



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO



VERANO DE LA CIENCIA UAQ

SOMOS UAQ
SERVIR. CONSTRUIR. TRANSFORMAR.

INDICE

Síntesis de hidroxapatita dopada con titanio para su potencial uso en regeneración ósea	Abigail Perrusquia Ledesma, Rodrigo Rafael Velázquez Castillo y Néstor Efrén Méndez Lozano.
Optimización de la formación de almidón resistente por extrusión.	Cárdenas Alvarado Aldo Alan, M. en C. Fernanda Guadalupe Castro Campos y Dra. Marcela Gaytán Martínez.
Desarrollo preclínico de vacuna contra la enfermedad hemorrágica viral del conejo: Evaluación de dos adyuvantes	Ana Isabel Rivera González y Juan Joel Mosqueda Gualito.
Evaluación del efecto del disolvente en la estabilidad de la molécula de delfinidina y su posible efecto antioxidante	Ana Paola Robles Sánchez y María de los Ángeles Cuán Hernández.
Una mirada a las relaciones de poder y de género en el convento de religiosas del Verbo Encarnado de Querétaro, 1905-1950	Andrea Itzel Elizondo Sánchez, María José Soto Zamora y Dra. Oliva Solís Hernández
¿Aliados o competidores? El empleo y la especialización económica de las capitales y ciudades secundarias.	Carlos Armando Salas Benítez y Dr. Enrique Leonardo Kato Vidal
Remoción de Cr (VI) en agua por adsorción de sílices mesoporosas funcionalizadas	Claudia Alejandra Díaz Dueñas
Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y magnetita.	Dante Eleazar Torres Pérez y Diana Issell Sandoval Cárdenas.
Perlas de hidrogel de AP de amaranto y GX	M.C. María del Carmen Cortez Trejo, Dra. Mendoza Díaz Sandra Olimpia y Zamorano Maldonado David Gael.
Evaluación de metabolitos secundarios y actividades biológicas de plantas tratadas con nanomateriales	Estefanía Arellano-Ordoñez y Ana Angélica Feregrino-Pérez.

El uso de “como” y “así” en las citas directas del habla de jóvenes Queretanos.	Gabriela Buentello Velasco y Dra. Juliana De la Mora Gutiérrez.
Efecto de hormonas esteroides sobre la reacción acrosomal del espermatozoide humano.	Ana Alicia Sánchez Tusie , Sheini Ruturi Sánchez González y Javier Tello Arellano.
Estandarización de la técnica de metilación del promotor del gen de adiponectina en tejido adiposo visceral humano	José Bernardo Rodríguez-Hernández, Paula Noemí Solís Reséndiz , Paulina Estrella Ibarra y Pablo García-Solís.
Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina	Dr. Feliciano Milian Suazo , M.C. Susana Lucía Sosa Gallegos , José de Jesús Saucedo Gutiérrez.
Perlas de hidrogel de APA y goma xantana	M. C. María del Carmen Cortez Trejo, Dra. Mendoza Diaz Sandra Olimpia y Carrillo Ramírez Katerine Nayeli.
Extracción y caracterización de proteínas de grillo (Acheta Domesticus)	Alexandro Escobar Ortiz y María Carolina Queiro Juárez.
Evaluación de la actividad antiinflamatoria de Medio Condicionado de Macrófagos M2 en un modelo de hígado graso no alcohólico in vitro	Dra. Ramos Gómez, Minerva, M. Manríquez Núñez, Josué, Lic. Avalos Márquez, Ximena y García Cardón, María Fernanda.
Obtención de un modelo in vitro de esteatosis hepática no alcohólica en la línea celular HepG2.	Dra. Ramos Gómez, Minerva, M. en C. Manríquez Núñez Josué, Lic. Ávalos Márquez, Ximena y María Gabriela Freites Darias.
Religión y narcocultura: reflexiones sobre su vínculo sociocultural.	Michelle Ramírez López
Evaluación de metabolitos secundarios y actividades biológicas en plantas.	Paola Irene Aguilar-Rodríguez , Ana Angélica Feregrino-Pérez
La experiencia inflacionaria en hogares de ingresos altos y bajos	Paula Mariana Padilla Sánchez y Enrique Leonardo Kato Vidal.
Evaluación de genes de patogenicidad en la tuberculosis bovina	Seula Kim, Susana L. Sosa Gallegos, Feliciano Milián Suazo

Propiedades tecnofuncionales de harinas extrudidas de leguminosas	Montante Arenas Valeria Siboney, Montoya Ramos Diana Karen, Gaytán Martínez Marcela.
La ausencia de clíticos en el discurso directo para expresar pensamiento en el habla de jóvenes queretanos	Vanessa Díaz Rodríguez y Juliana De la Mora Gutiérrez.
Caracterización nutracéutica y tecnofuncional de harinas leguminosas.	Ortiz Escamilla Wendy Patricia, Gaytán Martínez Marcela y Romero Ortiz Mirna Sofia.
Implementación de pruebas físicas en gutapercha de uso endodóntico	Janeht Lizbeth González-Toralla, Lilia Sánchez-Ugalde y Rubén Abraham Domínguez-Pérez



Síntesis de hidroxiapatita dopada con titanio para su potencial uso en regeneración ósea

Abigail Perrusquia Ledesma

E-mail: sjabiperrus@gmail.com

Asesores:

Rodrigo Rafael Velázquez Castillo

E-mail: rodrigo.velazquez@uaq.mx

Néstor Efrén Méndez Lozano

E-mail: nestor.mendez@uvmnet.edu

Resumen

Es bien sabido que, para lograr la implementación de compuestos sintéticos en procesos biológicos, es imprescindible que estos materiales tengan biocompatibilidad e interactúen benéficamente con el cuerpo en cuestión. El desarrollo de estos compuestos ha tenido gran protagonismo en la ciencia y, poco a poco, los investigadores encuentran aplicaciones cada vez más puntuales de los mismos, un ejemplo es en la regeneración ósea. En este trabajo se busca sintetizar hidroxiapatita (HAp) por el método hidrotermal asistido por microondas. La HAp se dopará con iones de titanio (Ti^{4+}) al 2%, utilizando isopropóxido de titanio como fuente de iones de titanio. Se analizará su estructura cristalina y propiedades por medio de difracción de rayos X (XRD) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Al final de las

reacciones de síntesis se obtuvo un compuesto blanco, opaco y quebradizo.

Abstract

It is well known that, in order to implement synthetic compounds in biological processes, it is essential that these materials have biocompatibility and interact peacefully with the body in matter. The development of these compounds has become an enormous protagonist in science and, little by little, researchers find more punctual applications of them, an example is bone regeneration. In this work it is intended to synthesize hydroxyapatite (HAp) with the technique of microwave assisted hydrothermal synthesis. It will be doped with titanium up to 2%, adding titanium isopropoxide to the first solution, at this point it will be possible to explore and analyze its properties using characterization tests such as x-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy. A white, opaque and brittle compound was obtained and it had indications of magnetic properties. Due to the lack of the necessary equipment, the characterization of the compound was not possible to execute.

Palabras clave

Hidroxiapatita, método hidrotermal asistido por microondas, dopado por iones metálicos, regeneración ósea.

Key words

Hydroxyapatite, titanium isopropoxide, microwaves, doping



Introducción

La hidroxiapatita (HAp) es un material cerámico. Se puede definir como un cristal perteneciente a la familia de las apatitas que tiene una estructura cristalina hexagonal y cuenta con la siguiente estequiometría: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

Este compuesto es el componente inorgánico principal en huesos y dientes, lo que les da la resistencia mecánica y dureza que requieren (García Garduño y Reyes Gasga, 2006).

La regeneración ósea ha sido un tema muy estudiado a lo largo de los años. Asimismo, se ha presentado la necesidad de encontrar maneras de impulsar y/o acelerar su proceso. El hueso está compuesto por 65% mineral (calcio, fosfato y carbonato, en proporciones 10:6:1), este se presenta en pequeños cristales de hidroxiapatita, junto con otros compuestos como Mg, Na, K, Mn y F (Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, et al., 2016).

En la ingeniería de tejidos se han propuesto biomateriales como los fosfatos de calcio (por ejemplo: hidroxiapatita y fosfato tricálcico) para aplicar a la regeneración ósea, estos materiales tienen una gran similitud química a los minerales del hueso, además de que tienen una muy buena respuesta biológica y excelentes propiedades bioactivas y osteoconductoras. No obstante, es posible (y necesario, considerando las aplicaciones que se buscan de este material) mejorar las propiedades mecánicas de este material (Vladescu, et al., 2016)

El titanio es conocido por su biocompatibilidad con el cuerpo humano y por su alta afinidad por el oxígeno, lo que lo permite formar óxidos que promueven el crecimiento celular.

En la literatura existente se ha identificado un importante interés por sintetizar hidroxiapatita dopada con titanio empleando distintas técnicas: pulverización catódica de magnetrón de radiofrecuencia, la formación de polvo con láser (LENS, por sus siglas en inglés), entre otras. En el presente trabajo se implementará una técnica conocida para obtención de HAp: Método hidrotermal asistido por microondas, a esto se le sumará agregar isopropóxido de titanio como fuente de iones dopantes. Lo que se buscará es promover la sustitución de dos iones de Ca por un ion de Ti^{4+} dentro de la estructura cristalina de la HAp.

Las microondas son ondas electromagnéticas con longitud de onda entre 1 y 0.001m. Estas ondas proveen de energía a una mezcla de reacción dentro del horno de microondas, lo cual hace que dicha reacción se lleve a cabo a mayor velocidad y con ello, se reduzcan los tiempos de reacción (Lara Ceniceros y Pérez Valdez, 2017).

La técnica de caracterización de difracción de rayos X por polvos (XRD) es útil para identificar fases cristalinas en una mezcla y para analizar su estructura cristalina. Por otro lado, la microscopía electrónica de barrido (SEM) permite observar la morfología, microestructura y topología de un material.

Es así que para este proyecto se pretende sintetizar HAp dopada con Titanio al 2% para su posterior caracterización, con lo cual se posibilita el análisis de sus propiedades y su posible aplicación a la regeneración ósea.

Objetivo general

Sintetizar hidroxiapatita dopada con iones de titanio (Ti^{4+}) al 2% y así aportar a las bases para futuras investigaciones de aplicación médica de este material, esto por medio de la adición de isopropóxido de titanio.

Objetivos específicos

Realizar e interpretar pruebas para la caracterización del compuesto generado.

Metodología

Para la síntesis de la hidroxiapatita dopada con titanio se utilizaron los siguientes reactivos:

Reactivo	Fórmula	Marca
Agua destilada	H_2O	-
Ácido glutámico	$C_5H_9NO_4$	J.T.Baker
Nitrato de calcio	$Ca(NO_3)_2$	Fermont
Fosfato de potasio	K_2HPO_4	J.T.Baker
Hidróxido de potasio	KOH	Sigma-Aldrich
Isopropóxido de Titanio	$C_{12}H_{28}O_4Ti$	Sigma-Aldrich

A su vez, se empleó el siguiente equipo:
Microondas Anton Paar (Modelo Monowave 300)

Los pasos seguidos se describen a continuación.

Solución 1

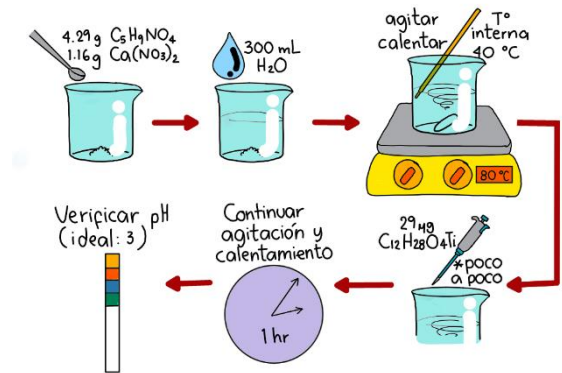


Figura 1. Metodología para la solución 1.

Solución 2

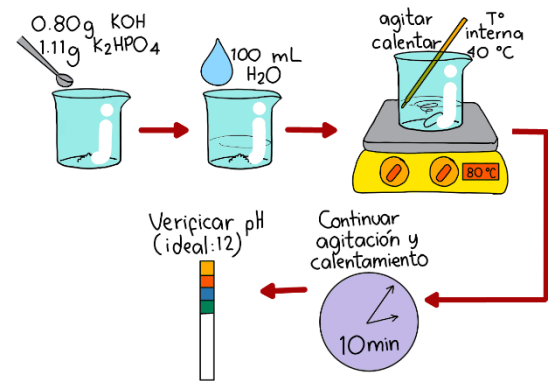


Figura 2. Metodología para la solución 2.

Solución final

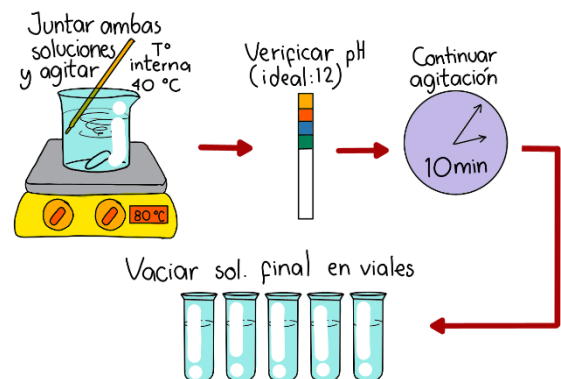


Figura 3. Metodología para la solución final.

Obtención de HAp dopada con Ti con microondas

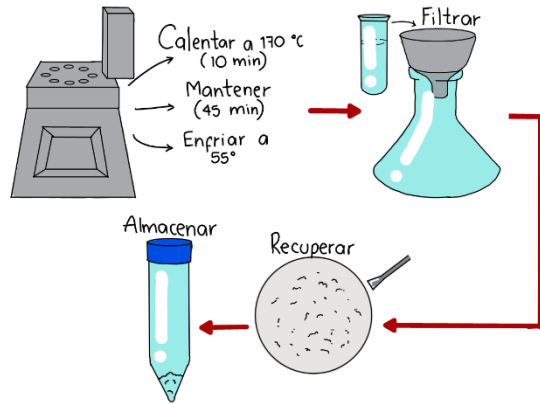


Figura 4. Metodología para obtención de HAp con Ti.

Resultados

Como resultado, se obtuvo una sustancia blanca, quebradiza y opaca (Figuras 5-7).



Figura 5. Compuesto obtenido tras sacar solución del microondas.



Figura 6. Raspado del compuesto tras dejarlo filtrar.

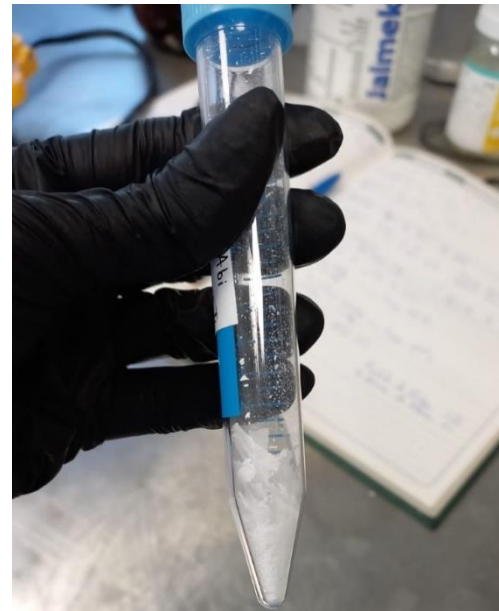


Figura 7. Compuesto almacenado.

Debido a que el equipo de laboratorio para realizar las pruebas de caracterización pertinentes no funcionó, no fue posible observar las particularidades del compuesto obtenido.

Es así que no se conoce a ciencia cierta la identidad del producto obtenido. Sin embargo, se pueden realizar algunas observaciones.



Se sabe que los materiales cerámicos no tienden a presentar propiedades magnéticas. Teniendo lo anterior en mente, una observación que se hizo con respecto al compuesto obtenido es que presentó cierta reacción física al interactuar cercanamente a un guante que había guardado estática.

Lo anterior se puede utilizar como un indicador cualitativo de la presencia de algo más que la HAp, es decir, un material con propiedades magnéticas. Sin embargo, es importante mencionar que el titanio, de igual manera, es no magnético.

A continuación, se presentan los resultados de pruebas realizadas a HAp pura, sintetizada al inicio del Verano para corroborar la técnica de síntesis elegida (síntesis hidrotérmal asistida por microondas).

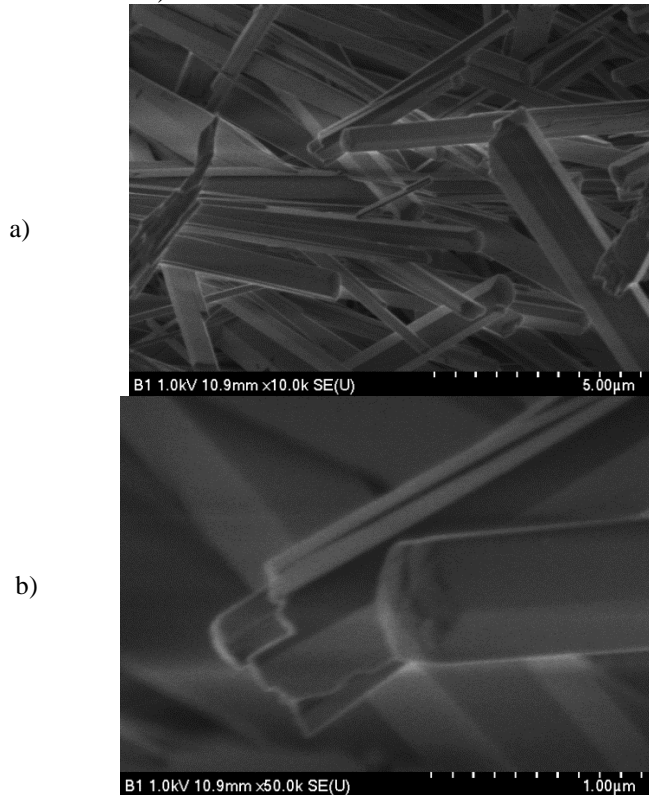


Figura 8. Micrográficas obtenidas por microscopía electrónica de barrido de las nanofibras sintetizadas de HAp a a) x10.0k y b) x50.0k.

A través de las micrográficas obtenidas por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés), mostradas en la figura 8, podemos observar la formación de las nanofibras de hidroxiapatita sintetizadas con un radio aproximado de 500 nm. De los ángulos obtenidos de las fibras pudiéramos sugerir que estas poseen una estructura casi hexagonal.

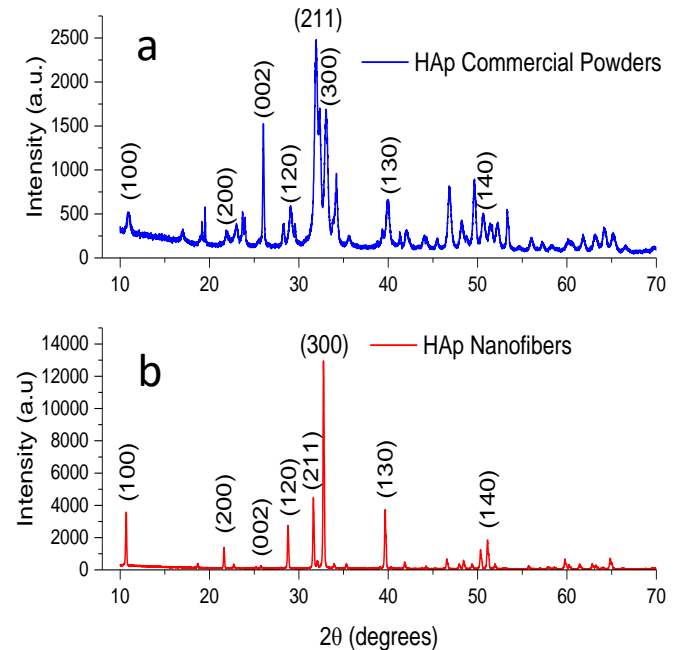


Figura 9. Difractogramas de difracción de rayos X de la referencia comercial (arriba) y las nanofibras de HAp sintetizadas (abajo).

Partiendo del patrón de difracción obtenido para las nanofibras de hidroxiapatita sintetizadas mediante difracción de rayos X (X-ray diffraction - XRD) mismo que se observa en la figura 9, podemos corroborar la correcta formación del compuesto de hidroxiapatita en su fase hexagonal (esto por medio de la comparación de las nanofibras de HAp y de la referencia comercial). El patrón también sugiere un tamaño de cristalito grande con una orientación preferencial hacia el plano (300). Con base en dicha orientación cristalina pudiéramos sugerir en conjunto con las imágenes de SEM obtenidas que la orientación



cristalina promueve la formación de la hidroxiapatita con la morfología fibrosa observada, así como la forma hexagonal que poseen dichas fibras.

Análisis y discusión

El empleo de la técnica de síntesis hidrotermal asistida por microondas para la elaboración de la HAp resultó muy eficiente pues se detectó una indudable similitud entre las pruebas de XRD de la síntesis y la referencia comercial.

Complementando la prueba anteriormente mencionada con la microscopía electrónica de barrido se concluye que (con base en la estructura observada) el compuesto sintetizado es HAp.

Se invita al lector a recurrir a literatura externa referente al tema y, de este modo, ampliar la gama de conocimientos que se tienen con respecto a la aplicación de HAp dopada con titanio en aplicaciones biomédicas (como lo es la regeneración de tejido óseo).

Agradecimientos

Se agradece al Dr. titular del proyecto Rodrigo Rafael Velázquez Castillo por sus valiosas y minuciosas explicaciones de los procesos a llevar a cabo, así como por la guía que brindó a lo largo de todo el Verano.

A los Dres. Néstor Lozano y Ricardo Pascual por el material de apoyo y recomendaciones que siempre tan oportunamente ofrecieron.

A los organizadores del Verano de Ciencia y a la Universidad Autónoma de Querétaro por impulsar

el acercamiento científico a los alumnos por medio de este tipo de dinámicas.

Referencias bibliográficas

A.Vladescu, S.C. Padmanabhan, F.Ak Azem, M.Braic, et al., "Mechanical properties and biocompatibility of the sputtered Ti doped hydroxyapatite". *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Vol. 63, pp 314-325. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.06.025> [Consultado en 2022].

A.C. Lara Cenicerros, J. Pérez Valdez, P. Vega Sánchez, T.E. Flores Guía, J. Bonilla Cruz, "Efecto de la Potencia en un Reactor de Microondas en la Síntesis del Polivinilcarbazol". Colección memorias de los Congresos de la Sociedad Química de México 52° Congreso Mexicano de Química y 36° Congreso Nacional de Educación Química, Vol. Química de Polímeros, Saltillo, Coahuila, septiembre 2017.

I. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, M. A. Alobera Gracia, M. del Canto Pingarrón, L. Blanco Jerez, "Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo". *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, Vol. 11, pp 1698-6946. Disponible en https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1698-69462006000200012 [Consultado en 2022].

M.V. García Garduño, J. Reyes Gasga, "La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica". *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, Vol. 9, No. 2 pp 90-95. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43211937005> [Consultado en 2022].

Optimización de la formación de almidón resistente por extrusión.

Cárdenas Alvarado Aldo Alan (Autor)^[1]
aldo222401@gmail.com

M. en C. Fernanda Guadalupe Castro Campos (Asesora)^[1]

fer.castro207@gmail.com

Dra. Marcela Gaytán Martínez (asesora)^[1]

marcelagaytanm@yahoo.com.mx

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.^[1]

Resumen

El almidón resistente tiene es de gran importancia nutricional, pues actúa como fibra dietética y es generado durante los procesos alimenticios. Se evaluó el efecto de la extrusión para la generación de almidón resistente tipo V. Los resultados mostraron que durante la extrusión la humedad de alimentación juega un papel determinante, junto a la temperatura y finalmente a la velocidad del tornillo para inducir la formación de estos complejo. La opción más optimas es una humedad 25, temperatura de 93 °C y una velocidad de tornillo 23 rpm es la opción optima de extrusión para la obtención de RS tipo V.

Resistant starch is of great nutritional importance, since it acts as a dietary fiber and is generated during food processes. The effect of extrusion for the generation of type V resistant starch was evaluated. The results showed that during extrusion the feed moisture plays a determining role, together with the temperature and finally the screw speed to induce the formation of these complexes. The most optimal option is a humidity of 25, a temperature of 93 °C and a screw speed of 23 rpm. It is the optimal extrusion option to obtain RS type V.

Palabras clave.

Extrusión, almidón resistente, complejo amilosa-lípido, almidón tipo V.

Keywords.

Extrusion, resistant starch, amylose-lipid complex, type V starch.

1. Introducción.

El almidón es un polisacárido producido por las plantas y algunas cianobacterias, para la industria alimentaria es importante por su abundancia, bajo costo, ser un material biodegradable. Es principalmente usado en la panificación, en la producción de sopas, salsas, usado como recubrimiento y espesante, entre otras aplicaciones (Apriyanto et al., 2022). El almidón existe en forma de gránulos y se compone de dos principales estructuras de glucosa polimerizadas llamadas amilosa (enlace α -D-(1-4)) generalmente lineal, o ligeramente ramificada, y amilopectina (enlace α -D-(1-6)), altamente ramificada. El contenido de amilosa y de amilopectina es diferente en cada fuente de almidón y determina su digestibilidad (Ismail et al., 2013).

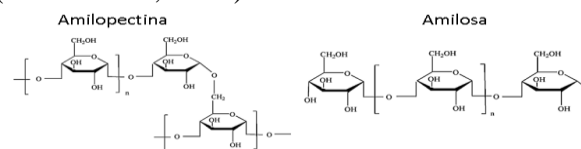


Figura 1. Estructura de la amilopectina y amilosa del almidón. Ilustración tomada de (Ismail et al., 2013).

El almidón resistente (RS) se define como la fracción de almidón que es capaz de resistir la digestión enzimática del tracto gastrointestinal. El RS se subdivide en 5 categorías: RS1= almidón dentro de las paredes celulares, RS2= almidón nativo protegido por su estructura compacta, RS3= almidón resistente por el proceso de gelatinizado, RS4= almidón resultado de eterificación, esterificación y reticulación y RS5= almidón con complejos amilosa-lípido (Ma & Boye, 2017). Este último, se puede generar por medio de la extrusión de almidón y ácidos grasos.

En (Cervantes-Ramírez et al., 2020), se reporta que la extrusión de almidón de maíz y ácido esteárico al 10% resultan en la mayor formación de los complejos amilosa-lípido. La formación de estos es debido al proceso de extrusión, pues es un proceso termomecánico con el potencial de modificar el almidón física y químicamente por medio de la aplicación de temperatura, cizallamiento y presión, que logran la formación de complejos amilosa-lípidos por medio de la presencia de los lípidos durante la disrupción del gránulo y la gelatinización inducida por la extrusión, de acuerdo a (Ye et al., 2018).

Objetivos

Objetivo general: Encontrar las condiciones óptimas de extrusión de maíz para la obtención de almidón resistente tipo V.

Objetivos específicos:

- Elaborar un diseño central compuesto para encontrar las condiciones que favorezcan la formación de almidón resistente tipo V.
- Analizar las propiedades fisicoquímicas de los diferentes almidones extruidos.

2. Metodología

2.1. Extrusión del almidón de maíz

Se propuso el siguiente diseño experimental para la extrusión del almidón de maíz (Tabla 1) teniendo como variables: la velocidad del tornillo (vt), la humedad (h) y la temperatura (durante) el proceso de la extrusión. Se usó almidón de maíz nativo adicionado con 10% de ácido esteárico (AE). El maíz-AE se procesó usando un extrusor de laboratorio (Patente MX /a/2007/016262), adicionado de un tornillo de 2.54 cm de diámetro, 48.26 cm de longitud y una profundidad de hélice de 0.125 pulgadas y un troquel de salida de 5 mm. Posteriormente las muestras fueron secadas a 40°C y tamizadas con una malla # 60.

Tabla 1. Propuesta de diseño experimental.

N. experimento	vt	h	t
1	10	25	100
2	20	25	100
3	10	40	100
4	20	40	100
5	10	25	120
6	20	25	120
7	10	40	120
8	20	40	120
9	15	32.5	110
10	15	32.5	110
11	7	32.5	110
12	23	32.5	110
13	15	20	110
14	15	45	110
15	15	32.5	93
16	15	32.5	127
17	15	32.5	110
18	15	32.5	110

2.2. Análisis de espectroscopia infrarroja (FT-IR)

Para determinar el efecto de los tratamientos en el perfil vibracional, se usó el Espectrómetro de infrarrojo Perkin Elmer IR (modelo Spectrum Two, Waltham-USA) con ATR (Reflectancia Total Atenuada), donde se analizó la muestra previamente seca y tamizada. Los espectros se obtuvieron en un rango de número de onda de 400-4000 cm^{-1} .

2.3. Análisis de perfil de viscosidad

Para obtener las curvas de viscoamilografía se usó el reómetro modelo MCR 101 (Anton Par, St Albans, Reino Unido). El análisis se realizó de acuerdo con lo descrito en (Castro-Campos et al., 2021; Ménera-López et al., 2013). 3 g de muestra previamente seca y tamizada con 18 mL de agua desionizada en la celda de medición de la viscosidad. La programación del equipo fue con un ciclo de 50-92 °C durante 8.5 min, luego se mantiene a 92 °C por 5 min y finalmente el enfriado hasta 50°C por 8.5 min, durante la medición, el equipo registra automáticamente la viscosidad en centipoise (cP).

2.4. Determinación del índice de acomplejamiento

Para determinar el índice de acomplejamiento (IC), se usó el método reportado en (Zhou et al., 2021). Se pesó 400 mg de muestra y se colocó en tubos falcon de 50 mL, posteriormente añadió agua hasta 5 mL y se agitó en vortex, luego se calentó por 10 min o hasta gelatinizar en un baño de agua hirviendo, se enfrió con 25 mL de agua destilada, se agitó nuevamente en el vortex por 2 minutos y se centrifugó (3000 rpm, 15 min). Finalmente, en un tomo una alícuota de 500 µL y se añadió 2 mL de solución de yodo (solución acuosa de 2% KI & 1.3% I₂), de esta se tomaron 200 µL y se midió por octuplicado en una placa de 96 pozos a una longitud de onda de 620 nm en un varioscán (Thermo Scientific®). La absorbancia (ABS) obtenida de las muestras y del control se sustituye en la ecuación (1).

$$CI\% = 100 * \left(\frac{ABS_{referencia} - ABS_{muestra}}{ABS_{referencia}} \right) \quad (\text{eq. 1})$$

Donde $ABS_{referencia}$ y $ABS_{muestra}$ son la absorbancia de los complejos del control y de las muestras respectivamente.

2.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos del índice de acomplejamiento se analizaron con el software estadístico Minitab 19.0, realizando un análisis de varianza (ANOVA) con comparación de media de Tuckey con una significancia de $p < 0.05$. Finalmente se realizó el análisis de superficie de respuesta del diseño experimental.

3. Resultados

3.1. Espectroscopia infrarroja (FT-IR)

En la Tabla 2 se muestran las bandas identificadas en los espectros de infrarrojo obtenidos de los diferentes tratamientos de almidón-AE procesados por extrusión identificados de la Figura 2.

Tabla 2. Posición de las diferentes bandas identificadas en los almidones extruidos.

Numero de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	*	Cita
3660–3040	O–H	[a]	(Priyan et al., 2020)
2917	CH ₂	[b]	(Wang et al., 2018)
2850	CH ₃	[c]	(Wang et al., 2018)
1715	C=O	[d]	(Marinopoulou et al., 2016)
1645	C=C	[e]	(Priyan et al., 2020)
3009	C=CH	[f]	(Cervantes-Ramírez et al., 2020)
1412	–COO–	[g]	(Cervantes-Ramírez et al., 2020)
1377	(H–C–H)	[h]	(Cervantes-Ramírez et al., 2020)
1283, 934	–COC–	[i]	(Cervantes-Ramírez et al., 2020)
1237	C–O	[j]	(Cervantes-Ramírez et al., 2020)
1078, 995	–C–O–H	[k]	(Zhao et al., 2021)
1463	–CH ₃	[l]	(Cervantes-Ramírez et al., 2020)
1149	C–O, C–C,	[m]	(Zhao et al., 2021)

*= cita en este trabajo

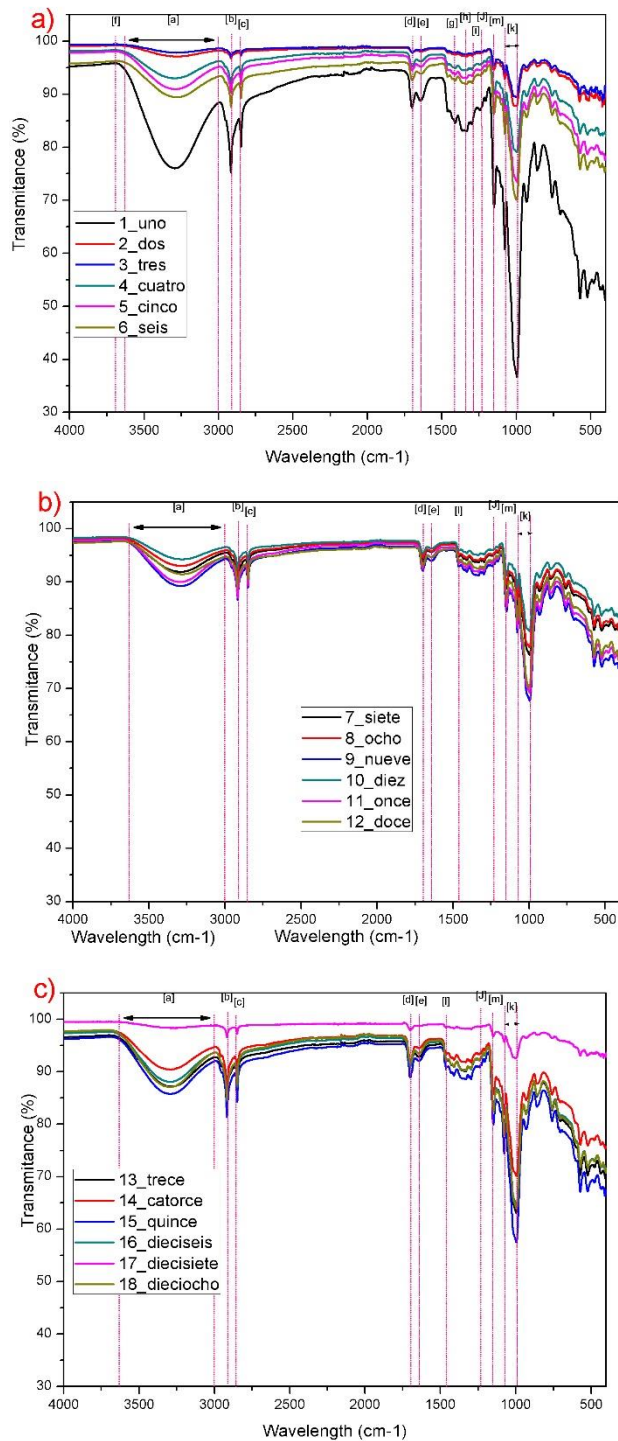


Figura 2. Espectros FT-IR de los almidones extruidos.
 a) tratamientos 1-6, b) tratamientos 7-12 y c) tratamientos 13-18.

De las bandas identificadas, el almidón nativo muestra bandas específicas como la de 3660-3040 cm^{-1} que corresponde al estiramiento del grupo

hidroxilo (-OH), la banda débil en 2917 cm^{-1} relacionada a los estiramientos de -CH o de -CH₂, las bandas consecutivas en 1078 y 995 cm^{-1} del doblamiento del (-COH), la banda en 995 cm^{-1} corresponde al doblamiento del (-COH) del carbono 6 asociado a la formación de puentes de hidrogeno, lo que lo hace sensible a la humedad (Priyan et al., 2020; Wang et al., 2018; Zhao et al., 2021). Para la formación de los complejos amilosa-lípido, las bandas en 2845 y 1715 cm^{-1} corresponden a la vibración asimétrica de los grupos metilo del ácido graso y de grupo carbonilo respectivamente, el grupo carbonilo en almidones nativos aparece en 1700 cm^{-1} , este desplazamiento es índice de la formación del complejo por que se atribuye a la interacción por puentes de hidrogeno del grupo carbonilo del ácido graso con la amilosa (Cervantes-Ramírez et al., 2020; Marinopoulou et al., 2016).

3.2. Perfil de viscosidad

En la Figura 3 se muestran los perfiles de viscosidad de los diferentes almidones tratados por extrusión.

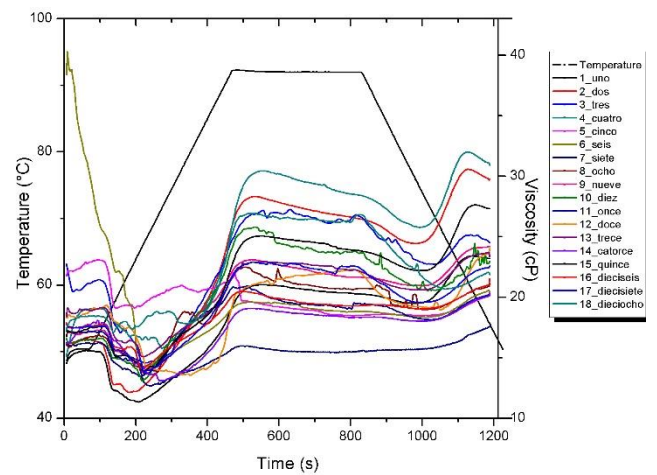


Figura 3. Perfil de viscosidad de los almidones extruidos.

El comportamiento de los almidones extruidos sigue los patrones ya conocidos, es decir que a mayor humedad incrementa la viscosidad, en cambio a mayor temperatura y/o mayor velocidad del tornillo baja la viscosidad (Ye et al., 2018). Así

mismo se esperaba una baja viscosidad en comparación al almidón nativo que alcanza cerca de 1000 centipoise, pues la adición de los lípidos, en este caso ácido esteárico al 10 %, afecta la solubilidad del almidón y reduce la absorción de agua, que se atribuyen a la formación de los complejos de amilosa-lípido y de la capa lipídica que recubre al grano de almidón extruido, reducen la interacción del almidón extruido con el agua (Cervantes-Ramírez et al., 2020; Ciardullo et al., 2019).

3.3. Índice de acomplejamiento (IC)

En la Figura 4 se muestran graficadas las medias y desviación estándar de los índices de acomplejamiento de los diferentes almidones tratados por extrusión.

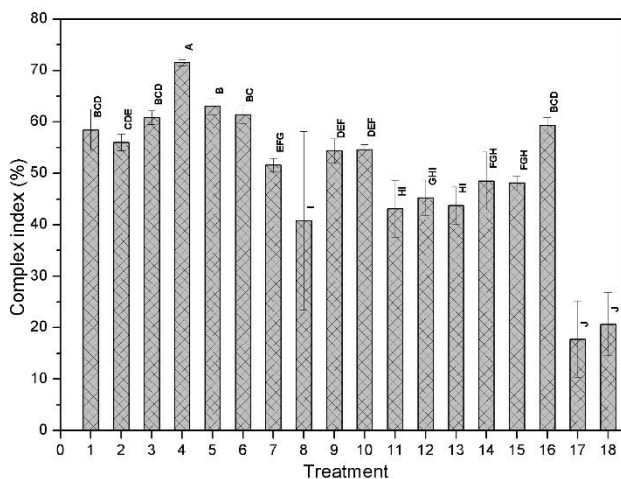


Figura 4. Índice de acomplejamiento de los almidones extruidos.

Se puede decir que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ($p < 0.05$), pero no existen diferencias significativas entre las variables, es decir no hay efectos entre la temperatura, la velocidad del tornillo y la humedad con el índice de acomplejamiento. Dado que se requiere de una optimización, en la Figura 5 se muestran las gráficas de superficie del diseño experimental (Tabla 1). De esta manera podemos decir que, para obtener la mayor cantidad de

almidón resistente tipo V, requerimos de una humedad de o alta temperatura con una baja velocidad del tornillo (107 °C, 10 rpm).

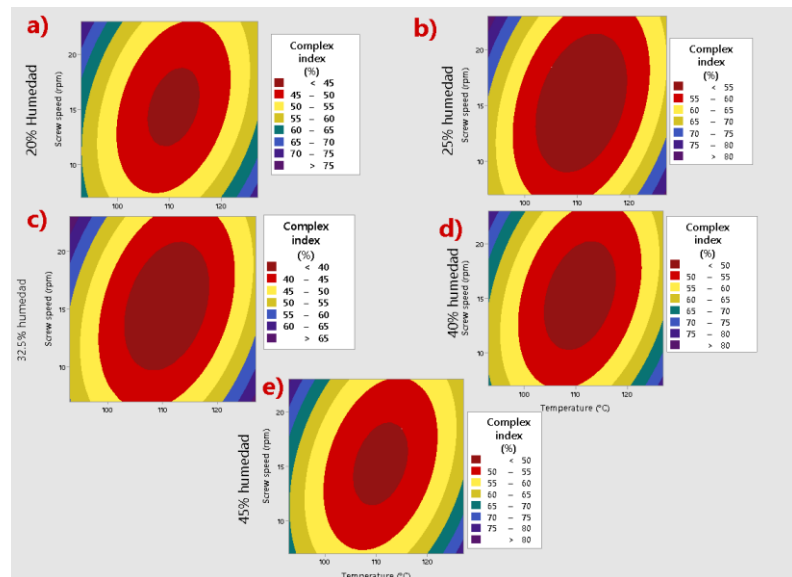


Figura 5. Grafica de superficie de acomplejamiento de los almidones extruidos temperatura (°C) vs velocidad del tornillo (rpm) para las diferentes humedades de entrada a) 20%, b) 25%, c) 32.5%, d) 40% y e) 45%.

Esto basado que, con obtener un mayor índice de acomplejamiento, lo que se relaciona con mayor cantidad de complejos amilosa-lípido formados y en consecuencia de almidón resistente tipo V. Esto debido a que una baja velocidad de tornillo permite un mayor tiempo de residencia en el extrusor, lo que provoca que almidón se gelatinice y tenga un mayor tiempo de interacción con el ácido graso. El uso de una velocidad alta de tornillo permite la fragmentación del almidón debido a la acción mecánica de cizalla. Una mayor temperatura permite la gelatinización del almidón provocando que sus componentes principales (amilosa y amilopectina) se lixivien, junto a la baja velocidad da lugar a fragmentos de menor tamaño que pueden interaccionar con el ácido graso y así poder generar complejos amilosa-lípido (Handarini et al., 2020; SEVERINI et al., 2016).

4. Discusión y conclusiones

La extrusión es un proceso altamente usado en la industria alimenticia, esencialmente para la producción de botanas, cereales para desayuno, pasta, entre otros. A pesar de ser un proceso común en la industria, no es entendido completamente por las variaciones en las condiciones y sus implicaciones en las propiedades del producto extruido (Ye et al., 2018). Este proceso se puede modular para la generación de almidón resistente tipo V. En el caso del maíz se requería de modificar previamente el almidón (Hasjim & Jane, 2009). Aunque recientemente se ha encontrado que la generación de almidón resistente a partir de almidón nativo de maíz depende del tipo de ácido graso añadido, siendo el ácido esteárico el que demuestra mayor cantidad de complejos amilosa-lípido inducidos por los cambios estructurales del tratamiento termomecánico que es la extrusión (Cervantes-Ramírez et al., 2020). En el presente estudio se evidencia la relación de la extrusión de almidón adicionado ácido esteárico para la generación de complejos amilosa-lípido, se encontró que la humedad de alimentación es el factor determinante y subsecuentemente la temperatura y la velocidad del tornillo para la generación de estos complejos, esto confirma los hallazgos de (Hasjim & Jane, 2009).

Entender la formación del almidón resistente por procesos como la extrusión es de vital importancia nutricional, pues una fracción del almidón deja de ser disponible y adquiere funciones fisiológicas similares a las de la fibra dietética (Sajilata et al., 2006). Además de tener un impacto tecnológico, pues la generación del almidón resistente tipo V es más fácil porque requiere de condiciones físicas menos extensivas a del almidón resistente tipo III o de modificaciones químicas como el almidón resistente tipo IV. El almidón resistente tipo V tiene la ventaja de ser un almidón termoestable en comparación al almidón nativo e incluso al almidón resistente tipo II, lo que lo hace ideal para procesos de calentamiento (Hasjim et al., 2013).

5. Agradecimientos

Agradecimientos especiales a los integrantes del Laboratorio de Química y Funcionalidad de Carbohidratos del Psgrado de Alimentos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro por abrirme las puertas y ayudarme a entender como es la labor de la investigación, así como a explorar por qué y para que se investiga. Muchas gracias por aguantarme estas semanas, Fernanda :)

6. Referencias bibliográficas

- Apriyanto, A., Compart, J., & Fettke, J. (2022). A review of starch, a unique biopolymer – Structure, metabolism and in planta modifications. *Plant Science*, 318, 111223. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2022.111223>
- Castro-Campos, F. G., Cabrera-Ramírez, A. H., Morales-Sánchez, E., Rodríguez-García, M. E., Villamiel, M., Ramos-López, M., & Gaytán-Martínez, M. (2021). Impact of the popping process on the structural and thermal properties of sorghum grains (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Food Chemistry*, 348, 129092. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.129092>
- Cervantes-Ramírez, J. E., Cabrera-Ramírez, A. H., Morales-Sánchez, E., Rodríguez-García, M. E., Reyes-Vega, M. de la L., Ramírez-Jiménez, A. K., Contreras-Jiménez, B. L., & Gaytán-Martínez, M. (2020). Amylose-lipid complex formation from extruded maize starch mixed with fatty acids. *Carbohydrate Polymers*, 246, 116555. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116555>
- Ciardullo, K., Donner, E., Thompson, M. R., & Liu, Q. (2019). Influence of Extrusion Mixing on Preparing Lipid Complexed Pea Starch for Functional Foods. *Starch - Stärke*, 71(7–8), 1800196. <https://doi.org/10.1002/STAR.201800196>
- Handarini, K., Sauman Hamdani, J., Cahyana, Y., & Siti Setiasih, I. (2020). Functional and pasting properties of a starch–lipid complex formed with gaseous ozone and palm oil. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1801723>, 23(1), 1361–1372. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1801723>
- Hasjim, J., Ai, Y., & Jane, J. (2013). Novel Applications of Amylose-Lipid Complex as Resistant Starch Type 5. *Resistant Starch*, 79–94. <https://doi.org/10.1002/9781118528723.CH4>
- Hasjim, J., & Jane, J. L. (2009). Production of Resistant Starch by Extrusion Cooking of Acid-Modified Normal-Maize Starch. *Journal of Food Science*, 74(7), C556–C562. <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2009.01285.X>
- Ismail, H., Irani, M., & Ahmad, Z. (2013). Starch-Based Hydrogels:

Present Status and Applications. <http://dx.doi.org/10.1080/00914037.2012.719141>, 62(7), 411–420. <https://doi.org/10.1080/00914037.2012.719141>

Ma, Z., & Boye, J. I. (2017). Research advances on structural characterization of resistant starch and its structure-physiological function relationship: A review. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1230537>, 58(7), 1059–1083. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1230537>

Marinopoulou, A., Papastergiadis, E., Raphaelides, S. N., & Kontominas, M. G. (2016). Morphological characteristics, oxidative stability and enzymic hydrolysis of amylose-fatty acid complexes. *Carbohydrate Polymers*, 141, 106–115. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.12.062>

Ménera-López, I., Gaytán-Martínez, M., Reyes-Vega, M. L., Morales-Sánchez, E., & Figueroa, J. D. C. (2013). Physico-chemical properties and quality assessment of corn flour processed by a continuous ohmic heating system and traditional nixtamalization. *CYTA - Journal of Food*, 11(SUPPL.1), 8–14. <https://doi.org/10.1080/19476337.2012.762692>

Priyan, V. V., Shahnaz, T., Kunnumakkara, A. B., Rana, V., Saravanan, M., & Narayanasamy, S. (2020). Antioxidant, Anti-inflammatory and Biosorption Properties of Starch Nanocrystals In Vitro Study: Cytotoxic and Phytotoxic Evaluation. *Journal of Cluster Science* 2020 32:5, 32(5), 1419–1430. <https://doi.org/10.1007/S10876-020-01905-5>

Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (2006). Resistant Starch—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and*

Food Safety, 5(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2006.TB00076.X>

SEVERINI, C., PILLI, T. DE, & DEROSI, A. (2016). Optimization of extrusion process of rice flour enriched with pistachio nut flour. *Italian Journal of Food Science*, 28(1), 50–56. <https://doi.org/10.14674/1120-1770/IJFS.V457>

Wang, L., Wang, W., Wang, Y., Xiong, G., Mei, X., Wu, W., Ding, A., Li, X., Qiao, Y., & Liao, L. (2018). Effects of fatty acid chain length on properties of potato starch–fatty acid complexes under partially gelatinization. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1489842>, 21(1), 2121–2134. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1489842>

Ye, J., Hu, X., Luo, S., Liu, W., Chen, J., Zeng, Z., & Liu, C. (2018). Properties of Starch after Extrusion: A Review. *Starch - Stärke*, 70(11–12), 1700110. <https://doi.org/10.1002/STAR.201700110>

Zhao, W., Sugunan, A., Gillgren, T., Larsson, J. A., Zhang, Z. Bin, Zhang, S. L., Nordgren, N., Sommertune, J., & Ahniyaz, A. (2021). Surfactant-free stabilization of aqueous graphene dispersions using starch as a dispersing agent. *ACS Omega*, 6(18), 12050–12062. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.1c00699>

Zhou, Q., Fu, X., Dhital, S., Zhai, H., Huang, Q., & Zhang, B. (2021). In vitro fecal fermentation outcomes of starch-lipid complexes depend on starch assembles more than lipid type. *Food Hydrocolloids*, 120, 106941. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.106941>

Galería fotográfica



Desarrollo preclínico de vacuna contra la enfermedad hemorrágica viral del conejo: Evaluación de dos adyuvantes

Ana Isabel Rivera González
Estudiante de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro
arivera58@alumnos.uaq.mx

Juan Joel Mosqueda Gualito
Investigador Anfitrión
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro
joel.mosqueda@uaq.mx

Resumen La Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo (EHVC) causada por el Virus hemorrágico del conejo tipo 2 (VHC2), apareció por primera vez en México en 2020. En el Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro se desarrolló una proteína multiepitópica recombinante como vacuna contra la EHVC. El objetivo de este proyecto fue evaluar una vacuna contra el VHC2 utilizando tres adyuvantes: el adyuvante Montanide ISA 71 VG, Rehydragel LV y Adju-Phos. Para esto se hicieron 5 grupos de 4 conejos de 6 semanas de edad que no estuviesen vacunados previamente contra el VHC. La proteína se obtuvo a partir de un cultivo de *Escherichia coli* BL21-AI. Primero por ultrasonificación, se hizo la lisis. Se purificó por cromatografía de afinidad y se hizo una diálisis para retirar la urea presente. Se evaluó la presencia de proteína con una electroforesis en gel de poliacrilamida y se cuantificó por un análisis

Bradford. En todas las dosis la proteína se utilizó a una concentración de 60µg/ml. Además se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar la proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP) de *Babesia bigemina*

Palabras clave Virus hemorrágico del conejo, proteína multiepitópica recombinante, vacunas, adyuvantes

Abstract The Rabbit Hemorrhagic Disease (RHDV) is caused by the Rabbit Hemorrhagic Disease Virus type 2 (RHDV2) which arrived to Mexico in 2020. At the Immunology and Vaccines Laboratory of the Autonomous University of Querétaro a recombinant multiepitope protein as a vaccine against RHDV2 was developed. This project's objective was to evaluate a vaccine against RHDV2 using three adjuvants: Montanide ISA 71 VG, Rehydragel LV and Adju-Phos. For this, 5 groups of 4 rabbits that were approximately 6 weeks old and were not previously vaccinated against RHDV were made. The protein was obtained from the bacteria *Escherichia coli* BL21-AI. First, the lysis was made by ultrasonification. It was purified by affinity chromatography and a dialysis was made to remove the urea present. The presence of protein was evaluated with a polyacrylamide gel electrophoresis and it was quantified by a Bradford analysis. In each dose, the protein concentration used was 60µg/ml. Additionally, an indirect immunofluorescence technique was carried out to detect the Translationally controlled tumor protein (TCTP) in *Babesia bigemina*.

Key words Rabbit Hemorrhagic Disease Virus, recombinant multiepitope protein, vaccines, adjuvants

Introducción

La Enfermedad Hemorrágica Viral del Conejo (EHVC) se describe por el Manual Terrestre de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como una hepatitis aguda, fatal y altamente contagiosa que afecta al conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*). Esta enfermedad es causada por el Virus hemorrágico del conejo (VHC) perteneciente a la familia *Caliciviridae* y al género *Lagovirus*. Es un virus de ARN monocatenario en polaridad positiva que no presenta envoltura. Se han descrito 6 genogrupos del virus, que pertenecen a la presentación clásica o tipo a; y una variante antigénica VHC tipo b o 2, que afecta también a liebres y conejos silvestres. El virus tiene una morbilidad y una mortalidad del 70–90% en el caso del VHCa y del 5–70% en el caso del VHC2 (OIE, 2018).

En México se declaró como “enfermedad ausente” de acuerdo a la OIE desde 1993, luego de su entrada en 1988 (SADER, 2020). En 2020 se recibió la notificación de la aparición de la nueva variante VHC2 en conejos tras la entrada a través de conejos silvestres en el norte del país (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, 2021). Esto representa un peligro para la producción cunícola y fauna silvestre de México, que posee una gran riqueza de especies de conejos y liebres silvestres, de las cuales, algunas son vulnerables o en peligro de extinción (Lorenzo, C., *et al.*, 2020).

La Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONAVIBE) desarrolló la vacuna VEHC-2-BIVE, la cual es una vacuna monovalente inactivada contra el VHC tipo 2 (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, 2021).

En el Laboratorio de Inmunología y Vacunas (LINVAS) de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) se desarrolló una proteína multiepitópica recombinante basada en péptidos de la proteína estructural VP60 del VHC. A una concentración de 60 µg se comprobó que la vacuna es inmunogénica y segura. El adyuvante utilizado fue el Montanide ISA 71 VG, que es una emulsión de agua en aceite que no es comercial. Los adyuvantes en las vacunas son

agentes que aumentan la respuesta inmune a antígenos específicos. Los adyuvantes de aluminio han sido ampliamente utilizados en medicina humana y veterinaria desde su descubrimiento en 1926. Algunos de ellos son el Rehydragel LV con hidróxido de aluminio o el Adju-Phos con hidroxifosfato de aluminio (Facciola A, Visalli G, Laganà A, Di Pietro A, 2022).

