus, Mycelia Sterilia</i>	<i>Rhizopus, Mycelia Sterilia</i>	<i>Mucor, Rhizopus, Plasmodium</i>
	Chía	<i>Mycelia Sterilia, Penicillium</i>	<i>Mycelia Sterilia, Penicillium</i>	<i>Penicillium, Aspergillus</i>		Chía	<i>Penicillium, Plasmodium</i>	<i>Mycelia Sterilia, Penicillium, Aspergillus, Alternaria</i>	sc

PDA: Papa dextrosa agar; EMA: Extracto de malta agar; CH: Cámara húmeda; SC: sin crecimiento

A pesar de que hubo muestras de semillas que, sin importar el tipo de medio, llegaron a presentar solo el crecimiento de una especie de hongo, la misma semilla proveniente de un mercado diferente llegó a presentar el crecimiento de más de 3 especies, esto se puede atribuir a las diferentes condiciones de almacenamiento en las que se encontraban las semillas. Ejemplo de esto es el caso de las muestras de garbanzo del mercado 3 que presentaron solo

Rhizopus spp. mientras que en los otros mercados además de *Rhizopus* spp. se llegaron a presentar más especies.

Conclusiones

Los hongos son organismos capaces de crecer en diferentes ambientes aprovechando factores como

la humedad, la temperatura y los nutrientes de los medios para asegurar su proliferación. Por lo que los alimentos, como es el caso de las semillas o granos, no están exentos de presentar crecimiento de hongos, específicamente micromicetos. Como se pudo observar hubo un crecimiento y proliferación de micromicetos debido a la presencia de esporas en las semillas, destacando los hongos *Rhizopus* spp. y *Penicillium* spp. que tuvieron presencia en la mayoría de las muestras cultivadas. Por ello es necesario dar a conocer a la población la importancia del correcto almacenaje de los granos, además de su adecuada limpieza antes del consumo para evitar el crecimiento de hongos productores de micotoxinas dañinas para la salud.

Perspectivas

Para una identificación profunda y análisis completo de los hongos presentes en los granos se requiere realizar ensayos de toxicidad que identifiquen los riesgos que puede tener para la salud, además de completar la investigación con análisis moleculares, esto con el fin de clasificar exactamente las muestras que no pudieron ser determinadas por el método tradicional.

Referencias Bibliográficas

- Arabuko New. (2017, Junio 19). Los granos básicos en México. Grupo Sacsá. Consultado el 10 de agosto de 2021, de: <https://www.gruposacsá.com.mx/los-granos-básicos-en-méxico/>
- Arahon-Hernández, G., Carballo-Carballo, A. (2014). Almacenamiento y conservación de granos y semillas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, y Alimentación, Subsecretaría de Desarrollo Rural (SAGARPA). México.
- García-Lara, S. & Bergvinson, D. (2007). Programa integral para reducir pérdidas postcosecha en maíz. Agricultura técnica en México, 33(2), 181-189. ISSN 0568-2517.
- Leyva-Mir, S. G., Vega-Portillo, H. E., Villaseñor-Mir, H. E., Tlapal-Bolaños, B., Vargas-Hernández, M., Camacho-Tapia, M., & Tovar-Pedraza, J. M. (2017). CARACTERIZACIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* CAUSANTES DE PUDRICIÓN DE RAÍZ DEL TRIGO EN EL BAJÍO, MÉXICO. Chilean journal of agricultural & animal sciences, 33(2), 142-151.
- Moreno-Martínez, E., & Benavides, O. C. (1988). Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Organización Mundial de la Salud. (2018). Micotoxinas. WHO int. Consultado el 12 de agosto de 2021, de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
- Roskopf, R. et al. (2017). Micotoxinas en los granos y subproductos. La prevención a campo, en la cosecha y durante el almacenamiento son determinantes. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. Consultado el 12 de agosto de 2021, de: <https://www.engormix.com/micotoxinas/articulos/micotoxinas-granos-subproductos-prevencion-t40611.htm>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019, octubre 14). Maíz, frijol, arroz y trigo, los granos básicos de México. Consultado el 10 de agosto de 2021, de: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/maiz-frijol-arroz-y-trigo-los-granos-básicos-de-méxico>
- Vázquez-Badillo, M. & Moreno-Martínez, E. (2016). Almacenamiento en México. Claridades Agropecuarias, 1(271), 3 – 20. ISSN 0188-9974.
- Wilman K, Stępień L, Fabiańska I, Kachlicki P. Plant-pathogenic fungi in seeds of different pea cultivars in Poland. Arh Hig Rada Toksikol. (2014) Sep 29;65(3):329-38. doi: 10.2478/10004-1254-65-2014-2480. PMID: 25205690.
- Zain, M. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society. 15(1): 129-144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>

Obtención de almidón resistente tipo V por medio de extrusión

Iturria Miranda H.D. 1; Gaytan Martínez M. 2; Castro Campos F.G. 3; Dorantes Campuzano M.F. 4.

1Universidad Autónoma de Querétaro, Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo iturria.hanna@gmail.com. 2Universidad Autónoma de Querétaro, Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos (PROPAC) marcelagaytanm@yahoo.com.mx. 3 Universidad Autónoma de Querétaro, Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos (PROPAC) fer.castro207@gmail.com. 4 Universidad Autónoma de Querétaro, Licenciatura en Ingeniería Química de Alimentos ferdorantescam@gmail.com

Resumen

El almidón resistente es una de las categorías en las cuales se divide el bien conocido polisacárido “almidón”, este opone en cierto grado a la digestión enzimática, por lo que tiene una variedad de aplicaciones y beneficios para la salud. Por lo tanto, este trabajo de investigación comprende la obtención de almidón resistente, así como la formación de complejos con el mismo para la posterior evaluación de sus propiedades físicas, en donde se encontró que menores temperaturas de extrusión favorecen el almidón resistente tipo I y que el ácido oleico a su vez favorece un mayor porcentaje de almidón resistente tipo V al formar complejos con el almidón.

The polysaccharide known as starch is divided into three categories to which resistant starch belongs. As its name suggests, it resists enzymatic digestion resulting in various applications and health benefits. Therefore, this study comprehends resistant starch obtention, in addition to the formation of starch- lipid and amylose- amylopectin complexes for the further evaluation of their physical properties. It was found that lower extrusion temperatures favor type I resistant starch while type V resistant starch obtention was favored by complex formation, particularly lipid-starch complexes.

Palabras clave

Almidón resistente, extrusión, solubilidad, absorción.

Resistant starch, extrusion, solubility, absorption.

Introducción

El almidón es el polisacárido de reserva más abundante después de la celulosa. De acuerdo con su digestión el almidón se divide en tres siendo; de digestión rápida, de digestión lenta y almidón resistente, en donde las propiedades de este dependen de dos componentes específicos; amilopectina y amilosa.

El almidón resistente es considerado un tipo de fibra dietética, que puede también contemplarse como un alimento funcional, en donde el contenido en los alimentos está directamente relacionado con la forma de esta, no obstante, esto se puede controlar también por medio de tratamientos tanto físicos como químicos (Baswaraj, Ezekiel, Raigond, 2014). Existen 5 subtipos de almidón resistente, sin embargo, el enfoque será particularmente en el tipo I el cual se debe a impedimento estérico y el tipo V, el cual

surge a partir de procesos químicos, en este caso; la formación de complejos lípido-amilosa, amilosa-pectina, entre otros. Estos complejos son resistentes a la degradación enzimática por parte de la α -amilasa (Emmambux, Panyoo, 2017)

De manera general el almidón se digiere y absorbe en el intestino delgado después de ser hidrolizado por las enzimas como α -amilasa, glucoamilasa y sucrosa-isoamilasa. Sin embargo, en el caso del almidón resistente, esto no ocurre ya que no es hidrolizado enzimáticamente en el intestino delgado y continúa su trayecto hacia el colón en donde es fermentado para dar lugar a ácidos grasos de cadena corta como el butirato, el cual es considerado el ácido graso de cadena corta más importante y que además es el principal nutriente de los colonocitos, por lo que al fungir como prebiótico, previene una gran variedad de enfermedades del colon tales como el cáncer (Baswaraj, et. al, 2014).

Dentro de las aplicaciones del almidón resistente se encuentran el potencial para controlar el contenido calórico en los alimentos, el índice glicémico, los niveles de triglicéridos y colesterol, así como para el control de diabetes, obesidad, entre otras enfermedades. Lo anterior debido a que la lenta digestión del almidón da lugar a una lenta liberación de glucosa.

En el caso de este proyecto se utilizó el método termo-mecánico de extrusión para la obtención de almidón resistente, en donde la combinación de la temperatura, presión y cizallamiento se espera que favorezca la pre-gelatinización del almidón, así como una fragmentación del mismo (Bian, Chen, He, Xie, 2021). Posteriormente se realizó la cuantificación del almidón resistente.

Por lo tanto, el objetivo del proyecto fue evaluar la formación de almidón resistente en complejos del tipo amilosa- lípido y almidón-pectina usando extrusión.

Metodología

Formación de complejos almidón-pectina

Se ajustó 1kg de almidón de maíz a 30% de humedad, se pasó por el extrusor a una temperatura de 75°C en las dos zonas de calentamiento con una velocidad de 15 rpm. Se secó la muestra en un horno de circulación forzada a 40°C por 12 h. Se molió y tamizó la muestra en malla US 60.

Formación del sistema almidón-pectina

Se añadieron 3g de pectina por cada 100g de almidón, se ajustó la humedad a 40% y se dejó reposar por 1h. Posteriormente se pasó en el extrusor con una velocidad de 15 rpm y 85°C en ambas zonas de calentamiento, nuevamente se dejó

secar el almidón bajo las condiciones mencionadas previamente.

Formación de complejos amilosa-lípidos.

Se ajustó 1kg de almidón de maíz a 30% de humedad, se pasó por el extrusor a una temperatura de 85°C en la primera zona de calentamiento y 100°C en la segunda a una velocidad de 15 rpm. Posteriormente se dejó secar el almidón extrudido en un horno de circulación forzada a 40°C por 12 h. A continuación, se molió usando un molino de café y tamizó en malla US 60. Se disolvieron 10 g de la muestra en 20 mL de agua destilada, se marcó

como “reserva 1”. Posteriormente se calentaron 80mL de agua destilada a 90°C en distintos matraces respectivamente, se añadió la “reserva 1”. A continuación, por separado, se disolvió 1g de ácido graso en 10mL de etanol, se mantuvo la temperatura por 45 minutos agitando constantemente. Al finalizar el tiempo, se colocó en un baño de hielo y posteriormente se centrifugó a 9000rpm durante 10 minutos para eliminar el exceso de agua. Se lavó con etanol y se secó a 40°C durante 24hrs, finalmente se molió y tamizó en malla US 60.

Determinación de almidón resistente

El contenido de almidón resistente se determinó por el método AACC 32-40.01 utilizando un kit de Megazyme®. Se nombraron las muestras como “85/100” y “75/75” para el almidón nativo extrudido a dichas temperaturas, los complejos almidón-lípido se nombraron “85/100-C” y “75/75- C” según las temperaturas y la última muestra se nombró “amilosa-pectina”.

Resultados

En todas las Figuras presentadas a continuación, se graficaron los promedios para cada uno de los tratamientos y temperaturas correspondientes.

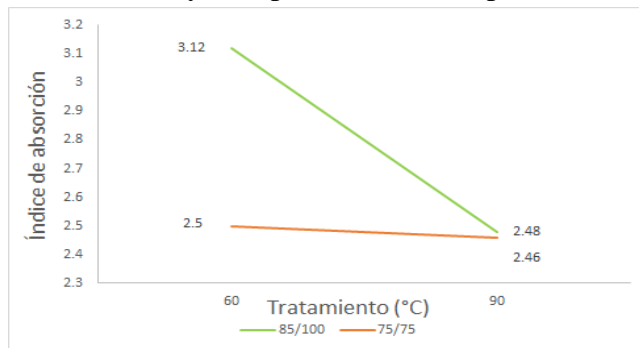


Figura 1. Índice de absorción de agua en complejos amilosa-lípido

En la Figura 1 se observa el índice de absorción de agua de los complejos amilosa-lípido extrudidos a dos temperaturas 85/100 (línea verde) y 75/75 (línea naranja) respectivamente como zonas de calentamiento.

Se observa que los complejos del tipo amilosa-lípido que fueron extrudidos a una temperatura de 85/100 presentaron un índice de absorción mayor que los que fueron extrudidos a una temperatura de 75/75. Sin embargo, lo anterior solo pudo observarse cuando la técnica se realizó a 60°C ya que, en contraste, al realizar la prueba a 90°C, no se encontraron diferencias en los índices de absorción para las muestras provenientes de ambos tratamientos (extrusión a 85/100 y 75/75 °C).

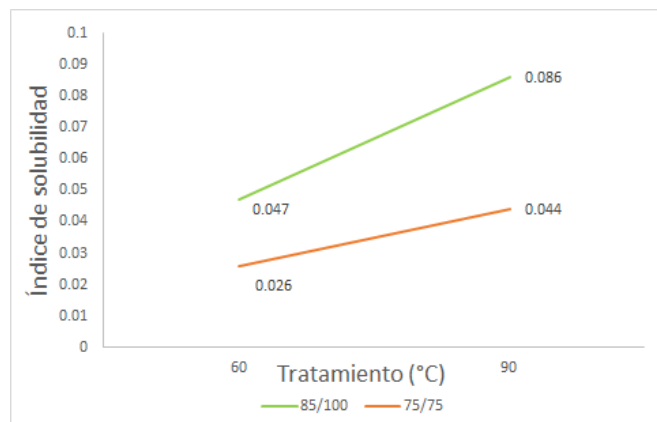


Figura 2. Índice de solubilidad de complejos amilosa-lípido

En la Figura 2, se presenta el índice de solubilidad en agua de las muestras de complejos amilosa-lípido extrudidas a 85/100 °C (línea verde) y 75/75 °C (línea naranja). En este caso las muestras extrudidas a 85/100 °C muestran un índice de solubilidad mayor al de aquellas extrudidas a 75/75 °C.

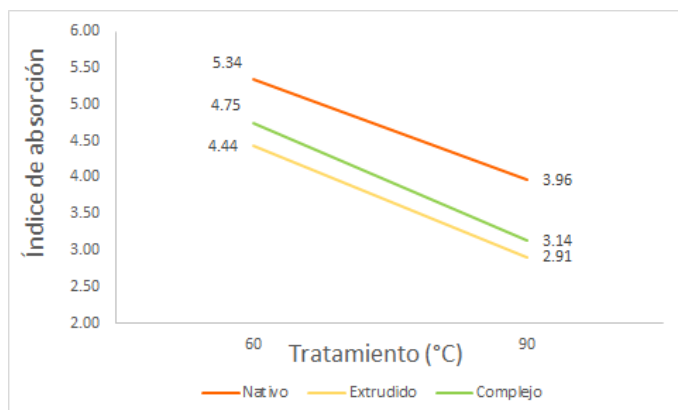


Figura 3. Índice de absorción de complejos almidón-pectina

En la Figura 3 se puede observar el índice de absorción de los complejos almidón-pectina (línea verde), así como el almidón nativo (línea naranja) y el extrudido (línea amarilla).

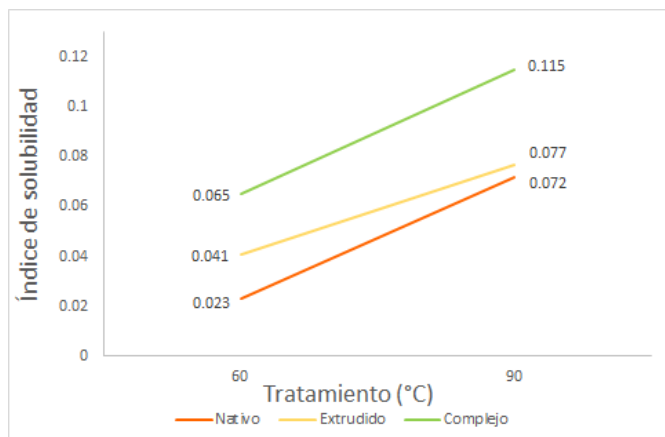


Figura 4. Índice de solubilidad de complejos almidón-pectina

En el caso de la Figura 4 se reportan los índices de solubilidad del almidón nativo (línea naranja), el extrudido (línea amarilla) y el complejo almidón-pectina (línea verde).

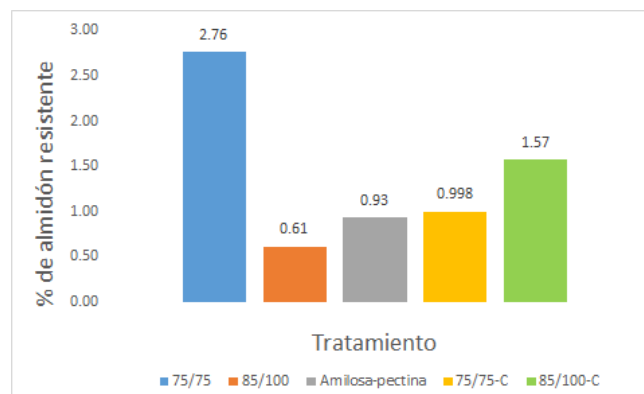


Figura 5. Porcentaje de almidón resistente en las distintas muestras.

En la Figura 5 se muestra el porcentaje de almidón resistente presente en cada muestra tras el tratamiento aplicado, en donde las muestras “85/100” (naranja) y “75/75” (azul) se refieren al almidón nativo extrudido a dos temperaturas distintas respectivamente, también se presenta el complejo de almidón-pectina (gris) y los complejos de almidón-lípido a dos distintas temperaturas “85/100-C” (verde) y “75/75-C” (amarillo).

Discusión y conclusiones

Los resultados obtenidos en el índice de absorción de los complejos amilosa-lípidos se puede atribuir a que una vez extrudido el almidón, este sufre un proceso de pre-gelatinización, en el cual el almidón adquiere una nueva estructura que permite la formación de enlaces con otras moléculas, en el caso de la Figura 1, el ácido oleico, lo cual se ve favorecido con una mayor temperatura. Anteriormente se ha reportado que el índice de absorción incrementa de manera proporcional con el grado de gelatinización (Ghafouriana et al., 2020), lo cual se ve favorecido con un proceso de extrusión a una mayor temperatura como se mencionó previamente.

En la Figura 2 se puede observar que aquellas muestras sometidas a un tratamiento de extrusión con temperatura de 85/100 °C muestran un índice de solubilidad ligeramente mayor, esto se asocia a los puentes de hidrógeno que el agua forma con el ácido oleico, tomando que la temperatura de extrusión mayor favorece la formación de complejos amilosa- lípido, por lo tanto, conforme haya mayor formación de complejos amilosa- lípido, habrá mayor disponibilidad de sitios que permitan la formación de puentes de hidrógeno, lo que dará lugar a una mayor solubilidad.

Distintos autores reportan que los complejos únicamente se precipitan en el caso de que la cadena de amilosa se encuentre saturada (Delcour et al., 2010), lo cual no sería posible en este caso debido al impedimento estérico. Asimismo, se puede observar que, en el caso de ambos tratamientos, al aumentar la temperatura aumenta de manera proporcional el índice de solubilidad, al igual que en lo reportado por Dangi et al., (2019).

En la Figura 3 se puede observar que el índice de absorción es menor al extrudir, pero mayor al añadir la pectina, sin embargo, estos datos no concuerdan con los reportados anteriormente por Dangi et al., (2019). Lo anterior se puede deber a que los autores mencionados previamente utilizan de manera sincrónica el pH como variable independiente. No obstante, se puede observar una diferencia entre el índice de absorción del almidón extrudido y el del complejo, en donde se puede observar claramente que la formación del complejo aumenta el índice de absorción con respecto al almidón que únicamente se encuentra

extrudido, lo cual se puede atribuir a que la pectina absorbe una gran cantidad de agua.

En este caso, es importante recordar que el complejo cuenta con un pretratamiento, por lo que resulta conveniente comparar por separado el almidón extrudido y el del complejo. Según lo reportado por Dangi et al., (2019), la formación de complejos almidón-pectina incrementan el índice de absorción de agua, esto se debe a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo presentes en el almidón y también se debe a que la pectina muestra interacciones adhesivas con el almidón favoreciendo la atracción entre los gránulos de almidón, lo anterior facilita la penetración del agua y por lo tanto incrementa el índice de absorción de agua.

En el caso de la Figura 4 se puede observar que, de los tres tratamientos, el almidón nativo es el que cuenta con un índice de solubilidad menor ya que se encuentra de manera compacta en forma de gránulos insolubles en agua a temperatura ambiente (Ezekiel et al., 2014).

Por otra parte, por medio de la temperatura de extrusión, el almidón adquiere una estructura lineal dando lugar a un mayor índice de solubilidad, a comparación del almidón nativo. Finalmente, al añadir la pectina, el índice de solubilidad aumenta, asimismo, se observa que la solubilidad se comporta de manera dependiente a la temperatura, en donde al aumentar ésta, aumenta la solubilidad, lo que concuerda con lo reportado por Dangi et al., (2019). En la Figura 5 se puede observar que el almidón nativo extrudido a 75/75 obtuvo el mayor valor de

almidón resistente siendo este de 2.76%, mientras que el almidón nativo extrudido a 85/100 obtuvo un valor por lo menos cuatro veces menor, lo que se atribuye a que el segundo tratamiento termomecánico (85/100 °C) resulta más agresivo debido al uso de temperaturas mayores. Asimismo, el cizallamiento llevado a cabo durante la extrusión favorece la formación de moléculas más pequeñas, reduciendo el porcentaje de almidón resistente tipo I el cual se debe a un impedimento estérico.

No obstante, en el caso de los complejos almidón-lípido la relación entre las temperaturas de extrusión y el porcentaje de almidón resistente se comporta de manera inversa, dado que el almidón, tras el tratamiento de extrusión a una temperatura de 85/100 °C cuenta con menor impedimento estérico, lo cual en un inicio muestra un menor porcentaje de almidón resistente, pero que de manera subsecuente propicia la disponibilidad de sitios de enlace para el complejo, dando lugar a un mayor número de complejos del tipo almidón-lípido y por lo tanto, un mayor porcentaje de almidón resistente con respecto a la muestra “75/75-C”.

Del mismo modo, es por esto que se puede observar que al formar los complejos ya sea del tipo amilosa-pectina (gris) o bien almidón-lípidos (verde y amarillo), el porcentaje de almidón resistente aumenta con respecto a la muestra “85/100” (naranja). Cabe resaltar que los complejos amilosa-lípido favorecen más la formación de almidón resistente que aquellos del tipo amilosa-pectina.

A manera de conclusión, se recomienda continuar con las pruebas para las distintas muestras, evaluando otros parámetros, así como incorporar nuevas variables independientes tales como el pH para observar el comportamiento tanto del almidón nativo como de los complejos formados y sus respectivas propiedades fisicoquímicas.

Bibliografía

Bian, H., Chen, L., He, H. & Xie, F. (2021) Different effects of pectin and κ-carrageenan on the multiscale structures and in vitro digestibility of extruded rice starch, *Food Hydrocolloids*, 111, 106216.

Baib, B., Chen, H., Chenga, J., Lia, X., Pana, Y. & Zhanga, B., (2018) Effects of pectin with different molecular weight on gelatinization behavior, textural properties, retrogradation and in vitro digestibility of cornstarch, *Food Chemistry*, 264, 58-63.

Dangi N., Yadav, B. & Yadav, R. (2019) Pectin and its acid hydrolysate for the modification of hydration, pasting, thermal and rheological properties of barley starch, *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 969-980.

Delcour, J., Lamberts, L. & Putseys, J. (2010) Amylose- inclusion complexes: Formation, identity and physico- chemical properties, *Journal of Cereal Science*, 51, 238-247.

Ezekiel, R., Raigond, B. & Raigond, P. (2014) Resistant starch in food: a review, *J Sci Food Agric.*, 95, 1968-78.

Ghafouriana, T., Missaghib, S., Naderic, M., Nokhodchia, A., Rajabi-Siahboomib, A., Rajabnezhada, S. & Salvaged, J. (2020) Investigation of water vapour sorption mechanism of starch-based pharmaceutical excipients, *Carbohydrate Polymers*, 238, 116208.

Kong, L. & Tan, L. (2019) Starch-guest inclusion complexes: Formation, structure, and enzymatic digestion, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60, 780-790.

Emmambux, M. & Panyoo, A. (2017) Amylose-lipid complex production and potential health benefits: A mini-review, *Starch*, 69, 1600203.

Gu, X., Gong, S., Li, W., Wang, Z. Wu, J., Yu, Y. & Zhang, W. (2020) Low and high methoxyl pectin lowers on structural change and digestibility of fried potato starch, *LWT*, 132, 109853.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma de Querétaro y al Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos por brindar el apoyo para la realización de este proyecto.

Cambios en el perfil de antocianinas de orujo de uva por la aplicación de DIC en el perfil de antocianinas de orujo de uva.

Martínez-Sánchez D.¹, Martínez-Meza Y², Reynoso-Camacho R².

¹Universidad Autónoma de Querétaro / Facultad de Química. Ingeniería en biotecnología, ² Universidad Autónoma de Querétaro/Posgrado en ciencias de los alimentos. *diegoarath18@gmail.com

Resumen

El orujo de uva es un subproducto rico en compuestos fenólicos, entre ellos antocianinas, a los cuales se le ha atribuido diversos efectos benéficos a la salud. Debido al interés en sus compuestos, ha sido necesaria la aplicación de diversas tecnologías para su aprovechamiento. Sin embargo, los cambios en el perfil de antocianinas por efecto de tecnologías han sido poco estudiado. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar los cambios en el perfil de antocianinas por la aplicación de DIC en diversas variedades de orujo de uva. De acuerdo a los resultados, la aplicación de una presión de 0.2 MPa puede generar la liberación de antocianinas como: malvidina hexósido, malvidina dihexósido, malvidina arabinósido, peonidina dihexósido y cianidina hexósido. Por otro lado, cuando se incrementó la presión a 0.4 MPa, la mayoría de las antocianinas presentaron una disminución, atribuido a su degradación por efecto de la temperatura. La degradación o incremento a diferente presión varió entre los diferentes materiales de orujo de uva, lo

que sigue que la composición de las matrices es un factor determinante en el efecto de DIC.

Palabras Clave

Orujo de uva, variedades, antocianinas, descompresión instantánea controlada.

Summary

Grape pomace is a by-product rich in phenolic compounds, including anthocyanins, to which various beneficial health effects have been attributed. Due to the interest in its compounds, it has been necessary to apply various technologies for its use. However, the changes in the anthocyanin profile due to the effect of technologies have been little studied. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the changes in the anthocyanin profile due to the application of DIC in various varieties of grape pomace. According to the results, the application of a pressure of 0.2 MPa can generate the release of anthocyanins such as: malvidin hexoside, malvidin dihexoside, malvidin arabinoside, peonidin dihexoside and cyanidin hexoside. On the other hand, when the pressure was increased to 0.4 MPa, most of the anthocyanins showed a decrease, attributed to their degradation due to the effect of temperature. The degradation or increase at different pressure varied between the different grape pomace materials, which follows that the composition of the matrices is a determining factor in the effect of DIC.

Keys Words

Grape pomace, varieties, anthocyanins, instant control pressure drop.

Introducción

El orujo de uva es un desecho de la industria del vino, este subproducto representa una cuarta parte del peso de la uva y contiene grandes cantidades de fibra dietética y aproximadamente una cuarta parte es de polifenoles. Sin embargo, la composición fenólica del orujo de uva depende en gran medida de la ubicación geográfica, las condiciones

climáticas, la tecnología de elaboración del vino y la variedad de uva (Monagas et al., 2003).