Objetivos

Formular y preparar dosis de la vacuna contra Virus hemorrágico del conejo con el adyuvante Montanide ISA 71 VG y dos adyuvantes de aluminio diferentes, Rehydragel LV y Adju-Phos.

Comparar la respuesta humoral producida por la proteína multiepitópica recombinante del VHC con los adyuvantes Rehydragel LV y Adju-Phos, contra la respuesta producida con el adyuvante Montanide ISA 71 VG.

Realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar la proteína tumoral controlada traduccionalmente (TCTP) de *Babesia bigemina*.

Metodología

Se utilizaron 20 conejos de aproximadamente 6 semanas de edad que no estuviesen vacunados previamente contra la EHVC2, pertenecientes a la Unidad Cunícola de la UAQ campus Amazcala. Los conejos fueron divididos en 5 jaulas de 4 conejos cada uno y los grupos fueron los siguientes: a) Inmunizados con Montanide ISA 71 VG y proteína como control positivo, b) Inmunizados con proteína quimérica recombinante VHC y el adyuvante Rehydragel, c) Inmunizados solamente con Rehydragel, d) Inmunizados con proteína quimérica recombinante VHC y el adyuvante Adju-Phos y e) Inmunizados solamente con Adju-Phos.

Se planificaron 2 dosis de 1ml cada una. Para los grupos que incluían proteína se prepararon las dosis con concentración de 60 µg. La inmunización se realizó el día 0 y el día 21, posterior a la toma de

muestra de suero por punción de la vena auricular de los conejos. Antes de tomar las muestras de suero de los conejos, estos se pesaron y se les midió la temperatura rectal. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos y se separó el suero para dejarlo en congelación. La última toma de muestra se programó para el día 31. La inmunización se realizó de manera subcutánea en la región del cuello del lado izquierdo de los conejos. Se regresó a inspeccionar el sitio de inyección si hubo reactividad de los linfonodos a las 24 y 48 hrs post inmunización.

La proteína es producida por la bacteria *Escherichia coli* BL21-AI. Tuvo que ser obtenida de un cultivo mediante su purificación. El primer paso de esta purificación fue la extracción por medio de lisis de las bacterias, primero por shock térmico metiendo la pastilla en nitrógeno líquido y descongelándose a baño María. Después con un ultrasonificador en intervalos de 10 segundos y centrifugando en centrífuga refrigerada a 4°C a 10 mil rpm. Para la sonicación energía sonora que agita las partículas del medio, rompiendo las membranas celulares y liberando el contenido celular al medio (Ramírez, S., Miranda, B. y Rodríguez, C. 2021). Después se adicionan 200 ml de búfer de unión (urea 8M, NaCl 150mM, Na₃PO₄ 20mM e imidazol) a pH 8. Posteriormente se realizó un filtrado con filtro de 0.20 µm.

El siguiente paso fue separar la proteína por medio de cromatografía de afinidad en un cromatógrafo ÄKTA Pure. Para este paso se preparó búfer de lavado a pH 6.3 y búfer de elución a pH 4.5 con los mismos componentes que el búfer de unión. Este método de cromatografía se eligió debido a que la Proteína quimérica recombinante del VHC2 posee una cola de histidinas en su extremo N-terminal que se unen a la columna. Al pasar la fase móvil, las moléculas no unidas a la columna se disocian y se recuperan al modificar el pH (Ramírez, S., Miranda, B. y Rodríguez, C. 2021).

Para evaluar la presencia de proteína en las 5 fracciones obtenidas de la cromatografía se corrió una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida 12%. Las muestras se prepararon con 15 µl de búfer

de carga (40% glicerol, 240mM tris HCl, 8% SDS, 0.04% azul de bromofenol y 5% betamercaptoetanol.) y 15 µl de la fracción. Se dejan 5 minutos a 95°C y se cargaron. El gel fue teñido con azul de Coomassie R250. En esta técnica las proteínas se despliegan y adquieren una carga negativa, por lo que, al aplicar la corriente, migrarán hacia el polo positivo a través del gel de poliacrilamida que funciona como tamiz. Las proteínas se separan de acuerdo a su tamaño, las de menor tamaño se quedarán en la parte superior del gel, mientras que las de mayor tamaño migrarán hacia abajo (Ramírez, S., Miranda, B. y Rodríguez, C. 2021).

Una vez seleccionadas las mejores fracciones se realizó una diálisis para retirar la urea por difusión pasiva a través de una membrana semipermeable. Se preparó 1L de solución de recambio (Tris base 50mM, NaCl 100mM pH7) la cual se esterilizó en autoclave y 400 ml de solución inicial (Tris base 150 mM, NaCl 100mM, urea 7M, pH7) que se filtró por un filtro de 0.22 µm. En tubos Eppendorf de 1.5 ml modificados se vertieron 1200 µl de la fracción. Se coloca la membrana semipermeable para cerrar el tubo y colocarlo boca abajo en un vaso de precipitado con la solución de recambio. Se deja en agitación leve por 30 minutos y se inician los recambios con solución de recambio y agua destilada estéril.

Al finalizar la diálisis se guardaron por separado las diferentes fracciones y se volvió a realizar una electroforesis de proteínas a cada una para evaluar su purificación. A las fracciones se les realizó un análisis Bradford, un método colorimétrico para cuantificar la cantidad de proteína quimérica recombinante de VHC presente en cada fracción. Para esto se usó una placa de 96 pozos. Las muestras de las fracciones y la curva del estándar de BSA se hicieron por duplicado cada una; también se agregaron 5 µl de muestra con 245µl de reactivo. Los resultados del Bradford se analizaron en Excel para la cuantificación de proteína presente en cada fracción. Después se realizaron los cálculos para saber cuántos µl de la fracción serían necesarios para tener la concentración deseada de 60µg/ml.

Para formular las dosis con los adyuvantes de aluminio, Rehydrigel y Adju-Phos, se recomienda

usar 500 µg de aluminio por cada dosis. El Rehydrgel LV utilizado tiene un contenido de aluminio de 2%, mientras que el Adju-phos utilizado tiene un contenido de aluminio de 0.5%. Se adicionan los µl necesarios de una fracción para tener la concentración de 60 µg/ml. El resto se completa con agua inyectable. El pH se ajustó a 7 y cada 15 minutos, se debe agitar en vórtex 7 segundos y repetir 3 veces.

Para la preparación de las dosis con el adyuvante Montanide ISA 70 VG se utilizó un ratio 70/30 Montanide a proteína. El resto se completa con PBS estéril. Los componentes se homogenizan mecánicamente durante 10 minutos. Se revisó al microscopio para evaluar que las micelas sean homogéneas y que midan 1µm, en caso de no verse así, se debe homogenizar mecánicamente por otros 10 min. Se prepararon en total 6 dosis con proteína de cada adyuvante y 6 dosis solamente de adyuvante de cada grupo, todas preparadas dentro de la Campana de flujo laminar.

Se realizaron frotis con eritrocitos infectados y no infectados con *Babesia bigemina*. Previamente centrifugados a 2800 gravedades por 5 minutos con solución VYM. Los frotis se secaron en campana y después se fijaron en una solución acetona 90% y metanol 10% a -20°C por una hora. Luego de dejarlos secar en campana se pareo una laminilla con frotis de eritrocitos infectados con una de no infectados. Se realizó un lavado con PBS-Tween 0.2%. Se añadieron entre las laminillas 200 µg de suero de conejo con anticuerpos contra TCTP en dilución 1:20. Se dejaron incubar a 37°C por media hora para después dar 10 lavados con PBS-T 0.2%. Se le añadieron 200 µl de anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo unido a Alexa 488 en dilución 1:200 y DAPI en dilución 1:10. Se incubó por media hora y se hizo un lavado con agua destilada antes de separar las laminillas. A cada una se le añadió una gota de glicerina fosfatada y se cubrió con el cubreobjetos para sellar las orillas con esmalte de uñas. Se observó al microscopio con lámpara de fluorescencia con el objetivo 100x pH3.

Resultados

Al finalizar la cromatografía de afinidad Se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida para evaluar la extracción de la proteína multiepitópica recombinante VHC. Como se muestra en la Figura 1, las fracciones 1 y 2 fueron las mejores en cuanto al tamaño e intensidad de la banda.

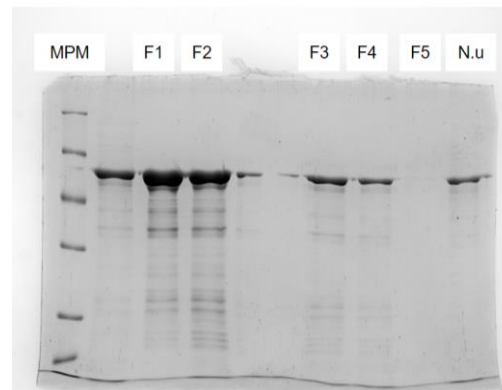


Figura 1. Resultados de la electroforesis de las fracciones. (MPM= marcador de peso molecular. N.u =fracción no unida)

Las fracciones 1 y 2 fueron seleccionadas para realizarles la diálisis y de esta manera extraer la urea que presentaban. Una segunda electroforesis se realizó a cada fracción, observando la presencia de proteína en la mayoría de estas, a excepción de las fracciones F1-4, F2-3 y F2-6 como se puede ver en la Figura 2. La fracción 2, por su pureza fue la elegida para la formulación de las dosis.

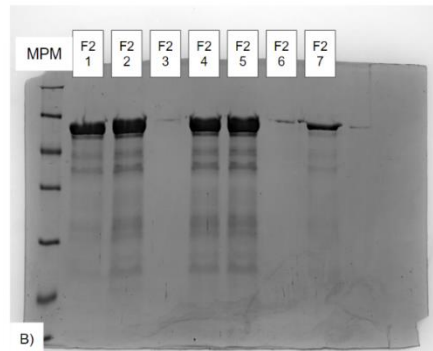
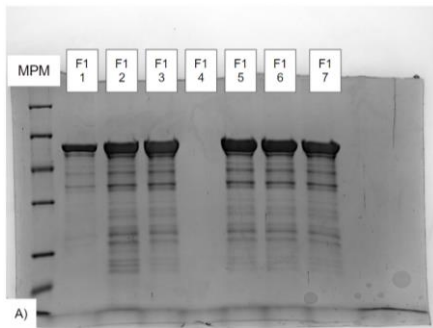


Figura 2. Electroforesis realizada posterior a la diálisis. A) Resultados de la electroforesis de las fracciones 1. B) Resultados de la electroforesis de las fracciones 2.

A pesar de esta selección, a todas las fracciones se les realizó una cuantificación de proteína por el método colorimétrico Bradford. La curva del estándar de albúmina de suero bovino (BSA) obtenida se muestra en la Figura 3. Se obtuvo una R^2 de 0.95, por lo que se considera confiable.

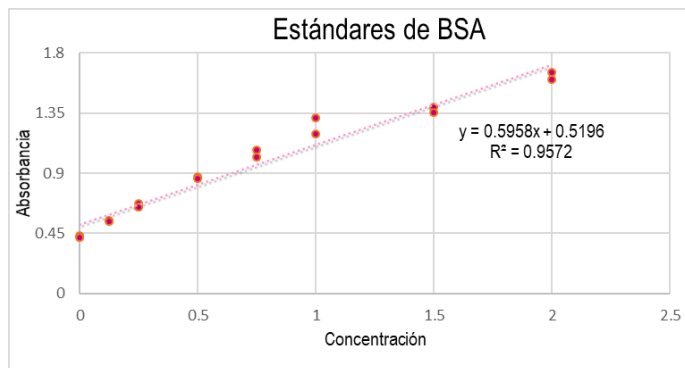


Figura 3. Curva del estándar de BSA. Se muestra la ecuación de la recta y la R^2

A partir de la ecuación de la recta presentada se despeja x , obteniendo la ecuación $x = \frac{y-0.5196}{0.5958}$. Para obtener la concentración de proteína se sustituye y por el valor obtenido en la absorbancia de la muestra. Se muestran los resultados en la Tabla 1. La fracción F1-1 fue descartada pues se precipitó la proteína.

Tabla 1. Concentración de proteína

Fracción	Absorbancia	Concentración
F1 2	0.6865	0.28012756
F1-3	0.953	0.727425311
F1-5	0.865	0.57972474
F1-6	0.945	0.713997986
F1-7	0.9175	0.667841558
F2-1	0.8425	0.541960389
F2-2	0.838	0.534407519
F2-4	0.73	0.353138637
F2-5	0.7685	0.417757637
F2-7	0.572	0.087948976
F2-3	0.4285	-0.152903659
F1-4	0.4435	-0.127727425
F2-6	0.459	-0.101711984

Dependiendo de la concentración de proteína se seleccionó la fracción F2-1 para las dosis con Adju-Phos, la fracción F2-2 para Rehydragel y la fracción F2-5 para Montanide. Los volúmenes utilizados de cada componente para las 6 dosis preparadas fueron los que se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Formulación de dosis

Grupo	Rehydragel proteína	Rehydragel solo	Adju-Phos proteína	Adju-Phos solo	Montanide
Fracción (μ l)	673.6	0	664.2	0	861.7
Adyuvante (μ l)	150	150	600	600	4200
Agua inyectable (μ l)	5176.3	5850	4735.7	5400	N.A.
PBS estéril (μ l)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	938.2

N.A. = no aplica

Para las dosis formuladas con Montanide se homogenizó en total 110 minutos para obtener micelas homogéneas y de tamaño aproximado de 1 μ m como se ve en la Figura 4.

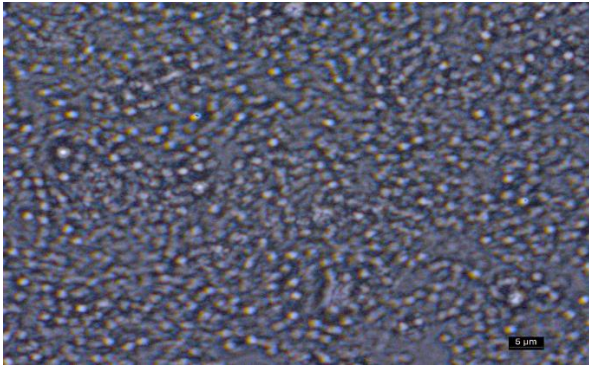


Figura 4. Dosis del adyuvante Montanide observada al microscopio luego de homogenizarse por 110 minutos en intervalos de 10 minutos.

Previo a la inmunización se tomó la temperatura y peso de cada conejo. A las 24 y 48hrs post inmunización se revisó la temperatura y reactividad de los linfonodos mandibulares y preescapulares. Ningún conejo presentó fiebre el día 0. En la revisión 24hrs post inmunización ningún conejo presentó fiebre. A las 48 horas post inmunización ningún conejo presentó fiebre, 10 conejos presentaron reactividad de los linfonodos.

Como se puede ver en la figura 5, con el fluorocromo DAPI, que es un intercalante de DNA se tiñen los núcleos. En este caso observamos los núcleos en color azul con una posición que nos sugiere que lo que vemos son merozoitos de *Babesia bigemina*. En la figura 6 vemos la emisión de Alexa 488 que muestra en color verde dónde se encuentra la proteína TCTP de *B. bigemina*. Comparando ambas imágenes vemos que los núcleos observados con DAPI corresponden con las estructuras observadas con Alexa 488.

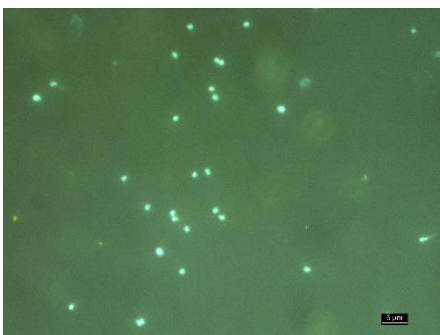


Figura 5. Inmunofluorescencia DAPI

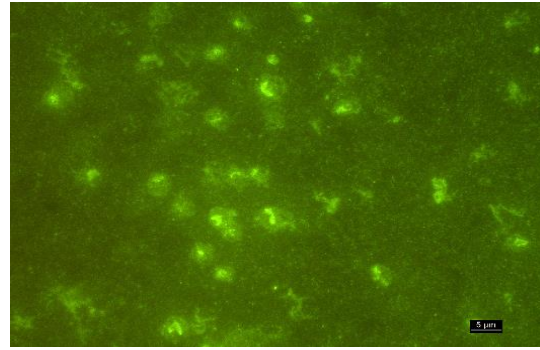


Figura 6. Inmunofluorescencia indirecta con Alexa 488

Discusión y conclusiones

Si bien el proyecto fue largo y uno de los objetivos no se alcanzó a realizar, es importante el haber iniciado el experimento para dar un avance al desarrollo de una vacuna accesible y efectiva para controlar la enfermedad. Las vacunas comercializadas actualmente en el mundo son vacunas de virus inactivado, que se recolectan de órganos de animales infectados, lo cual supone un problema en cuestiones de seguridad y ética (Dalton, K. P., *et.al.* 2021).

El adyuvante Montanide ISA 71 VG tuvo un mejor desempeño para producir inmunidad a largo plazo y fue mejor que el adyuvante Rehydragel para la vacuna de virus inactivado comercializada en Egipto (Salman, O. y Samah, E., 2021). Sin embargo los adyuvantes de aluminio son ampliamente utilizados en medicina veterinaria desde hace 80 años (Lindblad, E. B., 2004).

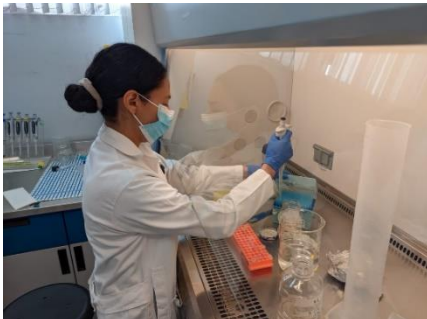
Para finalizar, se logró planificar e iniciar un proyecto experimental para evaluar la Proteína quimérica recombinante VHC con los adyuvantes Rehydragel y Adju-Phos, para lo cual fue realizada la purificación de la proteína y su cuantificación para hacer las dosis. La primera toma de muestra e inmunización se realizaron sin problema. Se espera que el proyecto sea concluido para evaluar la respuesta humoral producida y, de esta manera, avanzar hacia el desarrollo de una vacuna efectiva y económica contra el virus hemorrágico del conejo. Además, se logró

realizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta para detectar la proteína TCTP en *Babesia bigemina*

Agradecimientos

Gracias a mi familia, al Dr. Juan Joel Mosqueda por su enseñanza y por permitirme participar en el proyecto. Gracias a mis compañeros por su apoyo y esfuerzo y a todos los del Laboratorio de Inmunología y Vacunas por compartir conmigo sus conocimientos.

Galería fotográfica



Referencias

Dalton, K. P., *et al.* (2021). Chimeric VLPs Bearing VP60 from Two Serotypes of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus Are Protective against Both Viruses. *Vaccines*, 9(9), 1005. <https://doi.org/10.3390/vaccines9091005>

Facciola, A., Visalli, G., Laganà, A., & Di Pietro, A. (2022). An Overview of Vaccine Adjuvants: Current Evidence and Future Perspectives. *Vaccines*, 10(5), 819. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/vaccines10050819>

Lorenzo, C. (2020) La enfermedad hemorrágica viral de los conejos llega a México. *La Ciencia en el País*. <https://www.ecosur.mx/wp-content/uploads/2021/01/La-enfermedad-hemorr%C3%A1gica-viral.pdf>

Organización Mundial de Sanidad Animal (2018) Enfermedad hemorrágica del conejo. Manual Terrestre de la OIE Capítulo 3.6.2.

https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.06.02_RHD.pdf

Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (2021) Concluye la emergencia sanitaria por EHVC T2, continua la vigilancia y la vacunación. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/pronabive/es/articulos/concluye-la-emergencia-sanitaria-por-ehvc-t2-continua-la-vigilancia-y-la-vacunacion>

Ramírez, S., Miranda, B. y Rodríguez, C. (2021) Purificación de proteínas. *Mensaje Bioquímico*. 45 (2021) 35-47 Versión electrónica en <http://bq.facmed.unam.mx/tab>

Salman, O. y Samah, E.. (2021). The use of different types of Montanide adjuvant in preparation of inactivated rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) vaccine. https://www.researchgate.net/publication/349409426_The_use_of_different_types_of_Montanide_adjuvant_in_preparation_of_inactivated_rabbit_haemorrhagic_disease_virus_RHDV_vaccine

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

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/554870/Plan_de_emergencia_para_la_atenci_n_de_un_brote_de_la_EHVC_en_M_xico.pdf



Evaluación del efecto del disolvente en la estabilidad de la molécula de delfinidina y su posible efecto antioxidante

Ana Paola Robles
Sánchez

Universidad Autónoma
de Querétaro

Facultad de Química
Cerro de las Campanas
S/N, Centro

Universitario, 76010
Santiago de Querétaro,
Qro.

arobles07@alumnos.uaq.mx

María de los Ángeles
Cuán Hernández

Universidad Autónoma de
Querétaro

Facultad de Ingeniería
Cerro de las Campanas
S/N, Centro Universitario,

76010 Santiago de
Querétaro, Qro.
angelescuan@gmail.com

Resumen — Se examinaron tres estructuras predominantes de la delfinidina en tres distintos niveles de pH, mediante cálculos de la teoría funcional de la densidad (DFT) bajo un nivel B3LYP y un conjunto base 6-11+g(d,p), para cuatro diferentes solventes orgánicos (agua, metanol, etanol y acetona). Con el fin de obtener las cargas parciales atómicas y evaluar los posibles átomos con propiedades ácido básicas, para la estabilización de radicales libres. Se encontró que a pH menor a dos empleando metanol como disolvente el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo unido al carbono 4' es el más propenso a donar hidrógenos.

Palabras clave — antocianinas, delfinidina, química computacional, efecto del solvente, pH, DFT, química computacional.

Abstract — Three predominant structures of delphinidin were examined at three different pHs levels through density functional theory

(DFT). The calculations were carried out using B3LYP level and a basis set 611+g(d,p), for four different organic solvents (water, methanol, ethanol and acetone), in order to obtain the atomic partial charges and to evaluate the possible atoms with basic-acid properties for the stabilization of free radicals, it was found that the hydrogen atom of the hydroxyl bonded to the 4' carbon is the most likely to donate hydrogens when the pH is lower than two promoted by methanol as solvent.

Keywords — anthocyanins, delphinidin, computational chemistry, solvent effect, pH, DFT, computational chemistry.

I. INTRODUCCIÓN

Las antocianinas forman parte de la familia de flavonoides, son metabolitos generados por la misma vía biosintética en plantas [1] y confieren la pigmentación azul, rojo o púrpura a diversas flores, frutos y vegetales [2]. Como lo son las bayas (mora, aronia, saúco, uva, frambuesa, etc.), cereza, fresa, maíz morado, camote amarillo, granadas y cebolla roja [3,4]. Recientemente las antocianinas han sido ampliamente estudiadas por sus diversas actividades farmacológicas (actividad antioxidante, prevención de enfermedades neurodegenerativas, Cardioprotección) [3,10]. Las antocianidinas son la forma aglicona de las antocianinas, estas últimas poseen una o más azúcares enlazados al oxígeno de C3 o C3 y C5 principalmente. Además, de las más de 600 antocianinas que se han identificado, sólo 5 de estas se encuentran en mayor abundancia y se clasifican de acuerdo a los grupos hidroxilo del esqueleto flavylium que caracteriza a la antocianidina. [4,5].

El pH juega un papel fundamental en la estructura de las antocianinas al propiciar reacciones ácido básicas, de isomerización o de adición de una molécula de agua. Para un pH menor a 3 la estructura

mayoritaria es el catión flavilio (HA^+), con un pK_a de 4-5 para la formación de la base conjugada A (Base quinoidal). Una adición nucleofílica en el carbono 2 de H_2O resulta en la formación de la forma hemiacetal incolora, que tras un aumento en el pH conlleva a la formación de su tautómero incoloro Chalcona (Fig. 1) [6,7]. A parte de la importancia en el pigmento que adopta al variar el pH, en su utilización como

colorante natural en aditivos de alimentos, en la enología [8] o incluso como indicador inteligente en el empaqueo de productos para acertar su frescura [9], durante la digestión, los diferentes niveles de pH en el cuerpo propician el estado mayoritario de una estructura u otra.

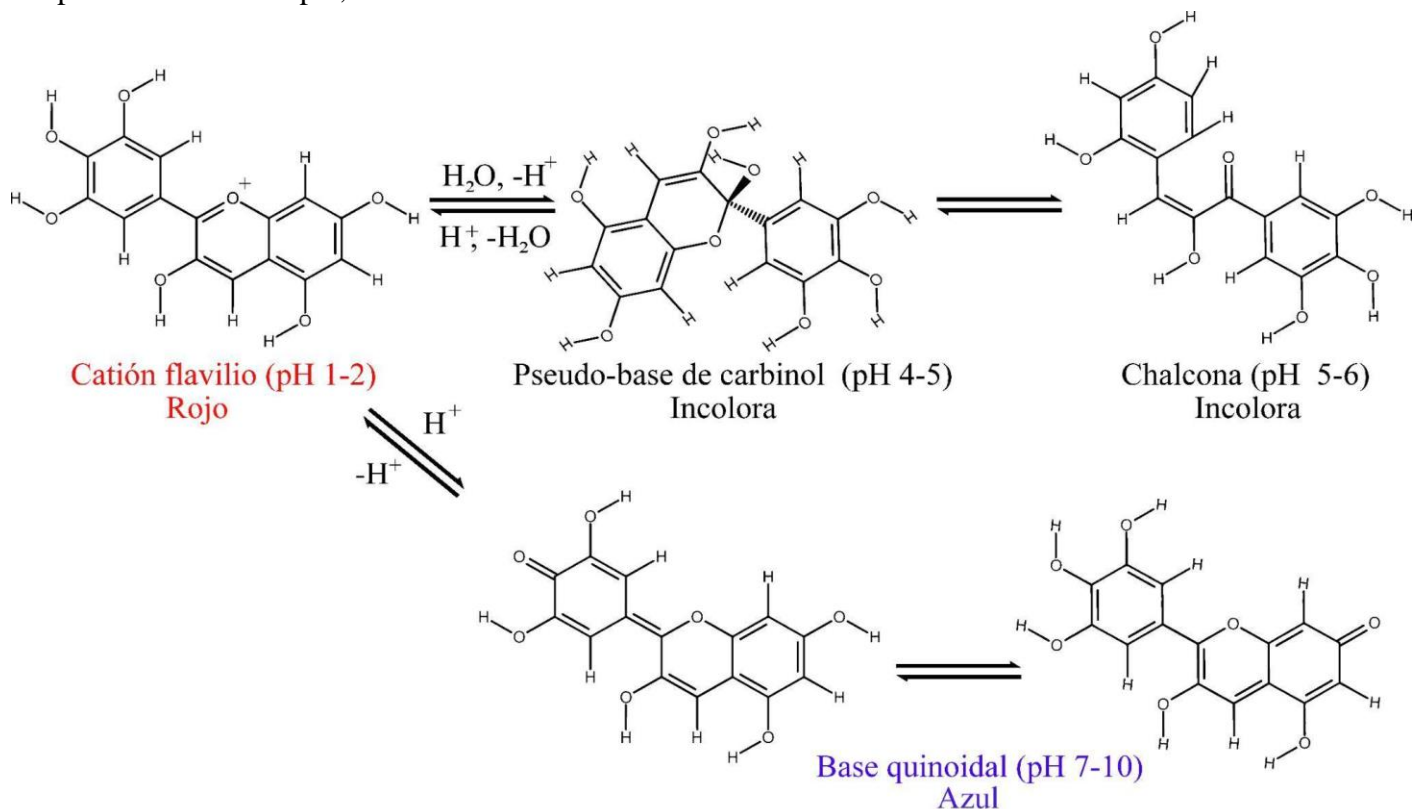


Fig. 1. Estructuras de la delphinidina a diferentes pH. Catión flavilio (pH 1-2) se observa la predominancia del ión oxonio en el anillo B. Pseudo-base de carbinol (pH 4-5) producto de la reacción de hidratación del catión flavilio. Base quinoidal (pH 7-10) producto de la reacción ácida del catión flavilio, los enlaces π conjugados de la estructura le proporcionan la absorción en el espectro visible. Chalcona (pH 5-6) tautómero de la molécula pseudo-base de carbinol, resultado de la apertura del anillo de pirilio, con H_2O como catalizador.

La delphinidina junto con la cianidina es la principal antocianina presente en mora azul, granada, la uva roja, entre otras [7], siendo la segunda más abundante en plantas y vegetales con tan solo el 12% es necesario un arduo trabajo de purificación, donde el disolvente juega un papel importante [11].

En este artículo se analizó la estabilidad de la molécula de delphinidina con diferentes disolventes empleando las diferentes estructuras predominantes de acuerdo al pH, con la finalidad de elucidar el mecanismo por el cual alcanzan su configuración más estable, así como sus diferencias para su posible aplicación en sistemas antioxidantes.

II. MÉTODOS COMPUTACIONALES

Se utilizó el método *ab initio* de DFT para la optimización de las geometrías de los tres isómeros de delfinidina en su estado fundamental (EF), junto con el funcional de correlación de intercambio B3LYP (Becke, 3 parámetros, Lee–Yang–Parr) [12] para la optimización energética y el conjunto base con una función difusa “+” y funciones de polarización (p,d): 6-311+g(d,p). Todos los cálculos se realizaron con el paquete de programas Gaussian 09. Además se realizaron los cálculos de frecuencia IR a 298.15 K, con el mismo nivel de cálculo para asegurarse de que exista concordancia entre las vibraciones obtenidas y las reportadas en la literatura [18].

Los efectos del solvente fueron calculados para cada estructura en EF utilizando el modelo de solvatación universal basado en densidad (SMD), representando el solvente implícitamente como un medio dieléctrico y su tensión superficial en el límite entre el soluto y el solvente [13]. Cada energía de solvatación se calculó como la diferencia de la energía libre de Gibbs en su estado solvatado menos la energía libre de Gibbs en el vacío.

Se optimizaron las cargas por cargas puntuales derivadas del potencial electrostático en específico CHELPG, con la optimización de geometría anterior.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Estructura de la delphinidina

La estructura optimizada obtenida en la fase gaseosa para el isómero catiónico (Cation flavilio) es completamente plana (Fig. 2). Los ángulos diedros ω_1 (C2-C3-O-H), ω_4 (C3'-C4'-O-H), ω_5 (C2'-C3'-O-H), y ω_6 (C4'-C5'-O-H) son anti-peri-planares, maximizando así la distancia entre los hidrógenos con

carga parcial positiva del grupo hidroxilo, mientras que ω_2 (C5-C6-O-H) y ω_3 (C6-C7-O-H) son sin-peri-planares, lo que está acorde con la literatura [14-15], solo con la diferencia en el ángulo ω_3 , que en este caso es sin-peri-planar lo que podría sugerir que la siguiente estructura es un mínimo local y no un mínimo global.

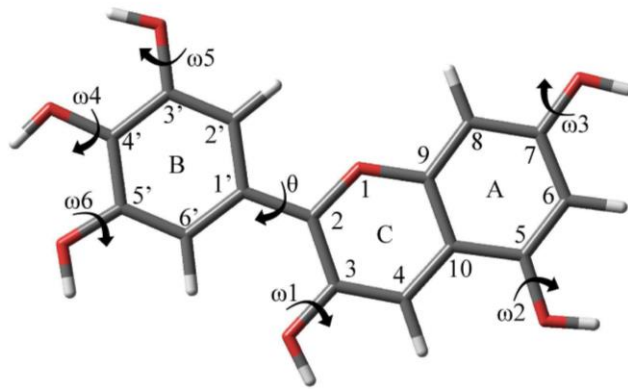


Fig. 2. Estructura optimizada de delfinidina en estado gaseoso [14]

B. Efecto del solvente sobre la estabilidad

Se evaluaron 4 solventes orgánicos puros: acetona, agua, metanol y etanol [16] para acertar su efecto estabilizante en la delfinidina de manera teórica. Cada geometría fue optimizada para el mínimo de energía y comparada (Fig. 3) Considerando el ion flavilio con carga positiva +1.

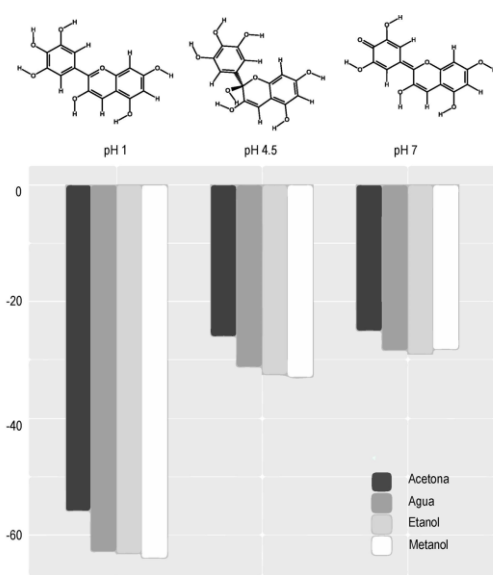


Fig. 3. Gráfica de la energía de solvatación de las diferentes estructuras pH<2: Cation flavilio, pH 4-5:Pseudo base de carbinol, pH>7 Base quinoidal evaluada en diferentes solventes orgánicos.

La de menor energía de solvatación obtenida conforme a la Ec. (1), corresponde a la geometría catiónica (pH<2).

$$\Delta G_{(solv)} = \Delta G_{(e\ s)} - \Delta G_{(e\ g)} \quad (1)$$

donde

$$\Delta G_{(solv)} = \text{Energía de solvatación},$$

$$\Delta G_{(e\ g)} = \text{Energía libre de Gibbs en estado gaseoso}$$

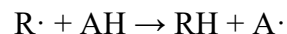
$$\Delta G_{(e\ s)} = \text{Energía libre de Gibbs en estado solvatado}$$

esto se atribuye a que el ión oxonio de la estructura flavilio, le confiere una mayor afinidad por el agua, además de el nivel de solvatación debida al solvente me mayor a menor fue de metanol > Etanol > Agua > Acetona, con las constantes dieléctricas 0.791, 0.789, 0.998, 0.788, respectivamente. De aquí podemos observar que cuando la constante dieléctrica se encuentra en el rango de 0.8 - 0.78 existe un aumento de la solubilidad conforme aumenta la polaridad del disolvente, sin embargo esto no sucede en el caso del

agua. Esto puede deberse a la diferencia en las polaridades entre el soluto y el agua, causando que las fuerzas de cohesión del agua sean mayores con respecto a las de la interacción agua-soluto, por lo que el agua interacciona entre sí con mayor fuerza y excluye en cierta medida al soluto, además utilizando la acetona, a diferencia de los demás disolventes, ésta no forma puentes de hidrógeno, por lo cual se ve una marcada disminución en la energía de solvatación. Por otro lado entre el ph de 4-5 y ph>7 no parece haber una diferencia significativa esto puede deberse a que ambos son neutrales, lo anterior concuerda con resultados experimentales [16].

C. Carga de la molécula

En la estructura del pH<2 el O1 presenta una menor carga negativa que los demás oxígenos, en forma gaseosa (-0.291), no alcanza una carga +1 en este átomo debido a que las cargas se distribuyen en todos los átomos de la molécula, sin embargo a comparación de los átomos de oxígeno restantes en la molécula, el O1 es ligeramente más positivo. El segundo oxígeno con mayor carga parcial positiva es 4'C-OH, por lo que actuando como un ácido débil (AH), podría ser un lugar de eliminación de radicales por el mecanismo de transferencia de hidrógenos a la especie reactiva (R·) (HAT, por sus siglas en inglés), como se muestra en la siguiente reacción:



La base conjugada producto de esta reacción (Base quinoidal) se estabiliza por puentes de hidrógeno de los hidroxilos 3'C-OH y 5'C-OH. [14], posterior a este el O de 5C-OH es el más positivo por lo que a pH 7, podría ser un posible grupo ácido, siendo esta estructura importante en la cavidad oral o en el intestino humano variando el pH en un rango de 5.6-7.9 y 6.7-7-4 respectivamente [16].

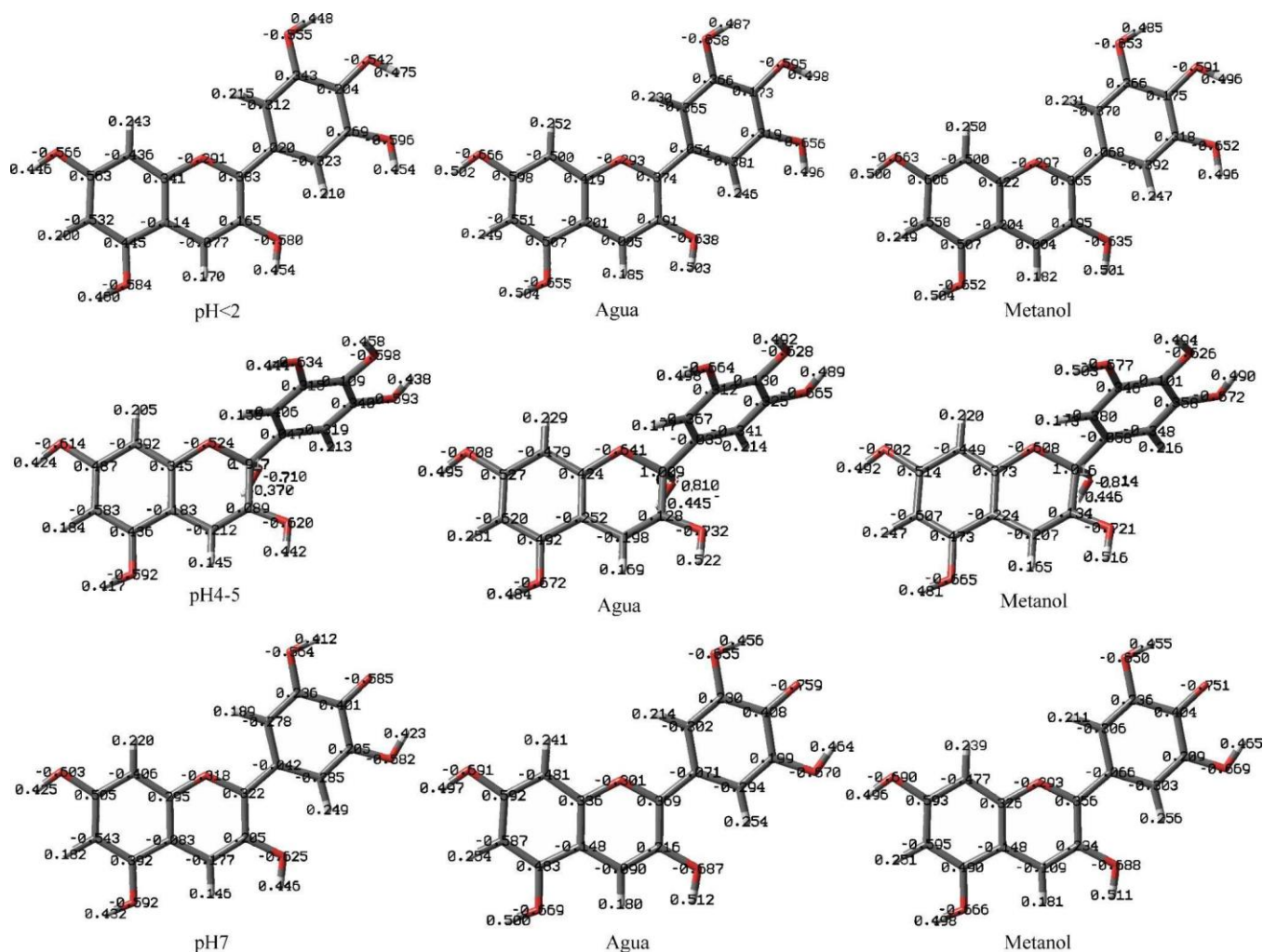


Fig. 4. Carga parcial atómica calculada con CHELPG, para el estado gaseoso puro del soluto y con los solventes agua y metanol.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Utilizando el análisis teórico por la teoría de funcionales de densidad se logró conocer la energía de solvatación de la molécula de delphinidina que corresponde con los reportes experimentales, Además se calculó las cargas parciales atómicas de la molécula para predecir el grupo con mayor potencial antioxidante, entre los solventes utilizados, sin embargo en las fuentes de consumo se encuentra en la

forma glicosilada que ha reportado una disminución de la actividad antioxidante además de que sufre una descomposición durante la digestión donde uno de sus metabolitos predominantes es el ácido protocatecuico, ácido cafeico o p comrie, por lo que su efecto antioxidante y por lo tanto sus efectos terapéuticos puede considerarse también a estos metabolitos [17].



V. RECONOCIMIENTOS (O AGRADECIMIENTOS)

Expresó mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro, a la doctora Ángeles Cuán Hernández y al estudiante de posgrado Oscar Ortiz quién también me apoyo en la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

- [1] S. K. Panchal, O. D. John, M. L. Mathai, and L. Brown, "Anthocyanins in chronic diseases: The power of purple," *Nutrients*, vol. 14, no. 10, p. 2161, 2022.
- [2] H. E. Khoo, A. Azlan, S. T. Tang, and S. M. Lim, "Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits," *Food & Nutrition Research*, vol. 61, no. 1, p. 1361779, 2017.
- [3] Bendokas, V., Stany, V., Mažeikienė, I., Trumbeckaitė, S., Baniene, R., & Liobikas, J. (2020). Anthocyanins: From the field to the antioxidants in the body. *Antioxidants*, 9(9), 819. <https://doi.org/10.3390/antiox9090819>
- [4] C. Chaiyasut, B. S. Sivamaruthi, N. Pengkumsri, S. Sirilun, S. Peerajan, K. Chaiyasut, and P. Kesika, "Anthocyanin profile and its antioxidant activity of widely used fruits, vegetables, and flowers in Thailand," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 9, no. 6, p. 218, 2016.
- [5] R. Matera, S. Gabbanini, S. Berretti, R. Amorati, G. R. De Nicola, R. Iori, and L. Valgimigli, "Acylated anthocyanins from sprouts of *Raphanus sativus* CV. sango: Isolation, structure elucidation and antioxidant activity," *Food Chemistry*, vol. 166, pp. 397–406, 2015.
- [6] [O. Dangles and J.-A. Fenger, "The chemical reactivity of anthocyanins and its consequences in food science and Nutrition," *Molecules*, vol. 23, no. 8, p. 1970, 2018.](#)
- [7] [H. E. Khoo, A. Azlan, S. T. Tang, and S. M. Lim, "Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits," *Food & Nutrition Research*, vol. 61, no. 1, p. 1361779, 2017.](#)
- [8] K. Zhang, L. Yuan, Q. Li, R. Wang, and Z.-Z. Zhang, "Comparison of the anthocyanins composition of five wine-making grape cultivars cultivated in the wujiaqu area of Xinjiang, China," *OENO One*, vol. 53, no. 3, 2019.
- [9] S. Roy and J.-W. Rhim, "Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 61, no. 14, pp. 2297–2325, 2020.
- [10] J. Liu, H. Zhou, L. Song, Z. Yang, M. Qiu, J. Wang, and S. Shi, "Anthocyanins: Promising natural products with diverse pharmacological activities," *Molecules*, vol. 26, no. 13, p. 3807, 2021.
- [11] A. Castañeda-Ovando, M. de Pacheco-Hernández, M. E. Páez-Hernández, J. A. Rodríguez, and C. A. Galán-Vidal, "Chemical Studies of anthocyanins: A Review," *Food Chemistry*, vol. 113, no. 4, pp. 859–871, 2009.
- [12] K. Sakata, N. Saito, and T. Honda, "Ab initio study of molecular structures and excited states in anthocyanidins," *Tetrahedron*, vol. 62, no. 15, pp. 3721–3731, 2006.
- [13] [A. V. Marenich, C. J. Cramer, and D. G. Truhlar, "Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 113, no. 18, pp. 6378–6396, 2009.](#)
- [14] [L. Estévez and R. A. Mosquera, "Molecular structure and antioxidant properties of Delphinidin," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 112, no. 42, pp. 10614–10623, 2008.](#)
- [15] [R. Guzmán, C. Santiago, and M. Sánchez, "A density functional study of antioxidant properties on anthocyanidins," *Journal of Molecular Structure*, vol. 935, no. 1-3, pp. 110–114, 2009.](#)
- [16] A. C. Kumoro, D. S. Retnowati, and C. S. Budiyati, "Solubility of delphinidin in water and various organic solvents between (298.15 and 343.15) K," *Journal of Chemical & Engineering Data*, vol. 55, no. 7, pp. 2603–2606, 2010.
- [17] N. Tena, J. Martín, and A. G. Asuero, "State of the art of anthocyanins: Antioxidant activity, sources, bioavailability, and therapeutic effect in human health," *Antioxidants*, vol. 9, no. 5, p. 451, 2020.
- [18] [Y.-K. Choong, "Fourier transform infrared and two-dimensional correlation spectroscopy for substance analysis," *Fourier Transforms - High-tech Application and Current Trends*, 2017.](#)

Una mirada a las relaciones de poder y de género en el convento de religiosas del Verbo Encarnado de Querétaro, 1905-1950

Andrea Itzel Elizondo Sánchez, María José Soto Zamora y Dra. Oliva Solís Hernández

Facultad de Ciencias Políticas y Sociales de la Universidad Autónoma de Querétaro

aelizondo27@alumnos.uaq.mx ;

msoto30@alumnos.uaq.mx ; osolish2@hotmail.com

Resumen

Analizar un discurso desde el área de la Comunicación implica contemplar el contexto y el significado de las palabras utilizadas dentro de un mensaje. Por ello, en apoyo con la Historia, se pretende dar cuenta de la vida cotidiana de las integrantes de la comunidad religiosa del Verbo Encarnado en Querétaro.

Las cartas, notas y diarios cuentan una historia paralela a la que los libros de texto describen. Siendo documentos tan cercanos a la cotidianidad, permiten la reconstrucción del pasado bajo la perspectiva de lo social y no sólo de los hechos.

Utilizando éstos como la principal fuente de consulta en esta investigación, se da cuenta de las relaciones, conflictos, goces y sufrimientos de la vida en el convento. Y con ello, se hace el intento de dejar registro de una comunidad que hasta el día de hoy se tiene poca información.

Abstract

Analyzing a discourse from the area of Communications implies considering the context and

meaning of the words used inside a message. Therefore, in support of the History, it is intended to account for the daily life of the members of the religious community of the Incarnate Word in Querétaro.

Letters, notes and diaries tell a parallel story to the one described in the textbooks. Being documents that are so close to everydayness, they allow the reconstruction of the past with a social perspective and not only based on the facts.

By using them as the prime source of consultation on this investigation, the relationships, conflicts, joys and sufferings of the daily lives inside the convent are explained. And with this, an attempt is made of trying to leave a record of a community that until today there's not enough information about.

Palabras clave

Religiosas del Verbo Encarnado; Comunicación; análisis del discurso; relaciones de poder; perspectiva de género.

Sisters of the Incarnate Word; Communications; speech analysis; relationships of power; gender perspective.

Introducción

Este proyecto de investigación, postulado bajo el nombre: "Goces y sufrimientos: la vida cotidiana en el claustro. Las Religiosas del Verbo Encarnado en Querétaro 1905-1950", estuvo a cargo de la Dra. Oliva Solís Hernández y se realizó durante el verano de 2022, con la participación de alumnas de la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales, perteneciente a la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ). La investigación fue de carácter histórico y con perspectiva de género.

Es de conocimiento popular que, en México, una parte importante de la cultura es la religión, las iglesias abundan en el país, así como las imágenes de Cristo,

de las vírgenes y los santos. Es un factor que merece y debe ser estudiado desde distintas disciplinas tales como la sociología, antropología, la comunicación y por supuesto, la historia.

En el presente reporte se buscó ahondar sobre una de las órdenes religiosas de las que poco se tiene información. Las religiosas del Verbo Encarnado arribaron a Querétaro en el año 1903 (Loyda, 2015), tenían un convento y un colegio para señoritas.

Los resultados obtenidos nos dejan ver la vida de las mujeres que, por una u otra circunstancia, decidieron ejercer y vivir como religiosas. Los datos recabados se analizarán bajo el método de análisis del discurso, la categoría “poder”, propuesta por Michel Foucault, así como se retomarán algunas ideas de la escritora y antropóloga feminista, Marcela Lagarde.

Objetivos

Como objetivo principal, la investigación pretendía conocer la vida cotidiana de las mujeres que formaban parte de las Religiosas del Verbo Encarnado en la ciudad de Querétaro, en un periodo de tiempo de 1905 a 1950.

Como objetivos secundarios, se quería conocer qué significa ser una Religiosa del Verbo Encarnado y cómo eran sus interacciones con las distintas autoridades (Obispo, confesor, Madre Superiora, otras religiosas y con las niñas del colegio).

Metodología

Al ser una investigación de carácter histórico, la metodología se centró en buscar archivos que brindaran un panorama general respecto las Religiosas del Verbo Encarnado y más tarde, documentos que dieran a conocer cómo eran sus vidas dentro del convento.

En una primera fase, se buscó en La Sombra de Arteaga, disponible en la hemeroteca digital de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); y también en el buscador, Google Académico, y la plataforma, Academia.edu.

Dentro de la Sombra de Arteaga, el periódico oficial del estado de Querétaro, se utilizaron las herramientas de “búsqueda avanzada” y “búsqueda filtrada”. Se filtró con las fechas de 1905 a 1950 y también se buscó por frase o palabras “religiosas del verbo encarnado”.

Se esperaba encontrar notas periodísticas que dieran cuenta de eventos importantes (tales como la inauguración del convento o del colegio), así como noticias sobre las festividades o sucesos de interés público en los que el Verbo Encarnado hubiera estado presente.

No obstante, en la Sombra de Arteaga no se encontró información sobre la comunidad religiosa.

Con respecto a los buscadores digitales, tampoco se tuvo mucha suerte. Como tal, el nombre de la comunidad religiosa era comúnmente interpretado, y confundido, como un sinónimo de evangelizar, por lo que encontramos un mayor número de documentos en relación con la enseñanza de la liturgia, pasajes bíblicos y conversión al cristianismo.

Ante estos primeros intentos de buscar información, se optó por cambiar la fuente de información. Para ello, se acudió presencialmente a la Curia Diocesana ubicada en la avenida Reforma Ote 52, en la colonia Centro de Querétaro.

Se realizaron visitas durante dos días al archivo. El primer día se tuvo acceso a un fragmento del libro de la Hermana Marilú Loyda Benítez (2015), *Presencia histórica de la vida consagrada en la Diócesis de Querétaro* y a un par de archivadores que contenían documentos relacionados con las religiosas de la diócesis.

Los archivadores carecían de orden y de una clasificación adecuada, por lo que la estancia en el recinto era hasta la hora de cierre del archivo (14 horas).

Resultados

Dentro del archivo diocesano se encontró una carpeta con información sobre las Religiosas del Verbo Encarnado, correspondiente al período de 1905 a 1940. También encontramos otros documentos

ubicados en carpetas que correspondían a otra congregación, algunos con fechas más recientes de 1970.

La mayor parte de los documentos recabados fueron cartas, las cuales habían sido enviadas desde el convento hacia un destinatario principal: el Obispo. Dichos escritos permiten ver un poco de cómo era la vida dentro de su comunidad religiosa, qué les preocupaba, de qué se quejaban, etcétera.

De igual forma, se encontraron documentos sobre la administración y contaduría del convento y colegio, así como las peticiones que realizaban al Obispo, pues a él tenían que pedir permiso para poder realizar numerosas actividades, como: llevar a cabo las misas, recibir a una nueva novicia y para concretar todas las ceremonias importantes que tomaban lugar en su capilla.

Existía una variedad en los temas que se tocaban dentro de las cartas que encontramos. Desde religiosas que pedían incapacidad por cuestiones de salud, de quienes querían retirarse del convento, así como de quienes querían unirse a él.

Las que contenían quejas eran las que más abundaban, sean respecto al confesor que les había sido asignado o sobre alguna otra hermana. Mostraban inquietudes respecto al padre que las confesaría, el tipo de interacción debían tener con las alumnas del colegio y las relaciones que existían entre las religiosas.

Inclusive se encontraron las actas de las visitas canónicas que se realizaban a diferentes congregaciones religiosas de julio de 1911 a enero de 1925. En dichas actas, el visitador dejó registro de cinco visitas al convento, una en 1911 y 1912, dos realizadas en 1913 (una registrada en agosto y la otra en octubre) y la última en 1925.

En esas visitas se dejó constancia de la vida dentro de la congregación, en cada una se realizaron “recomendaciones” para que las novicias pudieran mejorar su comportamiento dentro del claustro.

Los distintos contenidos consultados fueron revisados partiendo desde el análisis del discurso, definido por Zaldua Garoz (2006) como el “método que puede complementar el procesamiento de la información y del análisis de contenido tradicional para lograr

representar ciertos estadios del conocimiento y la experiencia de los productores de los textos, en forma de modelos funcionales de corte semántico”, y bajo esa óptica se decidió analizar las relaciones de poder que se pudieron identificar.

Entendamos poder desde lo definido por Michael Foucault (citado en Ávila-Fuenmayor, 2006) como aquello que un individuo puede ejercer por sobre otro, y relaciones de poder, o relación de dominación, como la óptica de estudio “en lo que tiene de fáctico, de efectivo y de ver cómo ella misma es la que determina los elementos sobre los cual recae” (p. 217).

En pocas palabras, el análisis de las relaciones de poder parte más allá de preguntar el cómo y por qué se gestan, sino en la observación de cómo se fabrican dichas relaciones de sometimiento (Ávila-Fuenmayor, 2006).

Contemplando los conceptos anteriores se identificaron cinco tipos de relaciones: *las del Obispo con las religiosas, con el confesor, con la madre Superiora, entre ellas mismas, y de las niñas del colegio con ellas.*

Para Marcela Lagarde (1990), uno de los cautiverios en los que viven las mujeres, es la vida religiosa, “las monjas sellan su pacto al convertirse en esposas de una deidad masculina patriarcal”.

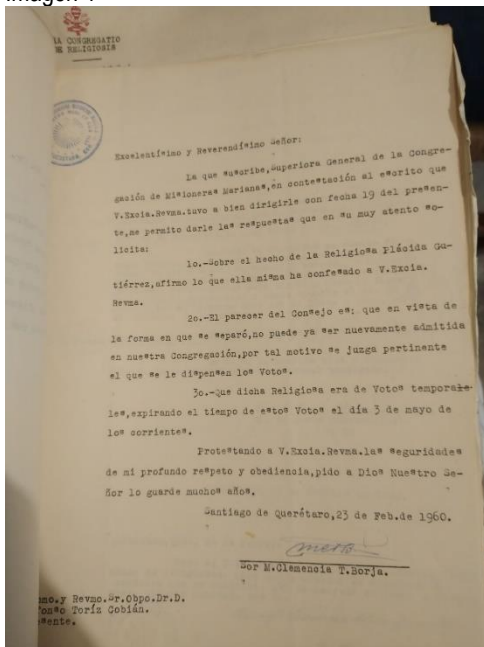
Es decir, las monjas quedan a subordinación de un Dios; sin embargo, esta figura, no realiza el mismo pacto con las mujeres y con los hombres. Los sacerdotes son los mensajeros, fungen como los intermediarios; lo que les otorga una jerarquía superior, autoridad y por lo tanto, poder sobre las monjas.

Es de esta forma que las religiosas, no solamente son sumisas y obedientes hacia una deidad, sino que, sus dotes, sus permisos, sus votos, su imagen, su estadía y el perdón de sus pecados depende de otros hombres, pues “la estructura eclesial expresa y reproduce la misma división y jerarquía de las relaciones genéricas en otras instituciones y en el conjunto de la sociedad patriarcal” (Lagarde, 1990).

En los documentos encontrados del Verbo Encarnado, se puede observar que la figura masculina que concede, niega los permisos y el que administra sus

recursos y bienes, el Obispo y si bien, jerárquicamente está en el puesto más alto, las religiosas tenían una forma especial para dirigirse a éste personaje: “Protestando a V. Excia. Revma. las seguridades de mi profundo respeto y obediencia, pido a Dios Nuestro Señor lo guarde muchos años.”

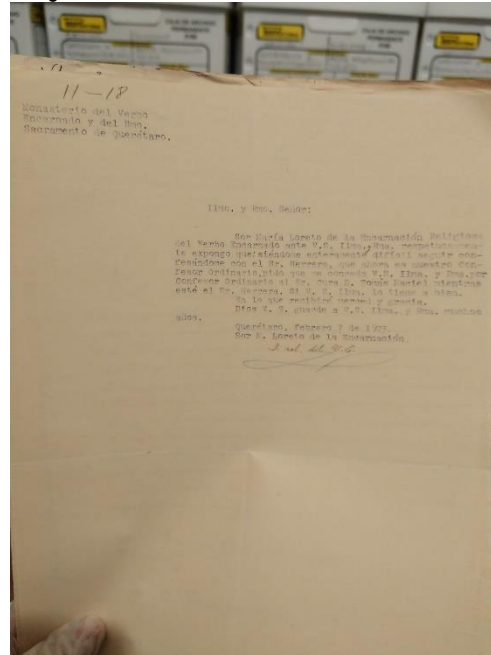
Imagen 1



Pie de foto: carta dirigida al Obispo.

De igual forma, llama la atención leer tantas solicitudes para cambiar de confesor, un puesto que podría parecer menor, pero que ejerce un poder superior a la de las mismas religiosas por su “capacidad” de perdonar o no los pecados de las religiosas.

Imagen 2



Nota: Carta donde religiosa expresa su deseo de seguir confesándose con el padre Tomás Maciel puesto que le resultaba difícil seguir confesándose con el padre Herrera, quien había sido designado confesor del monasterio.

De igual forma, había vigilancia entre ellas, parece que no solo la madre Superiora era quien se encargaba de mantenerlas disciplinadas, sino que, entre ellas mismas, se juzgaban y se acusaban.

Entre las acusaciones más encontradas, destacan las interacciones con las niñas del colegio. Pues, no podían convivir con ellas, su única relación debía ser alumna y maestra. No tenían permitido hablarles y mucho menos recibir obsequios, y quien no seguía estas reglas, era acusada ya que su falta era de gran motivo de escándalo.

Conclusiones

A modo de conclusión, todos los documentos encontrados son dignos de análisis y el estudio de las Religiosas del Verbo Encarnado tiene potencial para diversos temas. Esta investigación se limitó a centrarse en las relaciones de poder, utilizando la

perspectiva de género, pero existe una infinidad de categorías de análisis que pudieran ser aplicables en la investigación de esta comunidad.

Más que cerrar el tema, este trabajo pretende abrir una discusión respecto a las distintas realidades de las mujeres y cómo el poder, la desigualdad de género y el sistema patriarcal se refleja y se vive en cada una de ellas.

De igual manera, aunque todos los documentos encontrados sobre el Verbo Encarnado fueron valiosos, también fueron muy escasos. Por lo que, se espera que está sea una invitación a indagar más sobre la vida de estas religiosas y otras que todavía se encuentren en las sombras.

También se espera que incentive a elaborar más investigaciones interdisciplinarias. Las autoras no se imaginaron realizar un trabajo sobre religiosas y tener la oportunidad de combinar la Comunicación con la Historia.

Agradecimientos

En primer lugar, un enorme agradecimiento a la Dra. Oliva Solís Hernández, quien es una excelente persona, profesora e investigadora, por invitarnos a participar en este proyecto y por siempre inspirarnos a adentrarnos al mundo de la investigación.

A las Hermanas del Templo Teresitas que nos recibieron durante dos días en el archivo diocesano, por la paciencia y atención.

Agradecemos a los organizadores por permitirnos la estancia en el Verano de la Ciencia 2022 y a nuestra querida Facultad de Ciencias Políticas y Sociales, por darnos las herramientas teóricas para realizar este trabajo.

Y a nuestra familia por su apoyo incondicional y por escucharnos durante días hablar sobre este proyecto.

Referencias bibliográficas

Loyda Benítez, M. (2015). *Presencia histórica de la vida consagrada en la Diócesis de Querétaro*. Diócesis de Querétaro: México.

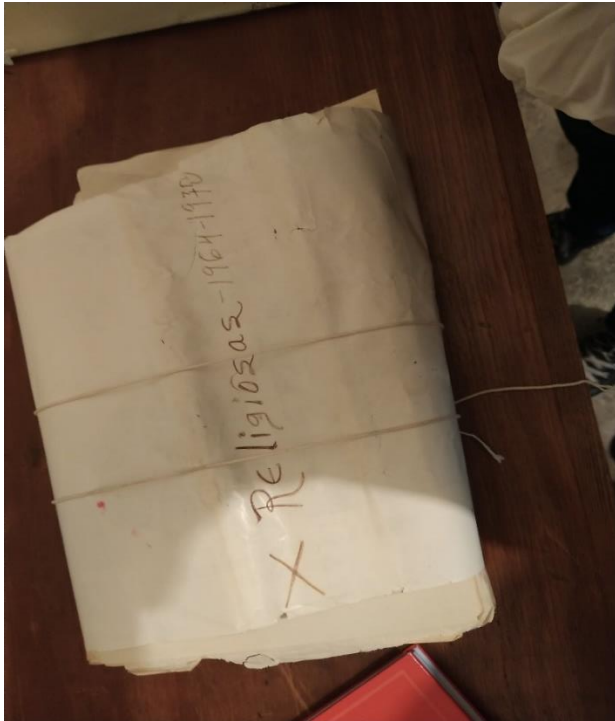
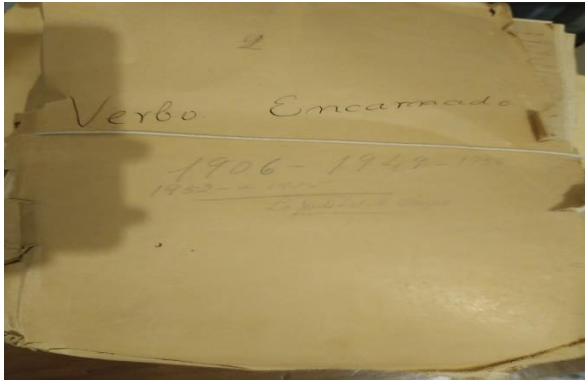
Ávila-Fuenmayor, F. (2006). *El concepto de poder en Michael Foucault*. Telos, vol. 8, núm. 2, mayo-agosto, 2006, pp. 215-234 Universidad Privada Dr. Rafael Beloso Chacín Maracaibo, Venezuela

Zaldua Garoz, Alexei. (2006). El análisis del discurso en la organización y representación de la información-conocimiento: elementos teóricos. *ACIMED*, 14(3) Recuperado en 08 de agosto de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-94352006000300003&lng=es&tlng=es.

Lagarde, M. (2005). *Los cautiverios de las mujeres: madresposas, monjas, putas, presas y locas*. Universidad Nacional Autónoma de México: México.

Galería fotográfica





¿Aliados o competidores? El empleo y la especialización económica de las capitales y ciudades secundarias.

Carlos Armando Salas Benítez (FCA, UAQ,
csalas18@alumnos.uaq.mx)

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

Resumen.

Este análisis contempla un análisis de la especialización de las regiones de México del año 2002 al 2022 a través del empleo. El informe toma como base 26 de las 32 entidades federativas donde se ve una mayor actividad económica. La actividad económica se puede calcular de diversas maneras la más conocida donde la producción es igual al valor agregado y la que nos permite tener datos actuales en México es el empleo, con los datos que ofrece el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), la producción se mide cada cinco años censales por lo que no se puede tener información actual. El índice de Krugman compara la especialización entre dos ciudades distintas, en el caso de nuestra investigación comparamos la especialización entre la primera zona metropolitana que en la mayoría de los casos será la capital de cada uno de los estados del país y una segunda zona metropolitana que será la ciudad secundaria más productiva con base en la generación de empleos. Esto nos permitirá realizar el cálculo correspondiente para obtener el índice de Krugman y podremos analizar la similitud o diferencia de la especialización entre ambas economías. Será

necesario el cálculo de regresiones lineales para poder medir la relación de esta medición con respecto a la generación de empleos. Finalmente conoceremos si la competencia o similitud entre las economías genera crecimiento económico y con ello plantear alternativas para impulsar la actividad económica.

Palabras clave.

Especialización, crecimiento, competencia, zona metropolitana, empleo.

Abstract.

This analysis contemplates an analysis of the specialization of the regions of Mexico from 2002 to 2022 through employment. The report is based on 26 of the 32 states where there is greater economic activity. Economic activity can be calculated in various ways, the best known where production is equal to value added and the one that allows us to have current data in Mexico is employment, with the data offered by the Mexican Institute of Social Security (IMSS), the Production is measured every five census years, so current information cannot be obtained. The Krugman index compares the specialization between two different cities, in the case of our research we compare the specialization between the first metropolitan area, which in most cases will be the capital of each of the states of the country, and a second metropolitan area that It will be the most productive secondary city based on job creation. This will allow us to carry out the corresponding calculation to obtain the Krugman index and we will be able to analyze the similarity or difference in specialization between both economies. The calculation of linear regressions is necessary to be able to measure the relation of this measurement with respect to the generation of jobs. Finally, we will know if the competition or similarity between the economies generates economic growth and with this we propose alternatives to boost economic activity.

Key Words.

Specialization, growth, competition, metropolitan area, employment.

Introducción.

La Organización de las Naciones Unidas (ONU) ha planteado al mundo la agenda 2030 que considera entre muchas cosas los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), dentro de los cuales se destaca el número ocho sobre el trabajo decente y crecimiento económico y una de sus metas es la diversificación de las economías para con ello reducir las desigualdades y la marginación.

Es así como nace la necesidad de poder medir entre muchas cosas la especialización económica de los estados de nuestro país para poder tener un panorama claro de la especialización, diversificación y demás situaciones a cerca del crecimiento económico, se estudia mediante la recolección de datos que permita medir la especialización de dos economías.

Históricamente la producción se concentra en las grandes ciudades de un país y se les reconoce como el motor de crecimiento económico y desarrollo, sin embargo, trae consigo diversos problemas como inseguridad y aglomeración en este tipo de ciudades.

Diversas situaciones, como la movilidad, la conectividad, el avance tecnológico, el comercio, entre otros, han dado pie a una redistribución de la geografía económica para tener ciudades más dinámicas que caminen de una economía agrícola a una economía industrial que genere crecimiento económico, reduzca la pobreza, sea estable en su demografía y amigable con el medio ambiente.

La especialización se produce cuando las personas, las empresas o incluso los países concentran sus esfuerzos en un determinado número de tareas o producción de una determinada variedad de bienes. (Nunes P. 2018)

El índice de Krugman se calcula como la sumatoria de las diferencias entre la participación de cada industria en las exportaciones entre dos países;

midiendo la desigualdad en las estructuras de producción en relación con el comercio de los dos países. Si el resultado es cercano a cero las estructuras productivas cada vez serán más iguales. Por otro lado, si el número se acerca a dos quiere decir que los productos que exportan son diferentes. Por consiguiente, no existe mucha superposición o competencia entre las estructuras comerciales de los países (Castellanos I. 2018)

Este índice nos permitirá realizar la comparación entre las dos zonas económicas más importantes de cada estado. De ello deriva su importancia en esta investigación pues nos dará la variación entre la primera y segunda zona.

Rondinelli considera que las funciones de las ciudades secundarias presentan un perfil mezclado de características urbanas y rurales. Su población económicamente activa muestra porcentajes altos en el sector primario o con ocupaciones dependientes de su hinterland rural y, aunque el nivel socioeconómico y las condiciones de vida de la población son mejores que en localidades más pequeñas, no son comparables con las de la población de las grandes metrópolis. La economía de las ciudades secundarias tiende a estar dominada por actividades comerciales y de servicios, el empleo en el sector manufacturero se concentra en la industria a pequeña escala.

Un análisis de regresión lineal nos permitirá conocer la influencia de la especialización económica sobre el empleo de un estado.

Se busca que este trabajo pueda al final del análisis ofrecer un amplio panorama sobre la especialización económica de las principales ciudades por estados, para poder proponer diversas líneas de acción que lleven a impulsar el crecimiento económico fuera de las capitales.

Objetivo.

Medir la especialización económica y la creación de empleo de las ciudades primarias y secundarias para describir la dinámica de las economías subnacionales de México.

Metodología

El análisis contempla 26 de las 32 entidades federativas las cuales tienen por lo menos dos ciudades económicas, se excluyen 6 estados al no cumplir con esta condición.

En este caso, en el estado de Guerrero se consideró como zona principal el Municipio de Acapulco, para el caso de Quintana Roo el municipio de Benito Juárez y para Guanajuato el municipio de León esto ya que presentan niveles de crecimiento y generación de empleos superiores a los de la capital de dichos estados.

Para la realización de nuestro trabajo de investigación se recurrió a calcular el índice de Krugman el cual compara la especialización económica de dos ciudades, toma el valor de cero si las dos estructuras económicas son idénticas. El índice toma como valor máximo la unidad. A mayor valor del índice, la zona

$$K_j \equiv 1/2 \sum_{j=1}^n |s_j^a - s_j^b|$$

metropolitana secundaria mayor será la diferencia con la región metropolitana principal. Y se obtiene mediante la siguiente ecuación.

donde a y b son, respectivamente, las zonas metropolitanas secundaria y principal de un estado, j es un índice de cada sector económico, s_j indica la proporción del empleo.

La información sobre las zonas metropolitanas se obtiene de la página oficial del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), de la cual se bajan los datos correspondientes a la generación de empleos formales registrados ante el Instituto por cada subdelegación estatal, en caso de existir dos o más se toma la de mayor productividad después de la capital.

La información disponible en el IMSS nos permite tener información certera y actual dado que se actualiza de manera constante y permite a nuestro

análisis profundizar al momento de realizar estimaciones.

Mediante un análisis de regresión lineal con el método Mínimos Cuadrados Ordinarios medir la relación del índice de Krugman con la generación de empleos para de este modo poder determinar el efecto de la especialización en la productividad estatal. Se utilizarán las siguientes ecuaciones.

$$1. \text{Log}(\text{empleo ZM1}) = a + b * \text{años} + e$$

$$2. \text{Log}(\text{empleo ZM2}) = d + g * \text{años} + u$$

$$3. \text{Log}(\text{empleo estatal}) = f + h * \text{años} + m * \text{Krugman} + z$$

donde e , u y z son términos de errores aleatorios.

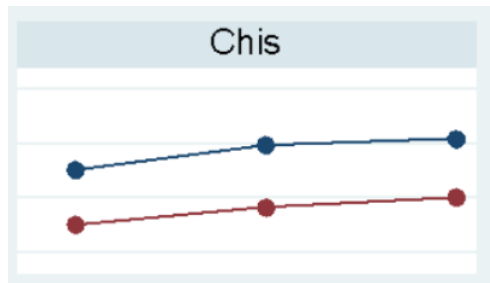
Usando los coeficientes "b" y "g" se estimaron las tasas de crecimientos 2002 – 2022.

En la ecuación 3 a través del coeficiente "m" se contrasta si la especialización (o diferenciación) tiene un impacto sobre el empleo, es decir, sobre la actividad económica estatal.

Resultados.

Una vez procesada la información se pueden obtener gráficos donde es posible analizar la tendencia de la actividad económica y del empleo, en su mayoría paralelas, lo que nos puede indicar que es similar la tasa de crecimiento en las zonas metropolitanas. Dado que la zona metropolitana principal es de mayor tamaño económico y poblacional, entonces gráficamente se encuentra por encima de la segunda zona metropolitana, para ilustrar y a modo de ejemplo el estado de Chiapas.

Gráfico 1. Ejemplo: Crecimiento de las zonas metropolitanas.



Nota. La línea superior (azul) representa el empleo en la zona metropolitana primaria (Tuxtla Gutiérrez), la línea inferior (roja) es la zona metropolitana secundaria (Tapachula). Fuente: Elaboración propia con datos IMSS.

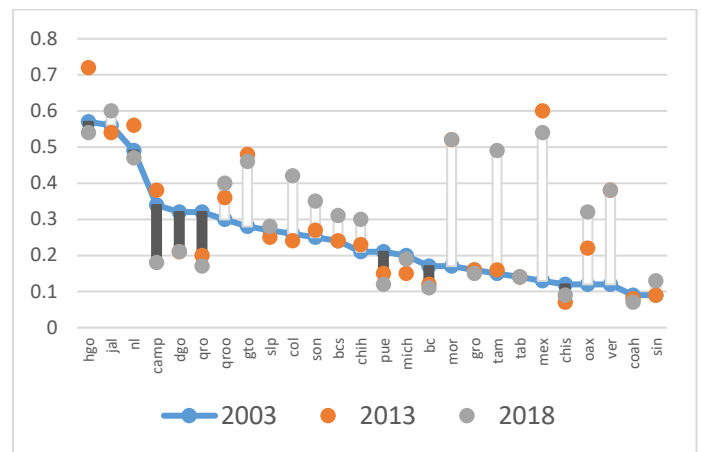
Para los casos de Guerrero y Quintana Roo la zona metropolitana secundaria está por encima de la principal tal es el caso de Acapulco sobre Chilpancingo y Benito Juárez con respecto a Cozumel

Se analizan los casos de todos los estados que cuentan con dos ciudades importantes en términos económicos según como se enlistan en la siguiente tabla. (Anexo 1)

La tabla permite observar los estados que cuentan con una zona económica primaria y al menos una secundaria, se excluye del análisis al estado de Aguascalientes, Nayarit, Tlaxcala, Yucatán, Zacatecas y la Ciudad de México dado que forma parte de la zona metropolitana del Valle de México resulta difícil su análisis solamente con dos ciudades.

Una vez que se calcula el índice de Krugman entre ambas economías estatales se llega a los siguientes resultados. (Anexo 2), y se pueden apreciar en el siguiente gráfico.

Gráfico 2. Evolución del índice de Krugman (especialización)



Nota: Entre más cercano a cero el índice de Krugman implica que las dos zonas metropolitanas de un estado comparten la misma estructura o especialización productiva; los valores altos indican importantes diferencias metropolitanas en la especialización económica

Fuente: Elaboración Propia con datos INEGI (2018)

Todos los datos de la tabla son el resultado de la aplicación de la fórmula del índice de Krugman, se realizaron tomando en cuenta cada uno de los sectores productivos de la economía y la cantidad de empleos que genera, como lo son el sector minero, de la construcción, corporativo, manufacturero, comercio, de transporte, entre otros.

En la primera columna se enlistan los estados de la República Mexicana que cuentan con al menos dos zonas altamente productivas, en la segunda el índice de Krugman para el año 2003, en la tercera para el 2013 y finalmente para el año 2018

En los resultados se pueden destacar estados donde las economías son muy diferentes entre sí, como Tamaulipas, Morelos, Hidalgo, y economías muy similares como Querétaro, Chiapas y Baja California.

El hecho de ser economías similares pudiera significar que, ambas economías se encuentran en competencia, por un mismo mercado, para el caso de las ciudades que son muy diferentes comercian entre sí dadas sus

distintas especializaciones productivas, por lo tanto, habría mayor crecimiento económico.

Una vez realizado el procedimiento anterior se procedió a calcular el crecimiento promedio Nacional durante dos periodos, quedando de la siguiente manera los resultados.

Tabla 3. Empleo por zona metropolitana (tasa porcentual de crecimiento promedio)

Periodo	ZM1	ZM2
2002-2012	3.0%	2.4%
2012-2022	2.8%	2.8%

Fuente: Elaboración Propia con Datos INEGI (2018)

Hasta el año 2012 en la zona metropolitana principal el crecimiento en promedio crecía de manera más acelerada que la zona secundaria, sin embargo, después de este periodo comienzan a crecer a la misma tasa, pero en niveles menores, es decir el crecimiento se desaceleró en la zona uno del estado y se aceleró en las zonas secundarias.

Con las variables analizadas se realizó una tabla de estadística descriptiva que explica diversas medidas de tendencia central (media, mediana y desviación estándar) a fin de conocer el entorno en el que se mueven los datos.

Tabla 4. Estadística descriptiva.

	Var	Media	Mediana	Desv. Est.
2003	Empleo	13.083	12.7352	12.7714
	Krugman	0.30	0.20	0.132
2013	Empleo	13.3754	13.0630	13.0280
	Krugman	0.28	0.23	0.181
2018	Empleo	13.6134	13.3966	13.2715
	Krugman	0.30	0.30	0.163

Nota. El empleo se expresa en logaritmo natural. **Fuente:** Elaboración propia con datos de IMSS.

Discusión y conclusiones.

El crecimiento del empleo en la mayoría de las regiones fue constante, oscilando en promedio entre un 3% y 4% anual en las regiones del país, en la mayor parte es posible ver que la capital crece más que la segunda zona metropolitana, sin embargo, esta tendencia se ha revertido con el paso del tiempo en algunos estados como Guerrero, Quintana Roo y Guanajuato donde la ciudad secundaria crece más que la capital y eso se debe principalmente a la especialización que han generado.

El crecimiento económico y el empleo son dos variables estrechamente ligadas y se requiere expandir de las grandes zonas metropolitanas a las partes más alejadas de los estados, para el caso Querétaro, el PIB se genera al menos en un 20% fuera de las zonas metropolitanas.

Agradecimientos.

Agradecemos a la Universidad Autónoma de Querétaro por la oportunidad de participar en el XXIV Verano de la Ciencia 2022. Así mismo, agradecemos, a nuestro investigador anfitrión por el apoyo recibido durante el desarrollo de esta investigación.

Bibliografía.

Borello J. et. 2012 Evolución de la actividad económica argentina desde una perspectiva territorial, 2004-2012 recuperado de https://www.cepal.org/sites/default/files/publication/files/40931/S1601093_es.pdf ISBN: 1680-8797

Garrocho Rangel, C. (2016). *EST Y la importancia de las ciudades, Economía Sociedad Y Territorio*. Economía Sociedad y Territorio. <https://est.cmq.edu.mx/index.php/est/article/view/1019/1257>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía Informática -INEGI- (2003) Censos económicos <https://www.inegi.org.mx/app/saic/>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía Informática -INEGI- (2013) Censos económicos <https://www.inegi.org.mx/app/saic/>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía Informática -INEGI- (2018) Censos económicos <https://www.inegi.org.mx/app/saic/>

Nunes P (2018) especialización (Económica) recuperado de: <https://knoow.net/es/cieeconcom/economia-es/especializacion-economica/> Fecha de consulta: 29/06/2022

Galería fotográfica.



Anexos.

Anexo 1.

Tabla 1. Estados con dos zonas metropolitanas.

<i>ESTADO</i>	<i>1ª ZM</i>	<i>2ª ZM</i>
Baja California	Mexicali	Ensenada
Baja California Sur	La Paz	Los Cabos
Campeche	Campeche	Cd del Carmen
Chiapas	Tuxtla Gutiérrez	Tapachula
Chihuahua	Chihuahua	Juárez
Coahuila	Saltillo	Torreón
Colima	Colima	Manzanillo
Durango	Victoria	Gómez palacio
Guanajuato	Guanajuato	Celaya
Guerrero	Chilpancingo	Acapulco
Hidalgo	Pachuca	Cd. Sagún
Jalisco	Guadalajara	Ocotlán
México	Toluca	Ecatepec
Michoacán	Morelia	Zitácuaro
Morelos	Cuernavaca	Cuatla
Nuevo León	Monterrey	Apodaca
Oaxaca	Oaxaca	Salina Cruz
Puebla	Puebla	Tehuacán
Querétaro	Querétaro	San Juan del Rio
Quintana Roo	Chetumal	Cancún
San Luis Potosí	San Luis Potosí	Cd. Valles
Sinaloa	Culiacán	Los Mochis
Sonora	Hermosillo	Agua Prieta
Tabasco	Villahermosa	Cárdenas
Tamaulipas	Tampico	Cd. Victoria
Veracruz	Xalapa	Poza rica

Fuente: Elaboración propia con datos de IMSS (2022)

Anexo 2

Tabla 2. Índice de Similitud de Krugman por Estado.

<i>ESTADO</i>	2003	2013	2018
Baja California	0.17	0.12	0.11
Baja California Sur	0.24	0.24	0.31
Campeche	0.34	0.38	0.18
Chiapas	0.12	0.07	0.09
Chihuahua	0.21	0.23	0.30
Coahuila	0.09	0.08	0.07
Colima	0.26	0.24	0.42
Durango	0.32	0.21	0.21
Guanajuato	0.28	0.48	0.46
Guerrero	0.16	0.16	0.15
Hidalgo	0.57	0.72	0.54
Jalisco	0.56	0.54	0.60
México	0.13	0.60	0.54
Michoacán	0.20	0.15	0.19
Morelos	0.17	0.52	0.52
Nuevo León	0.49	0.56	0.47
Oaxaca	0.12	0.22	0.32
Puebla	0.21	0.15	0.12
Querétaro	0.32	0.20	0.17
Quintana Roo	0.30	0.36	0.40
San Luis Potosí	0.27	0.25	0.28
Sinaloa	0.09	0.09	0.13
Sonora	0.25	0.27	0.35
Tabasco	0.14	0.14	0.14
Tamaulipas	0.15	0.16	0.49
Veracruz	0.12	0.38	0.38

Fuente. Elaboración propia con datos de INEGI (2003, 2013,2018)

Remoción de Cr (VI) en agua por adsorción de sílices mesoporosas funcionalizadas

Díaz Dueñas Claudia Alejandra
Estudiante Ingeniería en Nanotecnología
Universidad Autónoma de Querétaro
cdiaz23@alumnos.uaq.mx

Resumen

La contaminación del agua por metales pesados representa una amenaza para la salud de los seres vivos y afecta negativamente al ambiente. El proceso de adsorción es una alternativa viable y eficiente para la remoción de metales pesados, como Cr (VI), en agua. Consiste en la síntesis de sílices mesoporosas funcionalizadas con grupo amino. La eficiencia del proceso radica en las condiciones de pH, concentración y tiempo de contacto de la sílice mesoporosa funcionalizada con el agua contaminada.

Abstract

Water pollution by heavy metals represents a threat to the health of living beings and causes negatively effects to the environment. Adsorption is a viable and efficient alternative for removing heavy metals, such as Cr (VI), in water. It consists of the synthesis of mesoporous silicas functionalized with amino groups. The efficiency of the process lies in the conditions of pH, concentration and contact time of the functionalized mesoporous silica with the contaminated water.

Palabras clave

Contaminación de agua, sílice mesoporosa, Cr (VI), adsorción.

Key words

Water pollution, mesoporous silica, Cr (VI), adsorption

Introducción

El manejo inadecuado de residuos a lo largo de los años ha tenido como consecuencia, que actualmente nos encontremos ante un grave problema de contaminación ambiental.

Se considera como contaminante a todo aquel agente o elemento que no pertenece al medio de forma natural y que provoca un desequilibrio, afecta el uso del recurso y ocasiona efectos negativos en la salud de los seres humanos y en la biota.

El agua es un recurso natural de vital importancia para todos los seres vivos, por lo que su uso debe regularse y garantizar un tratamiento adecuado según su utilización. La contaminación del agua es causada mayoritariamente por aguas residuales provenientes del sector industrial y agrícola. Los componentes orgánicos, inorgánicos, biológicos y macroscópicos son los principales contaminantes encontrados en los cuerpos de agua. Algunos de estos son la acumulación de iones de metales pesados que se introducen en la cadena alimenticia y representan una amenaza para la salud.

Uno de los metales pesados que se encuentra con mayor frecuencia en los efluentes acuíferos es el cromo. El cromo es un elemento que se encuentra naturalmente en rocas, suelos, plantas, etc. Industrialmente, el cromo VI es utilizado en pigmentos textiles, curtido, aleaciones, agentes anticorrosivos, fungicidas, recubrimientos galvanizados y diversas aplicaciones.

El avance tecnológico, ha permitido el desarrollo e implementación de técnicas de remoción de Cr (VI) en agua, sin embargo, se cuestiona su eficiencia, los efectos secundarios que generan y los altos costos de producción y operación.

Los procesos de adsorción se muestran como una opción viable y eficaz en la remoción de metales pesados del agua. La adsorción es un método fisicoquímico que consiste en retener una sustancia en una superficie de un material sólido. El carbón activado es uno de los materiales más utilizados para estos procedimientos.

Diversos estudios anuncian la eficiencia de los materiales mesoporosos de sílice funcionalizados con grupos amino para la remoción de Cr (VI) de agua. Específicamente la EMS-15 que se caracteriza por el tamaño definido de sus poros que garantiza un área superficial grande permitiendo el acceso de moléculas grandes. Además, son química y térmicamente estables.

El presente trabajo muestra avances del proyecto “Materiales nanoestructurados para aplicaciones como adsorbentes, catalizadores ambientales y generación de energía renovable” donde se sintetizó una esponja de sílice mesoporosa EMS-15, se funcionalizó con grupos amino y se realizaron pruebas para comprobar su poder adsorbente en soluciones de Cr (VI) a diferentes concentraciones y valores de pH.

Objetivos

Estudiar y analizar los efectos del pH y concentración de iones Cr (VI) en la capacidad de adsorción de esponjas de sílice mesoporosas EMS-15 funcionalizadas con grupos amino.

Metodología

Llevar a cabo la síntesis y funcionalización con grupos amino de la esponja de sílice mesoporosa EMS-15. Posteriormente, preparar una solución con

una concentración de 1000 ppm de Cr (VI). Para la solución, pesar 0.2828 g de $K_2Cr_2O_7$, agregar en un matraz aforado de 100 ml con agua desionizada a temperatura ambiente.

A continuación, preparar una solución a 100 ppm de Cr (VI) y otra a 10 ppm. Con cada una de las soluciones llevar a cabo pruebas por duplicado de adsorción del ion Cr (VI) con la esponja de sílice mesoporosa EMS-15 modificando, además de la concentración, el pH de las soluciones.

En este proyecto, se trabajó con pH 0, 5, 7 y 9. El pH promedio de las soluciones se aproximaba a un valor de 5. Para disminuir el valor del pH de las soluciones se adicionaron algunas gotas de HNO_3 0.1 M, lentamente hasta observar el cambio en el medidor de pH. Por el contrario, para aumentar el pH, se adicionaron algunas gotas de $NaOH$ 0.1 M hasta alcanzar el valor deseado.

Cuando las soluciones de Cr (VI) alcanzaron los valores necesarios de pH se comenzó con la adición de la esponja de sílice mesoporosa, lentamente y en agitación. La agitación se prolongó durante una hora, finalmente se filtró por gravedad y se dejó secar a temperatura ambiente para recolectar y almacenar las muestras obtenidas con el propósito de realizar análisis UV-VIS y de cuantificación para comprobar los efectos del pH y la concentración en la adsorción del ion Cr (VI) en sílice mesoporosa funcionalizada.

Resultados

La Figura 1 presenta la imagen obtenida por HRSEM del adsorbente EMS-15N. Se observan partículas de tamaño grande, superior a $1 \mu m$ y con alta porosidad.

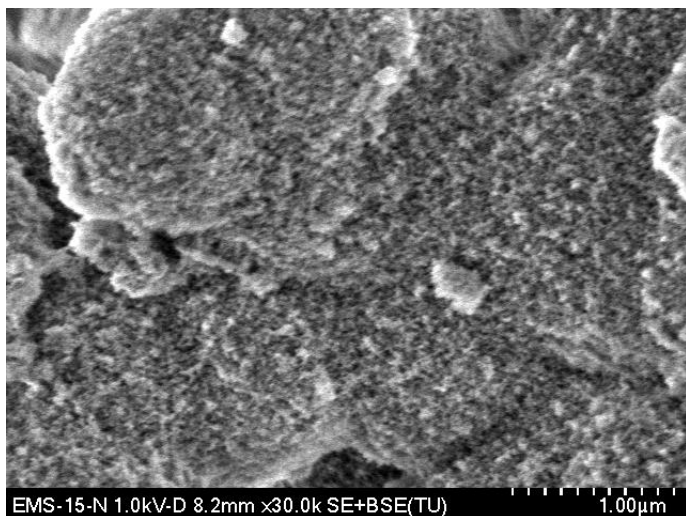


Figura 1. Micrografía SEM de esponja de sílice mesoporosa EMS-15-N sin funcionalizó

Una imagen del adsorbente 3NH-EMS-15N se exhibe en la Figura 2. Se puede observar que la funcionalización de la EMS-15N no modifica su estructura porosa.

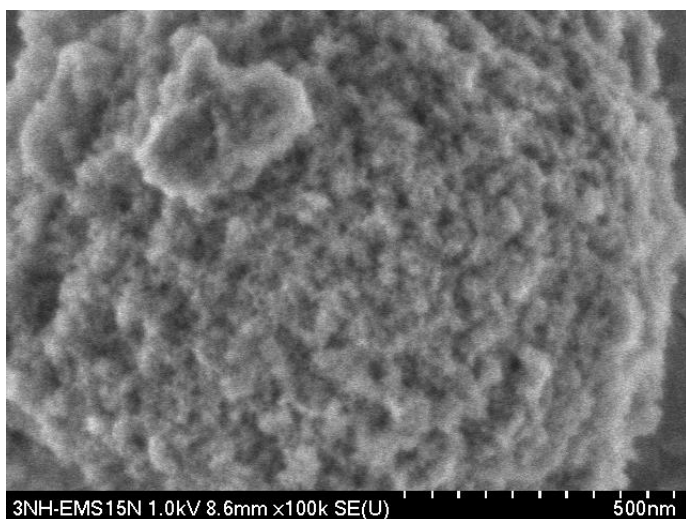


Figura 2. Micrografía SEM de esponja de sílice mesoporosa funcionalizada 3NH-EMS-15

Los espectros de UV-vis de las soluciones acuosas conteniendo los iones de Cr (VI), se presentan en las Figuras 3-6.

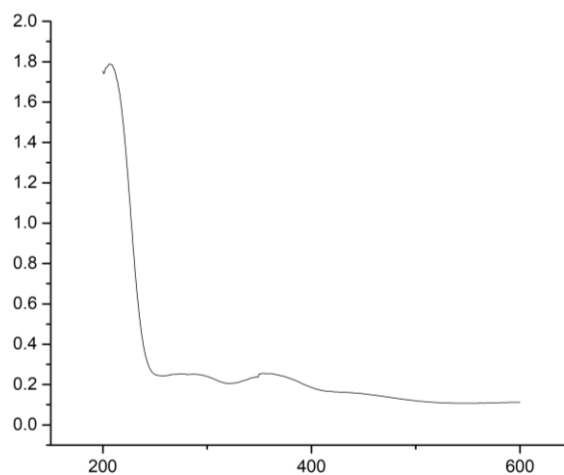


Figura 3. Espectro UV-VIS de reflectancia difusa pH 2 y 10 ppm

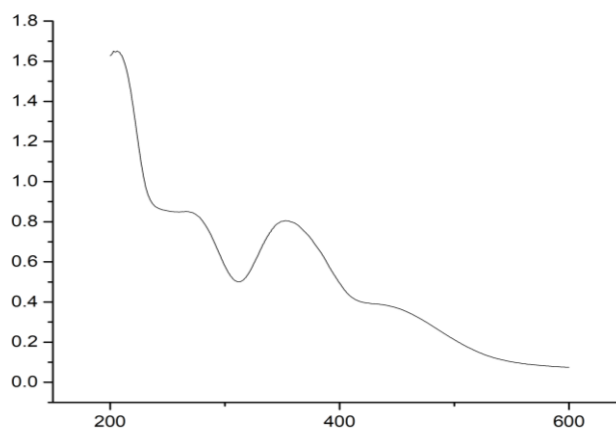


Figura 4. Espectro UV-VIS de reflectancia difusa pH 2 y 100 ppm

5

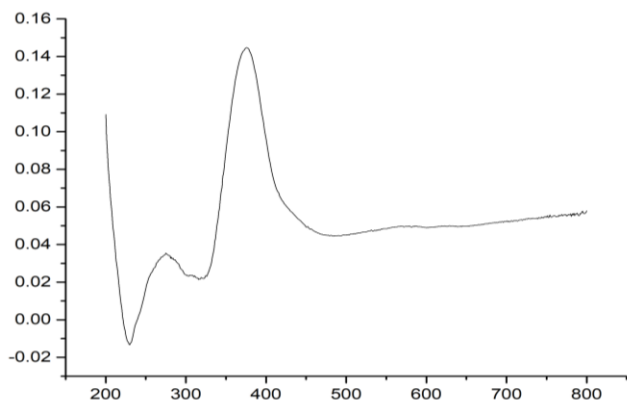


Figura 5. Espectro UV-VIS de reflectancia difusa pH 7 y 10 ppm

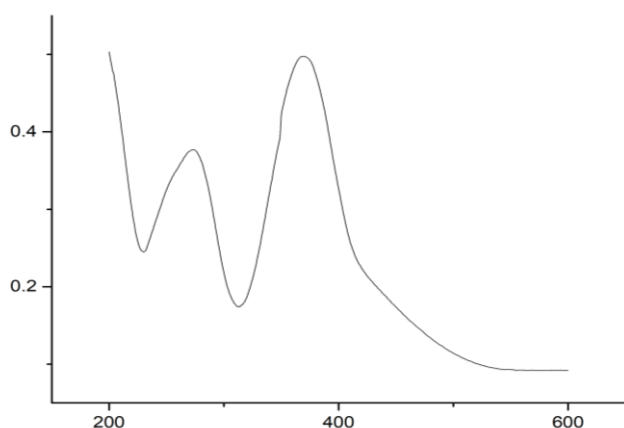


Figura 6. Espectro UV-VIS de reflectancia difusa pH 7 y 100 ppm

Discusión y conclusiones

La micrografía SEM muestra las sílices mesoporosas pura y funcionalizada, manifiestan una gran cantidad de mesoporos característicos de la esponja, que facilitará la adsorción del ion Cr (VI) en agua.

Por su parte, el análisis del espectro UV-Vis aportará información relevante sobre la capacidad de adsorción de la sílice mesoporosa funcionalizada del Cr (VI) a diferentes concentraciones y valores de pH al finalizar el proyecto. Para este trabajo solo se

realizaron las pruebas para las muestras de soluciones de 10 y 100 ppm con pH de 2 y 7.

Al finalizar el proyecto se espera demostrar la ventaja de funcionalizar la sílice mesoporosa con grupos amino para la adsorción y remoción de metales pesados en agua. Asimismo, se determinará en qué condiciones de pH y concentración el proceso de adsorción se realiza con mayor eficiencia.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Rufino Nava Mendoza por permitirme colaborar en el proyecto “Materiales nanoestructurados para aplicaciones como adsorbentes, catalizadores ambientales y generación de energía renovable” y enriquecer mi formación profesional.

A Ileri Segura Gutiérrez, estudiante de doctorado en Ingeniería, por su apoyo y asesoramiento durante las sesiones prácticas.

Referencias bibliográficas

Bolisetty, S., Peydayesh, M., & Mezzenga, R. (2019). Sustainable technologies for water purification from heavy metals: review and analysis. *Chemical Society Reviews*, 48(2), 463–487. <https://doi.org/10.1039/c8cs00493e>

Jang, E.-H., Park, S. P., Kim, I., & Chung, S. (2020). A systematic study of hexavalent chromium adsorption and removal from aqueous environments using chemically functionalized amorphous and mesoporous silica nanoparticles. *Scientific Reports*, 10(1), 5558. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61505-1>

Martin, P., Bengoab, F., Soldatic, A., Marchetti, S., & Fellenz, N. (2014). Aspectos estructurales de una sílice mesoporosa amino-funcionalizada y parámetros relacionados a su eficiencia en la adsorción de Cr(VI) acuoso.

Galería fotográfica



Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y magnetita.

Autor: Dante Eleazar Torres Pérez
E-mail: dantetorresperez@hotmail.com
Asesor: Diana Issell Sandoval Cárdenas
Universidad Autónoma de Querétaro

Resumen

La síntesis biológica de nanopartículas ha sido una de las ramas principales de investigación en el campo de la remediación ambiental al identificar y conocer las diferentes propiedades de control biológico en microorganismos. Dos nanopartículas de interés son las nanopartículas de plata y magnetita, por sus propiedades antimicrobianas y magnéticas respectivamente. Encontrar métodos que permitan obtener concentraciones mayores con un menor costo e impacto ambiental es uno de los principales objetivos de su síntesis; además su caracterización y rendimiento específico en cultivos celulares para su próxima aplicación es uno de los puntos clave en la metodología propuesta.

Palabras clave: nanopartículas de plata, nanopartículas de magnetita, albahaca, síntesis biológica.

Summary

The biological synthesis of nanoparticles has been one of the most relevant research branches on environmental remediation, reflecting the fact of microbiological control properties. To the experimental research, the silver and magnetite (or AgNP and MNP) nanoparticles are important because they have anti microbiological and magnetism effects. The experimental methodology is applied on the efficient synthesis and production of different nanoparticles with a low cost and

environmental null result, including maximize quantities and microbiological control in cell cultures for its useful and future application on advance technology.

Key words: silver nanoparticles, magnetite nanoparticles, basil, biologic synthesis

Introducción

La nanotecnología involucra el diseño, caracterización y aplicación de estructuras, sistemas y dispositivos controlando la forma y tamaño a escalas nanométricas (1 a 100 nm), como es el caso de las nanopartículas, las cuales, son sustancias particuladas con tamaños menores a 100 nm y cuyas propiedades dependen del tamaño, morfología y del material del que estén hechas (Galatage y col., 2021; Ganguly y col., 2019; Yin y col., 2020).

Las nanopartículas de plata (AgNP) han mostrado actividad antimicrobiana, antifúngica y antiviral contra un gran rango de patógenos, siendo capaces de penetrar las membranas celulares bacterianas, cambiando la estructura de las mismas e incluso provocando la muerte celular a través del aumento de la permeabilidad en las membranas y la producción de especies reactivas de oxígeno (Yin y col., 2020). Incluso, las AgNP muestran una mayor efectividad antimicrobiana en comparación con antibióticos clásicos como la penicilina, debido a la resistencia generada por los microorganismos contra los antibióticos (Mikhailova, 2020).

Las AgNP se pueden sintetizar por vías físico-químicas y biológicas. Los métodos químicos son los más utilizados debido a su alta reproducibilidad y relativa facilidad metodológica, sin embargo, se suelen requerir solventes tóxicos para la reducción de plata (Galatage y col., 2021). En la síntesis biológica se utilizan microorganismos o extractos de plantas que se exponen a solventes orgánicos para la extracción, estabilización y/o reducción de Ag(I) a plata elemental (Mikhailov y Mikhailova, 2019).

Dentro del mecanismo de reducción de Ag^+ a Ag en la síntesis de nanopartículas, siempre resulta una porción de plata ionizada dentro de la mezcla de plata elemental que varía de acuerdo con las condiciones de síntesis (Mikhailov y Mikhailova, 2019).

Aunque el mecanismo de acción exacto que tienen las AgNP sobre los patógenos aún no se conoce, se sabe que la adhesión y la penetración de las nanopartículas sobre la membrana celular se da en función del tamaño de las nanopartículas. A mayor tamaño, se tiene mayor adhesión a la membrana, mientras que, a menor tamaño, mayor es la permeabilidad de las nanopartículas hacia el interior de la célula (Mikhailova, 2020; Siddiqi y col., 2018).

El mecanismo más aceptado explica que dentro de las bacterias, las AgNP pueden liberar iones de plata que se anclan fuertemente a los enlaces tiol ($-\text{SH}$) de diversas proteínas y las desactivan (Anees Ahmad y col., 2020).

La magnetita es un mineral compuesto principalmente por óxido de hierro (Fe_3O_4) y es la especie magnética más fuerte entre los óxidos metálicos transitorios. Debido a sus propiedades físicas, químicas y estructurales, se ha utilizado por mucho tiempo en la fabricación de materiales de hierro, en brújulas de navegación, como catalizador para la producción de amoníaco, como pigmento para pinturas y recientemente se ha estudiado su funcionamiento en conjunto con nanopartículas de plata (Najafpoor y col., 2020; Ponomar, 2018; Wallyn y col., 2019).

Como se muestra en la figura 1, la magnetita cristaliza en cubos en forma de espinela inversa (izquierda), en donde el Fe^{3+} interactúa con el oxígeno. También puede cristalizar en la forma post-espinela ortorrómbica (derecha), en donde partes iguales de Fe^{2+} y Fe^{3+} interactúan con el oxígeno (Kozlenko y col., 2019).

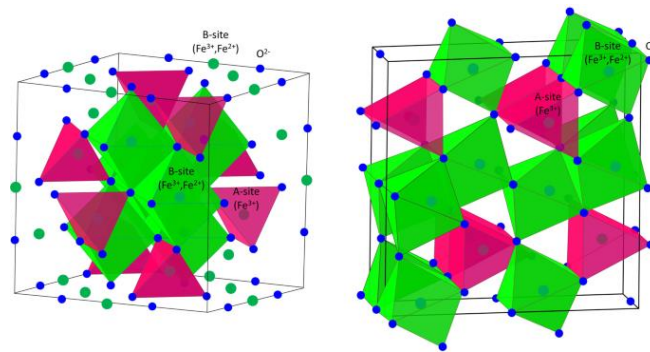


Fig. 1. Cristalización de la magnetita. Izquierda, espinela inversa. Derecha, post-espinela ortorrómbica.

La magnetita natural no puede ser aprovechada debido a que es muy variante en cuanto a tamaño y pureza. En orden de controlar las propiedades de la magnetita se han desarrollado diversos métodos de síntesis química que incluyen coprecipitación, descomposición térmica, síntesis hidrotérmica, entre otras. Cada metodología proporciona diferentes propiedades a las nanopartículas de magnetita (MNP) y le confiere aplicaciones diferentes (Ponomar, 2018).

En los últimos años se han estudiado diferentes aplicaciones que pueden tener las MNP, en el área médica se han estudiado en el direccionamiento de fármacos, hipertermias tumorales, imágenes de resonancia magnética y actividad antimicrobiana. Se han reportado diferentes nanoestructuras de MNP como agentes antibacterianos de un amplio espectro de especies de bacterias, incluidas bacterias multirresistentes y biopelículas bacterianas con una mínima capacidad inhibitoria (Lazić y col., 2019; Xu y col., 2019).

Debido a que son biodegradables, biocompatibles y de funcionalización sencilla, se pueden usar en tratamientos de aguas residuales para la recuperación de nanocompositos asociados a otros metales y la descontaminación por su actividad antimicrobiana (Lazić y col., 2019; Park y col., 2019).

Las propiedades antimicrobianas y magnéticas de la magnetita lo hacen un soporte ideal para las nanopartículas de plata y su aplicación en métodos de desinfección. Ya que, se puede aprovechar el magnetismo acoplado a las AgNP para permitir su recuperación por imantación.

Objetivos

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata (AgNP's) y magnetita (MNP) con una metodología establecida.
2. Aprender técnicas instrumentales para la caracterización de las nanopartículas, así como los fundamentos que estas sustentan.
3. Analizar y comprender los resultados obtenidos tras la experimentación
4. Modificar y relacionar aquellos errores e impedimentos tras la discusión de los resultados.

Metodología

Para la síntesis de AgNP se debe preparar una solución de Nitrato de plata 63mM. Las infusiones se realizarán con 1 g de hoja de albahaca fresca lavada con agua y jabón, posteriormente se hervirá durante 2 min en 10 mL de agua destilada, la reacción se detendrá en baño de hielo, con agitación y cubrir de la luz. La infusión se filtrará con papel de poro fino al vacío y se ajustará el pH a 12, luego 62 mL se colocarán en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se esterilizará en autoclave (15 min, 121 °C). A cada matraz se agregará 1 mL de una solución 63 mM estéril de nitrato de plata para obtener una concentración final de 1 mM y se incubará por 24 horas a 160 rpm protegido de la luz. La concentración y el tamaño aproximado de las AgNP se determinará mediante el análisis del espectro UV-VIS, en donde las AgNP de 10 nm de diámetro muestran una banda característica alrededor de los 388 nm. La curva de calibración se elaborará con AgNP comerciales (Sigma-Aldrich) de 10 nm de diámetro y estabilizadas en ácido cítrico.

La síntesis de nanopartículas de magnetita se realizará acorde a lo reportado por Díaz en 2018, mezclando 3.6×10^{-3} mol de hierro de en una proporción molar 2:1 (Fe^{3+} : Fe^{2+}) de cloruro férrico (FeCl_3) y cloruro ferroso (FeCl_2) añadidos con 5 ml de quitosano al 5 % en una solución al 3 % (v/v) de ácido acético a 100 rpm y 70°C hasta su disolución. La solución de hierro-quitosano se dispersará por ultrasonificación al 70 % de amplitud durante 10 min siguiendo el protocolo de Díaz y col. 2018. La solución hierro-quitosano se precipitará agregando una solución al 20 % (w/v) NaOH: 96 % (v/v) etanol en una relación de volumen 4:1, hasta llegar a pH 12. La mezcla se homogeneizará utilizando un vórtex por 30 s y posteriormente se incubará a 60 rpm a temperatura ambiente (25°C) durante 18 h. El precipitado se recuperará mediante centrifugación a 1,600 x g por 15 min. La mezcla se lavará con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 y 96 % (v/v) de etanol en proporción de 1:1 hasta la neutralización. Los sólidos neutralizados se secarán desecador durante 3 días; una vez seco, se molerá con mortero el material hasta obtener un polvo fino. El nivel de magnetización del material se determinó por triplicado colocando el nanocompuesto dentro de un tubo Eppendorf, se acercó a la base del tubo un imán férrico de 0.39 T y se invirtió el tubo. La cantidad de nanocompuesto retenido por el imán después de voltear el tubo se pesará y se reportará como % de masa atraída:

$$\% \text{ de masa atraída} = \frac{\text{masa retenida} (100)}{\text{masa inicial}}$$

Resultados

Para obtener la curva de calibración, primero se realizó un barrido a las AgNP comerciales en el espectrofotómetro en el rango de 300 a 600 nm (figura 2), donde el pico de absorbancia máxima se encontró a los 395 nm.

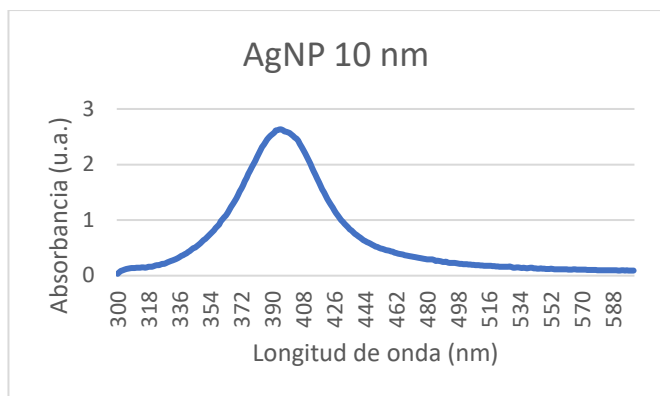


Fig. 2. Barrido en el espectrofotómetro de 300 a 600 nm del estándar de AgNP con diámetro de 10 nm.

La absorbancia máxima obtenida en el barrido se usó como referencia para realizar la curva de calibración, en donde se llevaron a cabo diluciones para establecer concentraciones seriadas de 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005 y 0.006 g/L. Se midió la absorbancia de cada una de las concentraciones por triplicado a 395 nm, incluyendo un blanco, cuya medición promedio se restó a las obtenidas por las diferentes concentraciones. Es así que la curva de calibración resultante (Figura 3) obtuvo un valor R de 0.9935, una pendiente (m) igual a 139.76 y un valor de b igual a -0.0189.

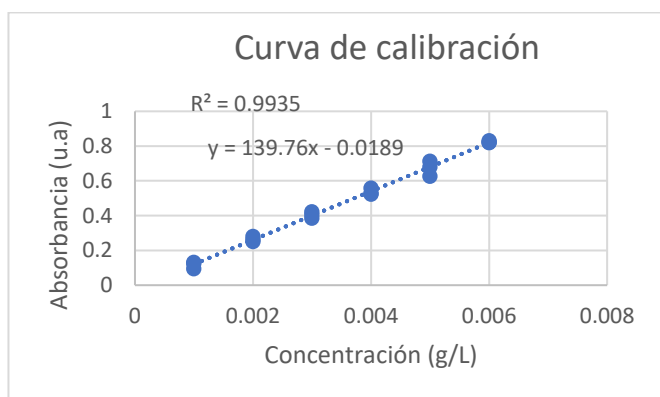


Fig. 3. Curva de calibración para AgNP de 395nm.

Para determinar la concentración y distribución de tamaño(s) de las AgNP sintetizadas, se realizó un barrido en el espectrofotómetro en dilución 1 a 20, que se muestra en la figura 4. En dicha figura se

puede observar una única distribución de tamaño donde el pico de máxima absorbancia está entre los 397 y 402 nm a 0.745 u.a., mientras que a 395 nm la señal fue de 0.744 u.a.