Además, debido a las importantes concentraciones de compuestos fenólicos y su asociación con efectos benéficos a la salud, diversos procesamientos se han empleado para su aprovechamiento. El procesamiento de alimentos puede afectar las estructuras de polifenoles, un tema que ha ganado un interés creciente en todo el mundo (Renard, Watrelot y Le Bourvellec, 2017). Durante el procesamiento de alimentos, los tejidos de la matriz de los alimentos se alteran, lo que hace que los compuestos contenidos en los orgánulos celulares y el citoplasma sean liberados y entren en contacto con la matriz de la pared celular. Además, el procesamiento de alimentos también puede resultar en diferentes tipos de cambios de textura, que a menudo están relacionados con alteraciones en la porosidad y área de superficie específica de la pared celular (Le Bourvellec y Renard, 2005), factores que afectan la liberación de los compuestos de la matriz. La mayoría de las tecnologías aplicadas al orujo de uva (extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por microondas) utilizan agua como medio de difusión, lo que conlleva a la separación sólido-líquido y nuevamente la generación de un residuo rico en compuestos que no se aprovecha (Guntero et, 2015). Una tecnología que no usa agua como medio de difusión es la descompresión instantánea controlada (DIC). Es una tecnología interesante tanto desde el punto de vista tecnológico como económico, que consiste en un tratamiento termomecánico de tipo HTST (High Temperature for Short Time, alta temperatura-corto tiempo), combinado con una descompresión instantánea a vacío.

Además de los cambios estructurales, éstos vienen acompañados de cambios en la diversidad de estructuras de los polifenoles. El efecto de los diferentes procesos a los que pueden ser sometidos genera cambios en el perfil de los compuestos, por

lo que es necesario evaluar las modificaciones en los compuestos fenólicos durante el procesamiento para mejorar la información sobre el contenido fitoquímico de productos procesados.

Objetivo

El objetivo fue evaluar el cambio en el perfil de antocianinas por la aplicación de DIC en los distintos orujos de uva.

Metodología

-Material vegetal

Se recolectó el orujo de uva Malbec, Merlot y Syrah de diferentes viñedos de la región de Querétaro, México. Los materiales se guardaron en recipientes herméticos, para protegerlos de la luz y prevenir su oxidación. Se congelaron (-20 °C) hasta su uso.

-Aplicación de DIC en orujo de uva

Para la aplicación de DIC se utilizó dos presiones 0.2 y 0.4 MPa, con 4 ciclos de aplicación de 30 segundos cada uno. Posteriormente las muestras se secaron a 45 °C, se molieron y pasaron por un tamiz para obtener un tamaño de partícula de <400 µm.

- Perfil de antocianinas de las muestras tratadas con DIC por UHPLC QqQ-ESI-MS
Para el análisis del perfil de antocianinas, se utilizó un extracto obtenido a partir de dos extracciones secuenciales; a 0.5 g de muestra se le adicionaron 20 mL de una solución de metanol/agua (50:50) a pH 2, se agitó y se centrifugó, al residuo se le adicionó 20 mL de una solución de acetona/agua (70:30) y se recuperó el sobrenadante. El extracto obtenido (1 mL) se secó al vacío (Speedvac, Savant, Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.) y se resuspendió en 200 µL de metanol y se filtró (0,45 mm). Las muestras se inyectaron en una columna BEH Acquity C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 m) a 35 ° C. Se utilizó un cromatógrafo líquido de alto rendimiento (UPLC) acoplado a un espectrómetro de masas (MS) de tiempo de vuelo cuadrupolo (Q-ToF MS) con una interfase ESI. Para las curvas de

calibración se utilizó cloruro de cianidina (Reynoso-Camacho et al., 2021).

Resultados

Los cambios en el perfil de antocianinas por efecto de DIC en las diferentes variedades analizadas se muestran en la Tabla 1. La descripción de la codificación de las antocianinas se presenta en la tabla 2.

En los materiales evaluados (Malbec, Merlot y Syrah), las tres antocianinas predominantes fueron malvidina cumaroil glucósido, malvidina hexósido y malvidina acetil-hexósido. Se observó que el impacto en la reducción de cada una de las antocianinas a 0,4 MPa con 4 ciclos no fue similar en todos los materiales. Así, la disminución de malvidina-cumaroil hexósido (antocianina principal) fue del 75% en el material Syrah, del 52% en el Merlot y del 44% en el Malbec. Mientras

que para las antocianinas no aciladas (malvidina hexósido, petunidina hexósido, peonidina hexósido y delfinidina hexósido) la disminución fue más notable en el material Malbec seguido de Syrah y Merlot. Por otro lado, DIC generó un aumento de algunas antocianinas (malvidina hexósido, malvidina dihexósido, malvidina arabinósido, peonidina dihexósido y cianidina hexósido) a 0.2 MPa con cuatro ciclos, atribuido a la expansión de la matriz generada por la autovaporización del agua dentro de la misma, cuando se somete a una abrupta caída de presión.

Tabla 1. Perfil de antocianinas identificadas en las tres variedades (Merlot, Malbec, Syrah) que se sometieron a DIC

#	SYR	SYR2	SYR4	MAC	MAC2	MAC4	MER	MER2	MER4
1	333±33 ^E	231±11 ^E	252±25 ^E	3845±1 ^{aA}	2983±63 ^{bB}	2174±59 ^{cC}	763±49 ^{abD}	951±27 ^{aD}	444±120 ^{bE}
2	2±0.2 ^{BC}	3.4±0.5 ^{AB}	4.3±0.9 ^A	2.0±0.0 ^{aBC}	1.2±0.0 ^{bC}	1.2±0.0 ^{bC}	ND	0.7±0.1 ^C	0.3±0.0 ^C
3	123±9 ^{aFG}	82.9±2.1 ^{bG}	99.5±3 ^{abFG}	953±2 ^{aA}	760±0 ^{bB}	573±19 ^{cC}	267±13 ^E	352±1 ^D	166±54 ^F
4	1198±85 ^{aD}	482±20 ^{bE}	299±11 ^{bEF}	5242±40 ^{aA}	4270±83 ^{bB}	2902±58 ^{cC}	305±16 ^{EF}	325±1 ^{EF}	144±49 ^F
5	34±5 ^{aD}	14±0.4 ^{bEF}	13.6±1 ^{bEF}	368±6 ^{aA}	244±3 ^{bB}	143±5 ^{cC}	22.1±1.6 ^{DE}	27.9±2.4 ^{DE}	7.0±2.3 ^F
6	19±2 ^{DE}	26.3±2 ^{CD}	20.3±3 ^{DE}	61.9±0.1 ^{aA}	53.9±4.3 ^{aA}	41.9±0.9 ^{bB}	16.1±0.1 ^{BE}	34.5±2 ^{aBC}	11.2±2.2 ^{bE}
7	3.8±0.4 ^F	3.8±0.7 ^F	5.2±0.7 ^F	46.1±1.1 ^{aA}	27.4±1.4 ^{bC}	16±0.6 ^{cDE}	22.5±2 ^{bCD}	35.5±2.9 ^{aB}	10.3±2.6 ^{cEF}
8	21.8±1 ^B	27.8±1.1 ^B	26.5±18 ^{AB}	42.3±2.8 ^A	25.1±4.7 ^B	ND	ND	ND	ND
9	30.2±5 ^F	20.6±1.3 ^F	23.5±6.2 ^F	1031±2 ^{aA}	720±16 ^{bB}	398±13 ^{cC}	139±11 ^{aE}	190±3 ^{aD}	50.8±18.1 ^{bF}
10	8.0±1.4 ^F	6.9±0.5 ^F	8.3±1.3 ^F	175±1 ^{aA}	123±3 ^{bB}	85.8±4.5 ^{cC}	39.5±3.1 ^E	62.6±3.4 ^D	19.5±7.1 ^F
11	34.2±4 ^F	31.3±1.4 ^F	42.5±5.2 ^F	331±7 ^{aA}	251±14 ^{bBC}	186±5 ^{cDE}	227±18 ^{abCD}	309±5 ^{aAB}	142±37 ^{bE}
12	2±0.1 ^{bBC}	3±0.1 ^{abAB}	3.7±0.6 ^{aA}	0.2±0.3 ^{CD}	ND	0.2±0.2 ^{CD}	0.3±0.0 ^{bD}	0.8±0.0 ^{aCD}	0.2±0.2 ^{bD}
13	7.9±1.3 ^F	6.2±0.4 ^F	6.4±2.1 ^F	502±10 ^{aA}	300±6 ^{bB}	128±5 ^{cC}	70.1±4.4 ^{aE}	100±11 ^{aD}	19.7±4.5 ^{bF}
14	2.6±0.6 ^E	2.1±0.2 ^E	2.6±0.5 ^E	51.5±2.1 ^{aA}	34.4±1.7 ^{bB}	23.6±0.8 ^{cC}	15.2±0.7 ^{bD}	25.2±1.2 ^{aC}	7.2±2.5 ^{cE}
15	33.2±5 ^{aC}	10.6±1.0 ^{bC}	8.6±1.0 ^{bC}	436±4 ^A	172±198 ^B	171±6 ^B	25.9±1.9 ^C	29.4±2.9 ^C	8.0±2.6 ^C
16	1.8±0 ^{bE}	2.7±0.1 ^{abE}	4.3±0.8 ^{aE}	44.7±1.3 ^{aA}	27.6±0.5 ^{bB}	17±0.7 ^{cCD}	24.5±2 ^{bBC}	45.4±3.4 ^{aA}	13.7±4.3 ^{bD}
17	ND	ND	0.89±0.1 ^B	0.7±0.01 ^{bB}	0.85±0.0 ^{bB}	1.69±0.1 ^{aA}	0.50±0.1 ^{bB}	1.67±0.2 ^{aA}	1.40±0.1 ^{abB}
18	1.01±0 ^D	1.1±0.03 ^D	1.7±0.32 ^D	7.2±0.3 ^{aC}	5.2±0.1 ^{bCD}	4.2±0.3 ^{bCD}	13.3±0.9 ^{abB}	20.9±2.1 ^{aA}	7.3±2.2 ^{bC}

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. y su concentración como µg/g. Cada tipo de antocianina fue representado con un número. En cada fila, diferentes letras minúsculas en superíndice indican diferencias significativas entre condiciones para un mismo material, mientras que diferentes letras mayúsculas en superíndice indican diferencias significativas entre todos los tratamientos, en ambos casos según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). ND: no detectado. La identificación se llevó a cabo mediante el análisis de la masa exacta del ion molecular (error de masa <5 ppm), la distribución de isótopos y el patrón de fragmentación. MAC, Malbec; MER, Merlot; SYR, Syrah. Y la notación de 2 y 4 corresponde a la aplicación de DIC a 0.2 y 0.4 MPa respectivamente.

Tabla 2. Descripción de la codificación del perfil de las antocianinas

#	Componente
1	Malvidina hexósido
2	Malvidina dihexósido
3	Malvidina acetil-hexosido
4	Malvidina cumaroil-hexosido
5	Malvidina cafeoil-hexosido
6	Ácido malvidina hexosido pirúvico (Visitina A)
7	Malvidina arabinósido
8	Malvidina hexósido vinilfenol (Pigmento A)
9	Petunidina hexósido
10	Petunidina acetil-hexósido
11	Peonidina hexósido
12	Peonidina dihexósido
13	Delfinidina hexósido
14	Delfinidina acetil-hexósido
15	Delfinidina rutinósido
16	Cianidina hexósido
17	Cianidina cafeoil-hexósido
18	Cianidina acetil-hexósido

Discusión

De acuerdo a los resultados, la aplicación de una presión baja genera la liberación de algunas antocianinas, lo cual se puede atribuir a la expansión de la matriz, sin dañar o degradar las antocianinas. Lo cual coincide con la aplicación de DIC en otros materiales, de acuerdo con Ben Amor y Allaf, (2009), en Malasia Roselle, se observó un incremento en la extracción de antocianinas mediante el proceso DIC a baja presión (0,18 MPa). Por otro lado, cuando la presión incrementó, las antocianinas se vieron afectadas, lo cual está asociado a la termosensibilidad de las mismas. En este sentido, cada presión tiene una equivalencia de temperatura basada en la ecuación de Antoine a 0,2 MPa (2 bar), la temperatura es de 120,23 °C y a 0,4 MPa (4 bar) es de 143,63 °C. La disminución fue más significativa a medida que aumentaron la presión y los ciclos de procesamiento.

Se sabe que la estabilidad de las antocianinas se ve afectada por varios factores como la temperatura, estructura química, pH, luz y oxígeno. Sin embargo, dependiendo de la variedad el impacto del incremento de la presión en el sistema afectó de manera más o menos drástica a la degradación de las antocianinas. De acuerdo con Fernandes y col., (2020), la termoestabilidad de las antocianinas podría mejorarse o esta en función de su asociación con polisacáridos pécticos, lo que sugiere que la composición de la fibra de cada una de las variedades es un factor determinante en cuanto el efecto de la aplicación de DIC en orujo de uva. Además, Padayachee y col., (2012) sugirieron que las antocianinas pueden generar interacciones iónicas con pectina e interacciones hidrófobas con la celulosa de las paredes celulares. Estos factores subyacentes explicarían las diferencias observadas entre materiales.