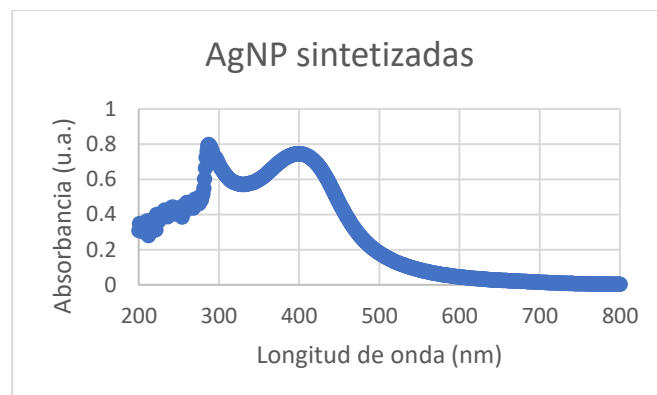


Fig. 4. Barrido en el espectrofotómetro de la solución de AgNP sintetizadas.

Durante la síntesis de AgNP, previo a la adición de AgNO_3 , se extrajo una porción de 1 ml de la infusión de albahaca y se preparó una dilución 1 a 20 para conocer la absorbancia de la infusión a 395nm y restarla a la presentada por la solución final, despejando la ecuación de la recta, calculamos la concentración real de AgNP presentes en la síntesis final, como se muestra a continuación.

$$\begin{aligned} \text{infusión}_{A395} &= 0.042 & \text{AgNP}_{A395} &= 0.744 \\ \text{AgNP}_{\text{real}} &= 0.744 - 0.042 = 0.702 \end{aligned}$$

$$[\text{AgNP}] = \frac{0.702 + 0.0189}{139.76} \times 20 = 0.103 \frac{\text{g}}{\text{L}}$$

Los porcentajes de masa atraída de MNP se reportan en la tabla 1. Para el primer tubo correspondiente a la primera serie de MNP sintetizadas el promedio de masa atraída fue de 84.35% y 0.074 gramos de masa perdida, mientras que para el tubo 2 y 3 el promedio de masa retenida fue del 100%, por lo tanto, no hubo masa perdida.

Tabla 1. Masa de MNP atraída por imán

Masa atraída						
Tubo	Rep.	Masa inicial (g)	Masa perdida (g)	Masa retenida (g)	Masa atraída (%)	Prom. (%)
1	1	0.492	0.0833	0.4087	83.07	84.35
	2	0.492	0.0737	0.4183	85.02	
	3	0.492	0.074	0.418	84.96	
2	1	0.4945	0	0.4945	100	100
	2	0.4945	0	0.4945	100	
	3	0.4945	0	0.4945	100	
3	1	0.161	0	0.161	100	100
	2	0.161	0	0.161	100	
	3	0.161	0	0.161	100	

Discusión y conclusiones

La liberación de compuestos orgánicos provenientes de la albahaca durante su infusión, funcionan como agentes reductores y estabilizantes para la formación de nanopartículas de plata, sin embargo, el tamaño que estas posean varía según las condiciones de la síntesis (temperatura, agitación, etc) (Pirtarighat, 2019; Yugal, 2017).

Las nanopartículas de plata son capaces de absorber diferentes longitudes de onda según su tamaño, como lo describió Paramelle y col. (2014), gracias a esto podemos determinar el tamaño de las AgNP sintetizadas y comerciales a través de un barrido espectral (figura 2 y 4). Es así que se tiene la certeza que las AgNP sintetizadas tienen un tamaño aproximado de 10 nm, ya que presentan un pico a las mismas longitudes de onda que las nanopartículas comerciales con dicho tamaño y las referenciadas por Paramelle y col. (2014).

Para determinar las concentraciones de las muestras fue necesario realizar una dilución 1 a 20 para no exceder el 1 en la escala de absorbancia, ya que el espectrofotómetro pierde sensibilidad por encima de este valor y las lecturas dejan de ser exactas.

Algunos compuestos orgánicos de la infusión de albahaca, aunque en menor medida, presentan absorbancia a 395 nm, por lo que es importante realizar una lectura solo a la infusión para conocer cuanto de la absorbancia de la solución final corresponde a la infusión de albahaca, y así, evitar calcular una mayor concentración de la que realmente se tiene.

La síntesis de MNP obtuvo buenos porcentajes de manera general, sin embargo, destaca el primer tubo al ser el único que no presentó una retención del 100%. La diferencia se puede explicar por un error en la metodología; al momento de homogeneizar la mezcla de cloruros de hierro en el ultrasonicador, se aplicaron pulsos para este primer lote de MNP, cuando nos percatamos del error, se corrigió para los tubos posteriores.

La síntesis de nanopartículas obtuvo buenos resultados y pueden usarse en un futuro entrecruzamiento en busca de una aplicación concreta. Las metodologías probaron ser efectivas si se siguen correctamente, además, la experiencia en el laboratorio demostró ser muy instructiva en el conocimiento de equipos, reactivos y metodologías de uso común.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro por espacio y la oportunidad brindada para realizar este verano de la investigación. También agradezco a la doctora Issell Sandoval por su tutoría y apoyo durante el proyecto y mi carrera como estudiante.

Referencias bibliográficas

Anees-Ahmad S, Sachi Das S, Khatoon A, Tahir Ansari M, Afzal Mohd, Saquib Hasnain M, et al. Bactericidal activity of silver nanoparticles: A

mechanistic review. *Materials Science for Energy Technologies* 2020;3:756–69.

Galatage ST, Hebalkar AS, Dhobale S v, Mali OR, Kumbhar PS, Nikade S v, et al. Silver Nanoparticles: Properties, Synthesis, Characterization, Applications and Future Trends. En: Kumar S, Kumar P, Pathak CS, Ed. *Silver Micro-Nanoparticles IntechOpen*, 2021.

Ganguly R, Singh AK, Kumar R, Gupta A, Pandey AK, Pandey AK. Nanoparticles as Modulators of Oxidative Stress. En: Maurya PK, Singh S, Ed. *Nanotechnology in Modern Animal Biotechnology*. St. Louis: Elsevier, pp. 29–35, Oct 2019.

Kozlenko DP, Dubrovinsky LS, Kichanov SE, Lukin E v., Cerantola V, Chumakov AI, et al. Magnetic and electronic properties of magnetite across the high pressure anomaly. *Scientific Reports*. Vol. 9, Jun. 2019.

Lazić V, Mihajlovski K, Mraković A, Illés E, Stoiljković M, Ahrenkiel SP, et al. Antimicrobial activity of silver nanoparticles supported by magnetite. *ChemistrySelect*. Vol. 4, Issue 14, pp. 24-37, Nov. 2019.

Mikhailov O v, Mikhailova EO. Elemental Silver Nanoparticles: Biosynthesis and Bio Applications. *Materials (Basel)*, Vol. 12, Issue 19, pp. 3177, Mar. 2019.

Mikhailova EO. Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application. *J Funct Biomater* Vol. 11, pp. 84-85, Apr. 2020.

Najafpoor A, Norouzian-Ostad R, Alidadi H, Rohani-Bastami T, Davoudi M, Barjasteh-Askari F, et al. Effect of magnetic nanoparticles and silver-loaded magnetic nanoparticles on advanced wastewater treatment and disinfection. *Journal of Molecular Liquids*, Vol. 3, pp. 112640, Nov. 2020.

Park SB, White SB, Steadman CS, Pechan T, Pechanova O, Clemente HJ, et al. Silver-coated magnetic nanocomposites induce growth inhibition and protein changes in foodborne bacteria. *Scientific Reports*, Vol. 9, Issue 1, Oct 2019.

Ponomar VP. Synthesis and magnetic properties of magnetite prepared by chemical reduction from hematite of various particle sizes. *Journal of Alloys and Compounds*, Vol. 5, pp. 28-34, Dec 2018.

Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology*, Vol. 16, Issue 1, pp. 14-16, Jan 2018.

Wallyn J, Anton N, Vandamme TF. Synthesis, principles, and properties of magnetite nanoparticles for in vivo imaging applications—A review. *Pharmaceutics MDPI AG*, Nov. 2019.

Xu C, Akakuru OU, Zheng J, Wu A. Applications of Iron Oxide-Based Magnetic Nanoparticles in the Diagnosis and Treatment of Bacterial Infections. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 8, Nov. 2019.

Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press. Vol. 12, Issue 2, pp. 62-67, May. 2020.

Agosto 15, 2022.

Universidad Autónoma de Querétaro

Perlas de hidrogel de AP de amaranto y GX

M.C. María del Carmen Cortez Trejo. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Doctorante. Responsable del proyecto, mariadelcarmen.cortez@hotmail.com

Dra. Mendoza Díaz Sandra Olimpia, Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Asesor, smendoza@uaq.mx

Zamorano Maldonado David Gael. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería. Estudiante, dzamorano05@alumnos.uaq.mx

Resumen

La producción de hidrogeles es una técnica de encapsulación que involucra la formación de redes tridimensionales de polímeros con alta capacidad de retención de agua y portadores de compuestos bioactivos. En particular, las proteínas vegetales son especialmente por sus excelentes propiedades como capacidad gelificante, biodegradabilidad y mayor sustentabilidad que sus contrapartes de origen animal. El objetivo de este trabajo fue obtener esferas de hidrogel a base de aislado proteico de amaranto y goma xantana para el desarrollo de un producto tipo "tapioca" para ello, se indujo la gelificación mixta de un aislado proteico de amaranto (APA) y goma xantana (GX) por acidificación con glucono- δ -lactona (GDL) mediante extrusión por goteo de soluciones de biopolímero en solución gelificante.

Palabras clave: aislado proteico de amaranto, goma xantana, esferas de hidrogel.

Abstract

The production of hydrogels is an encapsulation technique that involves the formation of three-dimensional networks of polymers with high water-holding capacity and carriers of bioactive compounds. In particular, plant proteins are especially well known for their excellent properties such as gelling capacity, biodegradability and greater sustainability than their animal counterparts. The objective of this work was to obtain hydrogel spheres based on amaranth protein isolate and xanthan gum for the development of a "tapioca" type product. For this purpose, mixed gelling of amaranth protein isolate (API) and xanthan gum (XG) was induced by acidification with glucono- δ -lactone (GDL) through extrusion of biopolymer solutions in gel-forming solution.

Key words: amaranth protein isolate, xanthan gum, hydrogel spheres.

Introducción:

Uno de los retos para el desarrollo de nuevos productos en las industrias alimentarias, cosméticas, farmacéuticas y veterinarias, es la incorporación de moléculas con demostrada actividad biológica que presentan inconvenientes de baja solubilidad, pobre absorción y consecuentemente baja biodisponibilidad, así como degradación durante su manejo. Por lo anterior, existe la necesidad de utilizar metodologías de encapsulación que disminuyan los problemas mencionados. Dentro de los sistemas acarreadores empleados en la actualidad se encuentran los hidrogeles. Éstos son redes sólidas tridimensionales formadas por cadenas de polímeros naturales o sintéticos que tienen la capacidad de absorber y retener grandes cantidades de agua o algún líquido biológico (Cao & Mezzenga, 2020).

Dentro de los polímeros naturales usados para la formación de hidrogeles se encuentran las proteínas. Si bien se ha reportado ampliamente el uso de proteínas de origen animal, las proteínas vegetales están ganando mayor atención debido a que exhiben propiedades tecno-funcionales que pueden aprovecharse para el desarrollo de sistemas de encapsulación y, además, son más sostenibles. Dentro de las proteínas vegetales más utilizadas en la formación de hidrogeles se encuentra la zeína y algunos aislados proteicos como el de soya y chícharo (McClements, 2020). Sin embargo, la identificación de otras fuentes de proteínas vegetales es uno de los actuales objetivos de investigación en el área de hidrogeles. De esta manera, algunos aislados proteicos de amaranto han sido evaluados y se ha demostrado su capacidad gelificante (Avanza, Puppo & Añón, 2005a,b; Bejarano-Luján, Da Cunha, & Netto, 2010).

Aunado a lo anterior, en años recientes se ha explorado el uso combinado de proteínas con algunas gomas para la obtención de geles con mejores propiedades reológicas y capacidad de retención de agua (Le et al., 2017). A este respecto, en trabajos recientes, se demostró que las proteínas de amaranto y la goma xantana son capaces de gelificar sinérgicamente a bajas concentraciones de biopolímero y sin el empleo de tratamiento térmico o adición de agentes reticulantes o sales (Cortez-Trejo et al., 2021, 2022), por lo anterior este sistema mixto resulta prometedor para el desarrollo de sistemas de encapsulación.

La tapioca o perlas de tapioca son pequeñas esferas (1-6 mm de diámetro) de almidón de tapioca producidas generalmente por extrusión. Las perlas de tapioca deben ser cocinadas para inducir la gelificación del almidón y son consumidas en bebidas calientes o frías. Es común su consumo en leche o en bebidas tipo “boba” (“boba” = “pearl” balls). El consumo generalizado de estas bebidas que son altas en calorías (200-450 calorías), es un factor importante que puede contribuir a la obesidad y diabetes (Min, Green, & Kim, 2017). En este sentido, el empleo de esferas de hidrogel a

base de biopolímeros con mejores características nutrimentales, como lo son las proteínas de amaranto y goma xantana, son una alternativa viable para el desarrollo de productos tipo “tapioca”.

Objetivo general

Obtener perlas de hidrogel a base de aislado proteico de amaranto y goma xantana para el desarrollo de un producto tipo “tapioca”.

Objetivos específicos

- 1) Obtener APA por precipitación isoeléctrica.
- 2) Caracterizar y obtener un extracto fenólico acuoso a partir de pulpa de café.
- 3) Obtener perlas de hidrogel variando niveles de concentración de GDL en solución gelificante y tiempo de reposo en dicha solución, evaluar el índice de hinchamiento y cargar al mejor tratamiento con el extracto acuoso de pulpa de café.

Metodología

Obtención de APA

Para la obtención de APA se empleó harina desgrasada de amaranto la cual se suspendió en agua (1:10 p/v) y se ajustó el pH a 9 con una solución de NaOH 2N. La suspensión se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó 20 min a 9000 rpm, el sobrenadante obtenido se ajustó a pH 5 con HCl 2 N y se centrifugó a 9000 rpm durante 20 min a 4°C. El sedimento se resuspendió en agua, se neutralizó con NaOH 0.1 N y se liofilizó. El contenido de proteína de este aislado fue de 85.1%.

Obtención y caracterización de extracto fenólico de pulpa de café.

Para la obtención del extracto se siguieron 3 metodologías, todas con una proporción igual 1:10 p/v de pulpa de café molida (malla #40) en diferentes disolventes, la primer metodología consistió en agregar 1g pulpa de café en 10 mL de etanol y sonicar durante 30 min, en la segunda se

siguió el procedimiento anterior pero usando como solvente agua-etanol (1:1) y para la tercera se agregó agua a 92°C, se agitó por 2 minutos se enfrió en baño de hielo hasta 35°C y el extracto se obtuvo por centrifugación a 3500 rpm 10 min a temperatura ambiente.

Para la determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante del extracto fenólico se siguieron las siguientes metodologías: se determinó la capacidad antioxidante por ABTS siguiendo la metodología de Nenadis et al. (2004) con modificaciones para microplaca empleando una curva estándar de Trólox. Para fenoles totales, se siguió el método Folin ciocalteu, de acuerdo con Prior et al. (20005) en microplaca empleando una curva estándar de ácido gálico.

Producción de esferas de hidrogel y determinación de índice de hinchamiento

Las esferas se prepararon mediante un método de extrusión-goteo de una solución de biopolímero APA:GX pH 10 ± 0.08 a 1% p/v y proporción 1:1 p/p con ayuda de una jeringa de 20 mL y una bomba de infusión trabajando a 0.586 mL/min en 40 mL de solución gelificante (GDL, 1, 2.5 y 5 mg/mL). La distancia entre la punta de la jeringa y la solución de gelificante se fijó en 7 cm. El tiempo de reposo de las esferas en la solución gelificante fue de 10 y 30 min.

Se trabajó con muestras de esferas de hidrogel en fresco o en seco dependiendo del ensayo correspondiente. Para la preparación de muestras de esferas de hidrogel en seco, las esferas recién producidas se secaron en horno a 35-40°C por 24 horas en portaobjetos.

El índice de hinchamiento se determinó siguiendo la metodología de Pourkhatoun et al. (2022) con modificaciones. Las muestras secas de esferas de hidrogel fueron sumergidas en 100 mL de agua ajustada con NaOH y HCl 0.1N a pH 4 (pH del extracto de café). El porcentaje de hinchamiento se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Hinchamiento} = \frac{w_1 - w_0}{w_0}$$

Donde w_0 y w_1 corresponden al peso en seco y en húmedo de las esferas de hidrogel a determinado tiempo.

Para cargar las perlas primero se probó secar en horno para posteriormente cargarlas con el extracto, pero la metodología que resultó mejor fue emplear perlas recién recuperadas de la solución gelificante y cargarlas dentro del extracto, en agitación suave por 6 h.

Resultados

De las tres metodologías de extracción, la de mayor capacidad antioxidante fue la extracción con agua caliente a 92°C.

Tabla 1. Capacidad antioxidante por ABTS de extracto de pulpa de café.

Extracto	mg Eq. Trólox/L de extracto
Pulpa de café	1625.3 ± 0.0121

Tabla 2. Contenido de fenoles totales de extracto de pulpa de café

Extracto	μg Eq. ác. Gálico /mL de extracto
Pulpa de café	757.18 ± 58.16

Tabla 3. Índice de hinchamiento de perlas de hidrogel APA:GX a diferentes tiempos (h).

h	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
1-10	52.7±13.3 ^a	64.24±13.9 ^a	66±16 ^a	70.5±16.7 ^{ab}	71.8±15.6 ^{ab}
2.5-10	23.7±4.9 ^b	32.6±7.9 ^b	366.24±10 ^b	39.7±9.8 ^b	40.9±9 ^b
5-10	12.5±3.4 ^b	17.3±4 ^b	22.2±7.8 ^b	21.8±5.4 ^b	23±6 ^b
1-30	25.8±3.8 ^b	32.54±5.1 ^b	36.2±7.2 ^b	38.01±7.6 ^b	40.66±8.07 ^b
2.5-30	16.6±2.6 ^b	23.02±1.3 ^b	27.04±2.32 ^b	29.02±2.7 ^b	31.54±2.8 ^b
5-30	11.3±4.4 ^b	16.1±4.6 ^b	19.1±5.9 ^b	21.5±6.5 ^b	23.87±7.04 ^b

h	3.0	4.0	5.0	6.0	24.0
1-10	73±17 ^{ab}	75±16 ^{ab}	76±17 ^{ab}	78.5±17.6 ^a	87±18 ^a
2.5-10	43±11 ^b	46±11 ^b	47.1±17.5 ^b	49.5±11.9 ^a	60.2±12.8 ^a
5-10	25±7 ^b	26.9±6.9 ^b	29.1±6.9 ^b	29.5±7.5 ^a	36.7±7.5 ^a
1-30	42.3±9.6 ^b	44.6±8.2 ^b	46.4±7.2 ^b	48.6±8.5 ^a	58.6±9.4 ^a
2.5-30	33.5±3.7 ^b	35.4±2.7 ^b	37±3 ^b	39.1±3.1 ^a	49.1±4.7 ^a
5-30	25.3±7.2 ^b	27.8±7.8 ^b	29.6±8.1 ^b	30.4±7.8 ^a	39.5±7.8 ^a



Fig. 1 Perlas de hidrogel APA:GX sin cargar.



Fig. 2 Perlas de hidrogel cargadas en extracto de café por 6 h.

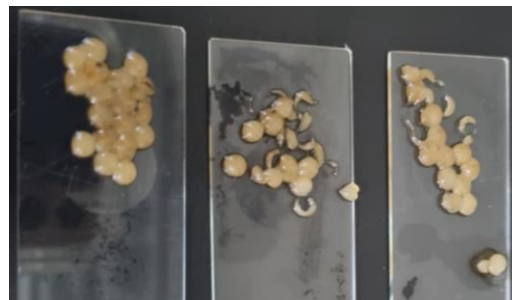


Fig. 3 Metodología alternativa de cargado de extracto. Perlas liofilizadas y luego rehidratadas en extracto de café.

Discusión

El uso de mezclas APA:GX ha demostrado ser un sistema eficaz de gelificación con potencial para su uso en sistemas de encapsulación. Por otro lado, el desarrollo de sistemas mixtos APA:GX para la formación de esferas de hidrogel supone una alternativa más saludable al consumo de productos a base de tapioca o bebidas tipo “boba”, los cuales por su alto contenido energético han sido identificados como factor de riesgo para la salud. Respecto a ABTS y fenoles totales realizadas para el extracto fenólico de pulpa de café, se presentaron varios inconvenientes de tiempo, reactivos y pericia en su realización. Por ejemplo para ABTS podemos decir que nuestro porcentaje de inhibición es del 25.8%, así que tenemos 1625.3 ± 0.0121 mg Eq. Trólox/L de extracto, el nivel de inhibición es bajo esto sugiere que en el extracto de café estudiado se encuentran presentes pocos compuestos donadores de hidrógeno o electrones que pueden estabilizar al radical catiónico ABTS. Sin embargo, dichos resultados no son concluyentes por las ya razones expuestas. Se requieren de réplicas adicionales para verificar los resultados.

Por otro lado, se ha estudiado que el contenido de fenoles totales está asociado a la actividad antioxidante, los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente en las plantas y han llamado mucho la atención por su actividad antioxidante y su capacidad para eliminar los

radicales libres. Para este ensayo se obtuvo un resultado de $757.18 \pm 58.16 \mu\text{g Eq. } \acute{\text{a}}\text{c. G\acute{a}}\text{l} \text{ico} / \text{mL}$ extracto. Resultados menores a lo reportado por Fonseca et al. (2014)

Respecto a la obtenci3n de perlas y determinaci3n de 3ndice de hinchamiento, se obtuvieron perlas de hidrogel con 3ndice de hinchamiento de hasta $55.28 \pm 9.96\%$. Sin embargo, dado que las perlas poseen bajos s3lidos totales (1%) perdieron su forma al ser secadas en horno, se observaron planas y a pesar de que su 3ndice de hinchamiento fue bueno, durante la rehidrataci3n hubo ruptura visual, as3 que se consideraron otras alternativas para realizar el proceso de carga del extracto fen3lico de caf3. De esta manera, se decidi3 evitar la rehidrataci3n, pasando directamente de la formaci3n de las perlas a la encapsulaci3n o absorpci3n del extracto. Para estos experimentos se seleccion3 el tratamiento obtenido con 1 mg GDL/mL y tiempo de reposo de 10 min por ser el tratamiento con mayor 3ndice de hinchamiento. Las perlas reci3n obtenidas fueron sumergidas en el extracto a temperatura ambiente durante 6 h.

Cabe mencionar que en el ensayo de 3ndice de hinchamiento se obtuvieron desviaciones est3ndar muy altas, por lo que se sugiere la realizaci3n de m3s r3plicas del experimento.

Conclusiones

Debido a las limitaciones de tiempo y falta de experiencia en todas las t3cnicas realizadas, los resultados obtenidos durante la estancia de verano arrojaron datos preliminares. Se requiere en todos los casos una mayor cantidad de r3plicas para la verificaci3n de los resultados. Sin embargo, estos datos preliminares permitieron encontrar la manera m3s adecuada para la carga del extracto de pulpa de caf3 en las esferas de hidrogel APA:GX, lo que sin duda contribuye de manera importante al progreso del proyecto.

Agradecimientos

El estudiante Zamorano Maldonado David Gael agradece a la M. C. Mar3a del Carmen Cortez por su empe3o y dedicaci3n en el trabajo realizado brindando el protocolo para las pr3cticas, guiarle y ense3arle en las t3cnicas y situaciones de laboratorio, a trav3s de sus conocimientos, experiencias y paciencia. As3 como por darle la oportunidad de participar en el proyecto.

Referencias bibliogr3ficas

AOAC (2000). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 17th ed. Washington, DC.

Avanza, M.V., Puppo, M.C., & A3on, M.C. (2005a). Rheological characterization of amaranth protein gels. *Food hydrocolloids*, 19(5), 889-898. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.0>

Avanza, M.V., Puppo, M.C., & A3on, M.C. (2005b). Structural characterization of amaranth protein gels. *Journal of Food Science*, 70(3), E223-E229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07139.x>.

Bejarano-Luj3n, D.L., Da Cunha, R.L., & Netto, F.M. (2010). Structural and rheological properties of amaranth protein concentrate gels obtained by different processes. *Food Hydrocolloids*, 24(6-7), 602-610. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.02.0>

C3rdenas, A., G3mez, M., & Frontana, C. (2014). Development of an Electrochemical Cupric Reducing Antioxidant Capacity Method (CUPRAC) for Antioxidant Analysis. *Electrochimica Acta*, 128, 113-118. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.10.191>.

Cortez-Trejo, M.C., Mendoza, S., Loarca-Piña, G., & Figueroa-Cárdenas, J.D. (2021). Physicochemical characterization of protein isolates of amaranth and common bean and a study of their compatibility with xanthan gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 861-868. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.242>

contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en norte de Santander (Colombia). *Vitae*, 21(3), 228-236.

Cortez-Trejo, M. C., Figueroa-Cárdenas, J. D., Quintanar-Guerrero, D., Baigts-Allende, D. K., Manríquez, J., & Mendoza, S. (2022). Effect of pH and protein-polysaccharide ratio on the intermolecular interactions between amaranth proteins and xanthan gum to produce electrostatic hydrogels. *Food Hydrocolloids*, 129, 107648.

Min, J. E., Green, D. B., & Kim, L. (2017). Calories and sugars in boba milk tea: implications for obesity risk in Asian Pacific Islanders. *Food science & nutrition*, 5(1), 38-45.

Mundo, J. L. M., Zhou, H., Tan, Y., Liu, J., & McClements, D. J. (2020). Stabilization of soybean oil-in-water emulsions using polypeptide multilayers: Cationic polylysine and anionic polyglutamic acid. *Food Research International*, 137, 109304.

Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., & Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669-4674. <http://doi.org/10.1021/jf0400056>.

Pourkhatoun, M., Kalantari, M., Kamyabi, A., & Moradi, A. Preparation and characterization of pH-sensitive carboxymethyl cellulose-based hydrogels for controlled drug delivery. *Polymer International*.

FONSECA-GARCÍA, L., CALDERÓN-JAÍMES, L. S., & Rivera, M. E. (2014). Capacidad antioxidante y

**FOTOGRAFIAS SOLICITADAS
PARA LA ELABORACION DE
MEMORIA FOTOGRAFICA DE
ACTIVIDADES**



Evaluación de metabolitos secundarios y actividades biológicas de plantas tratadas con nanomateriales

Estefanía Arellano-Ordoñez¹, Ana Angelica Feregrino-Pérez^{2*}

¹Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería, Ingeniería Agroindustrial, Campus Amazcala, El Marqués.

²Universidad Autónoma de Querétaro, Laboratorio de Metabolitos Secundarios y Nanocompositos, Campus Aeropuerto.

*Autor de correspondencia: feregrino.angge@hotmail.com

Resumen

México cuenta con 4, 500 especies de plantas que han sido utilizadas dentro de la medicina tradicional. *Argemone ochroleuca sweett*, mejor conocida como chicalote, forma parte de este grupo y sumado a ello, se caracteriza por ser una maleza. El interés puesto en el chicalote se debe a sus tantas propiedades curativas, asociadas a la presencia de metabolitos secundarios y las aplicaciones que han ido surgiendo, como su uso en la producción de biocombustible. Por tal motivo, en el presente estudio se cuantificó los metabolitos de interés mediante pruebas como fenoles totales, taninos condensados y flavonoides. La presencia de estos compuestos suele relacionarse con la actividad antioxidante, sumando el método de DPPH y ABTS al estudio. Siendo las muestras: hoja, tallo, raíz y fruto. Para el caso de fenoles las muestra 1 de raíz, hoja y fruto presentaron los valores más altos con 296.7, 296.7 y 384.16 mg AG/mg muestra. Para flavonoides raíz y tallo de la muestra 3 con 45.07y 43.35mg rut/mg muestra. En el caso de taninos se presentaron en raíz y fruto de la muestra 1 con 0.72 y 0.858 mg cat / mg muestra, respectivamente, en tallo de la muestra 3 con 0.442 mg cat / mg muestra. Para el caso de DPPH, raíz, hoja y fruto de la muestra 1 con 565.6, 551.9 y 739.7 mg trolox / mg muestra. Para el caso de ABTS, raíz y fruto de la muestra 1 con 506.7 y 729.9mg trolox / mg muestra. Sustentando sus propiedades curativas.

Palabras clave: chicalote, metabolitos, antioxidante, medicina, maleza.

Abstract

Mexico has 4,500 species of plants that have been used in traditional medicine. *Argemone ochroleuca sweett*, better known as chicalote, is part of this group and in addition to this, it is characterized by being a weed. The interest in chicalote is due to its many curative properties, associated with the presence of secondary metabolites and the applications that have been emerging, such as its use in the production of biofuel. For this reason, in the present study, the metabolites of interest were quantified utilizing tests such as total phenols, condensed tannins, and flavonoids. The presence of these compounds is usually related to antioxidant activity, adding the DPPH and ABTS method to the study. The samples are leaf, stem, root, and fruit. In the case of phenols, sample 1 of root, leaf, and fruit presented the highest values with 296.7, 296.7, and 384.16 mg AG/mg samples. For flavonoids root and stem sample 3 with 45.07 and 43.35 mg rut/mg sample. In the case of tannins, they were present in the root and fruit of sample 1 with 0.72 and 0.858 mg cat / mg sample, respectively, and in the stem of sample 3 with 0.442 mg cat / mg sample. For DPPH, root, leaf and fruit of sample 1 with 565.6, 551.9 and 739.7 mg trolox / mg sample. For ABTS, root and fruit of sample 1 with 506.7 and 729.9mg trolox / mg sample. Supporting its healing properties.

Keywords: chicalote, metabolites, antioxidant, medicine, undergrowth

Introducción

De acuerdo con la Secretaría de Salud en 2021, alrededor del 90 % de la población mexicana ha optado por alguna de las 4, 500 plantas medicinales de México, por lo menos una vez en su vida. La botánica es la medicina más accesible para pueblos y comunidades [5]. Dentro de las 4, 500 plantas medicinales mexicanas, se encuentra *Argemone ochroleuca sweet*, conocida como chicalote. Planta perteneciente a la familia Papaveraceae con un aproximado de 35 especies. Son plantas herbáceas, anuales o bienales perennes, ramosas y espinosas, con un látex acuoso de color blanquecino o amarillento. Las hojas son basales en forma de roseta con su margen irregularmente dentado-espinoso. Las flores que presenta son actinomorfas, terminales, de color blanco o amarillo [2].

A cada una de las partes del chicalote se le atribuyen propiedades curativas, por ejemplo: las hojas y semillas tienen uso para la regulación de los niveles de colesterol. El extracto en medio acuoso actúa como antiinflamatorio, la raíz se utiliza en el tratamiento de enfermedades cutáneas crónicas, la raíz es expectorante; si la raíz es macerada puede utilizarse para tratar el flujo vaginal. El aceite de las semillas es purgante, el látex se utiliza para problemas respiratorios. Y las flores son expectorantes. Muchas de estas propiedades se deben a la presencia de metabolitos secundarios [1][3].

Por otro lado, *Argemone* tiene más aplicaciones como la producción de biocombustibles sin que haya competencia por la producción de alimentos. En un estudio realizado por el Posgrado de Ingeniería Bioquímica de Durango se identificó las especies de plantas con un potencial para uso en la producción de biocombustibles en dicho estado, dentro de los resultados, se observó que *Argemone* presentó un 39.8 % \pm 0.02 en contenido de grasa [4].

La importancia del estudio de las plantas medicinales radica en que sólo se ha hecho un análisis farmacológico del 5% del total de las plantas medicinales presentes en México. De ese total 250 se comercializan diariamente, el 85% son extraídas del

medio silvestre. Un mejor conocimiento de las plantas puede traer consigo una mejor aplicación y avances a nivel tecnológico, científico y medicinal.

Objetivo

Cuantificar la presencia de metabolitos secundarios en hoja, tallo, raíz y fruto de *Argemone ochroleuca sweet* en tres etapas del desarrollo de la semilla.

Metodología

Muestras

Las muestras vegetales adultas se colectaron en campo en tres zonas de una parcela de agricultura de conservación, ubicada en el Tecnológico Nacional de México/IT Roque, campus Apaseo el Alto, en el Km 11 de la carretera Apaseo el Alto – Jerécuaro. Las plantas se recolectaron completas (con raíz, hojas, tallos y frutos conteniendo semillas).

Extracto de chicalote

Para la elaboración de los extractos se utilizaron 200 mg de raíz, tallo, hoja y fruto del chicalote (*Argemone mexicana L.*). Colocándose en tubos falcón con 10 ml de metanol, cubriéndose con aluminio, se dejaron sonicar por 30 min a temperatura ambiente y se centrifugaron por 10 min a 5000 rpm. El sobrenadante se filtró y se almacenó en refrigeración.

Determinación de capacidad antioxidante

Método ABTS

Para la curva de calibración se preparó una solución patrón, disolviendo 0.0025 g de trolox en 10 ml de metanol.

Se pesaron 19.20 mg de ABTS y se aforó a 5 ml con agua destilada. Por otro lado, se pesaron 0.1892 g de persulfato de potasio para aforarse a 5 ml. Agregando 88 μ l del persulfato de potasio al ABTS, dejando en reposo por 12 HRS en oscuridad y a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se hace una disolución: 500 μ l de ABTS + persulfato de potasio en 15-25 ml de etanol, todo depende de la lectura a 734 nm. Si el valor de la absorbancia se encuentra entre 0.7 y 1, esa disolución es la correcta.

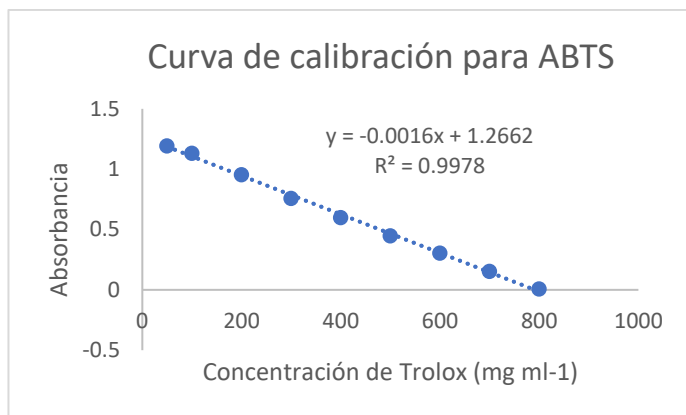


Figura 1. Curva de calibración para ABTS

Para su lectura, se colocaron 20 µl de muestra con 230 µl de ABTS en una microplaca de 96 pozos. La lectura se realizó en el equipo Multiskan Go (Thermo scientific) a 734 nm.

Determinación de capacidad antioxidante

Método DPPH

Para la curva de calibración se preparó una solución patrón, disolviendo 0.0025 g de trolox en 10 ml de metanol. Se pesaron 0.0015 g de DPPH se colocó en un matraz ámbar de 25 ml, se agregaron 20 ml de metanol, se sonicó durante 10 min, para lograr disolver completamente. Tras los 10 min se llevó a volumen con metanol.

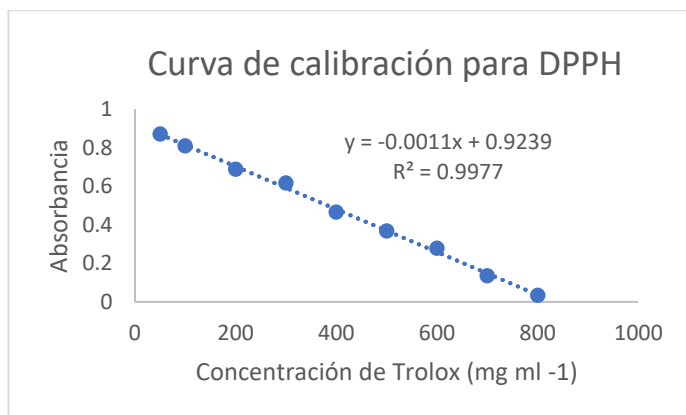


Figura 2. Curva de calibración para DPPH

En una microplaca de 96 pozos se colocaron 20 µl de muestra con 200 µl de radical DPPH, la lectura se realizó a 520 nm en el equipo Multiskan Go (Thermo scientific).

Determinación de fenoles totales

En el caso de la curva de calibración se preparó una solución patrón, disolviendo 5 g de carbonato de sodio en un matraz de 25 ml con 20 ml de agua destilada, se sonicó y se llevó a volumen con agua destilada. Por otro lado, se pesó 10 mg de ácido gálico, aforando a 10 ml con agua destilada; de esta solución se toma 1 ml y se afora a 10 ml.

Para la determinación y la curva patrón, el procedimiento es similar, se utilizaron viales color ámbar, siguiendo el orden siguiente: se tomaron 40 µl de muestra, adicionando 460 µl de agua destilada, 250 µl de folin, terminando con 1250 µl de Na₂CO₃. Posteriormente se agitaron los viales con ayuda del equipo Vórtex (ColeParmer) por 5 s y se dejaron reposar en oscuridad por 2 horas.

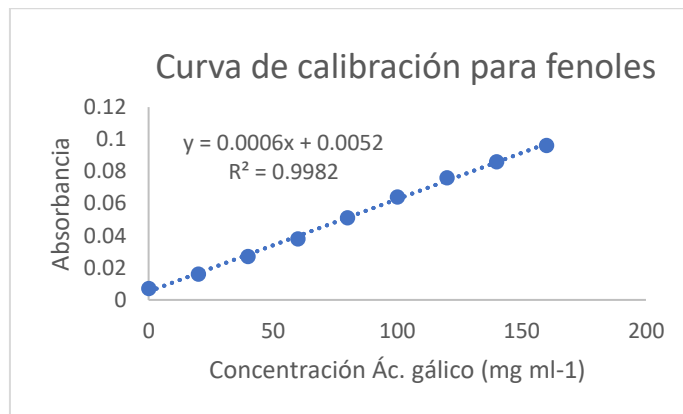


Figura 3. Curva de calibración para fenoles

La lectura se realizó con el equipo Multiskan Go (Thermo scientific) a 760 nm, colocando en la microplaca de 96 pozos 200 µl de cada valor de la solución patrón y de las muestras.

Determinación de taninos condensados

Para las soluciones requeridas en la curva de calibrado, se pesaron 10 g de vainillina y se aforó a en 1000 ml de metanol, guardándose en un cuarto oscuro. Para la siguiente se pesaron 0.008 g de

catequina y se aforó a 10 ml con metanol, siendo esta la solución stock. Se preparó HCl al 4% y 8% en metanol, con el HCl al 8% y la vainillina al 1% se realizó una solución 1:1 de 50 ml.

La curva de calibración se realizó de la siguiente manera. De la solución stock (catequina) se tomaron 7.5 ml y se aforó a 10 ml con metanol, de la solución anterior se tomaron 6.66 ml y se aforó a 10 ml con metanol, de la solución anterior se tomaron 5 ml y se aforó a 10 ml; repitiendo nuevamente el paso anterior. Teniendo en total 5 disoluciones.

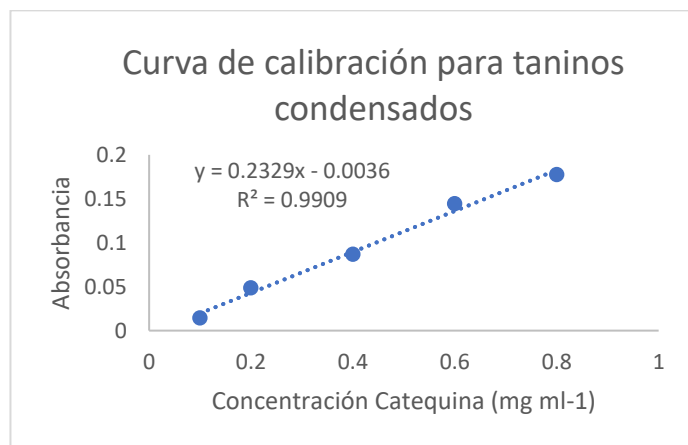


Figura 4. Curva de calibración para taninos condensados

Se tomaron 50 µl de cada concentración de la solución patrón y de las muestras y se colocaron directamente en la microplaca de 96 pozos, en seguida se colocaron 200 µl de la solución de HCl al 8% y Vainillina al 1%. Como relevante, deben colocarse de 50 µl en 50 µl, para evitar pérdidas de las concentraciones y/o muestras añadidas previamente. La lectura se realizó a 492 nm en el equipo Multiskan Go (Thermo scientific).

Determinación de flavonoides

La curva patrón se realizó pesando 0.025 g de rutina, se colocó en un matraz ámbar de 10 ml, llevándolo a volumen con metanol, nombrada solución stock. De dicha solución stock se pusieron 800 µl en un matraz ámbar de 10 ml y se llevó a volumen con metanol. De la solución anterior se tomaron 7.5 ml, se colocaron en un matraz de 10 ml y se llevó a volumen con

metanol. De la solución anterior se tomaron 6.67 ml, se colocaron en un matraz de 10 ml y se llevó a volumen con metanol. De la solución anterior se tomaron 5 ml, se colocaron en un matraz de 10 ml y se llevó a volumen con metanol. De la solución anterior se tomaron 4 ml, se colocaron en un matraz de 10 ml y se llevó a volumen con metanol. Se tomaron 4 ml de la solución anterior, se colocaron en un matraz de 10 ml y se llevó a volumen con metanol. Se toman 5 ml, se colocaron en un matraz de 10 ml y se llevó a volumen con metanol. Por último, se repite el procedimiento con 4 ml.

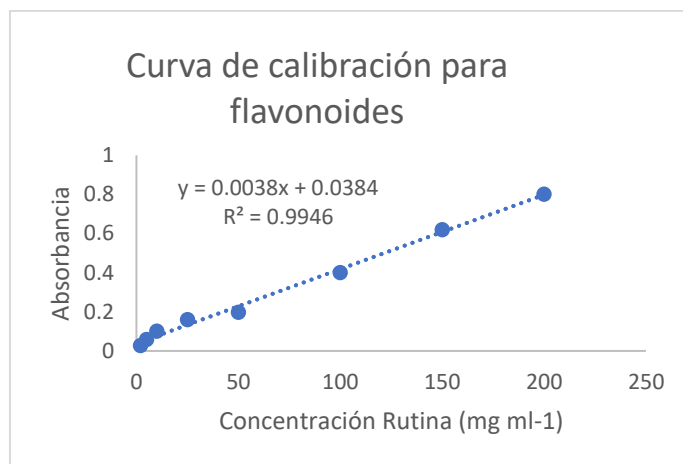


Figura 1. Curva de calibración para flavonoides

Por otro lado, se pesaron 0.1 g de 2-aminoetildifenilborato, se colocaron en un matraz de 10 ml y se llevó a volumen con metanol.

Se colocaron directamente 50 µl de las concentraciones de la curva patrón y de las muestras en la microplaca de 96 pozos. Se adicionaron 180 µl de agua destilada y 20 µl de 2-aminoetildifenil borato al 1%. Se leyeron las muestras a 404 nm en el equipo Multiskan Go (Thermo scientific).

Resultados y discusión

Análisis de fenoles totales

La curva de calibración obtenida se presenta en la figura 1. Los resultados mostrados en la tabla 1, permiten observar que la raíz, hoja y fruto de la

muestra 1 con 296.7, 296.7 y 384.16 mg AG / mg muestra respectivamente. De esa manera, la concentración de compuestos fenólicos, está relacionada a su vez con la actividad antioxidante; lo que fundamenta el uso medicinal – tradicional que se le otorga a la planta.

Análisis de flavonoides

La curva de calibración obtenida para este ensayo se presenta en la figura 2. Los resultados mostrados en la tabla 1, muestran resultados altos para raíz y tallo de la muestra 3 con 45.07y 43.35mg rut / mg muestra, respectivamente; para hoja la muestra 2 con 146.71 rut / mg muestra

y para fruto la muestra 1 con 132.78± 0.002 mg rut / mg muestra. Los resultados presentes en flavonoides son menores en comparación a fenoles, lo cual es correcto, pues se sabe que los flavonoides pertenecen a un subgrupo de los compuestos fenólicos.

Análisis de taninos condensados

La curva de calibración realizada para este ensayo se presenta en la figura 3. Los resultados mostrados en la tabla 1, arrojan que los valores más altos se presentaron en raíz y fruto de la muestra 1 con 0.72 y 0.858 mg cat / mg muestra, respectivamente, en tallo de la muestra 3 con 0.442 mg cat / mg muestra y en hoja de la muestra 2 con 1.923 mg cat / mg muestra.

Visto por separado, puede explicar las características antiinflamatorias que se le han atribuido y el olor que presenta puede ser relacionado a la presencia de taninos, pues presentan una característica importante, ser volátiles.

Análisis de actividad antioxidante

La curva de calibración de actividad antioxidante DPPH se presenta en la figura 1 y ABTS en la figura 2. Los resultados mostrados en la tabla 2, muestra que los valores más altos para DPPH, los cuales pueden dividirse en 2 grupos, raíz, hoja y fruto de la muestra 1 con 565.6, 551.9 y 739.7 mg trolox / mg muestra, respectivamente. Por otro lado, tallo de la muestra 3 con 321.12mg trolox / mg muestra.

Para el caso de ABTS, raíz y fruto de la muestra 1 con 506.7 y 729.9mg trolox / mg muestra, respectivamente;

hoja y tallo de la muestra 2 con 637.52 y 284.5 mg trolox / mg muestra respectivamente.

En general una planta que presenta un contenido alto de compuestos fenólicos presentará una actividad antioxidante mayor a lo esperado o en un caso contrario, presentará una actividad antioxidante baja por una escasez de fenoles; pero esto nos indica que capacidad antioxidante de la planta se da por un efecto combinado: presencia de otro tipo de metabolitos antioxidantes.

Tabla 1. Contenido de compuestos fenólicos, taninos y flavonoides en extractos de chicalote.

Muestra	Fenoles mg AG / mg muestra	Taninos mg cat / mg muestra	Flavonoides mg rut / mg muestra
Raíz 1	296.7± 0.0036	0.72 ± 0.0030	42.82± 0.004
Raíz 2	150.7± 0.0015	0.37 ± 0.0047	42.18± 0.0006
Raíz 3	168.2± 0.0034	0.38 ± 0.0042	45.07±0.0051
Hoja 1	280± 0.00083	1.528 ± 0.001	110± 0.002
Hoja 2	267.1± 0.002	1.923±0.0018	146.71± 0.007
Hoja 3	262.2± 0.0014	1.553±0.0013	121.14± 0.002
Fruto 1	384.16± 0.001	0.858 ±0.005	132.78± 0.002
Fruto 2	230.7± 0.003	0.765±0.0021	55.09± 0.0011
Fruto 3	242.8± 0.005	0.759±0.0008	64.45± 0.0030
Tallo 1	130.5± 0.0016	0.332±0.0022	35.38± 0.003
Tallo 2	146.7± 0.0091	0.311±0.0028	37.07± 0.0018
Tallo 3	185.8± 0.0039	0.442±0.0006	43.35± 0.0937

Tabla 2. Contenido de actividad antioxidante ABTS y DPPH en extractos de chicalote.

Muestra	DPPH mg trolox / mg muestra	ABTS mg trolox / mg muestra
Raíz 1	565.6± 0.0169	506.7± 0.0105
Raíz 2	316.9± 0.001	346± 0.0096
Raíz 3	371.4± 0.0032	383.2± 0.0018
Hoja 1	551.9± 0.0124	496.3± 0.0155
Hoja 2	461.7± 0.0088	637.52± 0.011
Hoja 3	465.2± 0.0034	473.8± 0.0090
Fruto 1	739.7± 0.0156	729.9± 0.0031
Fruto 2	582.8± 0.0065	588.8± 0.0074
Fruto 3	404.2± 0.0064	399.35± 0.003
Tallo 1	233.1± 0.0141	170.18± 0.106
Tallo 2	280.51± 0.01	284.5± 0.0026
Tallo 3	321.12± 0.01	266.9± 0.0013

Se observa que se mantienen constantes los valores altos de raíz y fruto para la muestra 1 y hoja de la muestra 2, siendo conveniente el analizar con más detalle dichas partes de la planta de chicalote para tener un conocimiento más amplio de su relación con el hombre y su uso para tratar padecimientos.

Conclusión

Se ha determinado y cuantificado el contenido de fenoles, flavonoides, taninos y la actividad antioxidante de la planta del chicalote, una especie perteneciente a las 4, 500 plantas medicinales que posee México con alto potencial farmacológico, medicinal y tecnológico. Encontrando altos valores para cada una de sus partes: raíz, fruto, hoja y tallo, lo cual sustenta sus usos tradicionales para el tratamiento de padecimientos. Dejando especial interés en el seguimiento del análisis más a detalle.

Agradecimientos

Mi agradecimiento a la dirección Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Querétaro por la oportunidad de participar en el Verano de la Ciencia edición 2022. Al Laboratorio de Metabolitos y Nanocompositos de la Universidad Autónoma de Querétaro en Campus Aeropuerto.

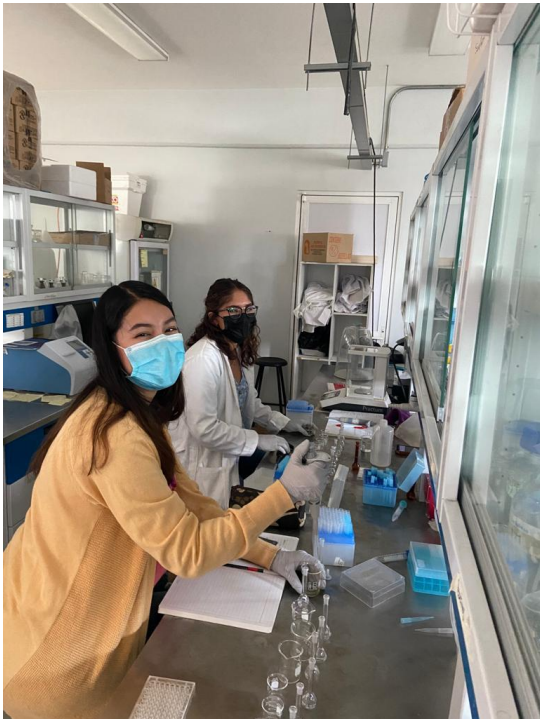
A la Dra. Angelica Feregrino Pérez por compartir su conocimiento y abrir las puertas de su laboratorio para sembrar la pasión por la ciencia.

A Paola Aguilar por su gran colaboración, comprensión como compañera de verano. Y a cada una de los estudiantes que vamos por el mismo sueño, dedicarnos a la ciencia.

Referencias

- [1] Argueta Villamar, A., Cano-Asselein, L., & Rodante, M. E. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana (Vol. 3). México: Instituto Nacional Indigenista
- [2] CONABIO (Ed.). (22 de Febrero de 2020). Papaveraceae. Recuperado de Argemone ochroleuca Sweet: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/papave>
- [3] Leticia Hernández Martínez, A., Armando, J., Jauregui, C., Cruz, D. C., & Villegas Gómez, C. (Ene de 2020). "Chicalote" Argemone ochroleuca Sweet: La Gran Fábrica de Alcaloides.
- [4] Reveles Saucedo, Fanny Olivia, Rosales Serna, Rigoberto, Nava Berúmen, Cynthia Adriana, Delgado Licón, Efrén, Cuéllar Robles, Evenor Idilio, Carrete Carreón, Francisco Óscar, & Ríos Saucedo, Julio César. (2010). Identificación de especies vegetales con potencial para la producción de biocombustibles líquidos en Durango, México. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 1(1), 45-54. Recuperado en 13 de agosto de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&id=S2007-09342010000100005&lng=es&tlng=es.
- [5] Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (29 de Marzo de 2021). Plantas medicinales de México. Gobierno de México. Recupero de: www.gob.mx

Galería fotográfica



El uso de “como” y “así” en las citas directas del habla de jóvenes Queretanos.

Buentello Velasco Gabriela
Directora del proyecto y asesora: Dra. Juliana De la Mora Gutiérrez
Universidad Autónoma de Querétaro
Correos de contacto:
gabrielabuentellovelasco@gmail.com
juliana.delamora@uaq.edu.mx

Resumen.

El estudio del discurso directo en la lingüística es muy importante para entender como las lenguas varían y cambian (Tagliamonte y Hudson, 1999). El objetivo de este trabajo es analizar desde una perspectiva sociolingüística, el uso de los marcadores “como” y “así” usado por jóvenes queretanos para introducir discurso directo en una conversación.

Palabras clave: Sociolingüística, Citas directas, Discurso Directo.

Abstract.

The study of reportatives its very important to understand linguistic variation and change (Tagliamonte y Hudson, 1999). The goal of this study is to analyze the use of quotative markers “así” and “como” in young Mexican speakers

Key words: Sociolinguistics, Reportatives, Direct Speech

1. Introducción

El estudio de las citas directas ha llamado la atención de más de un investigador, fundamentalmente para analizar el cambio y variación lingüística de estos (De la Mora, 2018,

Tagliamonte y Hudson, 1999). Además, su estudio permite entender cómo este funciona en el interior de la narración oral (Camargo, 2005) así como en ámbitos bilingües (Holguín, 2015).

Los estudios recientes en el español mexicano (De la Mora, 2018; De la Mora y Reig (en preparación); Holguín 2015) han mostrado que el sistema lingüístico para introducir discurso directo está en proceso de cambio. Por ello es importante documentar los usos innovadores especialmente aquéllos observados en el habla adolescente. sí el objetivo de este trabajo es documentar el uso de “como” y “así” para introducir citas con diferentes contenidos, ya sean realis, situacionales o hipotéticas (Buchstaller 2001).

Buchstaller (2001) sugiere que el contenido de las citas pueden clasificarse en tres grupos a) *realis*, las que tienen como característica principal ser reproducciones reales de actos de habla que sucedieron en el pasado; b) *hipotéticas*, que expresan opiniones, pensamientos o emociones y se podría decir que estas citas tienen una función apreciativa, según Vincent y Perrin (1999: 297) esto quiere decir que estas citas son evaluaciones que no mueven la historia hacia delante, y por último c) *situacionales*, que se refieren a comunicativas del presente, no narran acontecimientos del pasado y la cita se puede entender como un comentario referente a lo que está pasando.

Los marcadores ‘como’ y ‘así’ en el discurso

Lo que más podemos destacar de la función de “cómo” y “así” en los marcadores de citas directas tenemos que ambos son atenuadores o aproximadores, como nombra Briz (2001 y 2003). La atenuación se puede entender como un método de cortesía, en el que se mitiga la fuerza ilocutiva del habla, Briz habla de esta mitigación con “como” pero no desde la perspectiva de las citas directas. De igual forma Punussis y San Martín (2017) hablan desde las dos perspectivas del “como”, en forma de atenuante y de cita, mencionan lo que Montecino (2004) dijo respecto a que también funciona para que uno de los participantes “no se responsabiliza de aplicar el contenido de su predicado en toda su intensidad semántica”.

Por otro lado, también tomamos en cuenta que las citas en discurso directo no siempre son completamente fieles a lo que se dijo o se pensó. Punussis y San Martín (2017) resaltan que este carácter mitigador en las citas directas se relaciona con su índole comparativa y por esto, en la función introductoria de citas se aprecian rastros de esta índole. En el caso de “así”, estos autores han destacado su combinación con “cómo” y el verbo copulativo “ser”, también como un aproximativo a la cita, lo cual se observa también en otras lenguas con las formas equivalentes como en el caso de la forma “Be like” estudiada particularmente por Tagliamonte (2009, 2016).

Hipótesis:

A partir de la base semántica del marcador “como” en calidad de adverbio aproximante y de la base semántica de “así” a modo de adjetivo, cuya función es marcar la similitud o la semejanza; se espera que los marcadores de citas directas tendrán un valor atenuante en las citas que introducen, pero que las citas con “así” serán las encargadas de aproximar a contenido real y situacional (lo dicho) y las citas con “como” a contenido hipotético (pensado).

Objetivos:

El objetivo principal de esta investigación es analizar la frecuencia, distribución y la función de los marcadores de citas directas “como” y “así” en el discurso de jóvenes universitarios del estado de Querétaro. Asimismo se pretende indagar en las diferencias o posible especialización de dichos marcadores.

2. Metodología

2.1 Corpus y extracción de datos

Las muestras de habla que se utilizaron para esta investigación pertenecen al corpus sociolingüístico CORSO UAQ que consta de entrevistas sociolingüísticas recopiladas entre los años 2016 y 2021 por estudiantes Universidad Autónoma de Querétaro. Dicho corpus está conformado por 16

conversaciones grabadas con una duración aproximada de 15 a 20 minutos que fueron transcritas y etiquetadas para identificar los casos de discurso directo o discurso reportado.

Respecto a la caracterización sociolingüística de los participantes todos corresponden a un nivel alto educativo, siendo estudiantes de licenciatura en la UAQ, jóvenes entre 18 y 25 años y residentes con antigüedad de 10 años o más del estado de Querétaro.

Para el análisis de datos se recopilaron todas las citas directas hechas por los hablantes jóvenes dando un total de 299 citas, estas se ordenaron en una hoja de cálculo de excel en la cual se clasificó cada cita con su respectivo marcador de cita, siguiendo la clasificación de De la Mora (2018).

2.2 Clasificación y codificación de datos según introductores de citas

1. *Dicendi*. Se separaron aquellas citas directas introducidas con un verbo dicendi. (dijo, reportó, gritó, etc).

- (1) voy a decir “demonios ya estoy afuera de la universidad ahora qué” (risas) (CORSO UAQ, 5)
- (2) dije/ “no/ igual y voy a tener que” (CORSO UAQ, 34)
- (3) mi papá me dijo “ya no estoy para esas cosas que hicimos el sábado” (CORSO UAQ, 253)

2. *Y(FN)*. Para esta clasificación se agruparon las citas directas introducidas por una frase nominal, léxica o pronominal acompañada por la conjunción (Y). (Ver De la Mora, 2018)

- (4) y todos // “güey/ estamos en seminario/ estamos leyendo a pizarnik/ ¿qué pedo contigo?” (CORSO UAQ, 277)

3. *Marcador Nulo*. Al introducir la cita, hay un cambio de entonación, pero no hay marca lingüística que introduzca la cita.

- (5) le marcó para/ la puso en altavoz Ø/ “¿por qué te detuviste?”// (CORSO UAQ, 306)
- (6) ay/ pinche C aparte Ø “me depositaron/ güey”/ o sea (CORSO UAQ, 316)

4.Ser. Citas introducidas por alguna inflexión del verbo ser.

(7) es de/ “¡ah! sí por supuesto” (CORSO UAQ, 186)

5.Otros.

(8) lo ve y empieza “ah ah” (CORSO UAQ, 274)

6.Así.

(9) ya llegamos muy chingonas a hacer el examen así de “ahh pues <ps> ya no lo sabemos que” (CORSO UAQ, 235)

(10) pero E así de “no/ es que yo no quería” (CORSO UAQ, 265)

7.Como.

(11) ya le había comentado antes como de “ah está bien” (CORSO UAQ, 222)

(12) y después// como “qué pedo” (CORSO UAQ, 304)

Ya que este estudio se centra en “así” y “como” como introductores a las citas directas, dividimos todos los datos en los que estos aparecieran en conjunto con uno o dos introductores más.

8. Como dijo.

(13) como dices/ “no es que sepa más” (CORSO UAQ, 39)

9. *Dicendi* (así, como, así como).

(14) yo decía así de “¡hay no mames <mam>!” (CORSO UAQ, 241)

(15) dices como/ “¡ah! mucho gusto soy P/ ¿quieres ir a cenar mañana?” (CORSO UAQ, 189)

(16) le dijo algo así como “ay: /el otro día aquí mataron a un señor (CORSO UAQ,)

10. Y(FN) (así, como, así como).

(17) y yo así de “ay no dios mío [no no me voy a convertir en ellos” ¿no?] (CORSO UAQ, 84)

(18) y nosotros como de “ah”/ (CORSO UAQ, 208)

(19) y yo así como de que/ “pues <~ pos> de que estás hablando ¿no?” (CORSO UAQ, 81)

11.SER (así, cómo, así como)

(20) era así de// “te hago lo que quieras pero dame tu torta”] (CORSO UAQ, 32)

(21) fue como “¡ah existen!”[(risa)] (CORSO UAQ,1)

2.3 Clasificación de los datos según el contenido de la cita

Posteriormente determinamos el contenido de las citas por en realis, situacionales e hipotéticas, siguiendo la propuesta de Buchstaller (2001):

a) Realis.

(22) y me dijo “ah mira/ te presento a mi novia” (CORSO UAQ, 146)

(23) y a mí me dijeron “no pues <pus> pon tu casa de una vez ahí ahorita <orita> que se ve todo” (CORSO UAQ, 159)

b) Situacionales

(24) siempre todas las personas “no es que pobrecitos no/ no socializan con nadie porque están todo el día en su casa y no/ no tienen compañeros de la escuela” (CORSO UAQ, 48)

c) Hipotéticas.

(25) o sea yo dije/ “no pues <~ps> no quiero// terminar mucho más grande/// que ahorita que ya lo veo así hacia atrás/ realmente no era tanto”

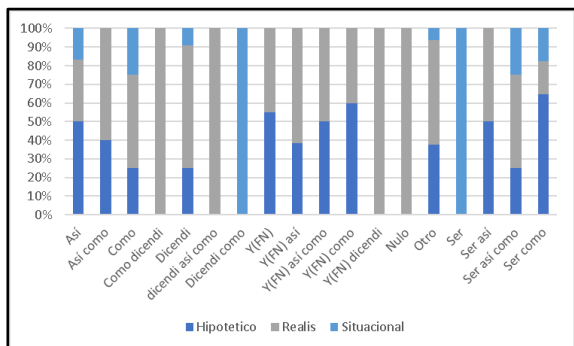
3. Resultados

3.1 Distribución general

Para la distribución general de las citas según su contenido, tomamos en cuenta todos los marcadores de citas directas que se encontraron en el CORSO UAQ y presentamos estos datos en la Gráfica 1. Estos datos muestran una inclinación por ciertos marcadores a tener cierta especialización de acuerdo

con el contenido que introducen ya sea hipotético, realis o situacional.

De esta gráfica podemos destacar que la gran mayoría de los marcadores pueden ser utilizados para cualquier tipo de contenido, sin embargo, se observan tendencias de algunos marcadores para introducir actos de habla o pensamientos.

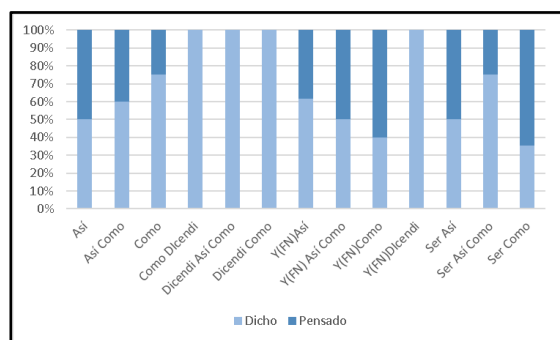


Gráfica 1. Marcadores de cita según su contenido

3.2 Marcadores con “como” y “así”. Entre lo dicho y lo pensado

En la siguiente gráfica, podemos observar más a detalle las diferencias entre lo dicho y lo pensado. En este caso se observa una preferencia por los hablantes para utilizar las citas introducidas por un verbo dicendi+así, así como, como, para referirse a actos de habla realizados, es decir a lo dicho. En este caso podemos concluir que lo que influye al contenido de la cita es el verbo *dicendi*.

Para los demás marcadores, al igual que en la distribución general, el uso de los marcadores con “como” o “así” puede ser usado para ambas categorías de cita (dicho y pensado).



Gráfica 2. Distribución de citas por contenidos dichos y pensados

3.4. “Como” y “así” especialización hacia lo dicho y lo pensado.

Con la finalidad de determinar las posibles diferencias entre las citas que introducen actos de habla y pensamiento, así como la posible especialización de los marcadores “así” y “como” se recodificaron los datos en dos categorías, considerando por un lado lo dicho y lo pensado y por el otro la presencia de “así” y de “como”. La Tabla 1, muestra los porcentajes para las citas que introducen lo dicho y lo pensado, así como la presencia de “así” y “como”.

	Dicho	Pensado	N
Contiene “así”	57.78%	42.22%	45
Contiene “como”	48.28%	51.72%	29

Tabla 1. Distribución y porcentajes de contenido de las citas que contienen “así” y “como”

Los resultados muestran que, aunque la diferencia no es muy grande, las citas que contienen “así” tienden a introducir actos de habla, mientras que las citas que contienen “como” tienen una ligera tendencia a introducir pensamientos del hablante.

4. Discusión y conclusiones

A partir de los resultados previos, podemos concluir de manera preliminar que los marcadores “así” y “como” muestran una tendencia a introducir actos de habla en el caso de “así” y pensamiento en el caso de “como”. Esto coincide con la base semántica que ambas formas tienen: “como” aproxima lo dicho y “así” marca la similitud o la semejanza. Se presenta una ligera inclinación por parte de los marcadores de citas con “así” a introducir contenido dicho y por parte de “cómo” al lado contrario, inclinándose a lo pensado o hipotético. Esto por lo tanto “así” funciona como un atenuador a la realidad, mientras de “cómo” mitiga o se deslinda la responsabilidad de pensamiento o hipotético. Aunque hay que tener en cuenta que es necesario analizar más datos para

llegar a una conclusión más certera sobre esta afirmación. Finalmente, también se observó que entre los jóvenes Queretanos, los marcadores con *dicendi* tienen la tendencia a introducir lo dicho y lo pensado se ha movido a nuevos marcadores de cita como los descritos en este reporte.

Agradecimientos:

Me gustaría expresar mi agradecimiento a la Doctora Juliana De la Mora, ya que fue una guía increíble en esta investigación, hizo que esta experiencia fuera llena de nuevo conocimiento y muy divertida. También quiero agradecer a Vanessa Díaz, quien me ayudó con ideas cuando me quedaba atascada. A mis padres por apoyarme a estudiar lejos de casa y a Julie Ponce por ser un gran apoyo en mi vida.

Referencias:

Buchstaller, I. (2001). He goes and I'm like: The new quotatives re-visited. *New Ways of Analyzing Variation in English (NWAVE)*, 30, 11-13.

De la Mora Gutiérrez, J. (2018). Las citas directas en el habla de la Ciudad de México. *Anuario de Letras. Lingüística Y Filología*, 6(2), 145.
<https://doi.org/10.19130/iifl.adel.6.2.2018.1521>

Fernández, L. C. (2004). Cuando "decir" equivale a "pensar": la función evaluadora de las citas directas en la conversación en español. *Interlingüística*, (15), 237-246.

Holguín Mendoza, C. (2015). Pragmatic functions and cultural communicative needs in the use of 'y yo' and 'así' ('be+ like') among Mexican bilingual youth. *Sociolinguistic change across the Spanish-speaking world: Case studies in honor of Dr. Anna Maria Escobar*, 57-92.

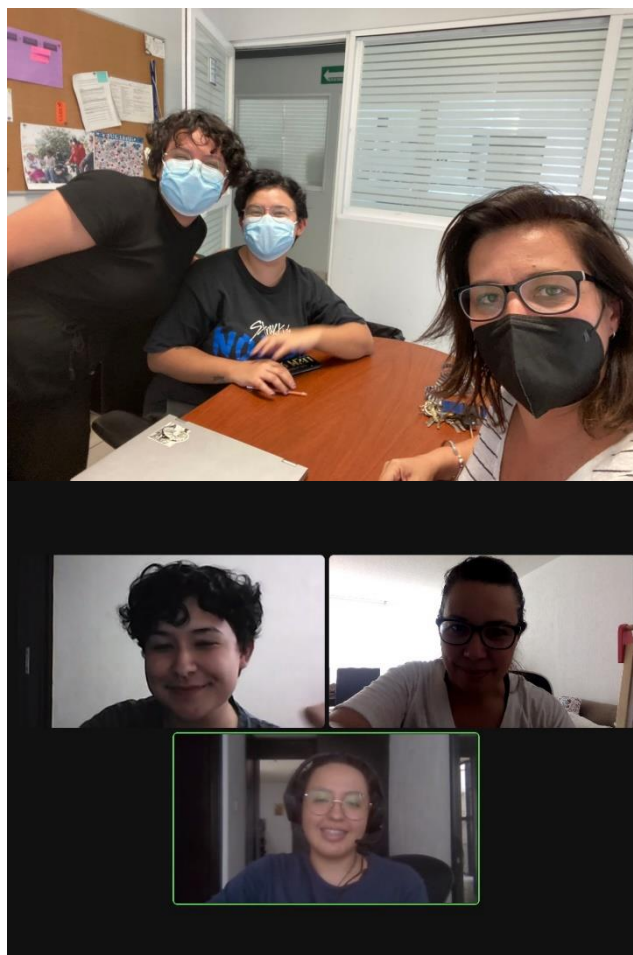
Lyon, C., & San Martín, Abelardo. (2017). *Como (que) y sus funciones discursivas en el habla santiaguina: análisis pragmático y sociolingüístico*. 55, 39-61.
<https://doi.org/10.4067/S0718-48832017000200039>

Montecino, L. A. (2004). Estrategias de intensificación y de atenuación en la conversación coloquial de jóvenes chilenos. *Onomázein*, (10), 9-32.

Tagliamonte, S. A. (2016). *Teen Talk : the Language of Adolescents*. Cambridge University Press.

Tagliamonte, S., & Hudson, R. (1999). Be like et al. beyond America: The quotative system in British and Canadian youth. *Journal of Sociolinguistics*, 3(2), 147-172.

Galería fotográfica:



VERANO DE LA CIENCIA 2022

SOMOSUAQ
SERVIR. CONSTRUIR. TRANSFORMAR.

Efecto de hormonas esteroideas sobre la reacción acrosomal del espermatozoide humano.

Investigadores: 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 esteroideas 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 spermatoc travel, fundamental for human's life cycle, requires specific quality parameters which can determine viability of cells. If these factors are negative, then spermatoc 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 Mannowetz'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 esperma *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).

Mannowetz 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.

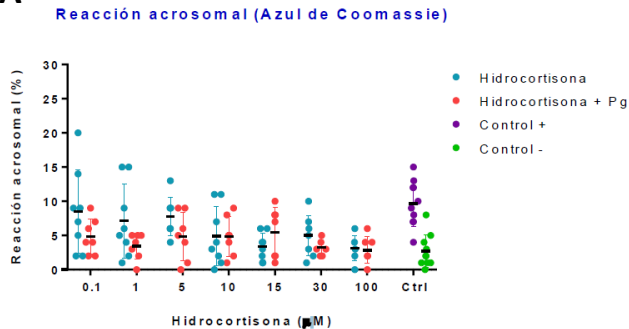
Tinción con Azul de Coomassie

Para fijar los espermatozoides se agregaron 100 μ L 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 μ L de PBS y se tomaron 50 μ L de cada vial para realizar los frotis.

A



B

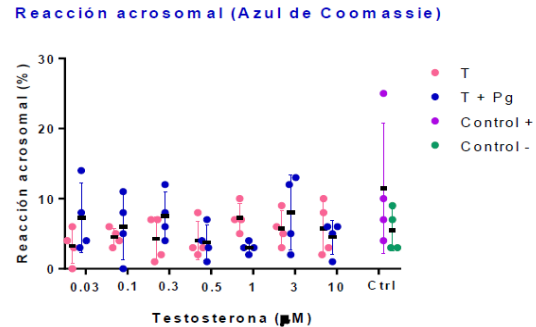


Fig. 1 Porcentajes de reacción acrosomal espermática (RA) a distintas concentraciones de las hormonas objetivo, A) representa el comparativo de porcentajes al utilizarse hormona Hidrocortisona ($n=11$), B) muestra los resultados en distintas concentración.

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.

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

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.

Estandarización de la técnica de metilación del promotor del gen de adiponectina en tejido adiposo visceral humano

José Bernardo Rodríguez-Hernández¹, Paula Noemí Solís Reséndiz², Paulina Estrella-Ibarra^{3,4}, Pablo García-Solís⁴

¹Estudiante, Ingeniería en Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México; jrodriguez167@alumnos.uaq.mx

²Estudiante, Ingeniería Biomédica, Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México; psolis03@alumnos.uaq.mx

³Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México; pestrella24@alumnos.uaq.mx

⁴Centro de Investigación Biomédica Avanzada, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México; pablo.garcia@uaq.mx

Resumen.

La adiponectina es una adipocitocina implicada en una aumento a la sensibilidad a la insulina. Se ha descrito que personas con obesidad presentan hipoadiponectinemia relacionada con el desarrollo de resistencia a la insulina. En el presente trabajo se inicio la estandarización de la técnica de metilación del gen de la adiponectina en tejido adiposo visceral humano usando la técnica de bisulfito y reacción en cadena de la polimersa punto final. Se hicieron gradientes de temperatura para determinar la temperatura de alineación de los oligos para las regiones ricas en CpG, R1 y R2, del promotor del gen de adiponectina.

Palabras clave: Epigenética, Adiponectina, metilación, tejido adiposo.

Summary.

Adiponectin is an adipocytokine involved in an increase in insulin sensitivity. It has been described that people with obesity present a reduction in the serum concentration of adiponectin and consequently the development of insulin resistance. In the present work, the standardization of the adiponectin gene methylation technique in human visceral adipose tissue using the bisulfite reaction technique and endpoint polymerase chain reaction was initiated. Temperature gradients were performed for the oligonucleotide alignment temperature for the CpG-rich regions, R1 and R2, of the adiponectin gene promoter.

Keywords: Epigenetics, adiponectin, methylation, adipose tissue.

Introducción.

La Organización Mundial de la Salud define al sobrepeso y la obesidad como “una acumulación excesiva de grasa que supone un riesgo para la salud” [1]. Más que el exceso de grasa corporal es la disfunción del tejido adiposo la que parece ser responsable del desarrollo de enfermedades metabólicas como la resistencia a la insulina (RI), la cual juega un papel clave en el desarrollo de diabetes mellitus 2 (DM2) [2]. No existen datos nacionales de la prevalencia de RI en México, algunos estudios reportan una prevalencia del 9-12% en hombres y del 16% en mujeres [3,4] De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2016, la prevalencia nacional de DM2 es del 9.4% [5].

El tejido adiposo es considerado un órgano endócrino que sintetiza diferentes moléculas activas a las cuales se les conoce como adipocitocinas [6]. La adiponectina es una adipocitocina que se sintetiza de manera exclusiva en el tejido adiposo, y posee propiedades antidiabéticas y antiinflamatorias [7]. La adiponectina disminuye la RI al incrementar la oxidación de ácidos grasos, vía la activación de AMPK y el PPAR α [8]. En el músculo la

adiponectina aumenta la sensibilidad a la insulina al favorecer la translocación del GLUT4 [9]. La adiponectina ejerce sus propiedades antiinflamatorias al inhibir la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales mediante la inactivación del factor de transcripción NF- κ B [10]. La hipoadiponectemia se ha asociado al desarrollo de RI, DM2, hipertensión arterial, síndrome metabólico, dislipidemias y enfermedades cardiovasculares [11]. En un estudio con 1134 participantes el cual tuvo un media de seguimiento de 9.4 años, Lindberg et al. [12] demostraron que bajas concentraciones de adiponectina se asocian a mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico independientemente del sexo, la edad, tabaquismo, actividad física, presión arterial, glucemia e índice de masa corporal. En un estudio de cohorte el cual tuvo una media de seguimiento de 18 años, Koenig et al. [13] encontraron que mayores concentraciones de adiponectina resultan en un factor protector para DM2 y enfermedades cardiovasculares. La obesidad, se ha asociado a una alteración en el patrón de secreción de adipocitocinas que incluye la disminución de los niveles de adiponectina [14]. Sujetos obesos presentan menores concentraciones de adiponectina en relación a aquellos normopeso y sus concentraciones se han asociado negativamente con marcadores de adiposidad [15, 16]. Se ha demostrado que existe una menor expresión de adiponectina en tejido adiposo visceral (TAV) y subcutáneo de sujetos obesos. Los mecanismos por los cuales se reduce la expresión de adiponectina no han sido elucidados [18].

Por otra parte, la epigenética constituye uno de los mecanismos de regulación de la expresión génica, esta se define como cambios mitóticamente heredables en la expresión génica sin que ocurran cambios en el ADN [18]. Los mecanismos epigenéticos incluyen la metilación del DNA, la acetilación de histonas y los micro RNAs [18]. La metilación del ADN inhibe la expresión génica ya que interfiere con la unión de factores de transcripción y ayuda a la compactación de la cromatina. La metilación del ADN se lleva a cabo en citocinas que forman dinucleótidos con guaninas a las cuales se les conoce como islas CpG

que están presentes en las regiones promotoras de los genes [18]. En los humanos se conocen 2 regiones de islas CpG en el promotor de adiponectina, la primera (R1) se encuentra a -74 pb del inicio de la transcripción mientras que la segunda (R2) se encuentra a -283 pb [19].

Estudios han encontrado una asociación directa entre el grado de metilación del promotor del gen de adiponectina en tejido adiposo, con el índice de masa corporal, la circunferencia de cintura, colesterol total, colesterol-LDL y TNF- α [20, 21]. En adolescentes obesos con RI, se ha reportado un menor porcentaje de metilación en el promotor del gen de adiponectina en leucocitos, con respecto aquellos obesos sin RI [19]. Debido a que los patrones de metilación del DNA son tejido-específicos, se desconoce la exactitud con la que los leucocitos reflejan los patrones de metilación del tejido adiposo [18].

Objetivos.

Estarizar la técnica de análisis de metilación con bisulfito y PCR punto final del promotor de la adiponectina en tejido adiposo visceral humano (TAV).

Metodología.

Aspectos bioéticos. El proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la UAQ. Los participantes lo hicieron de manera voluntaria y dieron su consentimiento informado. El estudio se realizó con la autorización de la Secretaría de Salud y el Hospital General del Estado de Querétaro.

Extracción de ADN total y evaluación de su integridad. Se obtuvieron muestras de TAV de pacientes mayores de edad que fueron sometidos a cirugía lectiva. El ADN genómico se purificó de las muestras del TAV con el estuche *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen), siguiendo las especificaciones del fabricante. La integridad del ADN genómico total purificado de TAV se visualizó con electroforesis de geles de agarosa (1.5%) teñidos con *GelRed* (Biotium).

Tratamiento con bisulfito y PCR punto final. Una vez obtenido el ADN genómico se hizo una conversión con bisulfito con el estuche *EpiTect Bisulfite* (Qiagen), siguiendo las especificaciones del proveedor. El reactivo con bisulfito convierte las citocinas no metiladas en uracilo mientras que a las citocinas metiladas las deja intactas. El ADN tratado con bisulfito fue amplificado por PCR utilizando el estuche de *PCR AllTaq Master Mix* (Qiagen), esto permite el análisis específico de sitios CpG, debido a que la polimerasa no es capaz de extender la cadena de ADN en presencia de *miss-matches*. Se utilizaron oligonucleótidos previamente validados para análisis de las islas CpG en el promotor del gen de adiponectina localizadas las posiciones -74 y -238 pb nativas al sitio de inicio de la transcripción.

Resultados.

En la **Figura 1** se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de las muestras de ADN genómico obtenido de TAV.

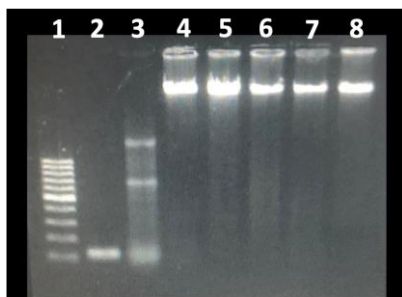


Fig. 1. Gel representativo de electroforesis de las muestras de ADN de tejido adiposo visceral. Carriles, 1: Marcador de peso molecular; 2: Amplicón producto de PCR; 3: Muestra de ARN total de tejido adiposo; 4-8 Muestras de ADN genómico obtenidas de tejido adiposo. Tinción con GelRed (Biotium).

En la **Figura 2**, se muestra una electroforesis en gel de agarosa donde se observan productos de PCR con gradiente de la región R1 del promotor de la adiponectina de muestras de ADN tratadas con bisulfito de dos pacientes. En el paciente 01 no se amplificó la R1 del gen de adiponectina lo que indica que no se encuentra metilada mientras que en paciente 02 si hubo amplificación.

En la **Figura 3**, se muestra una electroforesis en gel de agarosa donde se observan productos de

PCR con gradiente de la región R2 del promotor de la adiponectina de muestras de ADN tratadas con bisulfito de dos pacientes. En el paciente 01 no se amplificó la R2 del gen de adiponectina lo que indica que no se encuentra metilada mientras que en el paciente 02 si hubo amplificación.

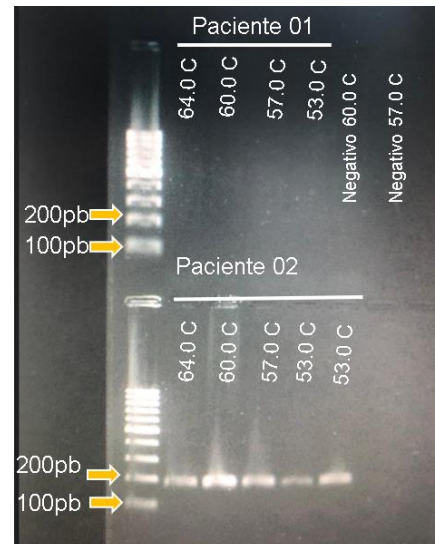


Fig. 2. Gel de electroforesis de productos de PCR de la región R1 del promotor de la adiponectina de tejido adiposo visceral tratados con bisulfito. Se realizó un gradiente de temperaturas para identificar la temperatura de alineación de los oligonucleótidos. La muestra del paciente 1 no amplificó y el paciente 2 se observa el amplicón de 181 pb.



Fig. 3. Gel representativo de electroforesis de productos de PCR de la región R2 del promotor gen de adiponectina de tejido adiposo visceral tratadas con bisulfito. Tamaño esperado del amplicon es de 186 pb. Carriles, 1: peso molecular, 2: Paciente 1 a 64°C; 3: Paciente 2 a 64°C; 4: Paciente 1 a 60°C; 5: Paciente 2 a 60°C; 6: Control negativo a 60°C; 7: Paciente 1 a 57°C; Carril 8 paciente 2 a 57 °C.

Discusión y Conclusiones.

Respecto a la purificación de ADN se obtuvieron muestras integras de ADN genómico extraído de

TAV humano de diferentes pacientes. Esto es evidente al mostrar una sola banda de alto peso molecular. Para el contraste del peso molecular se observa las evidencias con muestras de RNA total, un producto de PCR y un marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb.

En las **Figuras 2 y 3** se observa la amplificación de los productos de PCR de las regiones R1 y R2 del promotor del gen de adiponectina en muestras de ADN tratadas con bisulfito. Los tamaños de los amplicones corresponden a los esperados de 181 pb y 186 pb para las regiones R1 y R2, respectivamente.

En conclusión, se purificaron de forma adecuada las muestras de ADN de tejido adiposo, la técnica de bisulfito permitió observar diferencias entre sujetos en la metilación de las regiones R1 y R2 del promotor del gen de la adiponectina.

Agradecimientos.

Agradezco a la maestra Paulina Estrella que en todo momento nos asesoró y con mucha amabilidad respondió nuestras dudas, al Dr. Pablo García Solís y a mis padres por apoyarme con el transporte a la universidad. El presente proyecto fue financiado parcialmente por el FONDEC-UAQ 2019 (FME-2020-03).

Referencias bibliográficas.

1. WHO, World Health Organization, "Obesity and overweight" [Internet]. 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
2. V. Saini., "Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus", *World J Diabetes*, Vol. 1, Issue 3, pp 68, 2010.
3. M. Murguía-Romero, J.R. Jiménez-Flores, S.C. Sigrist-Flores, D.C. Tapia-Pancardo, R. Méndez-Cruz R, Villalobos-Molina R. "Prevalence of metabolic syndrome in young Mexicans: a sensitivity analysis on its components". *Nutr Hosp.*, Vol. 32, Issue 1, pp 189–95, 2015.
4. F. Guerrero-Romero, R. Villalobos-Molina, J.R. Jiménez-Flores, L. E. Simental-Mendia, R. Méndez-Cruz, M. Murguía-Romero, Rodríguez-Morán. "Fasting triglycerides and glucose index as a diagnostic test for insulin resistance in young adults", *Arch Med Res.*, Vol. 47, pp 382–387, 2016
5. M. Ávila-Hernández, J. Dommarco-Rivera, S.L. Levy, L. Cuevas-Nasu, L. Gómez-Acosta, E. Gaona-Pineada et al., "Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016". Cuernavaca, México; 2016.
6. M. Masoodi, O. Kuda, M. Rossmeisl, P. Flachs, J. Kopecky, "Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism", *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1851, Issue 4, pp. 503–518. 2015.
7. K. Ghoshal, M, Bhattacharyya, "Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity", *World J Diabetes*, Vol. 6, Issue 1, pp.151–166, 2015
8. M. J. Yoon, G. Y. Lee, J. J. Chung, Y. H. Ahn, S. H. Hong, J.B. Kim, "Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha", *Diabetes*, Vol. 55, Issue 9, pp. 2562–2570, 2006.
9. X. Mao, C.K. Kikani, R.A. Riojas, P. Langlais, L. Wang, F.J. Ramos et al., "APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function", *Nat Cell Biol*. Vol. 8, Issue 5, pp. 516-526. 2006.
10. N. Ouchi, S. Kihara, Y. Arita, Y. Okamoto, K. Maeda, H. Kuriyama et al., "Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-KappaB signaling through a cAMP-dependent pathway", *Circulation*, Vol. 102, Issue 11, pp. 1296–1301, 2000.
11. M. Hossain, A. Mukheem, T. Kamarul, "The prevention and treatment of hypo adiponectinemia-associated human diseases by up-regulation of plasma adiponectin", *Life Sci*, Vol. 135, Issue 55–67, 2015.
12. S. Lindberg, J. Jensen, M. Bjerre, A. Frystyk, A. Flyvbjerg, J. Jeppesen et al. Low adiponectin levels at baseline and decreasing adiponectin levels over 10 years of follow-up predict risk of the metabolic syndrome. *Diabetes Metab*, Vol. 43, Issue 2, 134-139.
13. W. Koenig, N. Khuseynova, J. Baumert, C. Meisinger, H. Lowel H, "Serum concentrations of adiponectin and risk of type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease in apparently healthy middle-aged men: results from the 18-year follow-up of a large cohort from southern Germany", *J Am Collage Cardiol*, Vol. 48, Issue 7, pp. 1369–77, 2006.
14. C. Zou, J. Shao, "Role of adipocytokines in obesity-associated insulin resistance", Vol. 19, Issue 5, pp. 277–286, 2008.
15. G. Derosa, E. Fogari, A. D'Angelo, L. Bianchi L, A. Bonaventura, D. Romano, et al., "Adipocytokine levels in obese and non-obese subjects: an observational study. *Inflammation*", Vol. 36, Issue 4, pp. 914–920, 2013.
16. Guenther M, James R, Marks J, Zhao S, Szabo A, Kidambi S. Adiposity distribution influences circulating adiponectin levels. *Transl Res*. 2014;164(4):270–7.
17. Lihn AS, Bruun JM, He G, Pedersen SB, Jensen PF, Richelsen B. Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;219(1–2):9–15.
18. C. Lavebratt, M. Almgren, T. J.Ekström, "Epigenetic regulation in obesity", *Int J Obes*, Vol. 36, Issue 6, pp. 757–765, 2012.
19. M. C. García-Cardona, F. Huang, J. M. García-Vivas, C. López-Camarillo, B. E. del Río Navarro, E. Navarro Olivos, et al. "DNA methylation of leptin and adiponectin promoters in children is reduced by the combined presence of obesity and insulin resistance", *Int J Obes*, Vol. 38, Issue 11, pp. 1457–1465, 2014.
20. A. Houde, C. Légaré, S. Biron, O. Lescelleur, L. Biertho, S. Marceau, "Leptin and adiponectin DNA methylation levels in adipose tissues and blood cells are associated with BMI, waist girth

and LDL-cholesterol levels in severely obese men and women”, BMC Med Genet, Vol. 16, 29.

21. A. Y. Kim, Y. J. Park, X. Pan, K.C. Shin, S-H. Kwak, A. F. Bassas et al., “Obesity-induced DNA hypermethylation of the adiponectin gene mediates insulin resistance”, Nat Commun, Vol 6, Issue, Art. 7585, 2015.

Galería Fotográfica.



Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina

Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales.

Dr. Feliciano Milian Suazo¹, M.C. Susana Lucía Sosa Gallegos², José de Jesús Saucedo Gutiérrez³.

¹Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Av. de las Ciencias s/n Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, C.P. 76230 Querétaro, México; feliciano.milian@uaq.mx

²Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las Ciencias S/N, Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, 76239 Querétaro, México; susana.lucia.sosa@uaq.mx

³Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro., Santiago de Querétaro 76010, México; jsaucedo22@alumnos.uaq.mx

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, vacuna, antígenos, PCR

Key Words: *Mycobacterium bovis*, vaccine, antigens, PCR.

Resumen.

Mycobacterium bovis es una bacteria que provoca la tuberculosis bovina, que afecta en cualquier parte del mundo, dentro de los cuales en su mayoría no han logrado eliminar o reducir. Es una enfermedad que se puede transmitir a otros animales o incluso a personas, lo cual puede generar problemas económicos en la región. Detectar a la bacteria en el ganado tiene sus dificultades y una forma de poder realizar diagnóstico es por medio de antígenos, los cuales pueden ser ESAT-6, CFP10, ESPC, y Mpt64. En este trabajo se prepararon muestras a partir de lesiones de distintos grupos de cabras para cultivarlos en medios Stonebrink, realizar tinciones de Ziehl Neelsen, extracción de ADN de los tejidos lesionados y realizar PCR para observar la especificidad para un posible

uso de prueba de diagnóstico. Al final del trabajo logramos inocular los medios Stonebrink, en la tinción se observaron pocos bacilos en las muestras, logramos extraer ADN y concluimos que la PCR es una prueba que puede detectar a la bacteria con una mayor rapidez en comparación con el cultivo de la misma, sin embargo, debe ser estandarizado con mayor detalle para los antígenos trabajados tengan mayor especificidad.

Abstract

Mycobacterium bovis is a bacterium that causes bovine tuberculosis, it is a problem that affects anywhere in the world, among which most have not been able to eliminate or reduce. It is a disease that can be transmitted to other animals or even to people, if it can't be controlled it can cause economic problems in the region. Detecting the bacteria in cattle has its difficulties and one way to make a diagnosis is through antigens like ESAT-6, CFP10, ESPC, and Mpt64. In this work, samples were prepared from lesions of different groups of goats to culture them in Stonebrink media, perform Ziehl Neelsen stains, extract DNA from the injured tissues and perform PCR to observe the specificity for a possible use as a diagnostic test. At the end of the work, we were able to inoculate the Stonebrink media, we were able to stain, but few bacilli were observed in the samples, we were able to extract DNA and we concluded that PCR is a test that can detect the bacteria more quickly compared to its culture, however, it must be standardized in greater detail so that the worked tigers will have greater specificity.

Introducción.

La tuberculosis bovina es una enfermedad que afecta directamente al ganado bovino, es ocasionada por la bacteria *Mycobacterium bovis*. Este problema afecta en la economía donde se desarrolla la enfermedad porque generan costos para programas de control y erradicación de la misma enfermedad y al mismo tiempo en costos para sacrificar al animal infectado (Sedighi, 2021). La tuberculosis bovina se transmite por el aire, su tasa de transmisión aumenta cuando a los animales se les mantiene confinados en los

establos; una vez que la bacteria es inhalada, es fagocitada por macrófagos alveolares, al ser un patógeno intracelular facultativo empezará a multiplicarse, la infección en el pulmón incrementará con el tiempo para propagarse a ganglios linfáticos, el animal seguirá con su respuesta inmune por medio de macrófagos y linfocitos T, los cuales se irán acumulando, la respuesta inflamatoria hace que haya una lesión conocida como granuloma (Collins, 2011). Para poder identificar la bacteria de tuberculosis bovina se utilizan antígenos que la misma bacteria produce, últimamente se han llevado a cabo estudios donde evalúan los polimorfismos de los mismos antígenos, y se ha demostrado que no ha habido cambios en el genoma entre las distintas bacterias que causan tuberculosis, por lo que el uso de antígenos como ESAT-6, CFP10, EspC, Mpt64 pueden ser útiles para poder llevar a cabo la detección de la bacteria en diagnósticos (Encinas, 2018). Cuando la bacteria ingresa al bovino, este tendrá respuesta inmune liberando macrófagos, la bacteria al ser internalizada libera el antígeno ESAT-6 el cual inhibirá el fagosoma para que la bacteria se pueda replicar. También permite la translocación de la bacteria del fagosoma al citosol, la región codificante del antígeno es esxA (Brandt, 2000). CFP10 es un antígeno que tiene actividad para lisar, su región codificante es esxB, y contribuye al escape microbiano del fagosoma para que induzcan la necrosis de la célula huésped y para que se puedan propagar a células adyacentes (Welin, 2014). EspC es el antígeno cuya región codificante es mb364 que provoca la apoptosis mediada por estrés en los macrófagos porque disipa el potencial transmembranal mitocondrial, lo que posteriormente provoca su apoptosis, la sobreexpresión de este antígeno aumenta significativamente la supervivencia bacteriana en macrófagos, bazo y pulmones (Guo, 2020). Por último, mpt64 es un antígeno de secreción temprana que inhibe la apoptosis en macrófagos del huésped, su región codificante es mpt64 (Wang, 2014). En este artículo nos enfocamos en preparar cultivos de muestras de tejidos de distintos bovinos que contaban con lesiones por *Mycobacterium bovis* para realizar tinciones Ziehl Neelsen, extraer ADN de

dichas muestras y posteriormente evaluar la especificidad de los primers diseñados para amplificar por PCR los genes mencionados previamente.

Objetivos.

General: Aprender el cultivo de la *M. bovis* y las principales técnicas para su detección.

Específicos: A partir de tejidos de cabras, realizar el aislamiento de la *M. bovis*, realizar sus tinciones Ziehl Neelsen, aprender preparar medios de cultivo 7H9 y evaluar la especificidad de los primers para detectar los antígenos ESAT-6, CFP10, EspC, Mpt.

Metodologías.

-Preparación de las muestras (Macerados).

Anteriormente ya contamos con muestras de tejidos (pulmón, hígado, nódulo linfoide, nódulo mesentérico) con lesión de 44 bovinos. Esterilizamos con etanol al 70% y con UV la cabina de seguridad. Dentro de la campana realizamos la búsqueda de lesiones en los tejidos de distintos bovinos. Extrajimos 1 g de tejido donde se encontraba la lesión y posteriormente descontaminamos los tejidos colocándolo en un recipiente que contenía 15 ml de NaClO 1:1000 por 20 minutos. Pasamos el tejido a un tubo CMAC con 7 ml de agua destilada estéril, licuamos con gentleMACS Dissociator con el protocolo RNA 01. Con el macerado obtenido en el tubo CMAC, pasamos 1 ml a un tubo falcón de 15 ml, el sobrante se guardó en congelación a -20 °C. Al tubo falcón con 1 ml de macerado se le agregaron 5 ml de HCl y se agregaron 2 gotas de rojo de fenol, se agito y se dejó reposar por 20 minutos. Añadimos aproximadamente 2-3 ml de NaOH hasta obtener un color lila. Centrifugamos a 3000 RPM por 20 minutos. Tiramos el sobrenadante procurando que quede una gota para que dicha gota sea inoculada en medio Stonebrink y en portaobjetos para su posterior tinción de Ziehl Neelsen. El medio Stonebrink inoculado al final se colocó a incubadora a 37 °C.

-Tinción Ziehl Neelsen.

Agregamos fucsina con calor por 1 minuto. Lavamos con agua de la llave y posteriormente agregamos la mezcla de alcohol-acetona y lo dejamos en la muestra por un minuto. Lavamos con agua de la llave. Por último, agregamos el azul de metileno por 1 minuto, se lavó y se dejó escurrir dejando el portaobjetos en posición inclinada. Colocamos los portaobjetos a horno a 70 °C por 5 minutos y observamos en microscopio.

-Preparación lisado para PCR para gradientes de temperatura.

Previamente se contaba con tres cepas cultivadas en tubos eppendorf. Las tres cepas se colocaron en baño maría a 95 °C por 30 minutos. Centrifugamos a 8000 rpm por 15 minutos, desechamos el sobrenadante, resuspendimos con 400 µL de buffer TE, agitamos con vortex, y centrifugamos a 8000 rpm por 2 minutos, desechamos el sobrenadante y resuspendimos en 400 µL de buffer TE, agitamos en vortex y se volvieron a colocar en baño maría a 95 °C por 30 minutos. Centrifugamos 12000 rpm por 5 minutos y usamos el sobrenadante como plantilla para cuantificar el ADN por Nanodrop.

-Gradientes de Temperatura para PCR

Para cada gen (esxA, esxB, mb364, mpt64 y SigA) preparamos 7 tubos eppendorf. Cada tubo se le agregaron 6.75 µL de GoTagGreen 2x, 1 µL del primer F del gen, 1 µL del primer R del gen, 2 µL de DNA y 2.5 µL de agua libre de nucleasas. La reacción de PCR la desnaturalización fue con temperatura de 95 °C por 30 segundos, para el alineamiento se utilizaron gradientes de 55.7 °C, 57.2 °C, 59.3 °C, 62 °C, 64.2 °C y 66°C por 30 segundos y para la etapa de extensión de ADN se usó la temperatura de 72 °C por un minuto. La duración de la PCR fue de 34 ciclos, el termociclador se programó para mantener las muestras a 4 °C al concluir los ciclos. Realizamos electroforesis para corroborar que se hayan amplificado los genes de interés con agarosa al 1.8%, buffer TAE fue a concentración 1x. Se mezclaron 4 µL de estándar de peso molecular con 2 µL de 6x load

dye. Usamos 6 µL de muestra y se mezclaron con 2 µL de 6x load dye. Se corrió a 75 V por 50 minutos.

-Extracción de ADN de los macerados.

Usamos 1 ml de cada macerado. Los centrifugamos a 3000 rpm por 20 minutos, tomamos 500 µL del precipitado y lo transferimos a un nuevo tubo eppendorf. Vortexeamos y añadimos 50 µL de lisozima (10 mg/ml), vortexeamos y calentamos a 37 °C por 1 hora. Agregamos 100 µL de SDS al 10% y agregamos 10 µL de proteinasa al 10 mg/ml, vortexeamos y calentamos a 65 °C por 30 minutos. Agregamos 100 µL de NaCl al 5 M, vortexeamos y agregamos 40 µL de CTAB al 10% (precalentado previamente a 65 °C), vortexeamos hasta obtener color lechoso y calentamos a 65 °C por 30 minutos. Agregamos 400 µL de fenol-cloroformo-isoamílico, vortexeamos por 10 segundos y centrifugamos a 13000 rpm por 10 min, transferimos 500 µL del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf. Agregamos 500 µL de cloroformo-isoamílico, vortexeamos y centrifugamos a 13000 rpm por 10 minutos. 500 µL del sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf. Agregamos 600 µL de alcohol isopropílico, vortexeamos y dejamos en congelación a -20 °C de 2 a 24 horas. Posteriormente centrifugamos a 13000 rpm por 15 minutos, desechamos el sobrenadante y agregamos 500 µL de etanol al 70%, vortexeamos y centrifugamos a 13000 rpm por 2 minutos y desechamos el sobrenadante. Dejamos secando el pellet mínimo 4 horas en cabina de seguridad para posteriormente resuspenderlo en 50 µL de agua libre de nucleasas. Cuantificamos ADN por Nanodrop.

-PCR de ADN de los macerados.

Por cada gen (esxA, esxB, mb364, mpt64) realizamos PCR frente a las 44 muestras de ADN de los macerados y se agregaron como control cepas de AN5, BCG, B33 y agua. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos eppendorf, colocando 6.25 de GoTagGreen, 1 del primer F, 1 del primer R, 1 de ADN de muestra y 3.25 de agua libre de nucleasas. Para la reacción de PCR la desnaturalización fue con temperatura de 95 °C por 30 segundos, para el

alineamiento se utilizaron 57.2 °C por 30 segundos y para la etapa de extensión de ADN se usó la temperatura de 72 °C por un minuto. La duración de la PCR fue de 34 ciclos, terminados se programó el termociclador para mantener las muestras a 4 °C. Se realizó electroforesis para corroborar que se hayan

amplificado los genes de interés. El gel de agarosa se preparó al 1.8%, el buffer TAE fue a concentración 1x. El buffer de carga utilizado fue el 6x load dye. Se mezclaron 3 µL de la escalera con 2 µL de 6x load dye. Se utilizaron 5 µL de muestra y se mezclaron con 2 µL del 6x load dye. Se corrió a 75 V por 50 minutos.

Resultados.

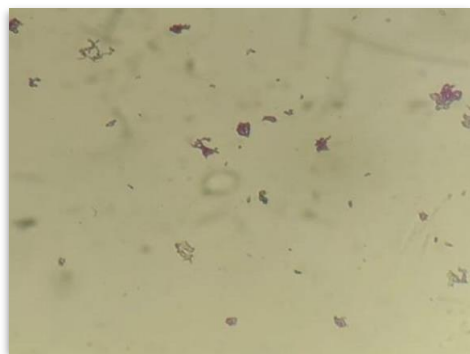


Figura 1. Tinción Ziehl Neelsen representativa de las muestras cepa 844 a 40x

Tabla 1. Agrupación de resultados de extracción de ADN, cultivo de tejido, tinción Ziehl neelsen y PCR.											
Grupo	#	Muestra	Concentración ADN	Pureza ADN	Cultivo	UFC	Ziehl Neelsen	ESAT6	CFP10	EspC	MPT64
1	1	4933	9825	1.87	-		-	-	-	-	-
	2	4992	2485	1.88	-		+	-	-	-	-
	3	4949	3764	1.87	-		-	-	-	-	-
	4	5000	1806	1.9	+		+	-	-	+	+
	5	4968	4477	1.9	+	50	-	-	-	+	+
	6	5019	652	1.76	+		+	+	-	+	+
2	7	4912	7460	1.94	+		-	-	-	-	-
	8	4820	4187	1.89	+		+	-	-	-	-
	9	4816	2225	1.82	+		-	-	-	+	+
	10	4838	8590	1.9	+		-	-	-	-	-
	11	4869	19705	1.66	+		-	-	-	-	-
	12	4879	6171	1.88	+		-	-	-	-	-
	13	4883	24.6	2.29	+		-	-	-	+	+
3	14	4920	17499	1.79	+		+	-	-	-	-
	15	4832	3104	1.87	+		+	-	-	-	-
	16	4828	4490	1.89	+		-	-	-	-	-
	17	4861	10306	1.9	+		-	-	-	-	-
	18	4855	10153	1.88	-		-	-	-	-	-
	19	4996	7801	1.84	-		-	-	-	-	-
	20	4929	7437	1.95	-		-	-	-	-	-
4	21	4888	4718	1.97	+		-	-	-	-	-

	22	4899	5499	1.84	+		-	+	-	+	+
	23	4909	11280	1.9	+		-	-	-	-	-
	24	4924	10902, 5398	1.88	+		-	-	-	-	-
	25	4847	7799	1.83	+		-	-	-	-	-
	26	4851	71.3	1.94	+		-	-	-	+	-
	27	5005	7759	1.92	-		-	-	-	-	-
	5	28	4894	12520, 3498, 4157	1.84	+			-	-	-
29		4905	18377	1.77	+			-	-	-	-
30		4916	16064	1.84	+			-	-	-	-
31		4824	19754	1.66	-			-	-	-	-
32		4843	38.8	2.04	-			-	-	+	-
33		4859	18862	1.71	-			-	-	-	-
34		4874	7393	1.82	-			-	-	-	-
6	35	5014	11045	1.88	-			-	-	-	-
	36	4955	15891, 8761, 8125	1.84	-			-	-	-	-
	37	4976	5461	1.87	+			-	-	-	-
	38	4981	4445	1.9	+			-	-	-	-
	39	4963	7877	1.83	+			-	-	-	-
	40	4963	4883	1.89	-			-	-	-	-
4'	41	4960	9524	1.88	-		-	-	-	-	-
	42	5010	7974	1.92	-		-	-	-	-	-
	43	4936	0.4, 5, -4	-0.2	+		-	-	-	+	-
	44	4944	7595	1.9	-		-	-	-	-	-
Controles	45	AN5						+	+	+	+
	46	BCG						+	+	+	+
	47	Agua						-	-	+	-
	48	844						+	+	+	+

Discusión y Conclusiones

La **figura 1** es una tinción Ziehl Neelsen realizada con la cepa 844, es la foto más representativa que obtuvimos, dicha imagen nos permite confirmar que el seguimiento del procedimiento de la tinción se realizó de forma correcta. La **tabla 1** agrupa todos los resultados obtenidos en las metodologías realizadas con cada una de las muestras, las cuales están ordenadas en grupos. En la extracción de ADN por medio de su cuantificación en Nanodrop, en su mayoría obtuvimos concentraciones elevadas y al mismo tiempo puros por estar en un rango de 1.8-2.0 en la relación A260/230 (Elosegi, 2009). Las 44

muestras en preparación de cultivos al ser inoculadas en cultivo Stonebrink, hasta la fecha 28 de Julio, colocamos signo positivo a las que se empezaron a observar crecimiento, aunque solo realizamos el conteo de unidades formadoras de colonias en la muestra 5 porque es la que ha tenido mayor crecimiento por el momento, conforme pase más el tiempo, el encargado del proyecto ira realizando el conteo de los que vayan creciendo ya que el crecimiento de *M. bovis* es lento, su crecimiento se puede observar de 3 a 6 semanas (Rodríguez, 2014). Realizamos las tinciones de las 44 muestras al realizar el cultivo de tejido, fue en pocas tinciones en las que logramos identificar a la bacteria, es cuestión de

volver a repetir las tinciones para buscar más bacilos. En dicha tinción, *M. bovis* al ser una bacteria ácido-resistente se espera que tras realizar la tinción se observen de un color rojo-rosado (Martos, 1994). Estandarizamos la reacción PCR con los primers diseñados con gradientes de temperatura para las muestras, esto optimiza la PCR, usando la temperatura ideal para el alineamiento donde los primers se van a unir a secuencias complementarias del ADN (Muthuraj, 2022). Los gradientes de temperaturas usados fueron 66 °C, 66.4 °C, 62 °C, 59.3 °C, 57.2 °C, 55.7 °C; para la mayoría de los genes se observó por medio de la electroforesis que todos los gradientes de temperatura son útiles para llevar a cabo la reacción en cadena de polimerasa, aun así, se eligió la temperatura de 57.2 °C. El uso del ADN de la cepa 844 en PCR para evaluar los gradientes con los primers de los distintos antígenos nos permitió corroborar que dicha cepa patogénica que se obtuvo de campo codifica y sintetiza los antígenos. En la PCR de las muestras, para los cuatro genes observamos que las cepas control (AN5, BCG, B33) si amplificaron, mientras que, a través del agua, nos sirvió como control negativo. Para el gen *esxA*, se observa que la muestra 6 y 22 lograron amplificar las secuencias específicas del antígeno. Para el caso de *esxB*, ninguna muestra amplificó el gen. Para *mb364*, la muestra 4,5,6,9,13,22,26,32,43 y 47 lo amplificaron. Cabe mencionar que el carril 47 corresponde al agua, lo que indica contaminación en la elaboración de esas reacciones. Por último, para *mpt64*, las muestras 4,5,6,9,13,22 son las que amplificaron. Como conclusión con base a los resultados que obtuvimos de las amplificaciones de los cuatro genes en las muestras, con datos de cultivos de años pasados que han elaborado en este proyecto (Datos no presentados) y con cultivos que realizamos inferimos que la PCR es una técnica que cuando tenga buena especificidad pueda ayudar al diagnóstico para detectar a la bacteria *Mycobacterium Bovis* en corto tiempo en comparación al cultivo. Es importante esperar para que crezcan las demás muestras de tejidos para completar el conteo UFC al igual que es importante repetir la PCR para eficientar la detección.

Agradecimientos.

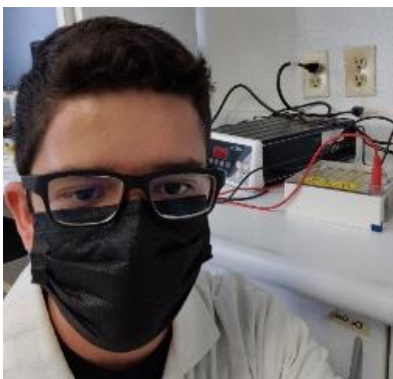
Quiero agradecer al Dr. Feliciano por permitirnos trabajar en el proyecto de desarrollo de vacuna para *M. bovis* y al mismo tiempo agradecer a la M. en C. Susana quién nos apoyó con sus conocimientos para guiarnos en todas las etapas de la estancia para cumplir con los objetivos. Agradezco a la Universidad Autónoma de Querétaro por brindarle este tipo de oportunidades a sus estudiantes para que adquieran experiencia en el campo en el que desean laborar.