Conclusiones

Este estudio exploró el efecto del material original, las condiciones de presión y el número de ciclos en el perfil de antocianinas al aplicar DIC a orujos de uva. Luego de realizar estas determinaciones en los materiales de Malbec, Merlot y Syrah, se observó que las características del material original marcan una diferencia significativa en los efectos del tratamiento DIC en los niveles finales de antocianinas. En conclusión, dependiendo de la composición de la variedad del orujo de uva se aumentará más las concentraciones de las antocianinas, siendo que en Syrah se aumenta con 0.4 MPa, con Malbec se conserva más con 0.2 MPa y en Merlot se da un aumento a una presión de 0.2 MPa

Agradecimientos

Un profundo abrazo y agradecimiento a la paciencia y disponibilidad de la futura doctora Yuri y a mis compañeros Joaquín y Rodolfo

Referencias bibliográficas

- V.A. Guntero, M.B. Longo, S.A. Ciparicci, R.E. Martini, A.E. Andreatta “Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola” VII Congreso Argentino de Ingeniería química.
- B. Ben Amor & K Allaf . “Impacto del texturizado mediante el tratamiento instantáneo de caída de presión antes de la extracción con solvente de antocianinas de Malaysian Roselle (Hibiscus sabdariffa)”. *Química de Alimentos*, 115(3), 820–825. 2009
- A. Fernandes, J. Fonseca, F. Ferreira-da-Silva, N Mateus, J.P. Vincken & V. de Freitas (2020). Unión molecular entre antocianinas y polisacáridos pécticos: revelación del papel de la estructura de polisacáridos pécticos. *Hidrocoloides alimentarios*. 102, 10562
- R. Rodríguez, I. Pérez, C. Bald, I. Martínez de Marañón “Descompresión Instantánea Controlada (D.I.C.), una tecnología prometedora” Disponible en: <https://alimentatec.com/descompresion-instantanea-controlada-d-i-c-una-tecnologia-prometedora/>
- R. Reynoso-Camacho, A.M. Sotelo-González, P. Patiño-Ortiz, N.E. Rocha-Guzmán, & I.F. Pérez-Ramírez (2021). “Berry by-products obtained from a decoction process are a rich source of low-and high-molecular weight extractable and non-extractable polyphenols”. *Food and Bioproducts Processing*, 127, 371-387.
- A. Padayachee, G. Netzel, M. Netzel, L.Day, D. Zabarás, D. Mikkelsen & M.J.Gidley (2012). Binding of polyphenols to plant cell wall analogues–Part 1: Anthocyanins. *Food Chemistry*, 134(1), 155-161.
- M. Monagas, C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé, Q. Laureano & J.M. Ricardo da Silva. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6475-6481. 2003
- C.M.G.C Renard, A.A. Watrelot, & C. Le Bourvellec. Interactions between polyphenols and polysaccharides: Mechanisms and consequences in food processing and digestion. *Trends in Food Science & Technology*, 60, 43–51. 2017
- C. Le Bourvellec, & C.M.G.C Renard. "Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part II: Quantification and impact of cell wall drying. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*", 1725(1), 1-9. 2005

Síntesis y caracterización de catalizador tipo perovskita para DOM.

Sebastián Mori Huerta ^a.

C-e: smori26@alumnos.uaq.mx

Asesor: Dr. Carlos Martín Cortés Romero a.

C-e: carloscort2001@yahoo.com.mx

^a Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, 76010, Santiago de Querétaro, Querétaro, México.

Resumen

Los catalizadores a base de perovskita (SrFeO_3) para la oxidación controlada en condiciones secas de metano (DOM, por sus siglas en inglés) constituyen una opción económicamente rentable además de poseer una estructura bien definida que les permite acomodar metales catalíticamente activos con alta estabilidad térmica y una alta dispersión, con resistencia al envenenamiento y mejor efectividad por su naturaleza misma. En este estudio se llevó a cabo la síntesis utilizando como precursores nitrato de estroncio ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$) y nitrato de hierro nonahidratado ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) y ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), posteriormente se impregno en alúmina (Al_2O_3) y esponja mesoporosa de sílice (EMS-15) y finalmente se calcino. Una vez listo el catalizador se realizó la caracterización aplicando los métodos analíticos instrumentales TGA, XRD y espectroscopia UV-Vis.

Abstract

The catalysts based on perovskite (SrFeO_3) for controlled oxidation in dry conditions of methane (DOM) constitute an economically profitable option in addition to having a well-defined structure that allows them to accommodate catalytically active

metals with high thermal stability and high dispersion, with resistance to poisoning and better effectiveness by its very nature. In this study, the synthesis was carried out using as precursors strontium nitrate ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$) and iron nitrate nonahydrate ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) and citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), later it was impregnated in alumina (Al_2O_3) and mesoporous silica sponge (EMS-15) and finally calcined. Once the catalyst was ready, the characterization was carried out applying the instrumental analytical methods TGA, XRD and UV-Vis spectroscopy.

Palabras clave: Oxidación en Seco de Metano, gas de síntesis, perovskita, catalizador.

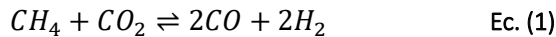
Keywords: Dry Oxidation of Methane, syngas, perovskite, catalyst.

Introducción

Actualmente estamos viviendo estragos producidos por las actividades humanas, el uso excesivo de combustibles fósiles nos ha llevado a una serie de problemas medio ambientales como lo es el cambio climático resultante de la cantidad excesiva de los gases de efecto invernadero (GEI) en la atmósfera. Según datos de la Organización Meteorológica Mundial (OMM) los niveles de los GEI han alcanzado niveles históricos, el más abundante es el dióxido de carbono (CO_2) que alcanzó la concentración media mundial de 410.5 ppm en 2019, si bien los niveles mundiales de CO_2 en 2015 sobrepasaron el umbral simbólico de 400 ppm tan solo cuatro años más tarde superamos 410 ppm y las tendencias marcan que continuará en aumento. Por otro lado, la concentración del metano (CH_4), un potente GEI, alcanzó en 2019 un nuevo máximo de $1\,877 \pm 2$ ppm, lo que representa un aumento de 8 ppm con respecto al año anterior (OMM, 2020). Para poder cambiar un poco este escenario es necesario optar por energías limpias en las que el hidrógeno (H_2) es una solución viable a las necesidades energéticas futuras. Se calcula que la liberación de calor por unidad de

masa de hidrógeno es tres veces mayor que la de la gasolina y durante su combustión solo se produce vapor de agua (Wang et al., 2019).

En este contexto se vuelve clave realizar avances tecnológicos ligados a la preocupación por el cuidado del medio ambiente, así como del uso o generación de energías limpias. Una parte importante de estas tecnologías son los procesos catalíticos que nos van a permitir incrementar eficientemente la velocidad y selectividad de las reacciones involucradas. Mediante DOM se puede producir hidrógeno como gas de síntesis (syngas, abreviado en inglés), para llevarla a cabo se hacen reaccionar metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) para obtener como productos hidrógeno (H₂) y monóxido de carbono (CO) (Ec. (1)), en presencia de un catalizador y condiciones de operación específicas.



En esta reacción se utilizan dos de los gases de efecto invernadero más importantes y permite producir energía limpia, sin embargo, el problema para llevar la DOM a escala industrial radica en que los metales con mejor actividad catalítica, como el rodio (Rh) y el rutenio (Ru), tienen un costo elevado y la formación de carbono y su deposición durante la reacción a alta temperatura. Para el diseño de un buen catalizador hay que tomar en cuenta diversos factores como lo son los sitios de metales activos, el tipo de soporte, la interacción del soporte con el metal, el método de preparación entre otros (Aziz et al., 2019). Catalizadores de óxidos cristalinos como lo son las perovskitas constituyen una alternativa viable, no solo económicamente, sino porque debido a su estructura bien definida permite acomodar metales catalíticamente activos con alta estabilidad térmica y una alta dispersión, con resistencia al envenenamiento y mejor efectividad por su naturaleza misma (Abdulrasheed, 2019). Las perovskitas, que originalmente se refiere a CaTiO₃, ahora se convierte en un nombre para el grupo de óxidos que se pueden formular como ABX₃, donde el sitio A representa un metal raro o alcalino, mientras que el sitio B es para

la mayoría de metales de transición, los cationes B y los aniones X forman octaedros BX₆ que comparten esquinas con los cationes A que ocupan los sitios dentro de la cavidad de ocho de estos octaedros (Xu et al., 2019) (Fig. 1). Debido a las características estructurales únicas, la perovskita podría acomodar alrededor del 90% de los elementos metálicos en los sitios A y/o B, sin dañar la estructura cristalina original (Bian, 2020).

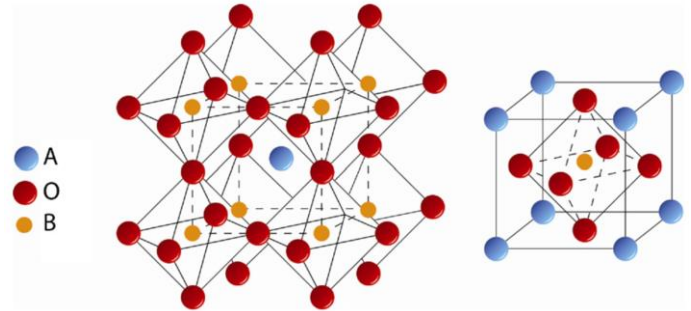
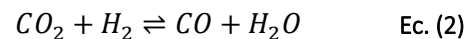


Fig. 1. Estructura de la perovskita.

En este caso se utiliza perovskita (SrFeO₃) en dos distintos soportes alúmina (Al₂O₃) y en esponja mesoporosa de sílice (EMS-15). Cabe señalar que en la DOM se llevan a cabo reacciones secundarias, como la reacción “Water-Gas Shift” (Ec. (2)), la reacción de Boudouard entre otras (Ec. (3)), que dificultan la selectividad. Además de ser una reacción que no se ve favorecida termodinámicamente. Por lo tanto, se vuelve un reto muy interesante para generar mayor información al respecto, puesto que es un proceso catalítico con un gran potencial y que podría generar muchos beneficios.



Objetivo general

Establecer métodos integrales para el estudio de un sistema reaccionante, la oxidación controlada en condiciones secas de metano, que permitan al investigador y a los estudiantes involucrados en el

proyecto, aplicar los preceptos de la ingeniería química para adquirir conocimientos, experiencias y criterios fundamentados en un análisis crítico de resultados experimentales, tanto para la preparación del material catalítico (perovskita).

Objetivos específicos

- Implementar una metodología de síntesis de un material cerámico (perovskita tipo SrFeO_3 soportada en alúmina Al_2O_3) mediante la técnica hidrotermal asistida por microondas, la cual es una técnica generalizada para preparar este y otros tipos de materiales compuestos.
- Caracterizar el material compuesto sintetizado y de referencia, basadas en técnicas fisicoquímicas y/o espectroscópicas, buscando estandarizar y generalizar los métodos analíticos instrumentales que permitan para conocer la naturaleza química y estructural de cualquier tipo material.

Metodología

Síntesis del catalizador

Para realizar la síntesis de SrFeO_3 , se utilizaron como precursores nitrato de estroncio ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$) y nitrato de hierro nonahidratado ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), se pesaron en una balanza analítica 2.6019 g y 3.8017 g respectivamente, se pesó por separado 5.7321 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$). Se colocó en un vaso de precipitados 475 mL de agua y se puso el vaso en agitación y a una temperatura de 80°C . Se adicionaron los compuestos al vaso lentamente, el nitrato de estroncio, posteriormente el nitrato de hierro y finalmente el ácido cítrico, la agitación y el calentamiento se mantuvieron durante y después de las adiciones hasta tener una solución color amarillo. Una vez sintetizada la solución se ajusta a un pH de 2

empleando una solución buffer de hidróxido de amonio (NH_4OH).

Impregnación de la perovskita en el soporte.

Se emplea un gramo de cada uno de los soportes, alúmina mesoporosa (Al_2O_3) y esponja mesoporosa de sílice (EMS-15), ambos poseen una gran superficie específica y porosidad, el objetivo de su uso es extender el área del agente activo, así como mejorar la estabilidad del catalizador y mejorar las características mecánicas del material. De la solución preparada de perovskita se toman con una jeringa 0.7 ml para la alúmina y 1.05 mL para la EMS-15 y se agregan gota a gota sobre el soporte. Es importante que la solución del catalizador moje completamente el soporte para hacer crecer la perovskita en la superficie. Se deja secar a temperatura ambiente y se repite el procedimiento cuatro veces.

Una vez impregnado el soporte se procede a realizar la calcinación en la mufla siguiendo la rampa de temperatura que se muestra en la Fig. 2.

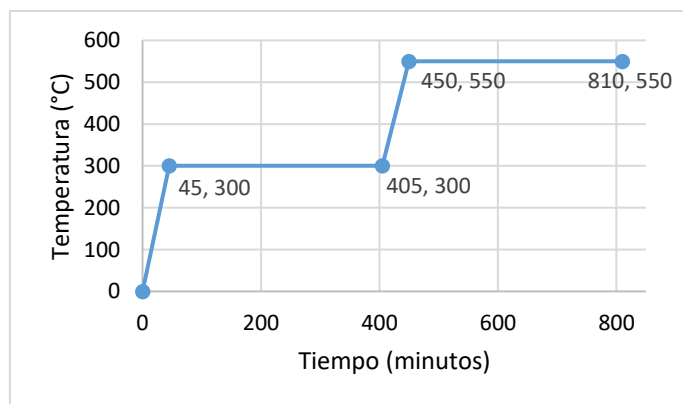


Fig. 2. Rampa de temperatura de la mufla para la calcinación del catalizador.

Caracterización del material sintetizado por técnicas espectroscópicas.

- Análisis termogravimétrico (TGA)

El TGA se utilizó para determinar la estabilidad térmica del catalizador, así como la fracción de

componentes volátiles. Estos estudios se realizaron en un equipo Q500 TGA de TA Instruments en un rango de temperatura de 28 °C a 650 °C.

b) Difracción de rayos X (XRD)

Para materiales inorgánicos, incluida la perovskita, la XRD es una de las medidas más simples para identificar la estructura cristalina, que se puede confirmar comparando con la base de datos estándar del archivo de difracción de polvo (PDF). Para este análisis se utilizó el difractómetro D8 Advance de la marca BRUKER, utilizando radiación Cu K α .

c) Espectroscopia UV-Vis

La espectroscopía UV-Vis es una técnica analítica que mide la cantidad de radiación absorbida por una muestra en comparación con una muestra de referencia o en blanco. Esta propiedad está influenciada por la composición de la muestra, lo que potencialmente proporciona información sobre lo que hay en la muestra.