Referencias Bibliográficas.

- Brandt, L., Elhay, M., Rosenkrands, I., Lindblad, E. B., & Andersen, P. (2000). ESAT-6 Subunit Vaccination against Mycobacterium tuberculosis. *Infection and Immunity*, 68(2), 791–795.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685), 537–544.
- Collins, M. T. (2011). Diseases of Dairy Animals | Infectious Diseases: Tuberculosis. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 195–198.
- Elosegui, A., Sabater, S. (2009). Conceptos y técnicas en ecología fluvial. España: Fundación BBVA.
- Encinas, M., Marfil, M. J., Garbaccio, S., Barandiaran, S., Huertas, P., Morsella, C., ... Eirin, M. E. (2018). Mycobacterium bovis ESAT-6, CFP-10 and EspC antigens show high conservation among field isolates. *Tuberculosis*, 111, 143–146.
- Guo, Q., Bi, J., Wang, H., & Zhang, X. (2020). Mycobacterium tuberculosis ESX-1-secreted substrate protein EspC promotes mycobacterial survival through endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Emerging Microbes & Infections*, 1–57.
- Martos, P., Fernández, M., Salido, F. (1994). Microbiología clínica práctica. Cadiz: Servicio Publicaciones UCA.
- Muthuraj, M., Usharani, B., Anbazhagi, S., Vidya, R., Venkatesh, K. (2022). Polymerase Chain Reactions: Basic Optimization Techniques. India: Notion Press.
- Rodriguez-Morales, A. J., & Castañeda-Hernández, D. M. (2014). Bacteria: Mycobacterium bovis. *Encyclopedia of Food Safety*, 468–475.
- Sedighi, T.; Varga, L. Evaluating the Bovine Tuberculosis Eradication Mechanism and Its Risk Factors in England's Cattle Farms. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2021, 18, 3451.
- Wang, Q., Liu, S., Tang, Y., Liu, Q., & Yao, Y. (2014). MPT64 Protein from Mycobacterium tuberculosis Inhibits Apoptosis of Macrophages through NF-κB-miRNA21-Bcl-2 Pathway. *PLoS ONE*, 9(7), e100949.

Welin, A., Björnsdóttir, H., Winther, M., Christenson, K., Oprea, T., Karlsson, A., ... Bylund, J. (2014). CFP-10 from *Mycobacterium tuberculosis* Selectively Activates Human Neutrophils through a Pertussis Toxin-Sensitive Chemotactic Receptor. *Infection and Immunity*, 83(1), 205–213.

Galería fotográfica.



Agosto 15, 2022.

Universidad Autónoma de Querétaro

Perlas de hidrogel de APA y goma xantana

M. C. María del Carmen Cortez Trejo.
Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Doctorante. Responsable del proyecto, mariadelcarmen.cortez@hotmail.com

Dra. Mendoza Diaz Sandra Olimpia Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Asesor, smendoza@uaq.mx

Carrillo Ramírez Katerine Nayeli.
Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Estudiante, kcarrillo27@alumnos.uaq.mx

Resumen

La producción de hidrogeles es una técnica de encapsulación que involucra la formación de redes tridimensionales de polímeros con alta capacidad de retención de agua y de acarreo de compuestos bioactivos. En particular, las proteínas vegetales son interesantes por sus excelentes propiedades gelificantes, biodegradabilidad y mayor sustentabilidad que sus contrapartes de origen animal. El objetivo de este trabajo fue obtener esferas de hidrogel a base de un aislado proteico de amaranto (APA) y goma xantana (GX) para el desarrollo de un producto tipo "tapioca". Para ello, se indujo la gelificación mixta mediante extrusión por goteo de soluciones de biopolímero en solución gelificante con glucono- δ -lactona (GDL) evaluando tiempos de reposo y concentración de acidificante. El tratamiento

con el mejor índice de hinchamiento fue cargado con un extracto acuoso de pulpa de café.

Palabras clave: aislado proteico de amaranto, goma xantana, esferas de hidrogel.

Abstract

The production of hydrogels is an encapsulation technique that involves the formation of three-dimensional networks of polymers with high water retention capacity and carriers of bioactive compounds. In particular, plant proteins are interesting due to their excellent gelling properties, biodegradability and greater sustainability than their counterparts of animal origin. The objective of this work was to obtain hydrogel spheres based on a protein isolate of amaranth (API) and xanthan gum (XG) for the development of a "tapioca" type product. For this, the mixed gelation was induced by extrusion of biopolymer mixtures into a gelling solution with glucono- δ -lactone (GDL) evaluating the hardening time and GDL concentration. The treatment with the best swelling index was loaded with an aqueous extract of coffee pulp.

Introducción

Uno de los retos para el desarrollo de nuevos productos en las industrias alimentarias, cosméticas, farmacéuticas y veterinarias, es la incorporación de moléculas con demostrada actividad biológica que presentan inconvenientes de baja solubilidad, pobre absorción y consecuentemente baja biodisponibilidad, así como degradación durante su manejo. Por lo anterior, existe la necesidad de utilizar metodologías de encapsulación que disminuyan los problemas mencionados.

Dentro de los polímeros naturales usados para la formación de hidrogeles se encuentran las proteínas. Si bien se ha reportado ampliamente el uso de

proteínas de origen animal, las proteínas vegetales están ganando mayor atención debido a que exhiben propiedades tecno-funcionales que pueden aprovecharse para el desarrollo de sistemas de encapsulación y, además, son más sostenibles. Dentro de las proteínas vegetales más utilizadas en la formación de hidrogeles se encuentra la zeína y algunos aislados proteicos como el de soya y chícharo (McClements, 2020). Sin embargo, la identificación de otras fuentes de proteínas vegetales es uno de los actuales objetivos de investigación en el área de hidrogeles. De esta manera, algunos aislados proteicos de amaranto han sido evaluados y se ha demostrado su capacidad gelificante (Avanza, Puppo & Añón, 2005a,b; Bejarano-Luján, Da Cunha, & Netto, 2010).

En trabajos recientes, se demostró que las proteínas de amaranto y la goma xantana son capaces de gelificar sinérgicamente a bajas concentraciones de biopolímero y sin el empleo de tratamiento térmico o adición de agentes reticulantes o sales (Cortez-Trejo et al., 2021, 2022), por lo anterior este sistema mixto resulta prometedor para el desarrollo de sistemas de encapsulación.

La tapioca o perlas de tapioca son pequeñas esferas (1-6 mm de diámetro) de almidón de tapioca producidas generalmente por extrusión. Es común su consumo en leche o en bebidas tipo “boba” (“boba” = “pearl” balls). El consumo generalizado de estas bebidas que son altas en calorías (200-450 calorías), es un factor importante que puede contribuir a la obesidad y diabetes (Min, Green, & Kim, 2017). En este sentido, el empleo de esferas de hidrogel a base de biopolímeros con mejores características nutrimentales, como lo son las proteínas de amaranto y goma xantana, son una alternativa viable para el desarrollo de productos tipo “tapioca”.

Objetivos

Objetivo general: Obtener esferas de hidrogel a base de aislado proteico de amaranto y goma xantana para el desarrollo de un producto tipo “tapioca”.

Objetivos específicos:

- 1) Obtener APA por precipitación isoelectrica
- 2) Obtener un extracto fenólico acuoso a partir de pulpa de café y determinar su capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales.
- 3) Obtener perlas de hidrogel variando niveles de concentración de GDL en solución gelificante y tiempo de reposo en dicha solución, determinar el índice de hinchamiento de las muestras y realizar la carga del extracto en el tratamiento con mejor capacidad de hinchamiento.

Metodología

Obtención de APA

Para la obtención de APA se utilizó harina desgrasada de amaranto la cual se suspendió en agua (1:10 p/v) y se ajustó el pH a 9 con una solución de NaOH 2N. La suspensión se agitó durante 30 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó 20 min a 9000 rpm. El sobrenadante obtenido se ajustó a pH 5 con HCl 2 N y se centrifugó a 9000 rpm durante 20 min a 4°C. El sedimento se resuspendió en agua, se neutralizó con NaOH 0.1 N y se liofilizó. El contenido de proteína de este aislado fue de 85.1%.

Obtención y caracterización de extracto fenólico de pulpa de café

Para la obtención del extracto se siguieron 3 metodologías, todas con una proporción igual 1:10 p/v de pulpa de café seca y molida previamente (malla

#40) con diferentes disolventes. La primer metodología consistió en agregar 1g pulpa de café en 10 mL de etanol y sonicar durante 30 min, en la segunda se siguió el procedimiento anterior pero usando como solvente agua-etanol (1:1), y para la tercera se agregó agua a 92°C, se agitó por 2 min, se enfrió en baño de hielo hasta 25° y el extracto se obtuvo por centrifugación a 3500 rpm (10 min, temperatura ambiente).

Para la determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante del extracto fenólico se siguieron las siguientes metodologías: Se determinó la capacidad antioxidante ABTS de acuerdo con Nenadis et al. (2004) con modificaciones para microplaca empleando una curva estándar de Trolox. Para fenoles totales, se siguió el método Folin ciocalteu, siguiendo la metodología de Prior et al. (20005) en microplaca empleando una curva estándar de ácido gálico.

Producción de esferas de hidrogel y determinación de índice de hinchamiento

Las esferas se prepararon mediante un método de extrusión-goteo de una solución de biopolímero APA:GX pH 10 ± 0.08 a 1% p/v y proporción 1:1 p/p con ayuda de una jeringa de 20 mL y una bomba de infusión trabajando a 0.586 mL/min en 40 mL de solución gelificante (GDL, 1, 2.5 y 5 mg/mL). La distancia entre la punta de la jeringa y la solución de gelificante se fijó en 7 cm. El tiempo de reposo de las esferas en la solución gelificante fue de 10 y 30 min.

Se trabajó con muestras de esferas de hidrogel en fresco o en seco dependiendo del ensayo correspondiente. Para la preparación de muestras de esferas de hidrogel en seco, las esferas recién producidas se secaron en horno a 35-40°C por 24 horas en portaobjetos.

El índice de hinchamiento se determinó siguiendo la metodología de Pourkhatoun et al. (2022) con modificaciones. Las muestras secas de esferas de hidrogel fueron sumergidas en 100 mL de agua ajustada con NaOH y HCl 0.1N a pH 4 (pH del extracto de café). El porcentaje de hinchamiento se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Hinchamiento} = \frac{w_1 - w_0}{w_0}$$

Donde w_0 y w_1 corresponden al peso en seco y en húmedo de las esferas de hidrogel a determinado tiempo.

Resultados

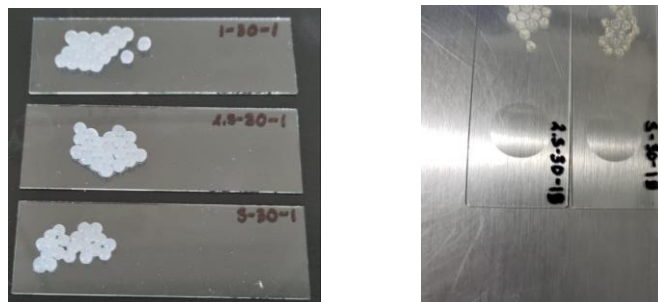


Fig. 1 y 2 perlas APA:GX hidratadas y secas.

En la figura 1 y 2 podemos observar como el secar las perlas de amaranto en el horno provoca su deformación, quedan planas y no como una esfera de "Tapioca".



Fig. 3 Perlas recién hechas en GDL, cargadas en fresco en extracto acuoso de pulpa de café por unos minutos y Fig. 4 Perlas hechas en GDL rehidratadas, cargadas en extracto acuoso de pulpa de café por 6 horas.

En la Figura 3 pudimos observar un método rápido para darnos un indicio si es que las perlas recién hidratadas absorben el extracto y en la Figura 4 visualizamos dos cosas muy importantes, primeramente, las perlas secas rehidratadas puestas en extracto por mucho más tiempo con un cambio notorio y en la parte de abajo se puede notar la ruptura de las perlas rehidratadas con la técnica de índice de hinchamiento.



Fig. 5 perlas liofilizadas rehidratadas en extracto de café.

Como se comentó en la Figura 4, en esta figura de igual manera podemos observar la ruptura de la rehidratación aunque se haga liofilización.



Fig 6 y 7. Perlas recién hechas en GDL y cargadas en fresco en extracto acuoso de pulpa de café.



Fig 8 y 9 Perlas recién recuperadas de solución de GDL y después de 6 h de carga dentro del extracto.

Tabla 1. Prueba de Tukey para el índice de hinchamiento

h	0.5	1	1.5	2	2.5
1-10	52.6 ± 13.3 ^A	64.2 ± 13.8 ^A	66.4 ± 16.0 ^A	70.5 ± 16.7 ^A	71.7 ± 15.6 ^A
2.5-10	23.4 ± 4.9 ^B	32.5 ± 7.3 ^B	36.2 ± 10.0 ^B	39.7 ± 9.8 ^{AB}	40.9 ± 11.1 ^{AB}
5-10	12.4 ± 3.3 ^B	17.3 ± 4.9 ^B	22.1 ± 7.8 ^B	21.7 ± 5.4 ^B	23.6 ± 6.0 ^B
1-30	25.7 ± 3.7 ^B	32.5 ± 5.9 ^B	36.2 ± 7.2 ^B	38.0 ± 7.6 ^B	40.7 ± 8.1 ^B
2.5-30	16.5 ± 2.6 ^B	23 ± 1.3 ^B	27.0 ± 2.3 ^B	29.0 ± 2.6 ^B	31.5 ± 2.8 ^B
5-30	11.3 ± 4.4 ^B	16.1 ± 4.6 ^B	19.1 ± 5.8 ^B	21.6 ± 6.5 ^B	23.9 ± 7.0 ^B

h	3	4	5	6	24
1-10	73.5 ± 17.8 ^A	75.0 ± 16.6 ^A	76.9 ± 17.9 ^A	78.5 ± 17.6 ^A	87.3 ± 18.0 ^A
2.5-10	43.6 ± 11.9 ^{AB}	46.4 ± 11.3 ^{AB}	47.1 ± 11.5 ^{AB}	49.5 ± 11.9 ^A	60.3 ± 12.8 ^A
5-10	25.0 ± 7.1 ^B	26.9 ± 6.8 ^B	29.1 ± 6.9 ^B	29.6 ± 7.5 ^A	36.8 ± 7.5 ^A

1-30	42.3± 9.6 ^B	44.6± 8.2 ^B	46.4 ± 7.2 ^B	48.6 ± 8.5 ^A	58.6 ± 9.4 ^A
2.5-30	33.5± 3.7 ^B	35.4± 2.7 ^B	37.6 ± 3.1 ^B	39.2 ± 3.9 ^A	49.2 ± 4.7 ^A
5-30	25.3 ± 7.2 ^B	27.9 ± 7.8 ^B	29.6 ± 8.1 ^B	30.5 ± 7.8 ^A	39.6 ± 7.3 ^A

Tabla 2. Capacidad antioxidante de extracto acuoso de pulpa de café.

Extracto	Mg Eq. Trólox/L de extracto
Pulpa de café	1643.3 ± 0.011

Tabla 3. Contenido de fenoles totales de extracto acuoso de pulpa de café.

Extracto	µg Eq. de ác. Gálico /mL de extracto
Pulpa de café	757.18 ± 58.16

Discusión

El uso de mezclas APA:GX ha demostrado ser un sistema eficaz de gelificación con potencial para su uso en sistemas de encapsulación. Por otro lado, el desarrollo de sistemas mixtos APA:GX para la formación de esferas de hidrogel supone una alternativa más saludable al consumo de productos a base de tapioca o bebidas tipo “boba”, los cuales por

su alto contenido energético han sido identificados como factor de riesgo para la salud.

Respecto a ABTS y Fenoles totales realizadas para el extracto fenólico de pulpa de café, se presentaron varios inconvenientes de tiempo, reactivos y pericia en su realización. Por ejemplo, para ABTS podemos decir que nuestro porcentaje de inhibición es del 26.3%, así que tenemos 1643.3 ± 0.011 mg/L de extracto, el nivel de inhibición es bajo esto sugiere que en el extracto de café estudiado se encuentran presentes pocos compuestos donadores de hidrógeno o electrones que pueden estabilizar al radical catiónico ABTS. Sin embargo, dichos resultados no son concluyentes por las razones expuestas. Se requieren de réplicas adicionales para verificar los resultados.

Por otro lado, se ha estudiado que el contenido de fenoles totales está asociado a la actividad antioxidante, los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente en las plantas y han llamado mucho la atención por su actividad antioxidante y su capacidad para eliminar los radicales libres. Para este ensayo se obtuvo un resultado de 757.18 ± 58.16 µg Eq. ác. Gálico /mL extracto. Estos resultados son mayores a lo reportado por Fonseca-García (2014), esto quiere decir que el nivel de fenoles se encuentra más bajo que lo reportado.

Respecto a la obtención de perlas y determinación de índice de hinchamiento, se obtuvieron perlas de hidrogel con índice de hinchamiento de hasta 55.28 ± 9.96 . Sin embargo, dado que las perlas poseen bajos sólidos totales (1%) perdieron su forma al ser secadas en horno, se observaron planas y a pesar de que su índice de hinchamiento fue bueno, durante la rehidratación hubo ruptura visual, así que se consideraron otras alternativas para realizar el proceso de carga del extracto fenólico de café. De esta manera, se decidió evitar la rehidratación, pasando las perlas, inmediatamente después de su recuperación de

la solución gelificante, al extracto para realizar la carga o encapsulación. Para estos experimentos se seleccionó el tratamiento obtenido con 1 mg GDL/mL y tiempo de reposo de 10 min por ser el tratamiento con mayor índice de hinchamiento. Las perlas recién obtenidas fueron sumergidas en el extracto a temperatura ambiente durante 6 h.

Cabe mencionar que en el ensayo de índice de hinchamiento se obtuvieron desviaciones estándar muy altas, por lo que se sugiere la realización de más réplicas del experimento.

Conclusiones

Debido a las limitaciones de tiempo y falta de experiencia en todas las técnicas realizadas, los resultados obtenidos durante la estancia de verano arrojaron datos preliminares. Se requiere en todos los casos una mayor cantidad de réplicas para la verificación de los resultados. Sin embargo, estos datos preliminares permitieron encontrar la manera más adecuada para la carga del extracto de pulpa de café en las esferas de hidrogel APA:GX, lo que sin duda contribuye de manera importante al progreso del proyecto.

Agradecimientos

A la estudiante Carrillo Ramírez Katherine Nayeli gustaría agradecer a la Dra. Mendoza Díaz Sandra Olimpia por aceptarla en el laboratorio y brindar los materiales, así como a la M. C. María del Carmen Cortez por aceptarla en este increíble proyecto de verano, brindar el protocolo para las prácticas, guiarla y enseñarla en las técnicas y situaciones de laboratorio, a través de sus conocimientos, experiencias y paciencia.

Referencias bibliográficas

AOAC (2000). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 17th ed. Washington, DC.

Avanza, M.V., Puppo, M.C., & Añón, M.C. (2005a). Rheological characterization of amaranth protein gels. *Food hydrocolloids*, 19(5), 889-898. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.0>

Avanza, M.V., Puppo, M.C., & Añón, M.C. (2005b). Structural characterization of amaranth protein gels. *Journal of Food Science*, 70(3), E223-E229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07139.x>.

Bejarano-Luján, D.L., Da Cunha, R.L., & Netto, F.M. (2010). Structural and rheological properties of amaranth protein concentrate gels obtained by different processes. *Food Hydrocolloids*, 24(6-7), 602-610. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.02.0>

Cárdenas, A., Gómez, M., & Frontana, C. (2014). Development of an Electrochemical Cupric Reducing Antioxidant Capacity Method (CUPRAC) for Antioxidant Analysis. *Electrochimica Acta*, 128, 113-118. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.10.191>.

Cortez-Trejo, M.C., Mendoza, S., Loarca-Piña, G., & Figueroa-Cárdenas, J.D. (2021). Physicochemical characterization of protein isolates of amaranth and common bean and a study of their compatibility with xanthan gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 861-868. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.242>

Cortez-Trejo, M. C., Figueroa-Cárdenas, J. D., Quintanar-Guerrero, D., Baigts-Allende, D. K., Manríquez, J., & Mendoza, S. (2022). Effect of pH and protein-polysaccharide ratio on the intermolecular interactions between amaranth proteins and xanthan gum to produce electrostatic hydrogels. *Food Hydrocolloids*, 129, 107648.

Fonseca-García, L., Calderón-Jaimes, L. S., & Rivera, M. E. (2014). Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en Norte de Santander (Colombia). *Vitae*, 21(3), 228-236.

Min, J. E., Green, D. B., & Kim, L. (2017). Calories and sugars in boba milk tea: implications for obesity risk in Asian Pacific Islanders. *Food science & nutrition*, 5(1), 38-45.

Mundo, J. L. M., Zhou, H., Tan, Y., Liu, J., & McClements, D. J. (2020). Stabilization of soybean oil-in-water emulsions using polypeptide multilayers: Cationic polylysine and anionic polyglutamic acid. *Food Research International*, 137, 109304.

Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., & Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4669–4674. <http://doi.org/10.1021/jf0400056>.

Pourkhatoun, M., Kalantari, M., Kamyabi, A., & Moradi, A. Preparation and characterization of pH-sensitive carboxymethyl cellulose-based hydrogels for controlled drug delivery. *Polymer International*.

Extracción y caracterización de proteínas de grillo (*Acheta Domesticus*)

Autoría: Alexandro Escobar Ortiz
(alexandro.escobarortiz@outlook.com),
Carolina Queiro María
(mqueiro28@alumnos.uaq.mx). Juárez

Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.

Resumen:

En la actualidad, el consumo de grillos se ha considerado como una alternativa debido a que presenta una fuente importante de proteínas; sin embargo, aún no se han realizado análisis sobre los efectos que los tratamientos postcosecha tienen sobre las características de la proteína. El objetivo de este trabajo fue, extraer un aislado proteico de grillo de la especie *Acheta domesticus*, sometido a 3 pretratamientos (Hervido y horneado, Hervido y Deshidratado), caracterizar la proteína soluble, la digestibilidad proteica, su perfil de proteínas medidas por electroforesis SDS-PAGE y sus características funcionales, capacidad de hinchamiento y retención de agua y aceite. Como resultados, se encontró que los pretratamientos que fueron sometidos a un mayor tratamiento térmico (Hervido y horneado y Hervido) mostraron menor contenido de proteína soluble, atribuido al efecto de la temperatura sobre la desnaturalización de las proteínas, efecto que se vio en el perfil de las proteínas por SDS-PAGE, donde se observó una mayor cantidad de proteínas en el aislado de grillo deshidratado; por otro lado, el aislado

proteico de grillo deshidratado mostró un mayor contenido de nitrógeno total y proteína, así como una mayor digestibilidad proteica. Por lo tanto, un aislado proteico a partir de grillo deshidratado puede ser un ingrediente novedoso para mejorar el contenido de proteína de alimentos y suplementos.

Abstract:

Nowadays, the consumption of crickets has been considered as an alternative because it offers an important source of protein; however, no analysis has yet been conducted on the effects that post-harvest treatments have on the protein characteristics. The objective of this work was to extract a cricket protein isolate from the species *Acheta domesticus*, subjected to 3 pretreatments (Boiled and baked, Boiled and Dehydrated), characterize the soluble protein, protein digestibility, its protein profile measured by SDS-PAGE electrophoresis and its functional characteristics, swelling capacity and water and oil retention. As a result, it was found that the pretreatments that were subjected to a greater thermal treatment (Boiled and baked and Boiled) showed lower soluble protein content, attributed to the effect of temperature on the denaturation of proteins, an effect that was seen in the profile of the proteins by SDS-PAGE, where a greater amount of protein was observed in the dehydrated cricket protein, on the other hand, dehydrated cricket protein extract showed a higher total nitrogen and protein content, as well as greater protein digestibility, therefore, a protein isolate from dehydrated cricket may be a novel ingredient to improve the protein content of foods and supplements.

Palabras clave: *Acheta Domesticus*, proteína, pretratamiento, deshidratación.

Keywords: *Acheta Domesticus*, protein, pre-treatment, dehydration.

Introducción

La crianza de insectos como el grillo *Acheta Domesticus* para consumo humano ha incrementado en los últimos años debido a su alto contenido proteico. El proceso para la elaboración de harina de grillos consiste en la crianza, selección, secado, tostado y por último molienda.

En la literatura se han reportado valores de hasta 82.4g/100g de proteína (Oloo et al., 2020), lo cual según Xiaoming et al., (2010), puede variar entre el 20-70% si éste se expresa en base seca. Asimismo, factores biológicos en su entorno, la alimentación del grillo y la etapa del ciclo de vida pueden afectar este rendimiento. Se han estudiado entonces las condiciones de crianza y las características nutricionales del grillo, no obstante, no hay reportes sobre los efectos de los tratamientos postcosecha, sobre la eficiencia de extracción de proteína de grillo. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue extraer un aislado proteico de grillo de las especies *Acheta domesticus*, sometido a 3 pretratamientos (Hervido y horneado, hervido y deshidratado), caracterizar la proteína soluble, la digestibilidad proteica, su perfil de proteínas medidas por electroforesis SDS-PAGE y sus características funcionales, capacidad de hinchamiento y retención de agua y aceite.

Objetivo general

Realizar aislados proteicos de harina de grillo *Acheta Domesticus* para analizar el rendimiento de proteína en los tres diferentes tratamientos postcosecha para seleccionar el tratamiento con mayor cantidad de proteína y evaluar las propiedades de la proteína.

Objetivos específicos

- Obtener aislados proteicos de harina de grillo.
- Cuantificar el contenido de proteína de los aislados proteicos de harina de grillo y comparar los tratamientos postcosecha.

- Caracterizar las proteínas de harina de grillo por electroforesis.
- Evaluar las propiedades de los aislados proteicos de harina de grillo.

Metodología

Materiales:

Tubos falcon, microtubos, matraz Erlenmeyer 125ml, matraz aforado de 25ml, vaso de precipitados 50ml, potenciómetro, micropipeta, microplaca, lector de microplacas (Thermo Scientific, Estados Unidos), centrífuga (Hermle, Alemania) agitador, sistema de electroforesis (BioRad, Estados Unidos).

Extracción de proteína: se pesaron 0.5 gramos de muestra y se diluyeron en 10 ml de agua. Se ajustó el pH a 10, se dejó en agitación 1 hora y se centrifugó a 10000 x g por 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se desechó el precipitado.

Cuantificación de proteína: la cuantificación de proteína soluble se realizó con la técnica de Bradford, usando el kit comercial de la marca BioRad y de acuerdo con las instrucciones del fabricante, para la cuantificación se realizó una curva de proteína de albúmina sérica bovina en un rango de 0.05 a 0.5 mg/mL.

Electroforesis SDS Page: la distribución del peso molecular de la proteína obtenida fue analizada con electroforesis SDS-PAGE usando un gel separador de poliacrilamida preparado al 12% y un gel concentrador de poliacrilamida al 5%. Las muestras fueron disueltas en solución digestiva preparada con buffer de carga y mercaptoetanol en proporción (1:1), e incubadas en baño maría por 5 minutos. Se utilizó como marcador Benchmark Protein Ladder con el número de catálogo 10747-012 (Invitrogen) y finalmente el gel se tiñó con una solución de Azul de Coomassie R-250 (Bio Rad) y se destiñó con una solución de agua-metanol y ácido acético.

Determinación de proteínas: la determinación de proteínas se realizó mediante el método 46-13 de la AACC (2000). Este método se basó en la digestión de las proteínas por acción del ácido sulfúrico en presencia de catalizadores. Durante la digestión el nitrógeno se convierte en sulfato amonio. La mezcla digerida se neutralizó con una base y posteriormente se destiló. El destilado se recogió en una solución de ácido bórico. Los aniones del borato así formado se titularon con ácido clorhídrico estandarizado para determinar el contenido de la muestra. Para realizar esta determinación, se pesó 1g de muestra y se pasó a un tubo Kjeldahl, al cual se le agregó 1g de sulfato de cobre, 10g de sulfato de potasio y 15mL de ácido sulfúrico concentrado, éste se colocó en el digestor y se calentó gradualmente a 400°C, hasta que el contenido del tubo presentó un color verde claro. El tubo se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se le adicionaron 50mL de hidróxido de sodio al 40%. Por otro lado, en un matraz Erlenmeyer se añadieron 50mL de ácido bórico al 4% y 10 gotas de indicador Wesslow. Se realizó la destilación hasta obtener un volumen de 100mL de la muestra en el matraz preparado anteriormente. La muestra obtenida se tituló con ácido clorhídrico 0.1N. Se calculó el porcentaje de proteína con la siguiente ecuación:

$$\%Proteína = \frac{mL \text{ gastados en el titulador} \times N \times 14}{\text{peso de la muestra en base seca (g)}} \times F \times 100$$

Donde:

N: normalidad del ácido de valoración

F: factor de conversión a proteína

14: peso atómico del nitrógeno

Capacidad de retención de agua: se pesaron 50mg de muestra y se diluyeron en 10ml de agua. Se dejó reposar por 24 horas y se centrifugó a 3000rpm por 20 min. Se rescató el precipitado y se pesó. El valor se despejó en la siguiente ecuación:

$$\text{capacidad de retención de agua} = \frac{\text{Sedimento Húmedo (g)} - \text{Muestra seca (g)}}{\text{Muestra seca (g)}}$$

Capacidad de retención de aceite: se pesaron 50mg de la muestra y se diluyeron en 10ml de aceite vegetal. Se dejó reposar por 24 horas y se centrifugó a 3000rpm por 20 min. Se rescató el precipitado, se pesó y se despejó en la siguiente ecuación:

$$\text{capacidad de retención de aceite} = \frac{\text{Sedimento Húmedo (g)} - \text{Muestra seca (g)}}{\text{Muestra seca (g)}}$$

Capacidad de hinchamiento: se pesaron 50mg de la muestra y se diluyeron en 10ml de agua. Se dejó reposar por 24 horas y se centrifugó a 3000rpm por 20 min. Se midió el volumen del precipitado y se sustituyó en la siguiente ecuación:

$$\text{capacidad de hinchamiento} = \frac{\text{volumen de muestra húmeda}}{\text{volumen de muestra seca}}$$

Determinación de la digestibilidad in vitro de las proteínas de harina de grillo: se elaboró una suspensión de proteínas 6.25 mg/ml de solución, se ajustó la suspensión a pH 8 con HCl 0.1 N y se añadió 1mL de solución multi-enzimática (1.6 mg/ml tripsina, 3.1 mg/ml de α – quimiotripsina y 1.3 mg/ml de pepsina). Se colocó a baño maría a 37 °C durante 10 min, agitando cada 2 min. Se midió el pH y se sustituyó en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ digestibilidad} = 229.3 - 30.3x$$

Donde: x = pH a los 10 min

Se utilizó como control caseína, la cual tiene una digestibilidad in vitro cercana a 100%, aproximadamente 98-99 %.

Análisis estadístico: Los resultados se reportaron como la media \pm desviación estándar, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. La comparación entre todos los tratamientos se realizó con la prueba de Tukey. Los datos se analizaron con el paquete estadístico utilizando el software JMP.

Resultados y discusión

Se realizó una extracción de proteína de los tres pretratamientos y se cuantificó por el método de

Bradford. En la Figura 1 se muestran los resultados de la cuantificación, en función de la cantidad de proteína soluble obtenida. Como se puede observar, el pretratamiento que presentó una mayor cantidad de proteína soluble fue el de deshidratación, con el doble de proteína que el extracto de grillo hervido, mostrando una diferencia estadísticamente significativa, este efecto de la disminución de la solubilidad en pretratamientos con un mayor tratamiento térmico, se puede atribuir a la desnaturalización de las proteínas, efecto reportado previamente por Montowska et al., (2018).

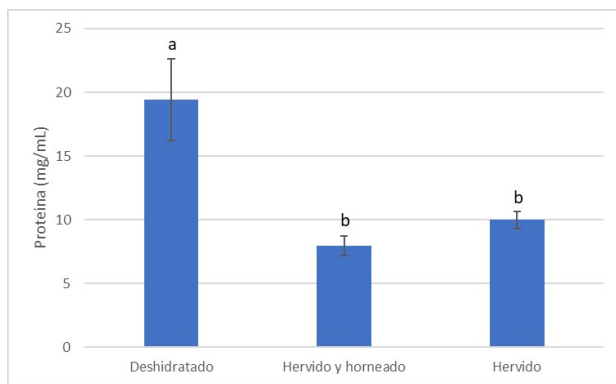


Figura 1: Cuantificación de proteína por método de Bradford.

La caracterización de las proteínas de grillo se realizó mediante una separación molecular empleando la técnica de electroforesis SDS-PAGE. En la figura 2 se observan las bandas de proteína de cada tratamiento

ensayado, conjunto con un marcador de proteínas de un rango de peso de 20 a 220kDa.

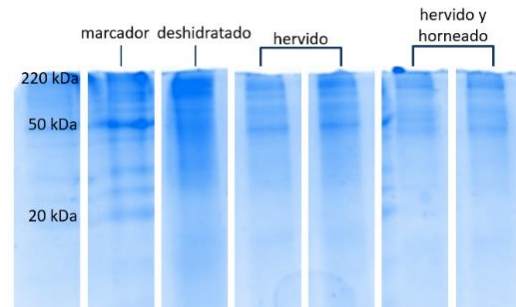


Figura 2: Gel de electroforesis SDS-PAGE, de extractos proteicos obtenidos de grillo con diferentes pretratamientos térmicos.

En los resultados se puede observar una diferencia entre la cantidad de proteína obtenida de los tratamientos térmicos y el grillo deshidratado, lo cual se puede apreciar con la cuantificación de Bradford (Figura 1), en donde el grillo deshidratado presentó el doble de proteína que el hervido, y en la electroforesis (Figura 2). En esta última se pueden observar proteínas en un rango de pesos moleculares de 50 a 220kDa principalmente. Con el grillo deshidratado se aprecia una mayor cantidad de proteínas solubles, mientras que en las muestras con un tratamiento térmico solamente quedan las proteínas más termoestables. Estos efectos del tratamiento térmico se reflejan tanto en el ensayo por el método de Bradford como en el gel SDS-Page.

En la literatura se han reportado proteínas de cutícula con un peso molecular de 14-32 kDa (Andersen *et al.*, 1995), arginina quinasa de 40kDa (Liu *et al.*, 2009) y hemocianina, de peso molecular de 77kDa (Srinroch *et al.*, 2015). De acuerdo con Brogan (2018) también se encuentran proteínas musculares actina (42kDa) y miosina (220kDa). No hay registros de proteínas con mayor peso molecular en la literatura.

Posteriormente se realizó un aislado proteico de la harina de grillo deshidratado como se muestra en la

Figura 3, para posteriormente analizar el aislado proteico, el grillo desproteínizado y el grillo deshidratado como control.

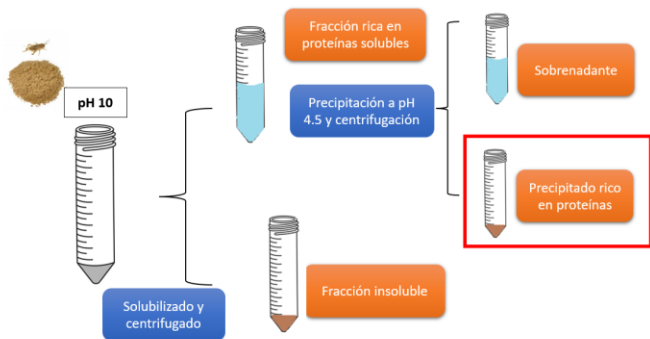


Figura 3: Diagrama de extracción de proteína de grillo deshidratado

Tabla 1: Determinación de porcentaje de nitrógeno y proteína total de diferentes fracciones del proceso de aislado de proteína de grillo

Muestra	%N	Proteína
Proteína pura	9.91%	61.94g*
Desproteínizado	11.17%	-
Deshidratado	10.81%	55.05g**

*Factor gravimétrico utilizado: 6.25g.
**Factor gravimétrico utilizado: 5.09g.

En la tabla 1 se presenta el porcentaje de nitrógeno y la cantidad de proteína obtenida. Para la proteína pura se utilizó un factor de 6.25g, que es el factor universal de conversión de nitrógeno a proteína. Por otro lado, dado que los insectos cuentan con un exoesqueleto de quitina, utilizar el mismo factor sería sobreestimar la cantidad de proteína, por lo que se utiliza un factor de 5.09 (Rivanen *et al.*, 2009). Se encontró que, en ambos, en el grillo deshidratado y en el aislado proteico, hay una cantidad muy parecida de proteína.

A continuación, se realizó una valoración de las propiedades de la proteína de grillo deshidratado. Se

realizó una prueba de absorción de agua y aceite, siguiendo la técnica descrita en la metodología. Se puede observar en la tabla 2, que al realizar la extracción se perdió la capacidad de absorción tanto de agua como de aceite, siendo menor a 1%, mientras que el grillo deshidratado tiene una retención de agua del 17.84% y de aceite del 10.49%, y el desproteínizado absorbe agua en un 12.08% y aceite en un 11%.

Tabla 2: Capacidad de retención de agua, de aceite y capacidad de hinchamiento.

Muestra	Agua %	Aceite %	Hinchamiento (ml/g)
Grillo deshidratado	17.8423	10.4940	8.1509
Desproteínizado	12.0815	11.0087	3.6525

Por último, un indicador esencial en la calidad de cualquier proteína es su capacidad de absorción en el organismo, por lo que se realizó una prueba de digestibilidad *in vitro* (Avilés-Gaxiola *et al.*, 2018). Los resultados se presentan en la tabla 3 y podemos observar que la proteína pura presenta una digestibilidad casi del doble que el grillo deshidratado y el extracto desproteínizado. Esto se debe a que tanto el grillo deshidratado como el desproteínizado cuentan con una alta cantidad de quitina, la cual no puede ser degradada y absorbida en el intestino, lo que afecta la digestibilidad de la muestra (Bovera *et al.*, 2015).

Tabla 3: Digestibilidad proteica *in vitro*.

Muestra	% digestibilidad
Proteína pura	53.7715%
Grillo deshidratado	35.6801%
Desproteínizado	30.5043%

Conclusiones

El pretratamiento post cosecha que permite un mayor rendimiento proteico es el de deshidratación, puesto que, con los tratamientos térmicos, como son el hervido y horneado, solo se encuentran proteínas termoestables. Además, el grillo deshidratado contiene una digestibilidad del 35.68%, y se demostró que, al extraer la proteína, la digestibilidad aumenta hasta llegar a un 53.77%.

Agradecimientos

Al doctorante Alexandro Escobar Ortiz por permitirnos trabajar con él durante el verano y guiarnos durante la estancia.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y al programa Introducción al Verano de la Ciencia por la oportunidad de participar en un trabajo de investigación durante el verano.

A los miembros del posgrado en química en alimentos por brindarnos orientación, comentarios y apoyo a lo largo de esta investigación.

A mis compañeros de laboratorio Ximena y Raúl.

Referencias bibliográficas

Andersen, S., Hojrup, P., & Roepstorff, P. (1995). Insect cuticular proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(2), 153-176.

Brogan, E. N., Park, Y.-L., Matak, K. E., & Jaczynski, J. (2021). Characterization of protein in cricket (*Acheta domesticus*), locust (*Locusta migratoria*), and silk worm pupae (*Bombyx mori*) insect powders. *LWT*, 152, 12314.

Liu, Z., Xia, L., Wu, Y., Xia, Q., Chen, J., & Roux, K. (2009). Identification and characterization of an arginine kinase as a major allergen from silkworm (*Bombyx mori*) larvae. *International Archives of Allergy and Immunology*, 150(1)

Marono, S., Piccolo, G., Loponte, R., Di Meo, C., Attia, Y. A., Nizza, A., & Bovera, F. (2015). In vitro crude protein digestibility of *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* insect meals and its correlation with chemical composition traits. *Italian journal of animal science*, 14(3), 3889.

Ndiritu, A. K., Kinyuru, J. N., Kenji, G. M., & Gichuhi, P. N. (2017). Extraction technique influences the physico-chemical characteristics and functional properties of edible crickets (*Acheta domesticus*) protein concentrate. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(4), 2013–2021.

Nizza A., 2015. Yellow mealworms larvae (*Tenebrio molitor*, L.) as protein source for broilers: effects on growth performance and blood profiles. *Brit. Poultry Sci.*

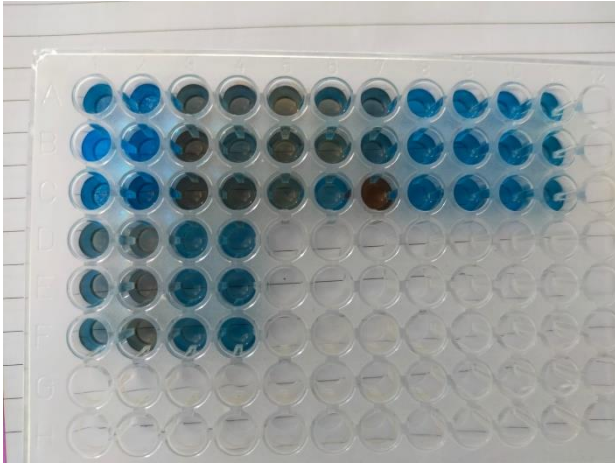
Ritvanen, T., Pastell, H., Welling, A., & Raatikainen, M. (2020). The nitrogen-to-protein conversion factor of two cricket species-*Acheta domesticus* and *Gryllus bimaculatus*. *Agricultural and Food Science*, 29(1), 1-5.

Srinroch, C., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Punyarit, P., & Phriyangkul, P. (2015). Identification of novel allergen in edible insects, *Gryllus bimaculatus* and its crossreactivity with *Macrobrachium* spp. allergens. *Food Chemistry*, 184, 160-166.

Oloo, J., Ayieko, M., Nyongesah, J. (2020). *Acheta Domesticus* (cricket) feed resources among smallholder farmers in Lake Victoria region of Kenya. *Food Science & Nutrition*, 8(1), 69-78.

Xiaoming, C., Ying, F., Hong, Z., Zhiyong, C. (2010) The nutritive value of edible insects. In: forest Insects as food: humans bite back workshop on Asia Pacific resources and their potential for development, Chiang Mai, Thailand. *FAO*, 21, 85-92.

Galería de fotos



Agosto 15, 2022.

Universidad Autónoma de Querétaro

Evaluación de la actividad antiinflamatoria de Medio Condicionado de Macrófagos M2 en un modelo de hígado graso no alcohólico *in vitro*

Dra. Ramos Gómez, Minerva.
Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Responsable del proyecto.
minervaramos9297@gmail.com

M. Manríquez Núñez, Josué.
Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Asesor.
Josuemn.11@hotmail.com

Lic. Avalos Márquez, Ximena.
Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Asesor.
Ximeam7@hotmail.com

García Cardón, María Fernanda.
Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Estudiante.
mgarcia264@alumnos.uaq.mx

1. Resumen

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa en el hígado, así como resistencia a la insulina. El desarrollo y progresión de NAFLD conlleva al aumento del estrés oxidativo en los hepatocitos que da como resultado un proceso inflamatorio crónico y una mayor progresión de la enfermedad. La terapia actual se centra en ralentizar la progresión de la NAFLD y los trastornos

metabólicos asociados a la misma. Los polifenoles son un grupo de sustancias con un potencial uso terapéutico en el tratamiento de NAFLD, el resveratrol (RSV), es un compuesto de particular interés para este tipo de tratamiento debido a sus múltiples efectos bioactivos, incluidos propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Por otro lado, los macrófagos activados alternativamente (M2) actualmente han atraído una atención cada vez mayor debido a sus funciones antiinflamatorias y de regulación inmunitaria al mitigar la respuesta inmunitaria e inflamatoria en algunas enfermedades poseyendo funciones protectoras en diversas enfermedades, lo cual podría proporcionar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades como NAFLD. Por lo anterior, como objetivo del proyecto de verano se buscó evaluar la actividad antiinflamatoria del medio condicionado de macrófagos M2 (MCM2) en un modelo *in vitro* de NAFLD en la línea celular HepG2 mediante ensayos de viabilidad celular (MTT), cuantificación de proteínas total (BCA) y cuantificación de nitritos (Óxido Nítrico); los resultados obtenidos indican una disminución en la concentración de nitritos de hasta 25% lo cual se puede relacionar a una disminución de los mecanismos proinflamatorios del modelo de NAFLD *in vitro*. Además, los resultados de viabilidad celular indicaron que al agregar el MCM2 al modelo *in vitro* de NAFLD se presenta un incremento de hasta 60% con respecto al control, mientras que en el tratamiento con RSV se aprecia una disminución de hasta 20%. Con estos resultados se puede concluir que los potenciales efectos benéficos del RSV se pueden ver potenciados por los elementos liberados por parte de los macrófagos M2 sobre el modelo *in vitro* de NAFLD. Por lo tanto, las perspectivas del proyecto comprenden el evaluar la influencia de los macrófagos M2 en conjunto con el RSV sobre la progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

2. Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by an excessive accumulation of fat in the liver and insulin resistance. The development and progression of NAFLD leads to a increase in oxidative stress in hepatocytes resulting in an proinflammatory process and further disease progression. Currently the therapy is primarily focused on decrease the progression and ameliorating the metabolic disorders related that play an important role in the pathogenesis of NAFLD. One of the substances with a potential use in the treatment of NAFLD are polyphenols, such as resveratrol which is a compound of particular interest for this type of treatment due to its multiple bioactive effects, including antioxidant and anti-inflammatory properties. On the other hand, alternatively activated macrophages (M2) have attracted attention due to their strong anti-inflammatory and immune regulation functions by limiting the immune and inflammatory response in some diseases, having protective functions in various diseases, which could provide new therapeutic strategies for the treatment of diseases such as NAFLD. Therefore, this project is aimed to evaluate the anti-inflammatory activity of M2 Conditioned Medium (MCM2) obtained using RSV on an *in vitro* NAFLD model in HepG2 cell line through cell viability assays (MTT), protein quantification (BCA) and nitrite quantification (Nitric Oxide), the results obtained indicate a decrease in the concentration of nitrites of up to 25%, which can be related to a decrease in the proinflammatory mechanisms of the NAFLD *in vitro* model. In addition, the results of cell capacity indicated that adding MCM2 to the NAFLD *in vitro* model shows an increase of up to 60% with respect to the control, while in the treatment with RSV a decrease of up to 20% is observed. With these results it can be concluded that the possible beneficial effects of RSV can be enhanced by the elements released by the M2 macrophages on the *in vitro* model of NAFLD.

Therefore, the prospects of the project will include evaluating the influence of M2 in conjunction with RSV on the progression of non-alcoholic fatty liver disease.

3. Introducción

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) está caracterizada por la acumulación excesiva de grasa en el hígado, así como resistencia a la insulina; por otra parte, NAFLD incluye dos tipos de diagnóstico patológico: hígado graso no alcohólico (NAFL) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH) (Shen, M. y col. 2020).

El desarrollo y progresión de NAFLD es un proceso complejo multifactorial, la patogenia de NAFLD se describió originalmente mediante la “hipótesis de los dos resultados” de Day, C. y James, O. en 1998. De acuerdo con esta suposición, el “primer golpe” está representado por un exceso en la acumulación de lípidos intrahepáticos debido a la alta ingesta de grasas saturadas y exceso de ácidos grasos en circulación, lo cual vuelve susceptible al hígado a otras agresiones que actúan como un "segundo golpe". Este segundo evento se asocia con un aumento del estrés oxidativo en los hepatocitos que da como resultado un proceso inflamatorio crónico y por ende una mayor progresión de la enfermedad hacia la esteatohepatitis no alcohólica; La progresión de esta enfermedad está estrechamente relacionada al estrés oxidativo, peroxidación de lípidos y la disfunción mitocondrial (Pastore, M. y col. 2019).

Actualmente la terapia se centra en ralentizar la progresión y disminuir los trastornos metabólicos asociados que desempeñan un papel importante en la patogenia de la NAFLD. Un grupo de sustancias con un uso potencial en el tratamiento de NAFLD son los polifenoles que pertenecen a un grupo muy grande de compuestos de origen vegetal, como el resveratrol (Izdebska, M. 2018).

El resveratrol (RSV) es uno de los polifenoles más estudiados, el cual ha generado gran interés a través de los años por sus potenciales beneficios a la salud (Springer, M. y Moco, S. 2019). Se ha reportado que el resveratrol exhibe múltiples efectos bioactivos, incluidos propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, cardiovasculares y antienvjecimiento en animales, y mejora de la función celular en general (Meng, T. y col. 2021).

Por otro lado, los macrófagos juegan un papel importante en una amplia variedad de procesos fisiológicos y patológicos, estos existen comúnmente en dos subconjuntos distintos: macrófagos activados clásicamente o proinflamatorios (M1), y macrófagos activados alternativamente o antiinflamatorios (M2), que impulsan la regulación inmunitaria y la remodelación de tejidos (Wang, L. y col. 2018). Estudios recientes han encontrado que los macrófagos tanto M1 como M2 están involucrados en la NAFLD (Shen, M. y col. 2020).

Los macrófagos tipo M2 han atraído una atención cada vez mayor durante la última década debido a sus fuertes efectos antiinflamatorios y de regulación inmunitaria al mitigar la respuesta inmunitaria e inflamatoria en algunas enfermedades, poseyendo funciones protectoras en diversas enfermedades, lo cual podría proporcionar una gran perspectiva para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, para enfermedades como NAFLD (Wang, L. y col. 2018).

3. Objetivo

Evaluación de la actividad antiinflamatoria del resveratrol (RSV) y del medio condicionado de macrófagos tipo 2 (MCM2) en un modelo *in vitro* de hígado graso no alcohólico (NAFLD) en la línea celular HepG2 mediante ensayos de MTT, BCA y Óxido Nítrico (ON).

4. Metodología

Modelo de esteatosis *in vitro*

Para evaluar el efecto del RSV y el MCM2 las células HepG2 se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad celular de 4×10^4 cel/pozo con medio alto en glucosa (30 mM) + 10 $\mu\text{g/mL}$ de insulina (Ins). Posteriormente se colocaron los tratamientos de MCM2 al 25%, 50% y 100% v/v, posteriormente se incubaron las células por 48 horas. Se tomaron como controles los tratamientos de glucosa 5 mM, glucosa 30 mM + 10 $\mu\text{g/mL}$ de Ins y glucosa 30 mM + 10 $\mu\text{g/mL}$ de Ins + 10 μM de RSV para realizar las comparaciones de las evaluaciones.

Viabilidad por MTT

Al finalizar la incubación se retiraron los tratamientos de los pozos y se enjuagó cada uno con 100 μL de PBS, posteriormente a cada pozo se le añadió 100 μL de la solución de MTT previamente preparada y 100 μL de medio estándar 5 mM, se cubrió la placa con aluminio y se incubó por 30 minutos a 37°C de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Al finalizar la incubación se retiró cuidadosamente la solución de cada pozo cuidando de no remover los cristales formados en el pozo, después se añadió 200 μL de DMSO a cada pozo y se procedió a disolver los cristales. Una vez disueltos los cristales se procedió a tomar lectura en espectrofotómetro a 570 nm.

Cuantificación de proteínas por BCA

Al finalizar la incubación se retiraron los tratamientos de los pozos y se enjuagó cada uno con 100 μL de PBS, y después se colocaron 50 μL de PBS por pozo y se envolvió la placa en aluminio. Se llevó la placa a congelar a -80°C de 20 a 30 min, para posteriormente llevarla a la incubadora a 37°C durante 15 minutos, repitiendo este proceso tres veces en total para lisis de las células por choque térmico. Después de la lisis celular se colocaron 200 μL de la solución de BCA previamente preparada a cada pozo y se incubó por 30 minutos a 37°C protegiendo la placa de la luz con aluminio de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente se registró el valor de absorbancia en el espectrofotómetro a 562 nm. Los resultados se

presentan por extrapolación con curva de calibración de albumina.

Cuantificación de Óxido Nítrico (ON)

Se tomaron 50 µL de medio de cultivo de cada tratamiento posterior a 28 horas de incubación y se colocaron en una nueva placa, posteriormente se agregaron 50 µL de la solución de Sulfanilamida a cada pozo y se incubó la placa a temperatura ambiente por 5 minutos protegido de la luz, al finalizar se agregaron 50 µL del reactivo NED y se incubó nuevamente a temperatura ambiente por 30 minutos. Finalmente se registró la absorbancia en el espectrofotómetro a 546 nm. Los resultados se presentan por extrapolación con curva de calibración de nitritos [µM].

5. Resultados

Viabilidad por MTT

Los resultados mediante el ensayo de MTT se muestran en la gráfica de la Fig 1.

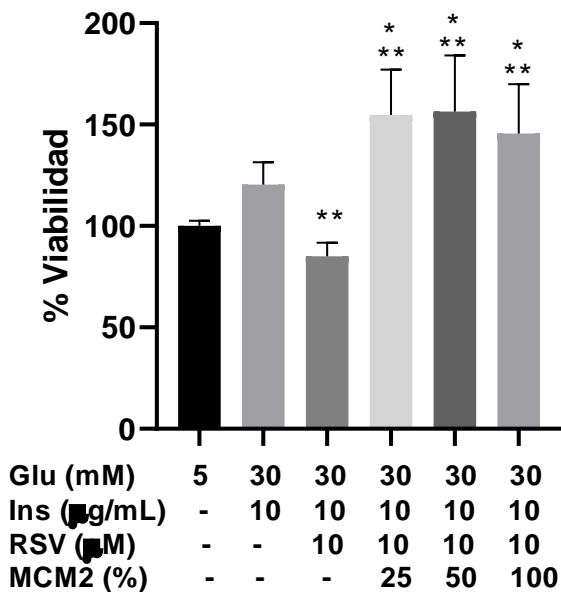


Fig 1. Viabilidad celular por MTT de la línea celular HepG2 incubada con diferentes condiciones de glucosa, ins, RSV y MCM2. Análisis estadístico: ANOVA/Dunnett * Indica diferencia estadística con

respecto al control (5mM glucosa) ** Indica diferencia significativa con respecto al modelo de EHGNA (30mM glucosa/ 10µg/ml insulina).

Cuantificación de proteína por BCA

Los resultados de la cuantificación de proteínas que se realizó mediante el ensayo de BCA se muestran en la Fig 2.