Resultados

Síntesis del catalizador.

Lo que se busca es producir iones de Fe³⁺ y Sr²⁺ en solución que al reaccionar con el ácido cítrico genere citratos, obteniendo una solución como la que se muestra en la Fig. 3. Una vez impregnada la solución en su respectivo soporte se lleva a calcar formando cristales de perovskita dentro de los poros del soporte, obteniendo nuestro catalizador (Fig. 4).



Fig. 3. Solución de perovskita SrFeO₃

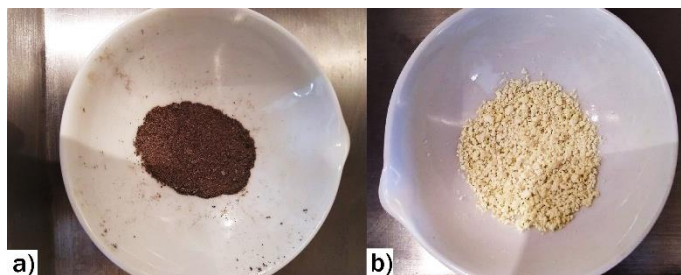


Fig. 4. a) Perovskita soportada en alúmina mesoporosa; b) Perovskita soportada en EMS-15.

Análisis termogravimétrico (TGA)

En el análisis termogravimétrico (Fig. 5-6) de la perovskita en alúmina mesoporosa se observa una pérdida de masa entre los 28 y 200 °C que se asocia a la pérdida de humedad y agua intermolecular. Mientras que para la perovskita en EMS-15, experimenta entre los 28 y 75 °C una enorme pérdida de masa de aproximadamente el 30% debida a la humedad contenida en el soporte. Posteriormente en ambos casos se da una pérdida de peso producto de la autocombustión de los citratos metálicos. A partir de entre los 500 y 550 °C se observa que se consolida la fase cristalina.

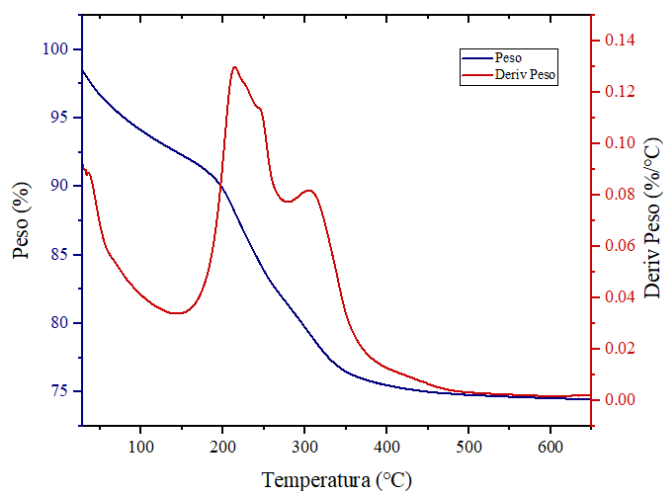


Fig. 5. Termograma de la perovskita (SrFeO₃) soportada en alúmina mesoporosa obtenido por TGA.

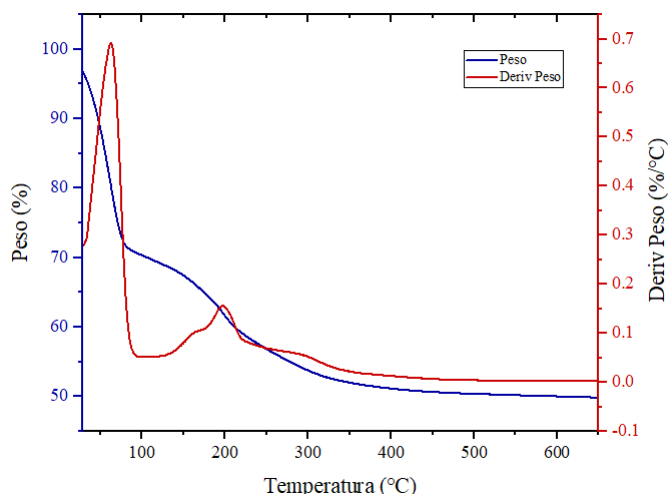


Fig. 6. Termograma de la perovskita (SrFeO_3) soportada en EMS-15 obtenido por TGA.

Espectroscopia UV-Vis

Las principales transiciones electrónicas para la perovskita soportada en alúmina y en EMS-15 fueron a una longitud de onda de 260 y 250 nm respectivamente (Fig. 7-8). En la región de UV comprendida entre los 200-300 nm se tienen materiales que presentan propiedades fotocatalíticas asociadas a una brecha energética que se puede evidenciar empleando el espectro UV-Vis, el análisis realizado confirma que el material preparado tendrá actividad, según los resultados probablemente la actividad se encontrará relacionada a un estímulo de radiación UV.

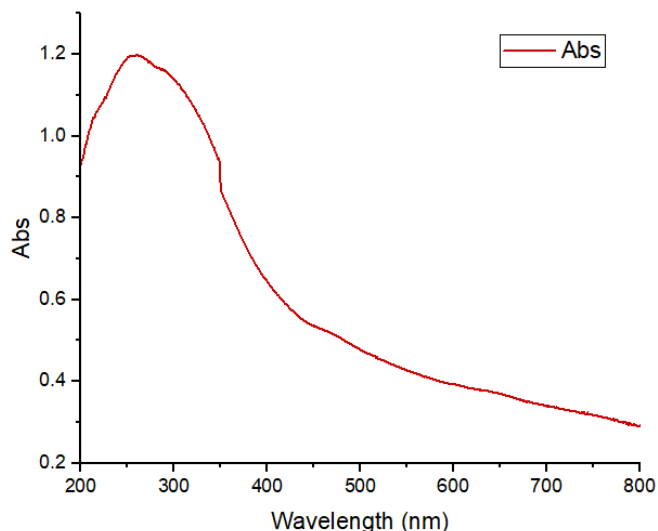


Fig. 7. Espectro UV-Vis de la perovskita (SrFeO_3) soportada en alúmina mesoporosa obtenido por TGA.

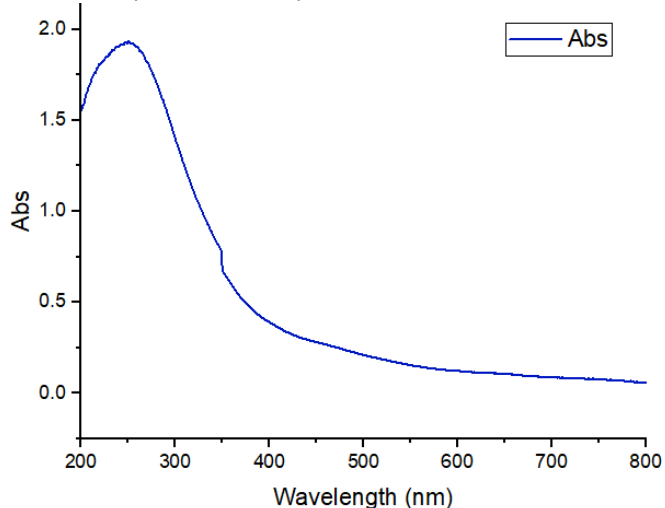


Fig. 8. Espectro UV-Vis de la perovskita (SrFeO_3) soportada en EMS-15 obtenido por TGA.

Difracción de rayos X (XRD)

En los difractogramas (Fig. 9) no se logra observar con claridad la presencia de perovskita debido a que la concentración de esta es baja en su respectivo soporte, aproximadamente el 5% m/m, por lo que la sensibilidad del instrumento no es suficiente para detectar su estructura cristalina, por lo tanto, para comprobar la presencia de perovskita es necesario realizar otros análisis complementarios.

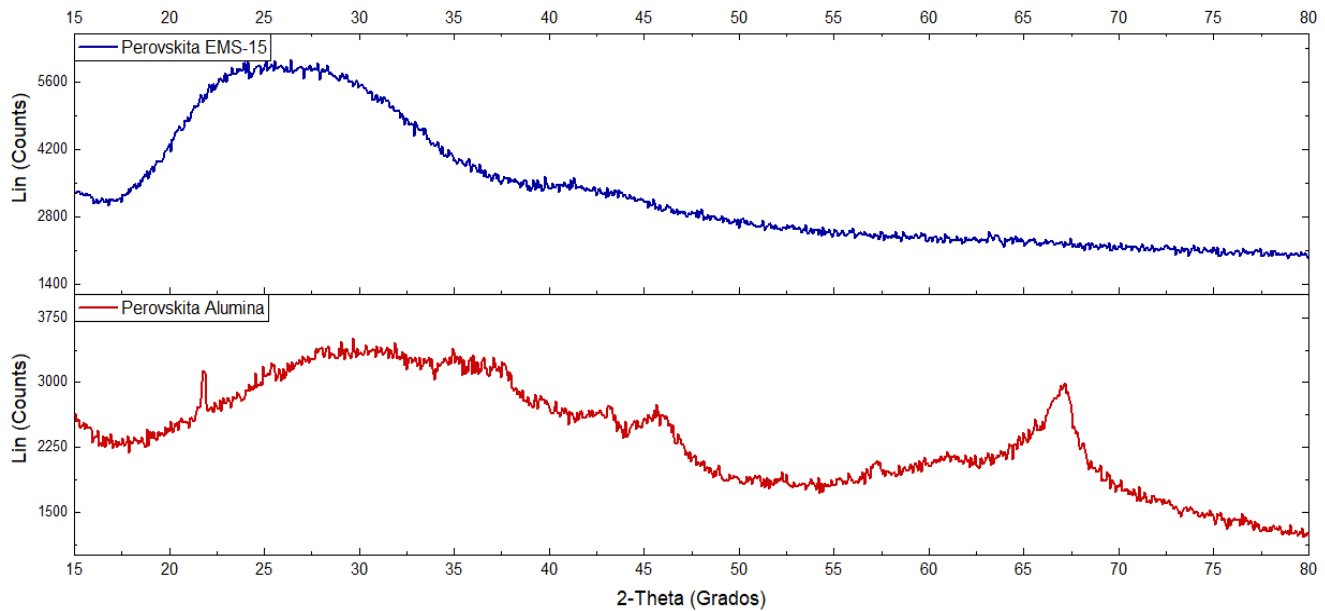


Fig. 9. Difractograma de perovskita soportada en alúmina mesoporosa y EMS-15

Discusión y conclusiones

Para realizar esta investigación fue necesario aplicar los preceptos de la ingeniería química para poder realizar la síntesis y caracterización de Perovskita soportada en alúmina y EMS-15, con la finalidad de ser utilizado como catalizador en la oxidación controlada de metano en condiciones secas.

Se implementó una metodología para la síntesis de perovskita (SrFeO_3) soportada en alúmina mesoporosa y en EMS-15, una vez sintetizada se procedió a su caracterización empleando métodos analíticos instrumentales. TGA para determinar la estabilidad térmica del catalizador, dándose a partir de una temperatura de 550 °C aproximadamente. Se utilizó espectroscopia UV-Vis para determinar la longitud de onda de sus principales transiciones electrónicas siendo a 260 nm para la perovskita soportada en alúmina y 250 nm para la soportada en EMS-15. Se empleó la técnica XRD para identificar la estructura cristalina, sin embargo, no fue posible identificar las difracciones características de la perovskita, por lo que es necesario realizar otras técnicas de caracterización complementarias.

Agradecimientos

El trabajo desarrollado para este reporte fue bajo los lineamientos del proyecto de investigación FONDEC-UAQ2019-FCQ202002 y del Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP) con numero de apoyo UAQ-PTC-339 PRODEP.

Referencias bibliográficas

Abdulrasheed, A., Jalila, A., Gamboa, et al. "A review on catalyst development for dry reforming of methane to syngas: Recent advances", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 108, pp. 175-193, 2019.

Aziz, M.A.A., Setiabudi, H.D., Teh, L.P., et al. "A review of heterogeneous catalysts for syngas production via dry reforming", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. Vol. 101, pp. 139–158, 2019.

Bian, Z., Wang, Z., Jiang, B., et al. "Una revisión de los catalizadores de perovskita para la transformación de metano en producción de hidrógeno", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 134, 2020.

OMM. "Boletín sobre los gases de efecto invernadero - N°16: Estado de los gases de efecto invernadero en la atmósfera según las observaciones mundiales realizadas en 2019", ISSN 2078-0796, No. 16, 2020.

Wang, M., Wang, G., Sun, Z., et al. "Review of renewable energy-based hydrogen production processes for sustainable energy innovation", *Global Energy Interconnection*, Vol. 2, pp. 436-443, 2019.

Xu, X., Zhong, Y., & Shao, Z. "Double Perovskites in Catalysis, Electrocatalysis, and Photo(electro)catalysis", *Trends in Chemistry*, Vol. 1, pp. 410-424, 2019.

Efecto de tecnología DIC en flavonoides de orujo de uva

Rojas-Medina R.J.¹, Martínez-Meza Y², Reynoso-Camacho R².

¹Universidad Autónoma de Querétaro / Facultad de Química. Ingeniería en biotecnología, ² Universidad Autónoma de Querétaro/Posgrado en ciencias de los alimentos. [*rodgrm99@gmail.com](mailto:rodgrm99@gmail.com)

Resumen

Se evaluó el efecto de DIC sobre la liberación de compuestos polifenólicos, principalmente de flavonoides en diversas variedades de orujo de uva (Syrah, Merlot y Malbec) a diferentes presiones (0.2 y 0.4 MPa). Se obtuvo un aumento de los EPP y una disminución de los NEPP. Este aumento tiene relación con la despolimerización y liberación de proantocianidinas y polifenoles no extraíbles y por tanto un aumento en el número de monómeros de flavonoides, mayoritariamente de dos de sus subfamilias; flavanoles y flavonoles identificados por medio de UHPLC QqQ-ESI-MS. Los resultados indican que el tratamiento con DIC tuvo un efecto positivo y significativo en la concentración de estas estructuras especialmente a presiones más altas, facilitando la difusión del disolvente de la matriz y promoviendo liberación y mayor rompimiento de polímeros, modificando su morfología y por consiguiente una superior generación en el porcentaje de flavonoides.

Palabras clave

Orujo de uva, polifenoles, proantocianidinas, flavonoides, DIC (Descompresión Instantánea Controlada).

Summary

The effect of DIC on the release of polyphenolic compounds, mainly flavonoids in various varieties of grape pomace (Syrah, Merlot and Malbec) at different pressures (0.2 and 0.4 MPa) was evaluated. There was an increase in PPE and a decrease in NEPP. This increase is related to the depolymerization and release of proanthocyanidins and non-extractable polyphenols and therefore an increase in the number of flavonoid monomers, mostly from two of its subfamilies; flavanols and flavonols identified by UHPLC QqQ-ESI-MS. The results indicate that treatment with DIC had a positive and significant effect on the concentration of these structures especially at higher pressures, facilitating the diffusion of the solvent of the matrix and promoting release and greater breakdown of polymers, modifying their morphology and therefore a higher generation in the percentage of flavonoids.

Introducción

El orujo de uva es un subproducto obtenido de la industria del vino, constituido por piel, semillas y tallos (Beres et al., 2017). Este subproducto contiene cantidades significativas de fibra dietética y diversos compuestos como polifenoles. El contenido fenólico del orujo de uva depende de varios factores, como el proceso de vinificación y la variedad de uva. La composición polifenólica de ésta fruta esta sujeta a varios factores que influyen a lo largo de su proceso de desarrollo y maduración: el genotipo, el ambiente y las condiciones de cultivo (Soledad M., 2016). Es así como algunas variedades de orujo de uva pueden ser más ricas en ciertos polifenoles que otras. Estos polifenoles se pueden dividir en: polifenoles extraíbles (EPP) y polifenoles no extraíbles (NEPP). Los EPP son compuestos solubilizados por disolventes acuosos-orgánicos y NEPP son polifenoles poliméricos (proantocianidinas) con alto peso molecular o compuestos fenólicos simples asociados con macromoléculas (Pérez J., Díaz M., &

Saura F., 2013). Desde el punto de vista cuantitativo, las proantocianidinas son el principal grupo de polifenoles, tanto en la uva como en el vino. Las proantocianidinas son productos finales oligoméricos y poliméricos de la ruta biosintética de flavonoides. Estas estructuras también conocidas como taninos condensados son dímeros, trímeros, oligómeros y polímeros de unidades de flavan-3-oles (flavanoles). Los flavanoles incluyen a la catequina, epicatequina, epigallocatequina, galato de epigallocatequina y cuando se agrupa en oligómeros o polímeros forma a las proantocianidinas (Herrero et al., 2012). Otra subfamilia de flavonoides característica en uvas, vino y orujo de uva son los flavanoles. Los principales flavanoles en orujo de uva son quercetina, miricetina, kaempferol y siringetina, entre otros. Estos compuestos están presentes en el orujo de uva como agliconas libres, resultado de la hidrólisis ácida durante la vinificación (Unusan N., 2012).

Debido a la dificultad de extraer y purificar las proantocianidinas, junto con su inestabilidad y complejidad estructural, su determinación es un desafío. A diferencia de los polifenoles no extraíbles, el análisis de los polifenoles extraíbles si es posible llevarlo a cabo con más facilidad, como, por ejemplo, de los flavonoides. Además de su facilidad de determinación, esta familia de EPP tiene diversos efectos bioquímicos y antioxidantes favorables (Panche A., Diwan A. & Chandra S., 2016).

En base a sus posibles impactos benéficos, es importante promover el aprovechamiento de este subproducto. Para esto se propone el uso de DIC con el fin de conocer los efectos de esta técnica sobre el contenido de los EPP y NEPP en el orujo de diferentes variedades de uva. Durante la aplicación de DIC, el material es llevado a altas presiones durante un tiempo determinado, al finalizar se somete a una abrupta caída de presión, la cual genera la evaporación instantánea del agua dentro de la matriz, causando una expansión de la misma, además del enfriamiento instantáneo del material (Hamoud M. & Allaf K., 2019).

Objetivos

- Estudiar el efecto de la tecnología DIC sobre los polifenoles presentes en distintas variedades de orujo de uva.
- Analizar cuantitativamente el cambio generado sobre la cantidad de flavonoides antes y posterior a la aplicación de DIC.

Metodología

- Material vegetal

Se recolectó el orujo de uva Malbec, Merlot y Syrah proveniente de diversos viñedos de Querétaro. El subproducto se congeló (-20 °C) en recipientes herméticos y protegidos de la luz hasta su análisis.

- Aplicación de DIC en orujo de uva

Para la aplicación de DIC en orujo de uva se utilizaron dos presiones (0.2 y 0.4 MPa) con 4 ciclos de 30 segundos cada uno. Posteriormente, las muestras se secaron (45 °C) y se molieron a un tamaño de partícula <400 µm.

- Obtención de polifenoles extraíbles (EPP)

Para la obtención de EPP se realizaron dos extracciones secuenciales; a 0.5 g de muestra se le adicionaron 20 mL de una solución de metanol/agua (50:50) a pH 2, se agitó y se centrifugó, al residuo se le adicionó 20 mL de una solución de acetona/agua (70:30) y se recuperó el sobrenadante. Se mezclaron ambos sobrenadantes y se determinaron flavonoides.

- Análisis de flavonoides

El contenido total de flavonoides fue medido en el extracto del EPP. Se utilizó el método del cloruro de aluminio (Heimler et al., 2006). Los resultados fueron expresados como equivalentes del catecol del magnesio por el gramo de materia seca (magnesio CE/g).

• Proantocianidinas extraíbles (PAE)

La determinación de las PAE se realizó únicamente en el extracto de acetona. Las PAE se cuantificaron según lo reportado por Zurita, Díaz-Rubio y Saura-Calixto, (2012). Los resultados se expresaron como mg PA/g de muestra.

- Cuantificación de proantocianidinas no extraíbles (PANE)

Del residuo obtenido en la extracción de EPP, se realizó el análisis de las PANE. Se cuantificaron según el método descrito por Zurita, Díaz-Rubio y Saura-Calixto, (2012). Los resultados se expresaron como mg PA/g de muestra.

- Perfil de compuestos fenólicos de las muestras tratadas con DIC por UHPLC QqQ-ESI-MS

Se utilizó el extracto obtenido para la fracción EPP. Los compuestos fueron identificados y cuantificados usando un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (UHPLC-QqQ-ESI-MS). La cuantificación se llevó a cabo utilizando estándares de flavonoides. Los resultados se expresaron como µg/g.

Resultados

Los efectos generados por la aplicación de DIC sobre las proantocianidinas y flavonoides se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Polifenoles totales obtenidos en las variedades Malbec, Merlot y Syrah de orujo de uva sometidas a DIC a diferentes condiciones.

Muestra	P MPa	C #	FV ¹	PAE ²	PANE ³
MAC	0	0	43.6±3.8	7.3 ± 0.2	68.8 ± 1.2
MAB	0.2	4	49 ± 2.3	8.5 ± 0.2	70.9 ± 4.1
MAA	0.4	4	61.4±2.5	10.5±0.3	40.5 ± 1.1
MEC	0	0	35.1±2.2	5.4±0.1	47.2 ± 1.2
MEB	0.2	4	43.4±1.2	5.5±0.3	41.3 ± 1.4
MEA	0.4	4	48.3±2.6	7.3±0.3	25.5 ± 1.5
SYC	0	0	7.9 ± 0.3	3.1±0.0	71.1 ± 2.5
SYB	0.2	4	9.1 ± 0.3	2.7±0.1	70.8 ± 1.6
SYA	0.4	4	19 ± 1.1	4 ± 0.0	47.2 ± 1.6

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar (n = 3) y sus concentraciones como: ¹CE mg/g, ²PAEs mg/g, ³PANes mg/g. P, presión; C, ciclos, FV, flavonoides; PAE, proantocianidinas extraíbles; PANE, proantocianidinas no extraíbles; CE, equivalentes de catequina.

MAC: Malbec sin DIC; **MAB:** Malbec 0.2 MPa; **MAA:** Malbec 0.4 MPa; **MEC:** Merlot sin DIC; **MEB:** Merlot 0.2 MPa; **MEA:** Merlot 0.4 MPa; **SYC:** Syrah sin DIC; **SYB:** Syrah 0.2 MPa; **SYA:** Syrah 0.4 MPa.

Los flavonoides totales extraíbles presentan un aumento comparado con la media de la muestra control de: MAB (12.39%), MAA (40.83%), MEB (23.64%), MEA (37.61%), SYB (15.19%) y SYA (140.51%). En cuanto a las proantocianidinas extraíbles los porcentajes de incremento de acuerdo con la media de controles fueron los siguientes: MAB (16.44%), MAA (43.84%), MEB (1.85%), MEA (35.19%) y SYA (29.03%). Respecto a las proantocianidinas no extraíbles, todas las muestras arrojaron concentraciones menores en comparación a sus controles, exceptuando solo a MAB (Malbec 0.2

MPa). Los porcentajes de disminución de acuerdo con sus respectivas medias fueron: MAA (41.28%), MEB (12.5%), MEA (45.97%), SYB (1.27%) y SYA (33.61%).

Las muestras sometidas a mayores presiones (0.4 MPa) presentaron concentraciones más altas en FV y PAE, en comparación a sus controles y a las muestras procesadas con DIC a presión de 0.2 MPa. Respecto a PANE, las tratadas a 0.4 MPa, fueron las que tuvieron una disminución superior en la concentración de este tipo de polifenol.

Los resultados obtenidos sobre el perfil de flavonoides utilizando UHPLC QqQ-ESI-MS se muestran tanto en la tabla 2 como en la tabla 3. La tabla 2 nos presenta el análisis de los flavanoles y la 3, los flavonoles. De acuerdo con los flavanoles se lograron identificar alrededor de 13 compuestos. Cuando las muestras se sometieron a 0.4 MPa la mayoría de ellos mostraron un incremento. Existen ciertas excepciones donde no se generó aumento e incluso hubo una disminución. Esto sucedió en MEA (Merlot 0.4 MPa) y MEB (Merlot 0.2 MPa) de

acuerdo con su control MEC. Específicamente ocurre en la cuantificación a ambas presiones de (Epi)-catequina hexóxido isómero I (1), Isómero II de (Epi)-catequina hexóxido (4) y Cinnamtannina A3 (11). Conforme a las variedades, para los flavanoles más abundantes en orujo de uva, catequina, epicatequina y (epi)-galato de catequina (Rucker R., Keen C. & Steinberg F., 2014)., SYA presentó el aumento mayoritario en porcentaje respecto a su muestra control, del 22,280%, 10,868.75%, y 14,200% respectivamente. En la tabla 3 de flavonoles se identificaron y cuantificaron 9 de estas estructuras. En gran parte la mayoría de los compuestos mostraron disminución. Ciertas muestras específicas se vieron incrementadas, principalmente en 4 tipos de flavonoles. Estas fueron: SYA y MAA para Siringetina hexosido (F), SYA, SYB, MAA, MAB y MEA para Quercetina, Kaempferol e (Iso)-rhamnetina. Esta alza de concentración solo fue notable a presiones de 0.2 MPa tanto para Syrah como para Malbec. Para Merlot si se observó aumento a ambas presiones ejercidas. Incluso para esta variedad a 0.4 MPa (MEB), se presentó crecimiento en todos los flavonoles.

Tabla 2. Perfil de flavonoides (Flavanoles) identificados en las tres variedades (Merlot, Malbec, Syrah) que se sometieron a DIC.

	SYC	SYA	SYB	MAC	MAA	MAB	MEC	MEA	MEB
1	ND	ND	ND	0.27±0.03	0.53±0.29	0.83±0.14	0.21±0.07	0.16±0.06	0.16±0.00
2	0.07±0.00	10.4±4.0	0.36±0.04	47.8±1.9	167.3±26.1	132.2±4.3	55.1±7.2	157.5±33.5	98.8±0.2
3	0.25±0.05	57.3±5.6	6.12±0.15	156.5±0.3	332.7±42.4	346.8±3.2	131.3±12.0	308.4±70.6	293.7±0.5
4	0.11±0.06	1.39±0.47	0.42±0.03	4.73±0.09	5.03±2.13	9.91±0.42	3.31±0.50	2.30±0.77	2.44±0.19
5	ND	1.22±0.28	0.13±0.00	6.97±0.55	37.13±8.09	30.53±1.11	11.14±1.82	31.73±13.09	20.00±0.28
6	0.18±0.00	29.4±8.0	1.10±0.08	62.4±3.4	193.8±31.8	134.9±0.7	71.5±8.6	152.5±30.9	108.5±0.8
7	ND	1.34±0.00	ND	6.15±0.61	23.25±6.23	26.06±1.96	12.52±1.60	25.86±12.13	23.04±0.74
8	0.64±0.07	70.2±4.1	13.3±0.7	98.4±1.2	188.4±33.0	233.6±8.4	98.4±9.0	201.5±45.5	215.6±0.7
9	0.06±0.00	4.32±1.23	0.27±0.00	19.57±1.35	53.10±8.55	56.08±1.89	26.42±4.13	51.49±13.73	42.70±0.50
10	ND	0.26±0.02	ND	1.31±0.03	3.61±1.93	5.77±0.40	2.71±0.33	3.38±0.61	3.26±0.01
11	ND	ND	ND	0.17±0.01	0.46±0.00	0.73±0.01	0.41±0.15	0.39±0.14	0.34±0.06
12	0.09±0.00	12.87±2.20	0.51±0.02	7.21±0.26	41.71±14.71	19.64±1.19	19.63±2.23	72.56±19.08	36.65±0.79
13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. y su concentración como µg/g. ND, no detectado. Cada tipo de flavanol fue representado con un numero. **1:** (Epi)-catequina hexóxido isómero I; **2:** Dímero de procianidina B (EC-EC) Isómero I; **3:** (+)-Catequina*; **4:** Isómero II de (Epi)-catequina hexósido; **5:** Trímero C de procianidina (cinnamtanina A1) isómero I; **6:** Dímero de procianidina B (EC-EC) isómero II; **7:** Trímero C de procianidina (cinnamtanina A1) isómero II; **8:** (-)-Epicatequina*; **9:** Trímero de procianidina C (cinnamtanina A1) isómero III; **10:** Tetrámero de prodelfinidina (cinnamtannina A2); **11:** Cinnamtannina A3; **12:** (Epi)-galato de catequina; **13:** Trímero C galato de procianidina.