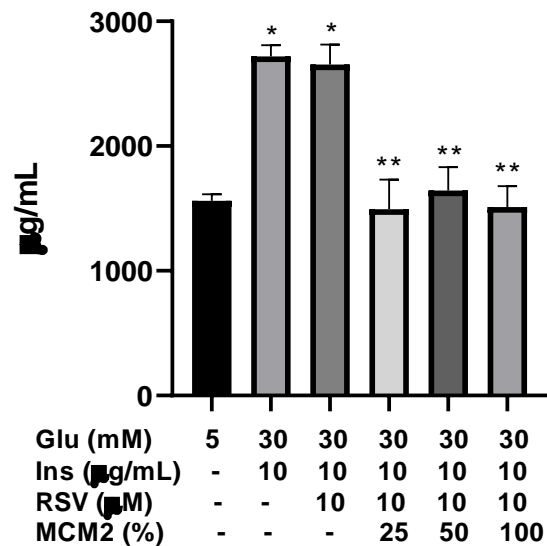


Fig 2. Cuantificación de proteína total por BCA de la línea celular HepG2 incubada con diferentes condiciones de glucosa, ins, RSV y MCM2. Análisis estadístico: ANOVA/Dunnett * Indica diferencia estadística con respecto al control (5mM glucosa) ** Indica diferencia significativa con respecto al modelo de EHGNA (30mM glucosa/ 10µg/ml insulina).

Cuantificación de Óxido Nítrico (ON)

Los resultados de la cuantificación de nitritos que se llevó a cabo mediante el ensayo de Óxido nítrico se muestran en la gráfica en la Fig 3.

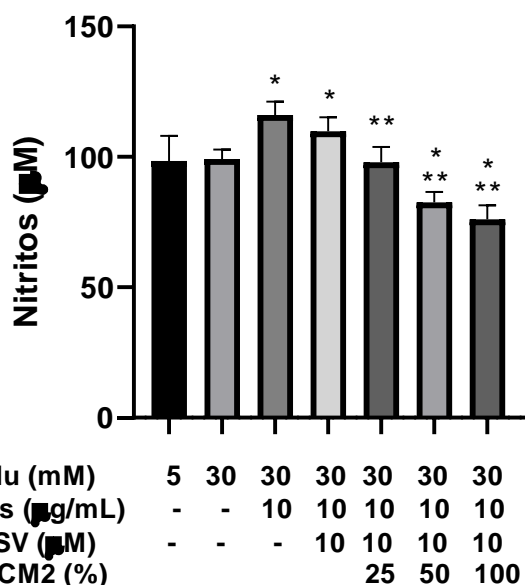


Fig 3. Cuantificación de nitritos por el ensayo de ON en medio de cultivo de la línea celular HepG2 incubada con diferentes condiciones de glucosa, ins, RSV y MCM2. Análisis estadístico: ANOVA/Dunnett * Indica diferencia estadística con respecto al control (5mM glucosa) ** Indica diferencia significativa con respecto al modelo de EHGA (30Mm glucosa/ 10µg/MI insulina).

6. Discusión y conclusiones

Los resultados de viabilidad celular (Fig. 1) muestran que al agregar el MCM2 (25%, 50% y 100%) al modelo *in vitro* de NAFLD se presenta un incremento de hasta 60% con respecto al control el cual crece en condiciones estándar de glucosa (5 mM). Lo anterior resulta interesante al compararlo con el tratamiento con RSV en el cual se puede apreciar una disminución de este parámetro de hasta 20%, por lo cual se podría inferir que el MCM2 promueve la viabilidad del cultivo aun en presencia de RSV.

Por otro lado, en la cuantificación de proteínas (Fig. 2) se observó que al incubar con los tratamientos de MCM2 al modelo *in vitro* NAFLD se obtiene una normalización del contenido de proteínas similar al del control (glucosa 5 mM). Así mismo se observa que en el modelo *in vitro* de NAFLD (glucosa 30 mM + Ins) se presenta un contenido mucho más alto de

proteínas a diferencia de los demás tratamientos de hasta 75%, además se pudo observar que al agregar RSV sin la presencia de MCM2 no se detecta una disminución significativa respecto a los controles con medio estándar y alta glucosa con insulina.

Finalmente en el ensayo de cuantificación de nitritos (Fig. 3) se observó que el modelo *in vitro* NAFLD (glucosa 30 mM + Ins) presenta un contenido mayor de nitritos en medio con respecto al control (glucosa 5 mM), donde; tras colocar los tratamientos con RSV y MCM2, se observa una disminución proporcional de estos nitritos en función del aumento de la concentración de MCM2 de hasta 25% como se observa en la Fig. 3, por lo que se puede inferir que los elementos presentes en el MCM2 pueden disminuir el efecto de los procesos proinflamatorios derivados de la incubación en alta glucosa en presencia de Ins.

Con estos resultados se puede concluir que los potenciales efectos benéficos del RSV se pueden ver potenciados por los elementos liberados por parte de los macrófagos M2 sobre el modelo *in vitro* de NAFLD. El uso de MCM2 en conjunto con el RSV contribuyó a normalizar los valores de proteínas y nitritos respecto al control sin tratamientos, al igual que aumenta la viabilidad celular. Por lo tanto, las perspectivas del proyecto comprenden el evaluar la influencia de los macrófagos M2 en conjunto con el RSV sobre la progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

7. Agradecimientos

A la autora le gustaría agradecer a la Dra. Minerva Ramos Gómez por aceptarla en la estancia académica y brindar los materiales para las prácticas y realización de la estancia, y al M. Josué Manríquez Núñez y a la Lic. Ximena Avalos Márquez por guiarla y enseñarla en las técnicas y situaciones de laboratorio, a través de su conocimientos y experiencias.

8. Referencias bibliográficas

1. Day, C. P., & James, O. F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114 (4), 842–845.
2. Izdebska, M., Herbet, M., Gawrońska-Grzywacz, M., Piątkowska-Chmiel, I., Korga, A., Sysa, M., & Dudka, J. (2018). Resveratrol Limits Lipogenesis and Enhance Mitochondrial Activity in HepG2 Cells. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 504.
3. Meng, T., Xiao, D., Muhammed, A., Deng, J., Chen, L., & He, J. (2021). Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. *Molecules*, 26(1), 229.
4. Pastore, M., Grimaudo, S., Pipitone, R. M., Lori, G., Raggi, C., Petta, S., & Marra, F. (2019). Role of Myeloid-Epithelial-Reproductive Tyrosine Kinase and Macrophage Polarization in the Progression of Atherosclerotic Lesions Associated With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10.
5. Shen, M., Shen, Y., Fan, X., Men, R., Ye, T., & Yang, L. (2020). Roles of Macrophages and Exosomes in Liver Diseases. *Frontiers in Medicine*, 7.
6. Springer, M., & Moco, S. (2019). Resveratrol and Its Human Metabolites—Effects on Metabolic Health and Obesity. *Nutrients*, 11(1), 143.
7. Wang, L., Zhang, S., Wu, H., Rong, X., & Guo, J. (2018). M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *Journal of Leukocyte Biology*.

Agosto 15, 2022.

Universidad Autónoma de Querétaro

Obtención de un modelo *in vitro* de esteatosis hepática no alcohólica en la línea celular HepG2.

Dra. Ramos Gómez, Minerva.
Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química. Responsable del proyecto.
minervaramos9297@gmail.com

M. en C. Manríquez Núñez Josué
Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Asesor.
josuemn.11@hotmail.com

Lic. Ávalos Márquez, Ximena.
Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Asesor.
ximeam7@hotmail.com

María Gabriela Freites Darias.
Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Estudiante.
mfreites31@alumnos.uaq.mx

1. Resumen

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) tiene una amplia prevalencia en el mundo, con una prevalencia de alrededor del 25 %. México es uno de los países cuya población reúne varios factores de riesgo para esta enfermedad y su prevalencia podría superar el 50%. Las líneas celulares hepáticas inmortalizadas se utilizan con frecuencia en el estudio del hígado debido a su facilidad de uso y relativo bajo costo de operación,

siendo la línea celular HepG2 una de las más utilizadas. Para lograr inducir un modelo similar a lo que se presenta durante la de esteatosis hepática no alcohólica en un cultivo de HepG2, se utilizó como referencia protocolos previamente publicados en la literatura; de los cuales se optó por emplear un medio hiperglucémico (30 mM) e insulina (10 µg/mL) con el fin de determinar de manera inicial las características morfológicas de la NAFLD al microscopio.

2. Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is widely presented worldwide, with a prevalence around of 25%. Immortalized liver cell lines are frequently used in the study of the liver disease due to their easy handle and relative low cost maintenance. HepG2 cell line is being one of the most widely used for this purpose. In order to induce a non-alcoholic hepatic steatosis *in vitro model* in the HepG2 cell culture, several protocols previously published was revised; after this, it was decided to apply a hyperglycemic medium (30 mM) and insulin (10 µg/mL) in order to obtain the morphological characteristics of the NAFLD, the results of this protocol were evaluated through microscopy analysis.

3. Introducción

La esteatosis hepática no alcohólica es un subtipo inflamatorio de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés). Esta se caracteriza principalmente por la acumulación macrovesicular de triglicéridos en los hepatocitos así como un aumento en la inflamación. A pesar de que la esteatosis hepática suele ser clínicamente silenciosa, con el tiempo puede evolucionar a cirrosis o en una enfermedad hepática terminal (Sheka *et al.*, 2020).

Se estima la prevalencia mundial de NAFLD en alrededor del 25%, teniendo las tasas más altas en Oriente Medio y América del Sur (>30 %) y las tasas más bajas en África (13 %). México es uno de los países cuya población reúne varios factores de riesgo

para esta enfermedad y su prevalencia podría superar el 50% (Bernal-Reyes *et al.*, 2019). Por otra parte, la estimación directa de la prevalencia de esteatosis hepática es difícil debido a que el diagnóstico requiere de una biopsia de hígado, lo que lo vuelve un procedimiento de riesgo para el paciente; sin embargo, estimaciones indirectas sugieren que entre el 3 % y el 6 % de los estadounidenses padecen de esteatosis hepática (Estes, *et al.* 2018).

Tanto la NAFLD como la esteatosis hepática están fuertemente asociadas con la obesidad, dislipidemias, diabetes tipo 2 y síndrome metabólico (Ong *et al.*, 2005). Además de esto, los pacientes con esteatosis hepática son susceptibles a desarrollar carcinoma hepatocelular a tasas significativamente más altas que la población general y tienen una tasa anual 12 veces mayor que los pacientes con NAFLD (Stine *et al.*, 2018).

A manera de poder generar alternativas de tratamiento para este y otros padecimientos, las líneas celulares se utilizan ampliamente debido a su similitud con los tejidos primarios, su bajo costo de mantenimiento y la facilidad de su uso y cultivo (Kaur *et al.*, 2012). En el caso específico del estudio del hígado, actualmente se utilizan líneas celulares hepáticas inmortalizadas en lugar de células derivadas de biopsias. Actualmente, existen alrededor de 40 líneas celulares hepáticas, siendo las más utilizadas: HepaRG, Huh7, SK-Hep-1, Hep3B y HepG2. HepG2 es particularmente conocida por ser la primera línea celular en exhibir características clave de los hepatocitos como su tamaño y número de núcleos, siendo un intermedio entre los hepatocitos normales y las células tumorales; fue aislada en 1975 y descrita inicialmente como carcinoma hepatocelular y luego clasificada como hepatoblastoma (Arzumian *et al.*, 2021).

Se ha reportado con anterioridad la aplicación de niveles altos de glucosa en medio de cultivo para la inducción de un modelo *in vitro* de esteatosis hepática no alcohólica en células HepG2. Gunning y

colaboradores reportaron en 2019 el uso de medio DMEM hiperglucémico (30 mM de glucosa) complementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y una solución de penicilina-estreptomomicina al 1 % en estas células para lograr el desarrollo de NAFLD con el fin de estudiar los cambios genéticos y fenotípicos clave en las células HepG2 (Su *et al.*, 2019). Hossein y colaboradores en 2019 también reportaron la obtención de un modelo de esteatosis hepática no alcohólica empleando medio hiperglucémico de 25 mM de galactosa con SFB al 10 % y penicilina/estreptomomicina al 1 % (Rafiei *et al.*, 2019). Basado en estos estudios se determinó emplear DMEM alto en glucosa (30 mM) como medio base para el desarrollo de NAFLD en la línea celular HepG2.

El uso de insulina también se encuentra en la literatura para inducir esteatosis hepática no alcohólica. Boeckman y colaboradores reportaron la obtención de un modelo suplementando insulina 100 nM, y glucosa 4.5 mg/mL, en el medio de cultivo (Boeckmans *et al.*, 2020).

3. Objetivos

Obtener un modelo *in vitro* de esteatosis hepática no alcohólica en células HepG2.

4. Metodología

Preparación de medio de cultivo

Para este proyecto, se utilizaron dos medios de cultivo DMEM con diferentes concentraciones de glucosa (5 mM y 30 mM); conteniendo cada uno 4.15 g de DMEM base en polvo, 20 mL de L-glutamina, 1.85 g de NaHCO₃, 7.5 mg de rojo fenol, 50 mL de SFB, 5 mL de antibiótico y dextrosa (0.5 g y 2.73 g para 5 mM y 30 mM, respectivamente).

Para la preparación del medio de cultivo se procedió a pesar y disolver los elementos sólidos en 425 mL de agua destilada. Posteriormente, se añaden en la cámara de bioseguridad previamente estéril, el

antibiótico, L-glutamina y el SFB, en este orden. Finalmente, el medio se esteriliza por filtración al vacío y se refrigera hasta su uso.

Sembrado de placa

Las distintas placas se sembraron partiendo de un stock de células HepG2 en condiciones estándar. Para esto se retira el medio de cultivo del stock para después eliminar las interferencias del medio usado con 5 mL de PBS a 37 °C. Después, se añadió 1 mL de tripsina y se incubó a 37 °C por 8 min. Una vez concluida la incubación, las células se desprenden de la placa añadiendo 9 mL de medio 5 mM fresco a 37 °C y se recolecta la suspensión celular.

Para obtener la densidad celular deseada, se toman 10 µL de la suspensión celular obtenida y se procede a cuenta en cámara Neubauer. Una vez conocida la densidad celular de la suspensión se procede a sembrar la cantidad requerida en las placas nuevas en medio 5 mM.

A lo largo del proyecto se utilizaron tres tipos distintos de placas (placa tipo Petri de 100 mm, placa tipo Petri de 60 mm y placa de 96 pozos). Las placas de stock se sembraron a una densidad celular de 5×10^5 células y se transfirieron a una nueva placa al llegar a una confluencia del 80 %. Las placas de 60 mm y 96 pozos se utilizaron para pruebas de viabilidad celular (MTT), cuantificación de proteínas (BCA), inflamación (óxido nítrico) y análisis de microscopia a una densidad celular de 4×10^4 y 2×10^4 células respectivamente.

Aplicación de tratamientos

Para la obtención del modelo de esteatosis hepática *in vitro* en placas de 60 mm y 96 pozos, se utilizó un medio alto en glucosa (30 mM) y una concentración de 10 µg/mL de insulina por un periodo de 48 h posterior a confluencia.

Microscopia

La evaluación del modelo de esteatosis hepática no alcohólica obtenido se llevó a cabo a través de microscopia (Fig. 1 y 2), comparando la morfología de las células HepG2 cultivadas en condiciones normales (5 mM) y aquellas a las que se les aplicó el tratamiento (medio 30 mM e insulina) por 48 h.

5. Resultados

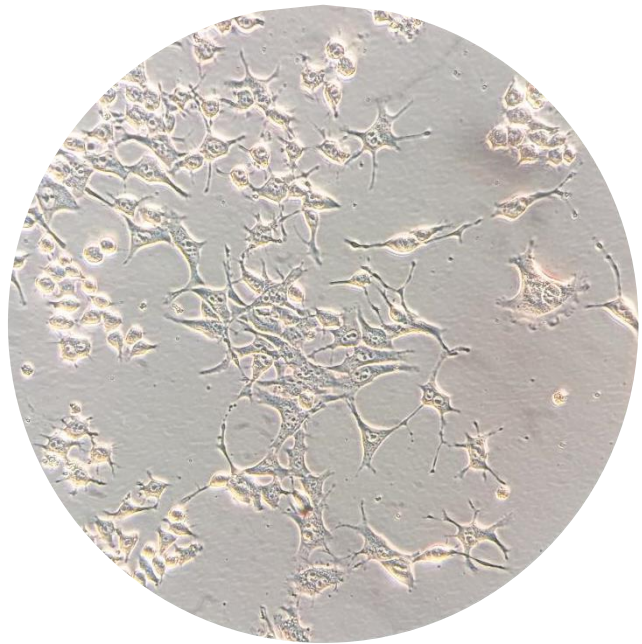


Fig. 1 Microscopia de células HepG2 en condiciones normales (medio 5 mM).

En la Fig. 1 se muestra una imagen de microscopía de las células HepG2 en condiciones estándar 4 días después de haber sido sembradas. Las células presentan una morfología consistente con la presentada en los manuales de ATCC; se puede observar fácilmente la estructura poliédrica característica de estas células hepáticas y no se observa formación de liposomas o gotas lipídicas en las mismas.

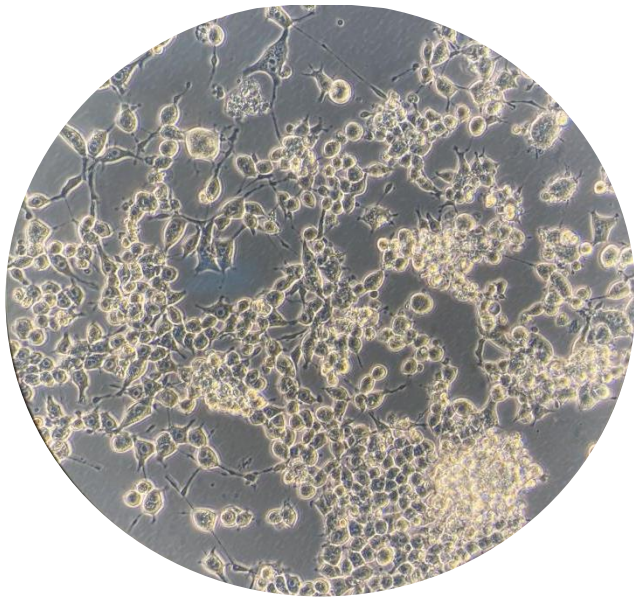


Fig. 2 Microscopía del modelo *in vitro* de esteatosis hepática no alcohólica obtenido mediante la incubación en medio alto en glucosa 30 mM e Insulina.

En la Fig. 2 se muestra una imagen de microscopía de las células HepG2 cultivadas en medio alto en glucosa e insulina 48 h después de haber aplicado el tratamiento. Las células presentan una morfología típica de esteatosis hepática de acuerdo a lo reportado por otros grupos de trabajo (Su *et al.*, 2019), se puede observar que estas se encuentran hinchadas, perdiendo la mayoría su forma poliédrica. También es posible observar la formación de liposomas o gotas lipídicas en el citoplasma, las cuales son un indicador de la acumulación de lípidos característica en NAFLD.

6. Discusión y conclusiones

Mediante los protocolos realizados fue posible observar un cambio significativo en la morfología de las células HepG2. Las cultivadas en condiciones normales (Fig 1) presentan una estructura típica de células hepáticas, sin presencia de gotas lipídicas. Por otra parte, las células a las cuales se les incubó con el medio alto en glucosa e insulina condujo a un modelo de esteatosis hepática (Fig 2), donde se puede apreciar

como las células están hinchadas y presentan gotas lipídicas.

A través de la microscopía se puede asumir que se logró satisfactoriamente el objetivo del proyecto de verano al obtener el modelo deseado de esteatosis hepática. Sin embargo, para apoyar este protocolo se deben realizar pruebas adicionales como la microscopía con tinción de rojo oleoso y la cuantificación de triglicéridos (TG), el cual es específico para lípidos intracelulares; lo anterior permitirá detectar con mayor precisión las gotas lipídicas al microscopio. También es necesario realizar pruebas de viabilidad celular (MTT), cuantificación de proteínas (BCA) y óxido nítrico (inflamación) para monitorear el estado del cultivo posterior a la inducción del modelo, así como evaluar la evolución de los mecanismos proinflamatorios derivados del protocolo.

7. Agradecimientos

En este presente trabajo agradezco a la Dra. Minerva Ramos Gómez, por permitirnos trabajar en su laboratorio, además de brindarnos los materiales y el protocolo para la realización de las prácticas.

Al programa de “Verano de la Ciencia” por dar a los estudiantes la oportunidad de participar en los proyectos de investigación.

De igual manera al M. en C. Josué Manríquez Núñez y a la Lic. Ximena Ávalos Márquez por formarnos en la realización de las técnicas del laboratorio y guiarnos con sus conocimientos y experiencias a lo largo de las prácticas.

8. Referencias bibliográficas

1. A. C. Sheka, O. Adeyi, J. Thompson, et al., “Nonalcoholic Steatohepatitis: A Review”, JAMA, Vol. 24, Issue 323, pp 1175-1183. Disponible en <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2298> [consultado en 2022].

2. C. Estes, H. Razavi, R. Loomba, et al., “Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease”, *Hepatology*, Vol. 67, Issue 1, pp 123-133. Disponible en <https://doi.org/10.1002/hep.29466> [consultado en 2022].
3. G. Kaur, J. M. Dufour, “Cell lines”, *Spermatogenesis*, Vol. 2, Issue 1, pp 1–5. Disponible en <https://doi.org/10.4161/spmg.19885> [consultado en 2022].
4. H. Rafiei, K. Omidian, B. Bandy, “Dietary Polyphenols Protect Against Oleic Acid-Induced Steatosis in an in Vitro Model of NAFLD by Modulating Lipid Metabolism and Improving Mitochondrial Function”, *Nutrients*, Vol. 3, Issue 11, pp 541. Disponible en <https://doi.org/10.3390/nu11030541> [consultado en 2022].
5. J. Boeckmans, A. Natale, M. Rombaut, et al., “Human hepatic in vitro models reveal distinct anti-NASH potencies of PPAR agonists”, *Cell Biol Toxicol*, Vol. 37, Issue 2, pp 293-311. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s10565-020-09544-2> [consultado en 2022].
6. J. G. Stine, B. J. Wentworth, A. Zimmet, et al., “Systematic review with meta-analysis: risk of hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis without cirrhosis compared to other liver diseases”, *Aliment Pharmacol Ther*, Vol. 48, Issue 7, pp 696-703. Disponible en <https://doi.org/10.1111/apt.14937> [consultado en 2022].
7. J. P. Ong, H. Elariny, R. Collantes, et al., “Predictors of nonalcoholic steatohepatitis and advanced fibrosis in morbidly obese patients”, *Obesity Surgery*, Vol. 15, Issue 3, pp 310–315. Disponible en <https://doi.org/10.1381/0960892053576820> [consultado en 2022].
8. R. Bernal-Reyes, G. Castro-Narro, R. Malé-Velázquez, et al., “The mexican consensus on nonalcoholic fatty liver disease”, *Revista de Gastroenterología de México*, Vol. 84, Issue 1, pp 69–99. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.rgmxe.2019.02.003> [consultado en 2022].
9. R. C. Su, A. Lad, J. D. Breidenbach, et al., “Hyperglycemia induces key genetic and phenotypic changes in human liver epithelial HepG2 cells which parallel the Leprdb/J mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)”, *PLoS One*, Vol. 5, Issue 14, pp 1-17. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225604>. [consultado en 2022].
10. V. A. Arzumanian, O. I. Kiseleva, E. V. Poverennaya, “The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise”, *Int J Mol Sci*, Vol. 4, Issue 22, pp 23. Disponible en <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>. [consultado en 2022].
11. Z. M. Younossi, A. B. Koenig, D. Abdelatif, et al., “Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes”, *Hepatology*, Vol. 64, Issue 1, pp 73-84. Disponible en <https://doi.org/10.1002/hep.28431> [consultado en 2022].

Religión y narcocultura: reflexiones sobre su vínculo sociocultural.

Ramírez López Michelle
Universidad Autónoma de Querétaro
mramirez126@alumnos.uaq.mx
Cel. 4423538925

Resumen

Este trabajo es resultado de una investigación por medio de trabajo de gabinete con el uso de fuentes de rigor científico y de trabajo de campo con el uso de entrevistas como un instrumento metodológico. Durante el desarrollo de este texto se emplean estadísticas sobre las situaciones de México, particularmente de los Estados de Sinaloa y Michoacán, respecto al narcotráfico, a sus factores de desarrollo y, principalmente, de las implicaciones religiosas que se han tenido en la narcocultura de estos territorios para identificar elementos que promuevan las conductas antisociales.

Palabras clave

Religión, narcocultura y conducta antisocial

Summary

This work is the result of a research through cabinet work with the use of sources of scientific rigor and fieldwork with the use of interviews as a methodological tool. During the development of this text we use statistics on the situations in Mexico, particularly in the states of Sinaloa and Michoacan, regarding drug trafficking, its development factors and, mainly, the religious implications that have had on the narcoculture of these territories to identify elements that promote antisocial behavior.

Keywords

Religion, narcoculture and conduct antisocial

Introducción

En el siguiente trabajo se presentará un análisis sobre las implicaciones que llegan a tener los preceptos religiosos en la narcocultura para, de esta manera, identificar algunos elementos que promueven conductas que dañan el tejido social.

Objetivo

Analizar las implicaciones que tienen los preceptos religiosos en la narcocultura para identificar elementos que promueven las conductas antisociales.

Metodología

Esta investigación se desarrolló a través del método de la criminografía, la cual consiste en el análisis en cuatro niveles: 1) el contexto general, 2) el contexto particular, 3) el contexto diacrónico-sincrónico y, el 4) contexto cultural implícito.

El contexto general y particular se generó a través de la recopilación de datos cuantitativos en investigación de gabinete; por otro lado, los dos últimos fueron desarrollados a través de los datos obtenidos por medio del trabajo de investigación de campo y el uso de entrevistas e historias de vida, como instrumentos metodológicos, a personas que tenían conocimientos sobre las dinámicas sociales y culturales en Michoacán y Sinaloa, y figuras religiosas vinculadas al ámbito del narcotráfico.

Estas entrevistas e historias de vida se realizaron a través de medios electrónicos debido a la situación de la pandemia por COVID-19, además de la lejanía territorial.

Resultados

En un contexto general, el narcotráfico durante muchos años ha sido desarrollado por diferentes organizaciones criminales de varias partes del mundo, particularmente en México ha tenido una importante presencia e influencia en fenómenos sociales, económicos, políticos y culturales.

El problema del narcotráfico ha sido una amenaza para el desarrollo del mundo, así como un fenómeno

que ha puesto en peligro la vida de la población; por el contrario, en otras partes ha sido una “solución” para diferentes situaciones que se le presenta a la gente o, incluso, ha sido visto como un modo de vida ideal al cual aspiran a tal grado de ser aceptadas diversas prácticas relacionadas al narcotráfico.

De acuerdo con el censo realizado por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI: s/p), México en el año 2020 contaba con una población de 126,014,024; dentro de la cual, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Ocupación y Empleo (ENOE, 2022, pp. 4-7) de mayo 2022, solamente 59,077,899 personas de 15 y más años contaban con una condición económicamente activa, aunque de esa cifra 57,145,785 era población ocupada, contemplando que 3,124,726 personas no reciben ingresos y que 18,751,654 reciben máximo un salario mínimo como ingreso. Considerando que la situación de las personas puede verse afectada por fenómenos externos como pandemias, guerras, etc.

Aunado a situaciones como, por ejemplo, que de acuerdo con la Encuesta Nacional de Cultura Cívica (ENCUCI, 2020, p. 13) 2020, el 84.7% de la población de 15 años y más identificó que en su colonia o localidad han tenido problemas de infraestructura, seguridad y/o provisión de servicios educativos y de salud.

Asimismo, hay que considerar las situaciones del consumo de sustancias ilícitas, por ejemplo, de acuerdo con el Informe sobre la Situación de la Salud Mental y el Consumo de Sustancias Psicoactivas en México (2021, p. 21), los datos obtenidos de la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017 (ENCODAT), informa que el consumo de cualquier droga¹ entre la población de 12 a 65 años, aumentó un 2.9%, es decir que aproximadamente 2.5 millones de personas consumieron cualquier sustancia psicoactiva. Incluso, de acuerdo con datos de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (United Nations

Office on Drugs and Crime, UNODC, 2022: s/p), la prevalencia del consumo de drogas en la población general (15 a 64 años) en el año 2017 había mayor consumo por parte de los hombres y las sustancias con mayor consumo fue el cannabis seguido de la cocaína. Considerando que mientras haya demanda habrá oferta.

Todas estas situaciones son factores causales del fenómeno del narcotráfico en diferentes grupos etarios de la población, ya que puede generar que lo vean como una forma de enfrentar la violencia estructural que viven, entendiéndola como, de acuerdo a La Parra y Tortosa (2003, p. 57) aquellas situaciones en las que no son satisfechas las necesidades humanas básicas de las personas (supervivencia, bienestar, identidad o libertad) por diferentes situaciones políticas, económicas, sociales, culturales, etc., es decir, debido a procesos de estratificación social. Incluso, en ocasiones, buscan satisfacer también sus necesidades no reales como son los lujos, además de buscarse de forma inmediata.

Por otro lado, se considera el modo de vida de los miembros del narcotráfico, siendo ahí donde el aspecto religioso ha tenido cierto impacto en el mundo del narcotráfico, ya que: “El constante acercamiento de los traficantes con la violencia y la muerte genera la necesidad de buscar protección en figuras sobrenaturales a quienes se pueda encomendar la buena fortuna y sobrevivencia” (Becerra, 2018, p. 19), figuras que son: “sacralizados no por instituciones religiosas sino por la práctica popular” (Becerra, 2018, p. 19).

Por ello, en medios audiovisuales se presentan imágenes por un lado, de la Santa Muerte, la cual es una deidad representada con un esqueleto vestido con un hábito franciscano, ya sea parado o sentado en un trono con una guadaña y un globo del mundo o una balanza, es conocida por diferentes eufemismos como “La Santa Niña”, “La Jefa”, “La Flaca”, “La Niña Blanca”, entre otros (Oleszkiewicz, 2010, p. 218); por

¹ Sustancias médicas fuera de prescripción o por más tiempo del indicado por el médico (opiáceos, tranquilizantes, sedantes y barbitúricos y anfetaminas o

estimulantes, etc.) o de sustancias ilegales (mariguana, cocaína, crack, alucinógenos, inhalables, heroína, metanfetaminas, drogas como ketamina, etc.).

otro lado, de Malverde, el cual su versión más conocida es como el “Ángel de los pobres”, ya que era un bandido legendario que le robaba a los ricos para repartirlos entre los necesitados, después fue considerado un santo no oficial (Oleszkiewicz, 2010, p. 220); entre otros.

México en el año 2020, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2020: s/p), contaba con 90,224,559 personas de 5 años y más dentro de la religión católica y 16,118,762 dentro de una religión distinta a la católica. En el 2016, de acuerdo con la Encuesta Nacional sobre Creencias y Prácticas Religiosas en México (2016, pp. 5-21), informó que el mayor número de población era católica con el 82.7%. Asimismo, se obtuvo que el 41.8% de la población con una religión era creyente por tradición y el 54.8% cuenta con un altar religioso en casa, de los cuales la mayoría con el 59.4% es de la Virgen de Guadalupe, el 0.3% a la Santa Muerte, el 1% a Santo popular (como Malverde, San Simón, Juan Soldado, etc.), entre otros.

En un aspecto de contexto particular, en los Estados de Sinaloa y Michoacán ha sido más notorio el problema del narcotráfico en conjunto con aspectos religiosos ligados a éste.

Primeramente, con mayor presencia de narcocultura, el Estado de Sinaloa que, de acuerdo al Censo y Conteo de Población y Vivienda del 2020 realizado por el INEGI (2020: s/p), cuenta con una población de 3,026,943 de la cual, de acuerdo con las estadísticas estatales obtenidas en el 2021 por el Centro de Información Estadística y Geográfica del Estado de Sinaloa (CIEGSIN, 2022: s/p) solamente el 30.76% tiene la condición de ocupada con ingresos mayores a los 2 salarios mínimos y la tasa de desocupación es de 2.74%.

Respecto al CIEGSIN (2022: s/p) en el 2020, el 98.07% de viviendas particulares habitadas disponen de servicio sanitario, el 19.6% de la población con carencia de servicios de salud del 19.6%. Asimismo, la percepción de inseguridad en el Estado es del 60.29% en el 2021, con una cifra negra de 95.63 en el

2021 de los delitos ocurridos en la entidad y con una tasa de prevalencia de incidencia (2020) de 22,026.

Con respecto a la religión, el Estado de Sinaloa pertenece a la región noroeste del país, de la cual, de acuerdo con la Encuesta Nacional sobre Creencias y Prácticas Religiosas en México (2016, pp. 8-25), el 92% pertenece a una religión. Esta región, es mayormente con el 50% creyente por tradición y 17.1% creyente por convicción, así como el 43.7% tiene un altar en casa. Asimismo, es importante considerar que el 42.1% le atribuye su estabilidad, éxito o fracaso en su vida al esfuerzo personal, seguido de 35.6% a la voluntad de Dios, ya que si se analiza podemos observar cómo estas entidades tienen una fuerte influencia o poder sobre el comportamiento y percepción de la población.

En segundo lugar, el Estado de Michoacán que, de acuerdo con el Censo y Conteo de Población y Vivienda del 2020 realizado por el INEGI (2020: s/p), cuenta con una población de 4,748,846 de la cual, de acuerdo con la Encuesta Nacional de Victimización y Percepción Pública (ENVIPE, 2020, pp. 7-23) 2020 de Michoacán de Ocampo, estima que el 19.7% de los hogares tuvo, al menos, una víctima de delito durante el 2019. Cuenta con una tasa de cifra negra en el 2019 de 95%. Asimismo, el 61.7% de la población de 18 años y más considera la inseguridad como el problema más importante, seguido de la salud con 39.5% y el desempleo con 38.5%.

Con respecto a la religión, el Estado de Michoacán pertenece a la región centro, occidente y centro norte del país, de la cual, de acuerdo con la Encuesta Nacional sobre Creencias y Prácticas Religiosas en México (2016, pp. 8-25), el 98.1% pertenece a una religión. Esta región, es mayormente con el 42.2% creyente por tradición y 29.4% creyente por convicción, así como el 46.2% tiene un altar en casa. Asimismo, es importante considerar que el 44.1% le atribuye su estabilidad, éxito o fracaso en su vida al esfuerzo personal, seguido de 35.3% a la voluntad de Dios, por lo anteriormente mencionado.

Esa información con respecto a los contextos general y particular, niveles cuantitativos, ahora pasando a los

niveles cualitativos, se da inicio con el contexto diacrónico-sincrónico, el cual consiste en el análisis del “[...] proceso de desarrollo del fenómeno o problemática de interés en la dimensión espacio-tiempo [...]” (Posadas, 2019, p. 69), el cual es un punto importante dentro de esta investigación, dado que, podemos identificar cuáles han sido los factores causales que promuevan conductas antisociales.

Los informantes comentan que el fenómeno del narcotráfico ha estado presente en sus Estados durante muchos años, de la misma manera su creencia en ciertas figuras religiosas. El informante José Enríquez² comparte que, debido a las situaciones de desempleo, pobreza, inseguridad, falta de oportunidades, etc., en el Estado de Michoacán, fue una forma de que entrara al narcotráfico a satisfacer necesidades que el Estado no cumple. Incluso, menciona que, dentro del pueblo, un miembro del narcotráfico es visto como: “el salvador, el mesías, el que los salvó, el que les da de comer o el que los mantiene, el que les da trabajo” (José Enríquez, comerciante, julio de 2022). Puesto que, “[...] el narcotráfico parece haber logrado su supervivencia y adaptación en razón a la miopía institucional” (Thoumi citado en Wilches, 2014, p. 212).

Asimismo, menciona el informante Jesús Enríquez que la relación con los preceptos religiosos es cuando los miembros del narcotráfico, “se encomiendan a alguna persona que ellos han conocido, ya sea de forma propia o por personas que lo conocieron” (José Enríquez, comerciante, julio de 2022) o que todo inicia cuando se acercan hacia una figura religiosa y le piden un favor, el cual por ciertos factores se cumple, entonces ellos se sienten comprometidos y se empieza a hacer la fama de que hace milagros.

Indicaron que las diferentes zonas territoriales tenían diferentes inclinaciones hacia ciertas deidades; por ejemplo, la informante Karla Pérez (antropóloga, julio de 2022) comentaba que, dentro de Culiacán, Sinaloa había una mayor inclinación hacia Malverde en comparación con la Santa Muerte, incluso, decía que

eran pocas las veces que ella se percataba de alguna capilla o altar hacia la Santa Muerte. Por el contrario, la informante Diana Juárez (agente de bienes raíces, julio de 2022) comentaba que en Mazatlán era mayor la inclinación hacia la Santa Muerte, al igual que en Michoacán, como lo mencionaba el informante José Enríquez, pero, así como hay presencia de la Santa Muerte, también una gran presencia del catolicismo en los miembros del narcotráfico de Michoacán y Mazatlán: “si eres narco, debes creer en la Santa Muerte, o sea no es opcional, es un deber, o sea en la Virgencita de Guadalupe, en Diosito y en la Santa Muerte porque así tiene que ser” (José Enríquez, comerciante, julio de 2022). Puesto que:

Las prácticas religiosas católicas latinoamericanas, frecuentemente sincréticas, se vuelven incluso más fluidas al entrar en contacto con el mundo del narcotráfico y otras actividades delictivas o marginales, generadas por la fractura de la sociedad, la inestabilidad, el consumismo y la pobreza, en la segunda mitad del siglo XX y a inicios del siglo XXI (Oleszkiewicz, 2010, p. 222).

Sin embargo, la informante Diana Juárez de Culiacán, Sinaloa, menciona que esto comienza a heredarse a las siguientes generaciones, además de que: “[...] creen más en lo que creen los narcos” (Diana Juárez, agente de bienes raíces, julio de 2022), de cierta forma por la percepción que puedan tener de los miembros de estos grupos. Incluso habla de una decisión propia, al mencionar que: “Ellos son muy respetuosos, o sea no tratan como de Oh, métete a mi religión como los cristianos que hasta con engaños te quieren meter a huevo” (sic) (Diana Juárez, agente de bienes raíces, julio de 2022).

Por ejemplo, el informante José Enríquez menciona que: “[...] se encomiendan a varias personas que ellos creen que los protegen, entre ellos el más buscado o el que más se conoce es la Santísima Muerte, que según le llevan a que les dé bendiciones a sus pistolas, a sus cargamentos para que no los detengan” (José Enríquez, comerciante, julio de 2022). Para ello,

² Se les denominó un seudónimo a los informantes por razones de confidencialidad y seguridad de estos.

hacen diferentes rituales para agradecer lo que piden como un favor; dentro de estos rituales incluyen misas, festejos, ofrendas u obsequios materiales. Por ejemplo, una ofrenda hacia Malverde: “[...] es tomarse un trago en honor del patrono y pagar por que le canten un corrido o, en el caso de toda una narcooperación exitosa, contratar una banda de corridos para darle las gracias” (Oleszkiewicz, 2010, p. 221).

Inclusive la informante Diana Juárez lo menciona en su frase: “su religión es un reflejo de su actuar” (agente de bienes raíces, julio de 2022), pues hace mención de la relación del actuar de los miembros del narcotráfico y con la dinámica utilizada con la Santa Muerte: “siempre te va a querer ayudar, apoyar, son re buena onda, pero si tú les haces algo te van a matar, te van a desaparecer” (sic), “la Santa Muerte tiene la misma ideología pendeja de yo te voy a dar, te voy a dar, pero si tú me haces algo o no me haces un tributo el día que necesito, te las voy a cobrar” (Diana Juárez, agente de bienes raíces, julio 2022).

Aunque, por otro lado, la informante Elisa Pedraza (estudiante y devota, julio de 2022) comenta, como devota de la Santa Muerte, que es una figura religiosa que es utilizada para diferentes contextos, es decir, que la Santa Muerte no es solamente motivo de devoción de los miembros del narcotráfico, sino que las formas religiosas del narco se reconocen como sincréticas, ya que es una mezcla de íconos y ritos populares con de religiones como el catolicismo, reapropiándose y resignificando aspectos del ámbito sagrado, según intereses y características de los grupos sociales (Becerra, 2018, p. 19).

Menciona la informante Elisa Pedraza (estudiante y devota, julio de 2022) que la manera de profesar su fe hacia la Santa Muerte es por medio de misas, fiestas dedicadas a ella, no descuidar su altar, agradeciéndole, llevando obsequios y cumpliendo lo prometido, incluso, decía que uno de sus mandamientos es no prometer cosas que no se pueden cumplir.

De la misma manera, dentro del análisis cultural implícito, el cual consiste en el análisis del “[...]

conjunto de valores, símbolos y representaciones propios de un grupo, que proyectan la acción social” (Posadas, 2019, p. 68), el informante José Enríquez menciona sobre un libro, que tienen los miembros de los grupos de narcotráfico en Michoacán, respecto a la vida de Nazario Moreno, en el cual se establecen ciertos mandamientos para sus miembros, algunos de ellos ponen énfasis en la prioridad y respeto a la familia, que las mujeres, niños y adultos mayores son intocables, entre otros. Además, comenta que son respetuosos del ámbito católico y que tener a la Santa Muerte es como para que los cuide y no los lleve, es decir, que sigan con vida (comerciante, julio de 2022).

Asimismo, se generan expectativas o percepciones sobre sus conductas antisociales de los miembros del narcotráfico tanto que se comienzan a replicar, normalizar o, incluso elogiar. Lo podemos observar en las frases de la informante Diana Juárez (agente de bienes raíces, julio de 2022): “[...] digamos a aquí son más relajados, más buen pedo, como que no se meten con nadie, como que son más pasivos, más finos, más elegantes; y allá, en Culiacán, son unos nacos, se meten con todo mundo, les vale gorro” (sic), “el narco vino a mejorar la cultura”, “está mejor ser lo que ellos son que ser cristiano o guadalupano”, “está mejor su cultura que la otra porque las otras son traicioneras, son así mochas, de todo se espantan y aquí tienes la libertad de ser quién eres, nadie de juzga ni te crítica y sobre todo nadie habla a tus espaldas porque no sabes quién puede ser narco y te pueda matar”. Aceptando la cultura de los miembros del narcotráfico, dejando de lado las actividades delictivas que cometían, debido a que les dan soluciones a sus necesidades, dejando a un lado lo que podría ser para el resto de la sociedad lo justo o injusto, moral o inmoral, etc. (Wilches, 2014, p. 212).

Pues dentro de estos productos auditivos o visuales se reproducen “códigos de conducta, metáforas y apotegmas que definen las prácticas colectivas, estilos de vida y formas de relación de quienes participan en el narcomundo” (Valenzuela citado en Becerra y Hernández, 2019, p. 261), los cuales “responden a un modo de entender el mundo, la legalidad, la vida, la muerte, la violencia, y se objetivan en prácticas

sociales de uso, de apropiación y de consumo” (Mondaca y Cuamea citados en Becerra y Hernández, 2019, p. 262).

Por ejemplo, dentro del trabajo de campo realizado se encontró una página de red social que lleva por nombre “Nazario Moreno G.”, la cual suele publicar, sin tener certeza de la fiabilidad de las mismas, en el año 2011 como (julio 2022): “[...] las circunstancias adversas como la pobreza (sic) y esas cosas nos forzaron a vivir del riesgo y en la ilegalidad como muchos deveran (sic) entender, pero nunca abandonaremos los valores humanos y éticos (sic) que nos hacen ser seres humanos y no animales sin razon” (sic), “justicia divina nadamas” (sic), “dios (sic) los bendiga raza sigo trabajando para mi gente michoacana” y “[...] lo que buscamos es sacar a nuestras familias del rezago y la marginacion economica (sic), educativa y del subdesarrollo que durante decadas (sic) nos ha tenido sumergidos”. En estas publicaciones podemos observar cómo buscan una forma de justificar las conductas antisociales y promoverlas como una forma adecuada de cambiar las condiciones en las que se encuentran.

Conclusiones

Acorde a los resultados en esta investigación, toma mayor relevancia el factor violencia estructural, el cual se vive en las diferentes entidades federativas dando paso al mundo del narcotráfico que satisface sus necesidades humanas básicas ante la negligencia del Estado. Aunado a la presencia de la venta, consumo y producción de diferentes tipos de droga; a la presencia de preceptos religiosos que son reapropiados y redefinidos para otorgar un sentido más acorde a su realidad de los miembros del narcotráfico, es decir, como el acercamiento a figuras religiosas para su protección y su justificación en preceptos religiosos que generan modos de entender el mundo y códigos de conducta que son replicados e idealizados por la población.

De la misma forma, gracias a la información obtenida, se abona a las disciplinas de las ciencias sociales y particularmente la Criminología, una visión más amplia con respecto al vínculo religión-narcotráfico,

particularmente sobre los preceptos religiosos, su significación y uso en su praxis antisocial cotidiana.

Dentro de la información obtenida en trabajo de campo, uno de los hallazgos principales fue dar cuenta los trasfondos sociales y culturales de dichas figuras o deidades que son motivo de devoción por los miembros del narcotráfico. Por lo tanto, se considera pertinente que el análisis del fenómeno de la reapropiación y redefinición de preceptos y figuras religiosas siguiera en constante investigación. Ello debería ser contemplado al momento del diseño e implementación de políticas criminológicas para un mayor impacto social con miras a la mejora de la convivencia social.

Referencias

- Becerra, A. & Hernández, D. (2019). Fascinación por el poder: consumo y apropiación de la narcocultura por jóvenes en contextos de narcotráfico. *Intersticios Sociales. El colegio de Jalisco*, marzo-agosto, núm. 17, pp. 259-285. Disponible en <https://n9.cl/n4a5w> [Consultado en 2022].
- Becerra, A. (2018). Investigación documental sobre la narcocultura como objeto de estudio en México. *Revista Culturales*, vol. 6, pp. 1-36. Disponible en <https://n9.cl/nqh57> [Consultado en 2022].
- Centro de Información Estadística y Geográfica del Estado de Sinaloa. Estadísticas Estatales. <https://n9.cl/z0nqy>
- DataUNODC. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. <https://n9.cl/06wug>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (junio, 2021). Encuesta Nacional de Cultura Cívica (ENCUCI) 2020. <https://n9.cl/iwlr4>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (diciembre, 2020). Encuesta Nacional de Victimización y Percepción sobre Seguridad Pública (ENVIPE) 2020. Michoacán de Ocampo. <https://n9.cl/m8jwk>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (junio, 2022). Indicadores de Ocupación y Empleo. Mayo 2022. <https://n9.cl/rw17x>
- La Parra, D. & Tortosa, J. (2003). Violencia estructural: una ilustración del concepto. *GEPYD, Grupo de Estudios de Paz y Desarrollo*, Universidad de Alicante. Disponible en <https://n9.cl/b1pba> [Consultado en 2022].
- Observatorio Mexicano de Salud Mental y Consumo de Sustancias Psicoactivas. (2021). Informe sobre la situación de la salud mental y el consumo de sustancias psicoactivas en México. <https://n9.cl/u78h6>

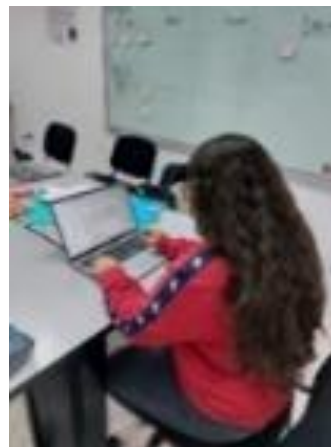
Oleszkiewicz, M. (2010). El narcotráfico y la religión en América Latina. *Revista del CESLA*, vol. 1, núm. 13, pp. 211-224. <https://n9.cl/lr1dk>

Posadas, J. (2019). *Criminografía cultural. Guía de investigación de campo para criminólogos*. Gedisa editorial; Universidad Autónoma de Querétaro.

Red de Investigadores del Fenómeno Religioso. (2016). Encuesta Nacional sobre Creencias y Prácticas Religiosas en México. <https://n9.cl/zl2q5>

Wilches, J. (2014). ¿Y educar para qué? Representaciones mediáticas de narcocultura en los modelos del progreso económico y prestigio social. *Desafíos*, vol. 26, núm. 1, enero-julio, pp. 199-234. <https://n9.cl/y0tfns>

Galería fotográfica



Evaluación de metabolitos secundarios y actividades biológicas en plantas.

Paola Irene Aguilar-Rodríguez¹, Ana Angélica Feregrino-Pérez²

¹Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería, Ingeniería Agroindustrial, Campus Amazcala, El Marqués.

²Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería, Laboratorio de Metabolitos Secundarios y Nanocompositos, Campus Aeropuerto.

Autor de correspondencia:
feregrino.angge@hotmail.com

Resumen

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados a partir de excedentes del metabolismo primario; estos compuestos son de interés científico de distintas áreas de la ciencia y tecnología pues se han descubierto múltiples beneficios que aportan a sectores de la industria farmacéutica, cosmética, agrícola y nutracéutica. Por tal motivo, en el presente estudio se evaluó la actividad antioxidante e identificación de metabolitos secundarios en semillas de *Zea mays* (maíz), *Phaseolus vulgaris* (frijol), *Solanum lycopersicum* (tomate) y *Helianthus annuus* (Girasol).

Palabras clave: metabolismo secundario, actividad antioxidante, maíz, frijol, tomate, girasol, espectrofotómetro, fenoles, flavonoides, taninos.

Abstract

Secondary metabolites are chemical compounds synthesized from surplus of primary metabolism; these compounds are of scientific interest in different areas of science and technology because multiple benefits

have been discovered in the pharmaceutical, cosmetic, agricultural and nutraceutical industries. For this reason, the present study evaluated the antioxidant activity and identification of secondary metabolites in *Zea mays* (maize), *Phaseolus vulgaris* (bean), *Solanum lycopersicum* (tomato) and *Helianthus annuus* (sunflower).

Key words: secondary metabolism, antioxidant activity, maize, bean, tomato, sunflower, spectrophotometer, phenols, flavonoids, tannins.

Introducción

Las plantas son capaces de sintetizar moléculas químicas conocidas como metabolitos secundarios, los cuáles no tienen una función aparente en el metabolismo primario, sin embargo, tienen una implicación ecológica sumamente importante para la planta, pues sirven de mecanismo de defensa, atracción o como sustancias alelopáticas. Aproximadamente el 60% de compuestos anticancerígenos y el 75% de medicamentos contra enfermedades infecciosas son productos naturales o derivados de los metabolitos secundarios y múltiples investigaciones demuestran que estos compuestos presentan actividad antioxidante, antimicrobiana y antitumoral, por lo tanto, son de interés científico y tecnológico.

Según la Secretaría de Salud, el 90% de la población mexicana ha optado por alguna de las 4500 plantas medicinales de México. De acuerdo a datos del Instituto Mexicano del Seguro Social, se tiene el registro de 3000 especies de plantas con atributos medicinales y sólo se ha hecho análisis farmacológico del 5% del total de estas plantas.

El análisis, evaluación e investigación de estas plantas es importante pues se podrían generar mejoras e innovaciones dentro de las industrias farmacéuticas, agrícolas y nutraceuticas.

Objetivo

Evaluar los metabolitos secundarios y actividad antioxidante de maíz, frijol, tomate y girasol.

Metodología

Extracción metanólica

Para la elaboración de los extractos se utilizaron 200 mg de muestra de cada tratamiento. Se colocaron en tubos falcón con 10mL de metanol. Los tubos se

colocaron por 30 min en la sonicadora y se centrifugaron por 10 min a 5,500 rpm a 4°C. El sobrenadante se almacenó en refrigeración.

Determinación de fenoles totales

Para la curva de calibración se realizaron 9 puntos con concentraciones diferentes, un tubo eppendorf por cada concentración. Las concentraciones se realizaron como se muestra en la siguiente tabla.

Tubo	Solución Ac. gálico	H2O destilada	Folin	Na2CO3
0	0	500	250	1250
1	20	480	250	1250
2	40	460	250	1250
3	60	440	250	1250
4	80	420	250	1250
5	100	400	250	1250
6	120	380	250	1250
7	140	360	250	1250
8	160	340	250	1250

Tabla 1. Concentraciones curva de calibración fenoles

Posteriormente, los tubos fueron agitados en el vortex para mezclar los reactivos y se dejaron reposar 2 horas en la oscuridad. Transcurrido el tiempo se leyeron a 760 nm en el espectrofotómetro MULTISCKAN.

Determinación de fenoles totales en muestra

Se tomaron 40 µL de extracto metanólico y se colocaron en los tubos eppendorf. Posteriormente, se adicionó en cada tubo 460 µL de H₂O destilada, 250 µL de folin, 1250 µL de Na₂CO₃, se agitaron en el vortex y se dejaron reposar 2 horas en la oscuridad. Transcurrido el tiempo se colocó 200 µL de cada tubo en pocillos por triplicado y finalmente se leyeron en el MULTISCKAN a 760 nm.

Determinación de flavonoides totales

Para la solución stock se pesaron 0.025 g de rutina, se colocaron en matraces aforados y se aforó a 10 ml de metanol.

De la solución stock, se tomaron 800 μL y se aforaron a 10 ml con metanol. De esta solución, se tomaron 7.5 ml y se aforaron a 10 ml con metanol. De la solución anterior, se tomaron 6.67 ml y se aforaron a 10 ml con metanol. De esta solución, se tomaron 5 ml y se aforaron a 10 ml con metanol. Repetimos esta técnica con 5ml dos veces más. De la última solución obtenida, se tomaron 4 ml y se aforaron a 10 ml de metanol. Finalmente, de la última solución se tomaron nuevamente 5 ml y se aforaron a 10 ml de metanol.

Teniendo nuestras respectivas concentraciones, se colocaron 50 μL de cada una y se colocaron por duplicado en los pozos de la microcelda. Se adicionaron 180 μL de H_2O destilada y 20 μL de solución de 2-aminoetildifenil-borato al 1%. El blanco se hizo con 230 μL de H_2O destilada y 20 μL de solución de 2-aminoetildifenil-borato al 1%.

Las muestras se leyeron a 404 nm en el MULTISCKAN.

Determinación de flavonoides totales en muestra

Se tomaron 50 μL del extracto metanólico de la muestra y se le adicionaron 180 μL de agua destilada, 20 μL de solución 2-aminoetildifenil-borato al 1%.

Para el blanco se tomaron 50 μL del extracto metanólico y se le adicionaron 200 μL de agua destilada.

Se leyó la absorbancia a 404 nm en el MULTISCKAN.