Tabla 3. Perfil de flavonoides (Flavonoles) identificados en las tres variedades (Merlot, Malbec, Syrah) que se sometieron a DIC.

	SYC	SYA	SYB	MAC	MAA	MAB	MEC	MEA	MEB
A	8.38±1.41	6.76±2.28	6.59±0.43	528.4±10.8	134.5±6.1	315.8±7.2	73.7±4.6	20.7±4.8	105.8±11.9
B	ND	ND	ND	47.04±1.37	17.99±0.77	29.03±0.61	25.78±2.26	14.46±4.53	47.80±3.65
C	31.74±5.69	24.77±6.52	21.71±1.42	1084.2±2.7	419.2±14.4	757.3±17.7	146.8±12.5	53.4±19.0	199.9±3.7
D	3.55±0.00	ND	ND	79.77±9.06	26.20±0.21	43.00±2.10	10.12±0.81	4.56±0.85	15.99±1.91
E	ND	ND	ND	7.66±0.40	4.48±0.34	5.47±0.13	14.03±1.00	7.71±2.33	22.03±2.19
F	8.71±1.31	15.10±2.11	11.56±1.61	7.25±0.18	7.85±0.15	6.21±0.20	4.20±0.14	3.69±1.81	7.50±2.03
G	90.05±11.16	346.5±18.1	318.1±8.4	110.42±2.64	302.1±10.2	199.2±7.3	141.1±11.2	253.5±71.5	317.4±7.1

H	18.82±2.77	38.86±0.10	36.11±0.73	31.13±0.25	45.45±2.60	33.25±0.76	40.64±1.33	51.00±17.81	75.29±1.05
I	44.77±6.23	123.6±0.4	111.1±4.1	12.85±0.40	26.03±0.47	17.68±0.47	25.10±2.60	39.21±13.35	58.71±2.26

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar y su concentración como $\mu\text{g/g}$. ND, no detectado. Cada tipo de flavonol fue representado con una letra. **A:** Hexósido de quercetina; **B:** Hexósido de kaempferol; **C:** (Iso)-rhamnetina hexósido; **D:** (Iso)-rhamnetina ramnosido; **E:** Kaempferol acetilhexósido; **F:** Siringetina hexósido; **G:** Quercetina*; **H:** Kaempferol*; **I:** (Iso)-rhamnetina*

Discusión de resultados

De acuerdo con los resultados, DIC es una tecnología que favoreció el aumento de los EPP y disminución de los NEPP. Se generó un incremento de flavonoides y proantocianidinas extraíbles en respuesta a la disminución de proantocianidinas no extraíbles. Se sugiere que esta relación se debe a que las proantocianidinas no extraíbles están disminuyendo a causa del efecto que DIC ejerce sobre su estructura compleja, formando y liberando estructuras más sencillas, ya que las proantocianidinas son productos poliméricos de flavonoides, principalmente de flavanoles (Herrero et al., 2012), donde los principales flavan-3-oles que componen a las proantocianidinas, la catequina y epicatequina (Ayabe et al., 2010) fueron los que mostraron aumentos de hasta 22,280% y 10,868.75% respectivamente.

En los flavanoles solo se observó el incremento de ciertos compuestos, principalmente los de relevancia estructural en el orujo de uva, como lo son la quercetina, el kaempferol y siringetina (Unusan N., 2012). Lo que supone que el incremento de estos flavanoles es debido a que DIC genera degradación sobre la matriz y al ser el orujo de uva el modelo de estudio, los flavanoles liberados son aquellos que se encuentran inmersos estructuralmente dentro de este subproducto, que especialmente son los

tres compuestos enunciados por Unusan (2012).

En lo que concierne a las variedades trabajadas, cada una de ellas reacciona de forma distinta respecto a DIC. Por ejemplo, para flavonoides, Syrah fue la de mayor porcentaje de incremento. Para PAE fue Malbec, mientras que para PANE, el mayor porcentaje de reducción fue en Merlot. Estas diferencias se pueden atribuir a las características de cada una de las variedades de orujo de uva, su proceso y desarrollo durante su maduración. Entre las modificaciones que la uva sufre se encuentran la acumulación de pigmentos en la piel, la síntesis de sustancias aromáticas y la modificación del sabor. Estos procesos están relacionados con la síntesis de compuestos fenólicos. Para cada una de las variedades, estos desarrollos son distintos, lo que desencadena en la variabilidad del tipo y contenido en cada tipo de orujo de uva (Brighenti E. et al., 2017).

Para flavanoles, Syrah y Malbec mostraron mayor incremento en comparación al control, en todos los compuestos. Por su parte, Merlot no mostro incremento en algunos de ellos. Esto puede estar ocasionado a que las proantocianidinas presentes en esta variedad, no contengan una cantidad significativa de estas estructuras o que DIC no ejerza el suficiente efecto sobre las paredes de la matriz de este tipo de orujo, ya que a ninguna de las presiones se vio incrementada la concentración.

Respecto a los flavonoles los resultados mostraron que Merlot es una variedad con mayor número de flavonoles interiorizados dentro de su matriz, ya que para todos los compuestos de esta subfamilia se pudo observar un incremento en su concentración en ambas presiones. La causa de esto puede ir relacionado de igual forma con las características propias de esta variedad y su proceso de desarrollo. Desde hace tiempo se sabe que las vías biosintéticas involucradas en la producción de flavonoides en los tejidos vegetales están muy influenciadas por la luz solar. En este sentido, normalmente se esperaría que las uvas altamente expuestas a la luz del día sean capaces de aumentar la biosíntesis de flavonol. De hecho, un examen detallado de la exposición a la luz solar y la temperatura en el contenido de quercetina, miricetina y glucósidos de kaempferol reveló que las bayas (*V. vinífera* cv. Merlot) de grupos expuestos al sol podrían contener hasta diez veces el contenido encontrado en muestras obtenidas de grupos sombreados (Makris D., Kallithraka S. & Kefalas P., 2006).

Se pudo estudiar el efecto que la presión ejerce sobre las matrices. Las muestras sometidas a un valor más alto de este parámetro (0.4 MPa), provocaron mayor liberación de compuestos bioactivos interiorizados, debido a una fuerte expansión de la matriz promovida por la diferencia de presión en el sistema (Martínez et al., 2021).

Los efectos benéficos que puede llegar a tener el orujo de uva se deben principalmente a los componentes fenólicos que éste mismo contiene. Por ejemplo, los flavonoides tienen la capacidad de inducir sistemas protectores humanos, y sugieren efectos defensores contra enfermedades cardiovasculares, cánceres, etc. (Yao et al.,

2004). La técnica DIC ayuda a promover la aparición de este tipo de biomoléculas ya que, basándonos en los resultados recopilados, los rendimientos de extracción aumentaron notablemente en los extractos derivados de muestras tratadas con DIC. Así el tratamiento DIC podría proporcionar una mayor porosidad, mejorar del área de superficie específica, una mayor difusión del disolvente dentro de la partícula de orujo de uva y, en consecuencia, una mayor disponibilidad de compuestos deseados.

Además de los efectos benéficos que DIC puede ocasionar sobre las estructuras y en su posterior aplicación en el área de la salud, gracias al rompimiento de matriz que llega a generar, será más sencillo llevar a cabo el análisis y cuantificación de compuestos fenólicos, ya que aquellos NEPP difíciles de ser procesados, tienden a fragmentarse y facilitar su estudio posterior como unidades sencillas.

Conclusión

El orujo de uva es una fuente de polifenoles que tienen muchos efectos favorables sobre la salud humana. La extracción de ingredientes bioactivos de este subproducto es un campo de estudio de interés en crecimiento. En este análisis se buscó aplicar la técnica DIC para conocer su modo de actuar sobre diferentes variedades de orujo de uva a distintas presiones y examinar su capacidad para llevar a cabo la liberación de polifenoles, principalmente de flavonoides. Se observaron diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos entre las diferentes variedades. Este hecho evidencia la interacción entre genotipo, desarrollo y ambiente como uno de los principales factores relacionados con la acumulación y

concentración de polifenoles de la uva. En general, los resultados del presente estudio indican que el tratamiento DIC tuvo un gran impacto en el rendimiento de extracción de estas moléculas. Mayoritariamente se confirmó la liberación de proantocianidinas extraíbles y flavonoides asociado a la disminución en los NEPA.

El aumento de los EPP se fundamenta en el rompimiento de los polímeros de flavonoides (proantocianidinas) en diferentes estructuras simples (flavanoles) causado por la expansión y rompimiento de la matriz generado por la diferencia de presiones en el sistema.

Agradecimientos

Agradezco la excelente asistencia técnica y el apoyo económico de la Dra. Yuridia Martínez Meza, la Dra. Rosalía Reynoso Camacho y del Posgrado de ciencias de los alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Referencias bibliográficas

A. N. Panche, A. D. Diwan, & S. R. Chandra, "Flavonoids: an overview", *Journal of Nutritional Science*, Vol. 5, e47, pp 1-15. Disponible en doi: 10.1017/jns.2016.41 [Consultado en 2021].

C. Beres, G. N. Costa, I. Cabezudo, N. K. da Silva-James, A.S. Teles, A. P. Cruz & S. P. Freitas. "Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review", *Waste Management*, Vol. 68, pp 581–594. Disponible en doi: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017> [Consultado en 2021].

D. Heimler, P. Vignolini, M. G. Dini, F. F. Vincieri & A. Romani. " Antiradical activity and polyphenol composition

of local Brassicaceae edible varieties", *Food Chemistry*, Vol 99, No. 3, pp 464-469. Disponible en doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07 [Consultado en 2021].

D. P. Makris, S. Kallithraka & P. Kefalas, " Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters", *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol 19, No. 5, pp 396-404. Disponible en doi: 10.1016/j.jfca.2005.10.003 [Consultado en 2021].

E. Brighenti, K. Casagrande, P. Z. Cardoso, M. da S. Pasa, M. N. Ciotta & A. F. Brighenti, "Total polyphenols contents in different grapevine varieties in highlands of southern Brazil", *BIO Web of Conferences* Vol 9. Disponible en doi:10.1051/bioconf/201709010 [Consultado en 2021]

J. Pérez-Jiménez, M. E. Díaz-Rubio & F. Saura-Calixto, F "Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: Occurrence, metabolic fate and health effects", *Nutrition Research Reviews*, Vol. 26, No.2, pp 118–129. Disponible en doi: 10.1017/S0954422413000097 [Consultado en 2021].

J. Zurita, M.E. Díaz-Rubio & F. Saura-Calixto, "Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, Vol. 63, pp 936-939.

L. H. Yao, Y. M. Jiang, J. Shi, F. A. Toms-Barberon, N. Datta, R. Singanusong & S.S. Chen, "Flavonoids in food and their Health Benefits". *Plant Foods for Human Nutrition*, Vol 59, No. 3, pp 113-122. Disponible en doi: doi:10.1007/s11130-004-0049-7 [Consultado en 2021].

M. Herrero, M. Plaza, A. Cifuentes, A. & E. Ibáñez, E, "Extraction Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Food". *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, pp 159–180. Disponible en doi:10.1016/b978-0-12-381373-2.00132-0 [Consultado en 2021].

M. M. Hamoud-Agha & K. Allaf, *Instant controlled pressure drop (DIC) technology in food preservation: Fundamental and industrial applications. Food preservation and waste exploitation*, Ed. Intech Open. 2019.

M. Soledad-Lingua, De la uva al vino: Estudio de las propiedades antioxidantes y dilucidación de los mecanismos de acción de sus compuestos polifenólicos [Tesis de doctorado]. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, España, 2016.

N. Unusan, "Proanthocyanidins in grape seeds: An updated review of their health benefits and potential uses in the food industry", *Journal of Functional Foods* Vol 67. Disponible en doi:10.1016/j.jff.2020.103861 [Consultado en 2021].

R. B. Rucker, C. L. Keen & F. M. Steinberg, "Vitamins and Food-Derived Biofactors", *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, pp 356-377. Disponible en doi: 10.1016/b978-0-444-52512-3.00071-1 [Consultado en 2021].

S. Ayabe, H. Uchiyama, T. Aoki & T. Akashi, "Plant Phenolics: Phenylpropanoids.", *Comprehensive Natural Products II*, pp 929-976. Disponible en doi: 10.1016/b978-008045382-8.00023-x [Consultado en 2021].

Y. Martínez-Meza, J. Pérez-Jiménez, N. E. Rocha-Guzmán, M. E. Rodríguez-García, M. Alonzo-Macías & R. Reynoso-Camacho, "Modification on the polyphenols and dietary fiber content of grape pomace by instant controlled pressure drop", *Food Chemistry*, Vol. 360. Disponible en doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130035> [Consultado en 2021].

Actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) y del quitosano contra *Escherichia coli* O157:H7

Herrera-Zamorano María F.¹, Regalado-González C.¹, Matadamas-Ortiz A.¹

¹DIPA, PROPAC, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro. C. U., Cerro de las Campanas s/n, Col. Las Campanas, 76010 Querétaro, QRO., México.

Abstract

Essential oils and chitosan are natural compounds with different uses in the food industry, including as antimicrobials. The aim of this work was to evaluate the antimicrobial activity of oregano essential oil (AEO) and chitosan (Q) against one of the most widely distributed microorganisms in food. The minimum inhibitory concentration (MIC) against *E. coli* O157:H7 of Q (1.0 mg / mL) was determined, while for AEO only a bacteriostatic effect was observed with the maximum concentration used (20 mg / mL). According to the above, Q as an antimicrobial can be considered a good alternative for use in food.

Key Words: oregano essential oil, chitosan, *E. coli* O157:H7, minimum inhibitory concentration.

Resumen

Los aceites esenciales y el quitosano son compuestos naturales con diferentes usos en la industria alimentaria, entre ellos, como antimicrobianos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (AEO) y del quitosano (Q) contra uno de los microorganismos más ampliamente distribuidos en alimentos. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *E. coli* O157:H7 del Q (1.0 mg/mL), mientras que para el AEO sólo se observó un efecto bacteriostático con la máxima concentración utilizada (20 mg/mL). De acuerdo con lo anterior, el Q como antimicrobiano puede considerarse una buena alternativa para su uso en alimentos.

Palabras clave: Aceite esencial de orégano, quitosano, *E. coli* O157:H7, concentración mínima inhibitoria.

1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. La bacteria se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, y hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas. (OMS, 2018)

Los aceites esenciales son terpenoides y moléculas aromáticas derivadas del metabolismo de las plantas, presentan varias actividades biológicas, como la bactericida, antiviral, antifúngica, antiparasítica, insecticida y otras propiedades medicinales. Las aplicaciones más recientes de aceites

esenciales incluyen su función como antioxidantes y conservadores alimentarios (Himed y col., 2019).

El efecto antimicrobiano del orégano mexicano (AEO) (*Lippia graveolens* H.B.K.) se debe principalmente al timol y al carvacrol, los cuales actúan a nivel de la membrana celular, provocando un incremento en la permeabilidad y desintegración. El daño se puede observar en la disipación de los dos componentes de la fuerza protón motriz, el gradiente de pH y el potencial eléctrico. Además, el timol puede sobre-regular o sub-regular los genes implicados en la síntesis de las proteínas de membranas (Hernández-Hernández y col., 2014).

El quitosano es un polisacárido obtenido mediante la desacetilación de quitina, la cual se extrae del exoesqueleto de crustáceos y paredes celulares de hongos, posee la capacidad de inhibir el crecimiento de algunas bacterias y hongos patógenos, debido a sus excelentes características antimicrobianas. (Romanazzi y col., 2002). El quitosano se compone de unidades de N-acetil-glucosamina y es un polisacárido seguro, natural, libre de alérgenos y biocompatible. El quitosano es estructuralmente similar a la celulosa, la única diferencia es que el grupo hidroxilo en el segundo átomo de carbono de la unidad repetida de hexosa es sustituido con la ayuda de un grupo acetamida (Hassan y col., 2018).

Las actividades antimicrobianas del quitosano, se cree que dependen de sus cargas positivas superficiales, las cuales pueden interferir con los residuos cargados negativamente de la célula bacteriana, conduciendo así a su muerte celular (Wang y col., 2019).

Los antimicrobianos son clasificados en bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacteriostáticos (solo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano). En general, son bactericidas aquellos

antimicrobianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular, alterando la membrana citoplasmática o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del ADN, y son considerados bacteriostáticos todos los que inhiben la síntesis proteica, a excepción de los aminoglucósidos. (Calvo y col., 2009)

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano y el quitosano contra *E. coli* O157:H7.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales y medios de cultivo.

El quitosano (mediano peso molecular 375 kDa, desacetilación 75 % y alto grado de pureza), se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, EUA). El Tween 80 se adquirió de J.T. Baker (Estado de México, México). Los medios de cultivo fueron adquiridos de Bioxon (Cuautitlán, México).

2.2 Material biológico y cepas microbianas

Las hojas de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth.) secas se adquirieron del mercado de Tolimán, Querétaro.

Las bacterias utilizadas se obtuvieron de la colección de cultivos del Laboratorio de Biotecnología de Alimentos del Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos (DIPA), Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, 24 México. Se utilizó la cepa *Escherichia coli* O157:H7.

2.3 Extracción del AEO

El aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación de 300 g de orégano seco con 5 L de agua destilada durante 3 h, utilizando un equipo diseñado en la planta piloto de Biotecnología del Parque Biotecnológico, UAQ (México). La capa oleosa de la superficie se recuperó y se secó con sulfato de sodio anhidro, posteriormente

fue esterilizado por filtración usando una unidad Swinnex con membrana (Millipore, Burlington, MA, EUA) con tamaño de poro de 0.45 μm de polifluoruro de vinilideno para finalmente almacenarlo viales ámbar sellados y almacenados a 4 °C hasta su uso. (Hernández-Hernández y col., 2014).

2.4 Conservación de las cepas microbianas

E. coli fue activada a 37 °C y posteriormente incubada a temperatura óptima hasta alcanzar la fase exponencial temprana (Hernández-Hernández, y otros, 2014).

2.5 Concentración mínima inhibitoria de AEO y Qitosano contra *E. coli* O157:H7:

Se añadió AEO en caldo nutritivo con Tween 80 (10 % v/v) para producir concentraciones de 1-20 mg/mL. Por otro lado, se elaboró una solución de caldo nutritivo con quitosano (1 % v/v), ácido láctico (0.05 % v/v) y Tween 80 (10 % v/v), la cual se diluyó con Tween 80 en caldo nutritivo (10 % v/v) para producir concentraciones en el rango de 0.25-10 mg/mL de Q.

Todas las concentraciones fueron probadas contra *E. coli* O157:H7 (10^5 UFC/mL) en etapa exponencial temprana. Finalmente, tras 6, 18 y 24 h de incubación a 37 °C, se tomaron alícuotas de 20 μL y se sembraron por triplicado en agar nutritivo siguiendo el método de la gota (Miles & Misra, 1938). La concentración mínima inhibitoria se definió como la menor concentración (mg/mL) que inhibió por completo a *E. coli* O157:H7.

3. RESULTADOS

3.1 Eficiencia de extracción de AEO

El tiempo de operación para la extracción de AEO fue de 2 h, tras las cuáles, el AEO recuperado en el condensado era despreciable. El AEO obtenido mostró un color amarillento claro, y un fuerte olor

característico. El porcentaje de recuperación fue de 3.36 % (p/p, base seca), el cual se encuentra por debajo del reportado por Hernández-Hernández (2014) y Castillo-Herrera (2007), quienes reportaron eficiencias de 4.29 % y 4.1 %, respectivamente.

3.2 Concentración mínima inhibitoria del AEO y el Q contra *E. coli* O157:H7.

Ninguna de las concentraciones utilizadas de AEO mostró una inhibición total del microorganismo, sin embargo, la máxima concentración de AEO usada (20 mg/mL), mantuvo la población inicial en 5 Log UFC/mL, mostrando un efecto bacteriostático, que se vio disminuido tras 18 h (Fig. 1a). El incremento en la población bacteriana puede atribuirse a una adaptación a una concentración subletal de AEO, el cual se asocia a un incremento en los ácidos grasos saturados en la membrana, causando una reducción no específica de la permeabilidad celular (Heipieper, 1994; Ultee, 2000). Por su parte, las concentraciones de Q que disminuyeron la población de *E. coli* tras 6 horas de incubación (0.25 y 0.5 mg/mL), no mantuvieron su efecto inhibitorio tras 18 h de incubación, observándose un incremento en la población. La concentración de 1 mg/mL mostró inhibición total del microorganismo tras 18 h de incubación, mientras concentraciones más altas (2.5-10 mg/mL) inhibieron totalmente a *E. coli* tras 6 h de incubación (Fig. 1b). Por tanto, los valores de CMI para *E. coli* O157:H7 fueron >20 mg AEO/mL y 1 mg Q/mL. Hernández-Hernández (2019) reportó un valor de CMI menor (5 mg/mL), sin embargo, el autor reporta la cosecha y el secado de las hojas de orégano, mientras que para este trabajo fueron obtenidas del mercado de Tolimán, por lo que el tiempo de almacenamiento pudiera ser un factor relevante en la calidad del AEO. Hernández-Hernández (2014) reportó que el efecto antimicrobiano contra *Micrococcus luteus* del AEO disminuyó 40.7% tras 3 meses de almacenamiento en refrigeración y en

viales ámbar, mostrando baja estabilidad de sus componentes. Se ha descrito que la actividad antimicrobiana del quitosano es resultado de su naturaleza catiónica, siendo la interacción electrostática de sus grupos amino (cargados positivamente) y las membranas celulares (cargadas negativamente) la responsable de la lisis celular (Ninthya, 2017). Adicionalmente, Rejane (2016) indica que la eficiencia antimicrobiana del quitosano depende de las características de las paredes bacterianas, siendo más delgada en las bacterias Gram-

negativas, haciéndolas, por tanto, más susceptibles que las bacterias Gram-negativas. Por otro lado, mientras más bajo sea el pH, la interacción iónica será más fuerte, debido a que los grupos amino están protonados y el par de electrones del nitrógeno en el grupo amino lo hacen disponible para la donación de iones, generando una hidrólisis de los constituyentes de la pared de peptidoglicano de los microorganismos (Ngamviriyavong, 2010; Rejane, 2016); el

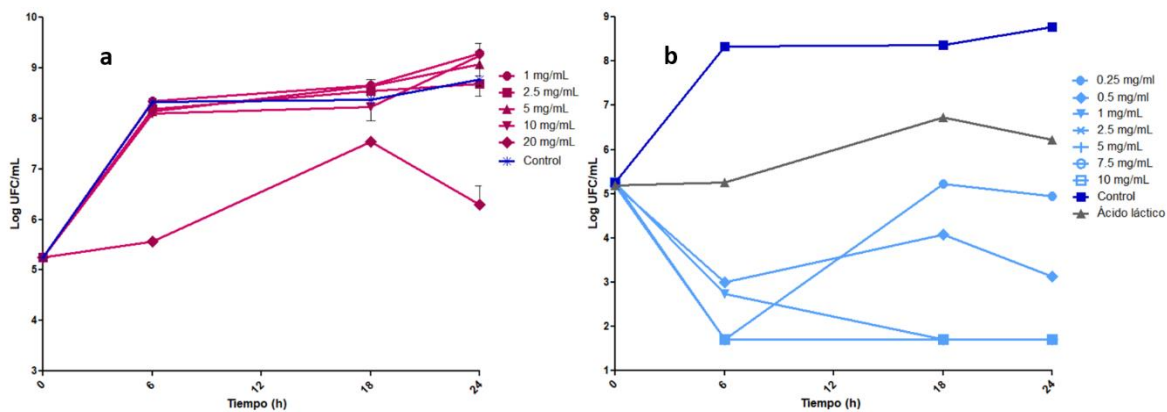


Figura 1. Concentración mínima inhibitoria (mg/mL) del AEO (a) y del Q (b) contra *E. coli* O157:H7. Concentración de ácido láctico (como control): 0.005% (v/v).

pH de la solución de quitosano fue de 3.1, dado por la adición de ácido láctico (0.05 %), el cual tiene actividad antimicrobiana ampliamente reportada.

incrementada por la presencia de ácido láctico, lo cual puede dar lugar a su uso (solo o combinado) como conservador natural en la industria de alimentos.

4 CONCLUSIONES

La actividad antimicrobiana del AEO mostró baja eficiencia contra *E. coli* O157:H7 comparado con reportes previos, indicando la baja estabilidad de sus compuestos y sugiriendo que factores como estado de maduración, método de secado y tiempo de almacenamiento deben considerarse para obtener AEO de calidad óptima. El quitosano mostró la mayor actividad antimicrobiana contra el microorganismo de prueba, siendo

5. REFERENCIAS

Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. ELSEVIER DOYMA, 45.

G.A. Castillo-Herrera, J.A.García-Fjardo, and M.Estarrpon-Espinosa, "Extraction method that enriches pehnolic content in oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.) essential oil" *Journal of Food Process Engineering*, vol.30, no.6, pp.661-669,2007.

- Hassan, B., Shahid Chatha, S., Hussain, A., Zia, K., & Akhtar, N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible. ELSEVIER.
- Heipieper, H.J.; Weber, F.J.; Sikkema, J.; Keweloh, H.; de Bont, J.A.M. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* 1994, 12, 409-415.
- Hernández-Hernández, E., Regalado González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., & García Alemendárez, B. E. (2014). Microencapsulation, Chemical Characterization, and Antimicrobial Activity of Mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and European (*Origanum vulgare* L.) Oregano Essential Oils. *ScientificWorldJournal*, 1-2.
- Hernández-Hernández, E., Regalado-González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., & García-Almendárez, B. E. (2014). Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *The Scientific World Journal*, 1-12.
- Himed, L., Merniz, S., Monteagudo-Olivan, R., Barkat, M., & Joaquín, C. (2019). Antioxidant activity of the essential oil of citrus limon before and after its. *Scientific African*.
- Ngamviriyavong, P., Thananuson, A., Pankongadisak, P., Janvikul, W., (2010). Antibacterial hydrogels from chitosan derivatives, *J. Met, Mater, Miner*.
- Ninthya, A.; Chandra Mohan, S.; Jeganthan, J.; Jothivenkatachalam, K. A potential photocatalytic antimicrobial and anticancer activity of chitosan-copper nanocomposite. *Int J. Biol. Macromol.* 2017.
- OMS. (2018). OMS. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- Rejane, C. Goy., Sinara T.B., Morais., & Odillo B.G. Assis. (2016). Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E.coli* and *S. aureus* growth. ELSEVIER.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., Di Venere, D., & Salerno, M. (2002). Effects of Pre- and Postharvest. *Journal of Food Science*, 1862-1866.
- Ultee, A.; Kets, E.P.W.; Alberda, M.; Hoekstra, F.A.; Smid, E.J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch. Microbiol.* 2000, 174, 233-238.
- Wang, L., Liu, F., Yanfeng, J., Zhi Chai, Chai, Z., Li, P., Leng, X. (2019). Synergistic Antimicrobial Activities of Natural Essential Oils with. *JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*, 12411.