Determinación de taninos condensados

Se pesaron 0.008 g de catequina y se colocaron en un matraz ámbar, posteriormente, se aforó a 10ml con metanol. De esta solución, tomamos 7.5 ml y se aforaron a 10ml con metanol. De esta solución, se tomaron 6.66 ml y se aforaron a 10ml con metanol. De la solución anterior, se tomaron 5 ml y se aforaron a 10 ml con metanol.

Teniendo las concentraciones, se colocaron 50 μL de cada concentración por triplicado en cada pocillo de la microcelda. Posteriormente, se le adicionó 200 μL de la solución de HCl al 8% y vainillina al 1%. Los 200 μL de la solución de HCl y vainillina debe adicionarse de 50 μL en 50 μL hasta completar el volumen deseado.

El blanco se realizó con 50 μL de metanol y 200 μL de HCl al 4%. Finalmente se leyó la absorbancia en el MULTISCKAN a 492 nm.

Determinación de taninos condensados en muestra

Se colocó 50 μL de cada muestra en los pocillos de la microcelda y se le adicionó 200 μL de la solución de HCl al 8% y vainillina al 1%. Los 200 μL de la solución de HCl y vainillina debe adicionarse de 50 μL en 50 μL hasta completar el volumen deseado. Se leyó la absorbancia en el MULTISCKAN a 492 nm.

Capacidad antioxidante DPPH

Para la solución de DPPH, se pesaron 0.0015 g de DPPH para aforar a 25ml. Posteriormente, se diluyó en 20 ml de metanol.

La solución obtenida, se dejó en la sonicadora durante 10 min, cubierta completamente de la luz.

Al transcurrir el tiempo marcado, se aforó con metanol a 25 ml.

Para la solución stock de trolox, se pesaron 0.0025gr de trolox y se aforó con metanol a 10ml.

Para la curva de calibración se colocaron 20 μ L de muestra con 200 μ L de radical DPPH en cada pocillo de la microplaca y se realizó la lectura a 520nm en el MULTISCKAN.

Capacidad antioxidante ABTS

Para la curva de calibración se preparó una solución stock tomando 0.0025 g de trolox y se aforó a 10 ml de metanol.

Se pesó 19.20 mg de ABTS y se aforó a 5ml de agua destilada. Posteriormente, se pesaron 0.1892 g de persulfato de potasio y se aforó a 5 ml.

Se agregaron 88 μ L de la solución de persulfato de potasio a la solución de ABTS. Esta solución se dejó en reposo durante 12 horas en oscuridad.

Pasado el tiempo establecido, se hizo una disolución de 500 μ L de ABTS y entre 15-25 ml de etanol dependiendo la lectura del espectrofotómetro a 734 nm, pues se buscó un valor de absorbancia entre 0.7 y 1 para obtener resultados más sólidos.

Se colocó 20 μ L de muestra con 230 μ L de ABTS en cada pocillo de la microplaca y se leyó a 734 nm en el MULTISCKAN. A continuación, se muestran las curvas de calibración realizadas.

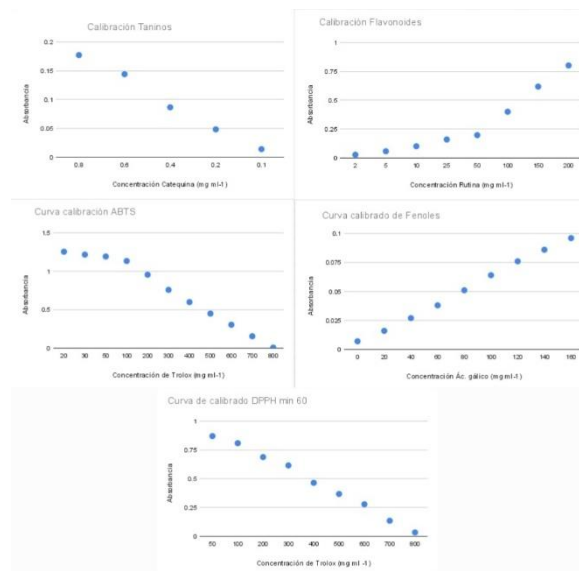


Imagen 1. Curvas de calibración realizadas para fenoles, flavonoides, taninos, ABTS, DPPH

Resultados y discusión

En la siguiente tabla, se muestra el contenido de actividad antioxidante ABTS y DPPH en extractos de maíz proveniente de dos distintos tratamientos y frijol, así como el contenido de taninos, flavonoides y fenoles en extractos de maíz proveniente de dos distintos tratamientos, semillas de frijol y semillas de girasol.

Muestra	Fenoles	Taninos	Flavonoides	DPPH	ABTS
	mg AG / mg muestra	mg cat / mg muestra	mg rut / mg muestra	mg trolox / mg muestra	mg trolox / mg muestra
Maíz 1	243.33± 0.00841	0.97± 0.001305	55.89± 0.00468	136.85± 0.0118	92.56± 0.0058
Maíz 2	211.72± 0.01511	0.85 ± 0.002893	53.43± 0.00359	200.12± 0.0043	328.67±0.0042
Maíz 3	227.44± 0.00467	0.87 ± 0.00105987	47.19±0.00075	190.27± 0.0036	151.77± 0.0058
Girasol 1	185.72± 0.00355	1.23486± 0.01355	86.605± 0.01358		
Girasol 2	355.55± 0.00119	1.0911±0.001750	76.0789± 0.0015		
Girasol 3	448.66± 0.0025	0.8970±0.0038436	64.0350± 0.0030		
Frijol 1	221.72± 0.0090	0.6383 ±0.0012055	78.4122± 0.0178	431.69± 0.0085	219.97± 0.0018
Frijol 2	206.27± 0.0081	0.614426±0.00208	68.3684± 0.0060	422.82± 0.0111	176.08± 0.0010
Maíz4 1	150.666± 0.0020	0.5789±0.003951	35.38± 0.003	283.21± 0.0052	280.708± 0.0011
Maíz4 2	166.444± 0.0061	0.5958±0.001457	37.07± 0.0018	246± 0.004757	91.229± 0.01271
Maíz4 3	155.555± 0.0067	0.62730±0.00384	43.35± 0.0037	342.39± 0.0028	232.625± 0.0008

Tabla 2. Contenido de actividad antioxidante ABTS, DPPH, taninos, flavonoides y fenoles por cada muestra.

Podemos observar que las muestras de semilla de girasol presentan un alto contenido en taninos y fenoles. También se observó una alta actividad antioxidante en las semillas de frijol.

Conclusiones

El trabajo presente evaluó y cuantificó el contenido de fenoles, flavonoides, taninos y actividad antioxidante DPPH y ABTS en plantas de interés comercial y nutracéutico, obteniendo resultados interesantes, específicamente en la semilla de girasol.

Se finaliza el trabajo con interés de continuar con la investigación de estos compuestos para una aplicación en la industria.

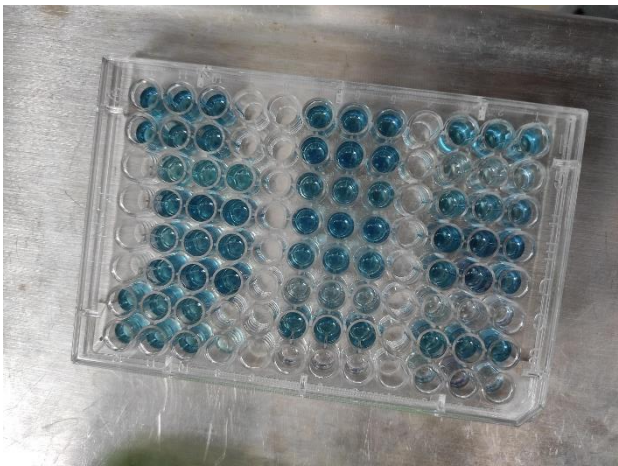
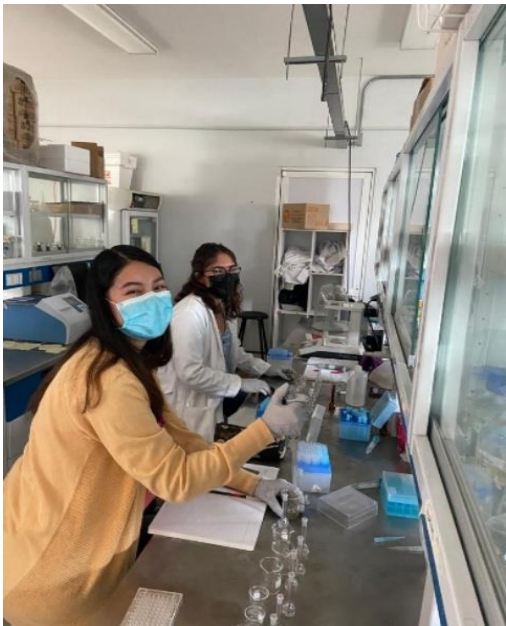
Agradecimientos

A la Dra. Ana Angélica Feregrino por brindarnos las instalaciones, por compartirnos sus conocimientos y por su constante apoyo. A Estefanía Arellano por compartirme su conocimiento y ser paciente conmigo, por ser mi compañera de laboratorio este verano. A mi familia y a mi novio, por apoyarme y alentarme siempre a lograr mis metas y propósitos, pues sin su amor no hubiera podido. A Valeria Caltzontzin por la paciencia y apoyo brindado durante todo el verano en el laboratorio. A la Dirección de Investigación y Posgrado de la UAQ por darme la oportunidad de participar en este Verano de Ciencias.

Referencias

- Castillo et al (2019) “Qué son y para qué sirven los metabolitos de las plantas” Recuperado de: <https://www.cyd.conacyt.gob.mx/?p=articulo&id=227>
- Guizar (2019) “El papel de los metabolitos secundarios en la agricultura” Recuperado de: <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/El-papel-de-los-metabolitos-secundarios-en-la-agricultura/124>
- SEMARNAT (2021) “Plantas medicinales de México” Recuperado de: <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales-de-mexico?idiom=es>

Galería Fotográfica



La experiencia inflacionaria en hogares de ingresos altos y bajos

Paula Mariana Padilla Sanchez
(ppadilla06@alumnos.uaq.mx)
Enrique Leonardo Kato Vidal
(enriquekato@uaq.mx)

Resumen

La inflación reportada por el Instituto de Estadística refleja un promedio de la realidad de la población, dejándonos con una pregunta ¿qué sucede con grupos particulares de la población? La presente investigación pretende medir la inflación en hogares de ingresos alto, medio y bajo durante dos episodios de alta inflación (2017 y 2021); esto para lograr evaluar qué hogares presentan una mayor pérdida de su poder adquisitivo. Esto se logra a través de la recolección de datos, como lo son el Índice Nacional de Precios al Consumidor y el gasto corriente por parte de los hogares. Estos datos fueron procesados con el fin de obtener la inflación para grupos de hogares en cada nivel de ingreso (bajo, medio y alto). Gracias a lo anterior, se logró observar que las tres clases de hogar presentan valores diferentes, siendo la inflación más alta para el nivel de ingreso bajo. Por su parte también se analizan los periodos 2017 y 2021, en los cuales la inflación presenta un aumento considerable, demostrando que es más notorio en esos periodos la diferencia de inflación entre niveles de ingreso. Es así que se concluye que la inflación para el nivel ingreso bajo es mayor que las demás en la mayoría

de los casos, esto debido a los patrones de consumo que presenta.

Abstract

The inflation presented year after year by the authorities only reflects the reality of a sector of the population, leaving us with a question: what happens to the rest of the population?

This research aims to measure inflation in high, medium and low, income households during two periods of time, in which prices presented considerable increases (2017 and 2022). In order to evaluate which households, present a greater decrease in their purchasing power. This is achieved through gathering data, such as the National Consumer Price Index and current spending by households. This data is processed and applied in 3 formulas, in order to obtain the inflation of each income level (low, medium and high). Thanks to the above, it was possible to observe that each income level presents different values, with the highest inflation rate for the low income level. As part of the investigation, the periods 2017 and 2022 are also analyzed, due to a considerable increase in the inflation, demonstrating that the difference in the inflation rate between income levels is more noticeable in those periods. Thus, it is concluded that inflation rate for the low income level is higher than the others in most cases, due to the consumption patterns they presents.

Introducción

La inflación, como indicador económico, enseña el aumento generalizado y continuo que presentan los precios de bienes y servicios de una economía durante un periodo de tiempo. La inflación se calcula “dividiendo el precio de la cesta de bienes y servicios (representativa del lugar) en un determinado año entre el precio de la misma cesta en el año base”. Dicha cesta se utiliza para obtener el Índice de Precios al Consumidor (IPC); con esto en mente podemos decir que la inflación es la variación porcentual del IPC.

La importancia del cambio de precios de bienes y servicios radica en el gasto del ingreso que hacen las familias. Pese a que se usa una canasta general para medir esta variación en todo el país, en la realidad los hogares mexicanos cuentan con diferentes tasas de inflación, esto debido a las diferencias en sus costos de vida. Es así que la inflación que se reporta año con año sobrestima o subestima la inflación que viven los hogares. Como varios autores lo mencionan, estas diferencias de inflación solo agravan aún más la desigualdad entre niveles de ingreso, agrandando la brecha entre las personas con bajos ingresos y personas con altos ingresos.

La inflación busca reflejar la realidad de la economía. En diversos documentos y estudios, se ha buscado mostrar las diferencias inflacionarias en la población, según la clase social. Por ejemplo, el Instituto Mexicano para la Competitividad (2022) realizó un estudio sobre las presiones inflacionarias en los diferentes hogares mexicanos, demostrando que los hogares de más bajos ingresos destinan la mayoría de sus ingresos a la compra de productos cuyos precios han aumentado más durante el año. Bonilla (1975) en su artículo *Inflación y Clase*

Sociales, nos ejemplifica en situaciones hipotéticas, como es que los salarios y los precios cambian en diferente medida, siendo la mayoría de los casos, que los salarios de los trabajadores no cubren por completo el cambio inflacionario de los productos, mientras que las ganancias de los empresarios no se ven afectadas de igual manera por estos cambios.

Por su parte, Noyola (2009) nos presenta el caso mexicano para ilustrar que la inflación expresa la lucha de clases, además de presentar como actúa la política para contrarrestar las presiones inflacionarias; “lo grave de la inflación no es el aumento de precios en sí mismo, sino sus consecuencias en la distribución del ingreso y las distorsiones que trae aparejada entre la estructura productiva y la estructura de la demanda”. Pang-Tien, Chinkun y Jry-rong, al igual que IMCO, en su documento, demuestran empíricamente si es conveniente usar el IPC de Taiwan para mostrar los ajustes de la inflación en los diferentes hogares. Es así que logran llegar a la misma conclusión, que en los hogares con menores recursos, presentan mayores variaciones en la inflación.

El objetivo de este reporte fue demostrar cómo se comporta la inflación en México para tres clases sociales -alta, media y baja-, durante dos episodios con precios crecientes (2017 y 2021), con el fin de ilustrar que hogares tienen una mayor pérdida de poder adquisitivo.

El análisis de la inflación ayuda a comprender y formular las políticas necesarias a aplicar para contrarrestar las alzas imprevistas de precios. El estudio que se lleva a cabo no solo expondrá la realidad de las familias mexicanas, sino que brindará una visión amplia de cómo se comporta la inflación en el país, educando a más personas sobre este fenómeno.

Metodología

La presente investigación pretende ser de carácter cuantitativo y descriptivo, en particular se medirán tasas de inflación no disponibles en fuentes oficiales y se mostrará su evolución en el tiempo. Los datos provienen de INEGI.

Obtención de la inflación para las 3 clases socioeconómicas

a División de clases socioeconómicas

Para efectos de esta investigación, el nivel de ingreso de las familias será dividido en 3, según lo plantea [1], nivel bajo, medio y alto. En su documento *World Inequality Report 2022*, se plantea que el 50% de las personas reciben los ingresos más bajos, 40% los ingresos medios y solo el 10% los ingresos más altos. Es así que se tomaran esas medidas de referencia para clasificar a los hogares. El INEGI, plantea 10 deciles de hogares (sectores socioeconómicos según ingreso per cápita familiar). Con el fin de realizar esta investigación la división será: deciles I a V (ingreso bajo), deciles VI a IX (ingreso medio) y decil X (ingreso alto).

b Alfa como ponderador

De primera instancia, se recurre a la Encuesta Nacional de Ingreso y Gasto de los Hogares (ENIGH) de dos periodos 2016 y 2020, para analizar dos procesos de alta inflación (2017 y 2021), donde se tabula el gasto total y gasto corriente por ponderadores (8), de los deciles de hogares. α

Con esta información obtendremos *alpha* (α), la participación del ponderador en el gasto del hogar.

$$\alpha_{i,k} = \frac{\sum \text{gasto corriente del ponderador}}{\sum \text{gasto total de la clase socioeconómica}} \quad [\text{Ec. 1}]$$

Esta operación se realiza tres veces, para cada nivel de ingreso k , en cada uno de los ocho ponderadores i (ver anexo).

c Índice Nacional de Precios al Consumidor (INPC)

Posteriormente utilizaremos el INPC de 2015 a 2022, donde se mide la variación porcentual mensual de los bienes y servicios de la canasta representativa a nivel nacional. Con los datos proporcionados y las dos tablas (2016 y 2020) del indicador α para cada ponderador, se multiplicará la variación porcentual mensual de cada ponderador por los valores de α para los tres niveles de ingreso de cada año. Así tendremos P

$$\text{Variación } P = \sum \alpha_{i,k} * \text{VARIACIÓN DE LOS PRECIOS} \quad [\text{Ec. 2}]$$

Una vez obtenido el producto de la multiplicación, se suman los productos de los ocho ponderadores, según su nivel de ingreso y el año de α . En este caso de enero 2015 a diciembre 2018 se usará α 2016 y de enero 2019 a marzo 2022, α 2020. Es decir, para agosto 2017 en el nivel de ingreso bajo, sumaremos el producto (P de α 2016 del nivel de ingreso bajo, deciles I-V) de alimentos bebidas y tabaco; prendas de vestir calzado y zapato; vivienda, agua, electricidad, gas y otros combustibles; entre otros... Es así que se obtiene una tabla con valores para cada mes desde enero 2015 a marzo 2022, con cada nivel de ingreso.

d Tasa de inflación

Obtenidos los datos, los usaremos para obtener la inflación π

$$\pi_t = \left(\frac{IPC_t}{IPC_{t-1}} \right) - 1 \quad [\text{Ec. 3}]$$

La operación se realizará para cada clase socioeconómica en el periodo determinado. Así teniendo como resultado 3 valores de inflación, uno por cada clase.

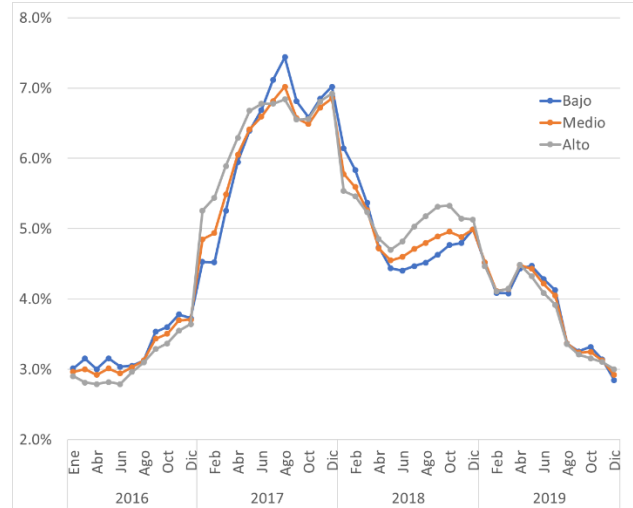
Resultados

Como bien se mencionó, la inflación es el aumento general del nivel de los precios, ésta responde a los desequilibrios en el sistema económico. No basta con saber cuánto aumenta, también debe conocerse cuál es el impacto que tiene en la población. Debido a que la inflación es un fenómeno que afecta a la población, diversos estudios se han realizado para observar de qué manera afecta a todas las partes de la población, debido al desajuste en el aumento de precios comparado con los salarios.

“Al ordenar a los hogares de México por decil de ingreso y analizar las diferentes proporciones de gasto que destinan a los diferentes rubros de consumo, es posible construir un índice de precios para la canasta representativa de cada decil, y por ende, distinguir el cambio en el costo de la canasta de consumo que cada familia enfrenta.” (IMCO, 2022). A continuación, se presentarán los Gráfico 1 y 2, donde se muestran las diferencias en la inflación de cada nivel desde enero de 2016 hasta marzo 2022.

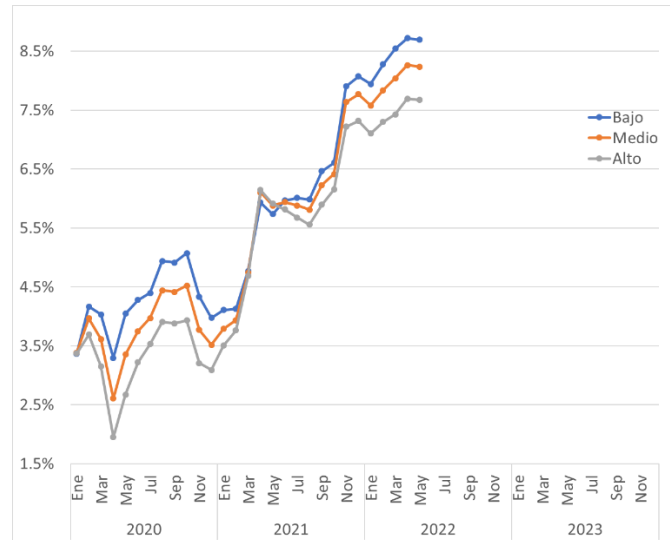
En los dos periodos relevantes de estudio 2017 y 2022, se presenta una fuerte subida de precios, donde se observa que la línea de color azul (nivel bajo, deciles I-IV), son los que mayormente se ven afectados debido a que presentan una inflación mayor que los demás; se puede observar que, en febrero 2022, la diferencia entre el nivel alto y bajo es de un punto porcentual.

Gráfico 1. Inflación 2016-2019



Fuente: Elaboración propia con datos de INEGI.

Gráfico 2. Inflación 2020-2023



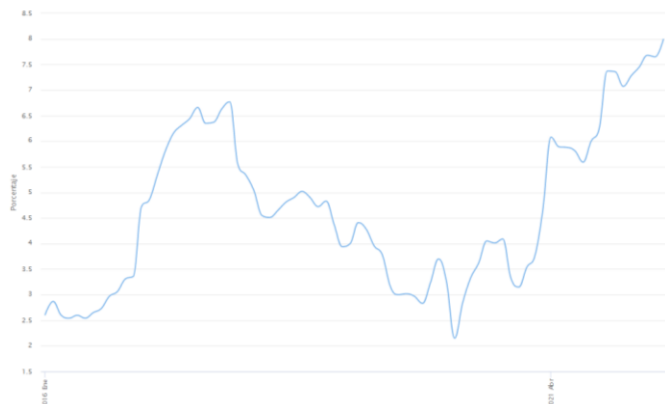
Fuente: Elaboración propia con datos de INEGI.

Para el año 2017, la economía mexicana vio reflejado un creciente aumento de los precios. (Gráfico 1) La inflación se ubicó alrededor de

6.5% a 7.5%, siendo el nivel de ingreso bajo con la inflación más alta en agosto (7.5%) ubicándose por arriba de los demás niveles de ingreso. Para el año 2018, la tasa de inflación se desaceleró, y se logra ver que, a finales de ese año, el nivel de ingreso alto logra tener una inflación mayor que el ingreso medio y bajo.

Al igual que el año 2017, la inflación a partir de octubre 2021 hasta mitad de 2022 ha presentado una subida abrupta y continua de los precios, pasando de 6% a arriba del 8%, así es necesario plantear y preguntar, si para la segunda mitad del 2022 y 2023 la tasa de inflación disminuirá al igual que lo hizo en 2018.

Gráfica 3. Inflación General 2016-2022



Fuente: Tomado de Banco de México.

Para enero 2022 la inflación se reportó en 7.070%. Para el nivel bajo la inflación fue de 7.9%, mientras que para el nivel alto se reportó ser de 7.1%. El mismo caso ocurre en agosto 2017, con una inflación reportada de 6.6%. En el nivel bajo la inflación alcanzó 7.4% y en el alto 6.8%. Aunque se sabe que la inflación reportada es un promedio, esta refleja más la situación del nivel medio y alto.

Una vez mostrado que la inflación es distinta para los hogares, surge una duda ¿qué genera esta diferencia?

Diversos estudios han comprobado que esta diferencia se debe a la proporción del gasto que hace cada hogar en diversos rubros. El nivel bajo destina mayor gasto de sus ingresos a alimentos y bebidas, productos que tienden a reflejar un mayor aumento en sus precios. Mientras que, por otro lado, el nivel alto destina mayor parte de sus ingresos a bienes y servicios de esparcimiento, educación, comunicación, entre otros..., los cuales no tienden a aumentar en la misma proporción que los alimentos y bebidas. “La canasta de consumo de hogares con bajo nivel de ingresos (decil 1) se concentra más en bienes de consumo básico como alimentos y bebidas, que enfrentan incrementos pronunciados en precios. Los hogares con mayores ingresos (decil 10) dedican más recursos al pago de servicios de educación, cuidado de vehículos y comunicaciones, donde los precios han aumentado en menor medida (o incluso caído), por lo que el impacto de la inflación sobre su gasto ha sido menor” (IMCO, 2022).

De igual manera, Pang-Tien, Chinkun y Jry-rong (2004) dicen “Specifically, the poorest household group spent relatively more on Food and Beverages than other household groups over the period 1991-1996, and the prices of the commodities in this category happened to experience relatively faster than average price increases in the same period.” Como se mencionó, el ponderador de alimentos y bebidas, es uno de los que presenta mayor subida de precios y que tiene gran impacto a la población de bajo ingreso. En el presente año (2022) el gobierno mexicano [2] en su Paquete Contra la Inflación y la Carestía (PACIC), presenta su respuesta a la creciente

inflación, con estrategias para contrarrestar los efectos de la inflación; entre las más importantes se encuentra apoyo para el sector alimentario y subsidio a la gasolina, que como ya se dijo son rubros que tienen un peso importante en la economía de las familias mexicanas.

Discusión y conclusiones

Con todo lo planteado queda evidenciado que el dicho “en tiempos de crisis, los pobres se vuelven más pobres” es una realidad. Los hogares de más bajos recursos son los que se ven más afectados por las presiones inflacionarias, lo cual se traslada a una disminución de su economía, agravando más la brecha de desigualdad entre clases. Y pese a que este documento solo se enfoca en temas de inflación, es importante tener en mente que esta diferencia entre clases, no solo evidencia el problema en los ingresos y precios, sino que también demuestra la realidad que viven día a día las familias mexicanas. Dejándonos con más preguntas como ¿de qué manera se ven afectados otros sectores dentro de la familia, como lo es la educación? ¿cómo se logra disminuir esta desigualdad?

Aquí las políticas públicas juegan un peso importante, para esto, IMCO propone tres acciones a tomar para disminuir la desigualdad y salvaguardar el poder adquisitivo de la población: a) Fortalecer la competencia económica, b) Aprovechar los beneficios del comercio exterior, c) Facilitar la producción nacional de bienes con alta inflación. Aunque se proponen acciones claras que tienen más peso político, es importante reflexionar que cada uno individualmente puede aportar, solo es necesario preguntarse ¿cómo se puede contrarrestar esto de manera individual o

familiar? ¿qué acciones se pueden tomar como individuos?

Agradecimientos

A mi tutor el Dr. Enrique Leonardo Kato Vidal. Por la oportunidad de formar parte de esta investigación que me abrió los ojos a la realidad económica que se vive en el país. Gracias por compartir el conocimiento, los consejos y las técnicas para lograr realizar un trabajo de esta talla. Muchas gracias por formar parte de mi educación y lo que fue una experiencia que sin duda será de valor en mi carrera profesional; gracias por plantar la semilla de la investigación en mí.

Bibliografía

- [1] F. Bajard, L. Chancel y R. Moshrif, «World Inequality Report 2022 Technical Notes for Figures and Tables,» 2021. [En línea]. Available: <https://wir2022.wid.world/www-site/uploads/2021/12/WIR2022-Technical-Note-Figures-Tables-1.pdf>. [Último acceso: 2022].
- [2] SHCP, «PAQUETE CONTRA LA INFLACIÓN Y LA CARESTÍA (PACIC),» 2022. [En línea]. Available: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/723331/CPM_SHCP_Pacic__04may22.pdf.
- [3] IMCO, «LA INFLACIÓN AFECTA MÁS A LAS FAMILIAS QUE MENOS TIENEN,» 2022. [En línea]. Available:

<https://imco.org.mx/la-inflacion-afecta-mas-a-las-familias-que-menos-tienen/>. [Último acceso: 2022].

- [4] A. Bonilla, «INFLACION Y CLASES SOCIALES,» 1975. [En línea]. Available: <file:///Users/applemac/Downloads/41727-Texto%20del%20art%C3%ADculo-106229-1-10-20130906.pdf>. [Último acceso: 2022].
- [5] J. Noyola Vázquez, «El desarrollo económico y la inflación en México y otros países latinoamericanos,» s.f.. [En línea]. Available: http://olafinanciera.unam.mx/new_web/03/pdfs/Clasicos-Noyola-Ola-3.pdf. [Último acceso: 2022].
- [6] L. Pang-Tien, C. Chinkun y C. Jry-rong, «Inflation Rate Variations across Household: Empirical Evidence from Taiwan,» 2004. [En línea]. Available: <https://ijb.cyut.edu.tw/var/file/10/1010/img/850/V91-6.pdf>. [Último acceso: 2022].
- [7] INEGI, «Índice Nacional de Precios al Consumidor (INPC),» 2022. [En línea]. Available: <https://www.inegi.org.mx/temas/inpc/>. [Último acceso: 2022].

Anexo. Rubros de gasto

- 1 Alimentos, bebidas y tabaco
- 2 Prendas de vestir y calzados
- 3 Vivienda, agua, electricidad, gas y otros combustibles
- 4 Muebles, artículos para el hogar y para su conservación
- 5 Salud y cuidado personal
- 6 Transporte
- 7 Educación y esparcimiento
- 8 Bienes y servicios diversos

Evaluación de genes de patogenicidad en la tuberculosis bovina

Seula Kim, Susana L. Sosa Gallegos, Feliciano Milián Suazo

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las Ciencias S/N, Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, 76239 Querétaro, México; skim22@alumnos.uaq.mx; susana.lucia.sosa@uaq.mx; feliciano.milian@uaq.mx

Resumen

La tuberculosis bovina (Tbb) es una enfermedad que afecta al ganado bovino y otras especies animales incluyendo el humano, por lo que es un riesgo para la salud pública. Se han realizado estudios para vacunas con BCG y proteínas específicas para aumentar la eficacia de ésta, y este esfuerzo continúa hasta hoy en día. En este estudio, se realizaron cultivos de tejido de 44 muestras de cabras que fueron vacunadas con distintos protocolos de refuerzo con cepa vacunal BCG. Para dichas muestras se realizó extracción y cuantificación de ADN y reacción en cadena de polimerasa (PCR) para poder visualizar la expresión de genes que codifican para antígenos que causan la signología de la tuberculosis bovina, además de sus respectivas tinciones Ziehl Neelsen para identificar los bacilos ácido alcohol resistentes.

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, vacuna BCG, PCR, tinción Ziehl Neelsen.

Summary

Bovine tuberculosis (bTB) is a disease that affects cattle and other animal species including humans, being a risk for public health. Previous studies have

been focused on BCG vaccines with specific proteins to increase their efficiency and this effort continues to this day. This study includes tissue culture of 44 goat samples vaccinated with different boosting protocols with BCG vaccine strain. For these samples DNA extraction and quantification and PCR were carried out to visualize the expression of genes that code for antigens responsible for the clinical signs of bTB, along with the respective Ziehl Neelsen staining to identify acid-alcohol resistant bacilli.

Key words: *Mycobacterium bovis*, BCG vaccine, PCR, Ziehl Neelsen staining.

Introducción

La tuberculosis bovina es una enfermedad transmitida por *Mycobacterium bovis*, un agente bacteriano aerobio que afecta distintos órganos incluyendo los pulmones, ganglios linfáticos, hígado y bazo. Dentro de este proyecto se investigaron cuatro genes, tres de ellos que son responsables de producir proteínas tóxicas causantes de la signología en la tuberculosis bovina. Estos genes son *esxA*, *esxB* y *mb3645* que codifican la proteína ESAT6, CFP-10 y EspC respectivamente, y el gen *mpt64* codificante de la proteína Mpt64. La proteína ESAT-6 es un antígeno al linfocito T y afecta su función de presentación de antígenos a través de su interacción con la microglobulina $\beta 2$ en el retículo endoplásmico de la célula (Sreejit et al, 2014). Por lo tanto, el sistema inmune no detecta los antígenos de la tuberculosis en el organismo. La CFP10 forma un complejo con la ESAT-6 inhibiendo o promoviendo la producción del factor de necrosis tumoral TNF- α de los macrófagos e induce su apoptosis y necrosis (Guo et al, 2012). La EspC es la proteína que causa estrés en el retículo endoplásmico de los macrófagos y su consecuente apoptosis a través de la generación de citocinas proinflamatorias, liberación de Ca^{2+} intracelular y

acumulación de las especies reactivos de oxígeno (ROS) (Guo et al, 2020). En base a esta información se realizó una evaluación de especificidad de los primers de cada gen y posteriormente una serie de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para comprobar la presencia de genes en 44 muestras caprinas.

Objetivos

El objetivo del proyecto consistió en aprender el aislamiento de la *Mycobacterium bovis*; los objetivos más específicos fueron obtener cultivos de tejidos, realizar tinción Ziehl Neelsen, preparar medios 7H9 y evaluar la especificidad de primers diseñados para detectar los antígenos ESAT6, CFP-10, EspC y Mpt 64 a través de la reacción en cadena de la polimerasa.

Metodología

La primera fase consistió en el cultivo de tejidos para evaluar la presencia de *Mycobacterium bovis* en muestras tisulares tomadas de 44 cabras, las cuales fueron divididas en seis grupos experimentales suplementados con diferentes protocolos de vacunación (Contreras Magallanes et al, 2021). Por cada muestra se colectó 1 gr de tejido proveniente del sitio de inoculación (tráquea), nódulo linfático traqueal, mesentérico, mediastínico, hepático y pulmones, además de tejidos con lesiones visibles.

Para este procedimiento se esterilizó la campana de flujo laminar con gasas y etanol al 70%, se expuso a luz ultravioleta por 5 minutos y se activó el flujo de aire durante 15 minutos. Después, se desinfectaron los materiales con etanol al 70%, los cuales incluyeron bisturí, pinzas, tijeras, balanza electrónica, papel aluminio, vaso de precipitado y fenol al 5%. Con el equipo de protección personal adecuado se empezó a examinar el tejido con pinzas y bisturí para distinguir las lesiones y extraer 1 gr de tejido de cada muestra

sin incluir el tejido adiposo. Este fue colocado en un frasco estéril rotulado con 15 ml de hipoclorito de sodio 1:1000 para descontaminar durante 20 minutos, después de este tiempo fue transferido a un tubo cMAC Disociator estéril y rotulado, con 7.5 ml de agua destilada. Se accionó el homogeneizador Macs Disociator en el programa RNA 01 y el macerado resultante se transfirió a un tubo falcon de 15 ml estéril y rotulado con el número de muestra que se guarda a congelación. Se colocó una alícuota de 1 ml de macerado a un segundo tubo falcon de 15ml estéril y rotulado. Se adicionaron 5 ml de ácido clorhídrico al 10% y 2 gotas de rojo de fenol. Posterior a 20 minutos se añadieron 4 a 6 ml de hidróxido de sodio 2N gota a gota hasta que el indicador cambió de color a lila-morado. Los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm por 20 minutos y durante este tiempo se atemperaron los tubos con medio de cultivo Stonebrink. Posteriormente, se desechó el sobrenadante de cada tubo centrifugado a un frasco con fenol al 5%. Se eliminó el agua condensada de los tubos de medio de cultivo y se inoculó 1 ml de pellet centrifugado a manera que resbale por toda la superficie del medio. Una gota de cada pellet se tomó para realizar frotis para las tinciones Ziehl-Neelsen. Los cultivos se mantuvieron inclinados en gradillas e incubados a 37°C. Además de los tejidos también se inocularon cinco muestras de BCG-SPGA en cinco tubos rotulados con medios de cultivo Stonebrink. Los tubos fueron enderezados dos días tras la incubación.

Las laminillas fueron flameadas para fijar la muestra y se prosiguió a la tinción Ziehl-Neelsen: donde se añadió fucsina bajo flama durante 2 minutos, posteriormente se lavaron las laminillas con agua corriente y se colocó alcohol-ácido durante un minuto. Tras otro lavado con agua se colocó azul de

metileno durante un minuto para finalmente lavar y secar dentro de la estufa a 70°C durante 5 minutos. Las laminillas fueron observadas en el microscopio eléctrico al 10X, 40X y 100X para buscar bacilos *M. bovis*.

Para la estandarización de la expresión de los genes *esxA*, *esxB*, *mb3645*, *mpt64* y *SigA* (gen de referencia) se trabajó con la cepa de campo 844 aislada por el Laboratorio de Microbiología Veterinaria FCN-UAQ, como control positivo. Se realizó un gradiente de temperatura para lograr la alineación de los primers diseñados para cada gen, encontrando que todos los genes amplificaron a 57.2°C. Para cada uno de los genes se realizó una mezcla maestra de 43.75 µl de GoTaqGreen2X, 7 µl del primer Forward, 7µl del Reverse y 15.75µl de agua libre de DNasa. Se distribuyó esta mezcla a siete tubos de PCR y a cada tubo se le agregaron 2 µl de ADN de la cepa 844 (250 ng). En total fueron 12.5µl de solución en cada tubo. El gradiente de temperatura para la alineación de los primers fue de 55.7°C, 57.2°C, 59.3°C, 62°C, 64.2°C y 66°C. El programa de termociclado consistió en un precalentamiento a 95°C durante 3 minutos, después la desnaturalización a 95°C por 30 segundos, la alineación dentro del rango 55°C a 65°C durante 30 segundos y la elongación a 72°C durante un minuto. Estos tres pasos fueron repetidos por 34 ciclos. El proceso duró una hora y 40 minutos.

Para poder visualizar las moléculas del ácido nucleico amplificado de cada gen se procedió a la electroforesis. Se preparó gel de agarosa al 1.8% en buffer TAE al 1X. Se virtió la agarosa caliente en un molde con peine y se dejó enfriar. Posteriormente se retiró el peine y se colocó el gel en la cámara de electroforesis la cual se llenó con buffer TAE 1X. En el primer pocillo de cada gel se colocó estándar de

peso molecular Promega 100bp mezclado en proporción 1:3 con buffer de carga Promega Blue/Orange 6X Loading Dye incluyendo Gel Red 1:1000. En los siguientes pozos se cargó la mezcla de 6 µl de producto de PCR con 2 µl de buffer de carga. Una vez que se llenaron los pozos con las seis muestras de cada gen se corrió la electroforesis a 75V por 50 minutos. El gel se observó bajo luz ultravioleta dentro del BIO-RAD Universal Hood II y a través del software Quantity One. Según el resultado (**Fig. 1**), todos los genes amplificaron a 57.2°C.

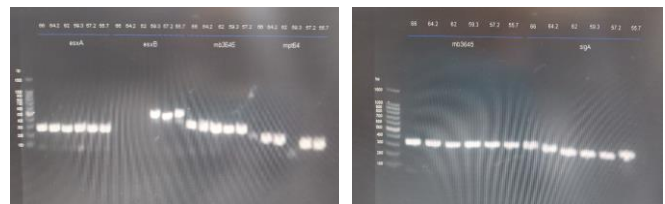


Fig.1. Gradiente de temperaturas para los genes *esxA* (280pb), *esxB* (450pb), *mb3645* (312pb), *mpt64* (185pb) y *SigA* (254pb).

Para la preparación de medio de cultivo 7H9, se prepararon 3 medios con Tween 80 al 20% y uno con glicerol al 2%. Previo a empezar el procedimiento se esterilizaron los materiales incluyendo vasos, matraces, frascos, tampones, agua destilada, Tween 80 al 20% y glicerol a 1.5 atm y 121°C por 15 minutos. Se sanitizó la cabina de flujo laminar y se colocaron los materiales a ocupar. Se pesaron 1.2g de medio Middlebrook 7H9 para 500 ml de medio y se agregó filtrando con membrana de 45 micras la solución de Tween 80 al 20% y para los medios con glicerol, éste también se agregó filtrándolo con membrana de 45 micras. Se agregó el agua destilada necesaria y se colocó un tapón de gasa y papel aluminio en la boca del matraz. Los matraces fueron esterilizados por 7 minutos a 1.5 atm y fueron incubados a 37°C por 48 horas para prueba de esterilidad. A cada medio 7H9 se agregó el

suplemento ADC en un 10%. Se incubó otras 48 horas más de periodo de esterilidad y posteriormente se inocularon las bacterias.

Para realizar la extracción del ADN de los 44 macerados, se centrifugaron 6 ml de los macerados a 3000 rpm por 20 minutos; de cada precipitado se tomaron 500 µl y se transfirieron a un nuevo tubo eppendorf rotulado con su número respectivo. Se añadieron 50 µl de lisozima, se realizó un vortex y se incubaron todos los tubos a 37°C por una hora. Tras este tiempo se agregaron 100 µl de SDS al 10% y 10 µl de proteinasa K de 10mg/ml, se realizó un vortex y se incubó en 65°C por 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 100 µl de cloruro de sodio (NaCl) de 5M y 40 µl de CTAB al 10% precalentado a 65°C. Los tubos fueron sometidos a vortex e incubados en 65°C por 30 minutos, se añadieron 400 µl de fenol-cloroformo isoamílico (24:24:1), se hizo un nuevo vortex y los tubos fueron centrifugados a 13,000 rpm por 10 minutos. Se transfirieron aproximadamente 500 µl del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 500 µl de cloroformo isoamílico y se realizó otro vortex y centrifugado de 13,000 rpm por 10 minutos. Aproximadamente 500 µl del sobrenadante fueron transferidos nuevamente a otro tubo eppendorf y se agregaron 600 µl de alcohol isopropílico; se realizó un vortex y se dejó a -20°C por 20 horas. Posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 minutos; se eliminó el sobrenadante tras la centrifugación y se agregaron 500 µl de etanol al 70% y se realizó un vortex con posterior centrifugado a 13,000 rpm por 2 minutos. Se tiró el sobrenadante con cuidado sin eliminar el pellet y se dejó secar por 20 horas. Se resuspendió el pellet en 50 µl de agua destilada procurando disolverlo completamente, se realizó vortex y se distribuyeron dos alícuotas de 15 µl a dos tubos eppendorf de 1.5 ml. Todos los tubos

fueron guardados en congelación a -20°C. Se tomaron 2 µl de cada muestra para la cuantificación y análisis de pureza en el Nanodrop 2000.

Para evaluar la integridad del ADN, se prepararon geles de agarosa al 1%. Al primer pocillo se colocó estándar de peso molecular. Los siguientes pocillos se llenaron con las 44 muestras de ADN. La PCR para los genes *esxA* (tamaño de amplicón: 280 pb), *esxB* (450 pb), *mb3645* (312 pb) y *mpt64* (185 pb) se realizó preparando las reacciones con la misma formulación y termociclado que el gradiente de temperatura arriba mencionados. Se añadieron 4 muestras correspondientes a los controles AN5, BCG, agua y 844. Tras la PCR los tubos se mantuvieron a 4°C.

Para visualizar el producto de amplificación se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1.8% bajo las mismas condiciones de voltaje y carga de muestras que las arriba mencionadas para el gradiente de temperaturas.

Resultados

Se obtuvieron resultados de la electroforesis a través de los geles de agarosa en luz ultravioleta.

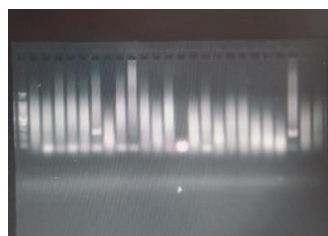


Fig. 2. Gel de agarosa al 1.8% del ADN con amplificación del gen *esxA*. Muestras 1 al 24.

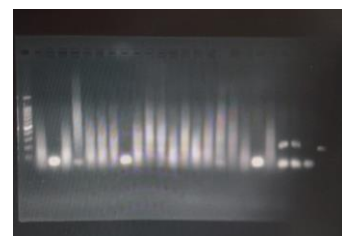


Fig. 3. Gel de agarosa al 1.8% del ADN con amplificación del gen *esxA*. Muestras 25 al 48.

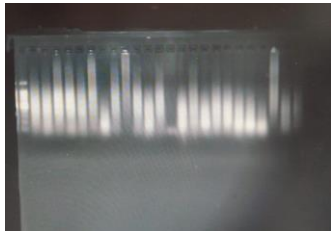


Fig. 4. Gel de agarosa al 1.8% del ADN con amplificación del gen esxB. Muestras 1 al 24.

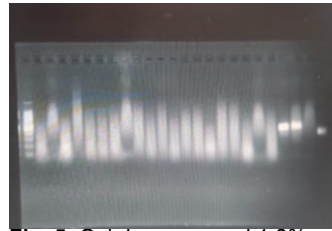


Fig. 5. Gel de agarosa al 1.8% del ADN con amplificación del gen esxB. Muestras 25 al 48.

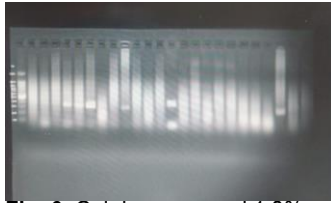


Fig. 6. Gel de agarosa al 1.8% del ADN con amplificación del gen mb3645. Muestras 1 al 24.

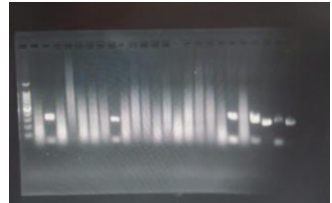


Fig. 7. Gel de agarosa al 1.8% del ADN con amplificación del gen mb3645. Muestras 25 al 48.

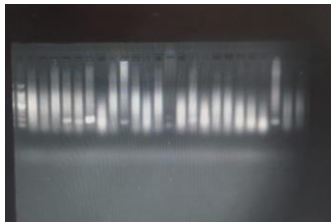


Fig. 8. Gel de agarosa al 1.8% del ADN con amplificación del gen mpt64. Muestras 1 al 24.

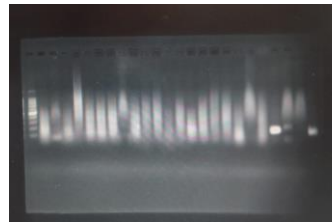


Fig. 9. Gel de agarosa al 1.8% del ADN con amplificación del gen mpt64. Muestras 25 al 48.

Se observaron bandas cerca de 300 pares de bases (pb) en las muestras 6 y 22 para el gen esxA, los restos sin bandas distinguibles; para el gen esxB no se observaron bandas en ninguna muestra; del gen mb3645 se distinguieron bandas de 300 bp en las muestras 4, 5, 6, 9, 13, 26, 32 y 43; del gen mpt64 se observaron una banda de 200 pb en las muestras 4, 5, 6, 9, 13, 15 y 22. Cabe mencionar que las muestras controles AN5, BCG y 844 expresan el ADN de los cuatro genes, y el agua mostró una banda para el gen mb3645 lo cual indica contaminación durante la preparación de esas reacciones.

De los cultivos de tejido en medio Stonebrink, solo hubo crecimiento en la muestra 4968A hasta la fecha.

Las muestras teñidas se observan en la **Fig. 10** que son las representativas de todas las muestras. No se observaron bacilos de color fucsia.

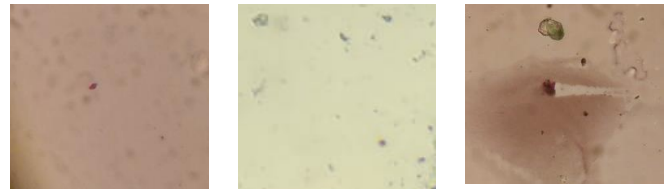


Fig.10. Tinción Ziehl-Neelsen de muestras 4888A, 4992A y 4820A.

El resumen de los resultados se muestra en el **Anexo 1**.

Discusión

Las reacciones de PCR en comparación con los cultivos previamente realizados de éstas mismas muestras en años anteriores, no fueron similares ya que hay muestras que son negativos al PCR pero positivos al cultivo de tejido, por lo que se deberá continuar la estandarización de la técnica de PCR para esos genes y lograr una buena especificidad. Las tinciones Ziehl-Neelsen de las muestras tampoco mostraron bacilos, por lo que repetir las tinciones sería lo recomendado para poder corroborar resultados.

Conclusión

Por el corto tiempo de la estancia y el largo tiempo de crecimiento de las bacterias, no se observó el crecimiento completo de los tejidos cultivados, por lo que se debe estar pendiente. También para mejorar el resultado de la PCR se recomienda manejar menores concentraciones de ADN para eliminar los efectos degradados, y repetir las electroforesis para mejorar resolución.

Agradecimientos

Expreso mi agradecimiento a M. en C. Susana Lucía Sosa Gallegos por haberme guiado y brindado el conocimiento a lo largo de la estancia, y al Dr. Feliciano Milian Suazo por haberme brindado la oportunidad de trabajar en este gran proyecto.

Referencias

G. Sreejit, A. Ahmed, N. Parveen, et al., "The ESAT-6 Protein of *Mycobacterium tuberculosis* Interacts with Beta-2-Microglobulin (β 2M) Affecting Antigen Presentation Function of Macrophage", PLoS Pathog, Vol. 10, Issue 10, e1004446. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004446> [consultado en 2022].

Q. Guo, J. Bi, H. Wang, X. Zhang. "Mycobacterium tuberculosis ESX-1-secreted substrate protein EspC promotes mycobacterial survival

through endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis", Emerging Microbes & Infections, Vol. 10, Issue 1, pp 19-36. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1861913> [consultado en 2022].

S. Guo, R. Xue, Y. Li et al., "The CFP10/ESAT6 complex of *Mycobacterium tuberculosis* may function as a regulator of macrophage cell death at different stages of tuberculosis infection", Med Hypotheses, Vol. 78, Issue 3, pp 389-392, Mar. 2012.

Y.G. Contreras-Magallanes, M. Durán-Aguilar, S. L. Sosa-Gallegos et al., "Prime Vaccination with Chitosan-Coated Phipps BCG and Boosting with CFP-PLGA against Tuberculosis in a Goat Model", Animals, Vol. 11, Issue 4, p 1046. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ani11041046> [consultado en 2022].

Anexo 1.

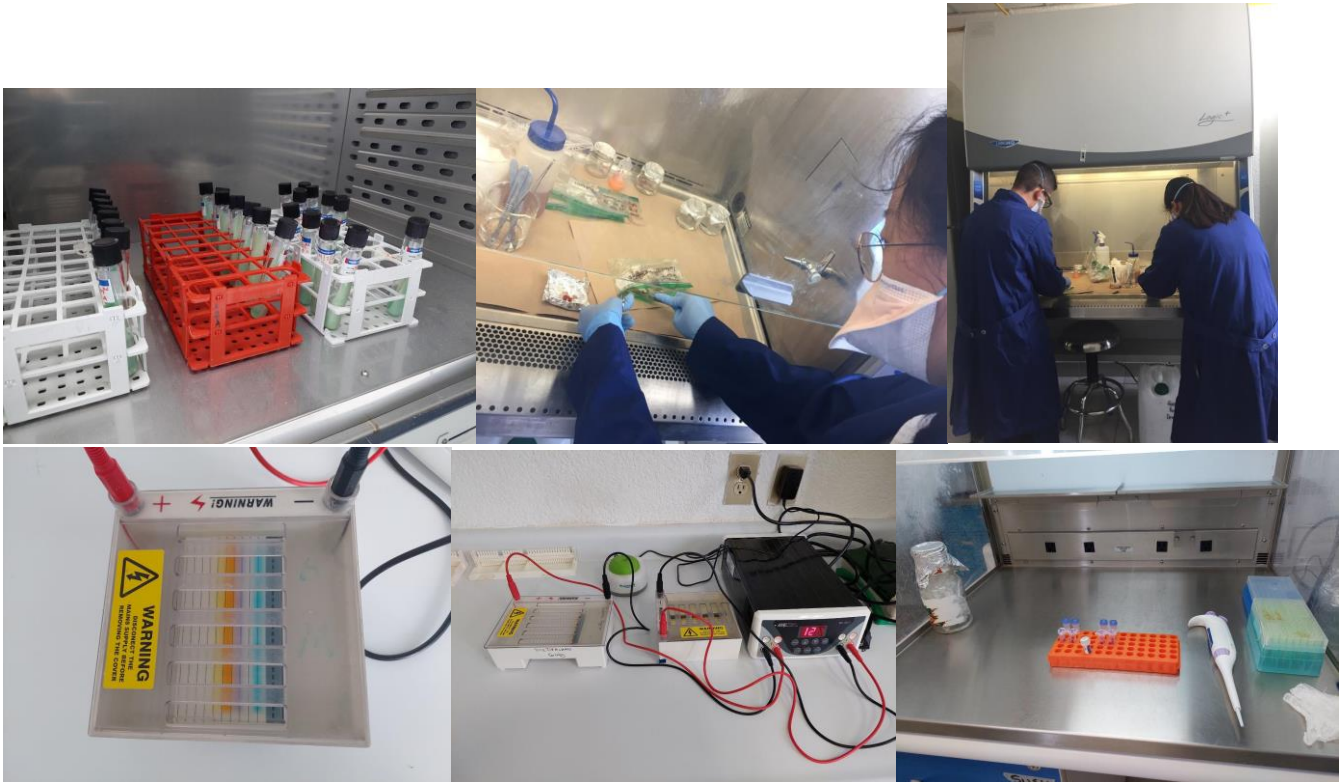
Resultado final de cultivo de tejidos, tinción Ziehl-Neelsen y PCR.

Grupo	#	Muestra	Cct	Pureza	Cultivo	UFC	Ziehl Neelsen	ESAT6	CFP10	EspC	MPT64
1	1	4933	9825	1.87	-		-	-	-	-	-
	2	4992	2485	1.88	-		+	-	-	-	-
	3	4949	3764	1.87	-		-	-	-	-	-
	4	5000	1806	1.9	+		+	-	-	+	+
	5	4968	4477	1.9	+	50	-	-	-	+	+
	6	5019	652	1.76	+		+	+	-	+	+
2	7	4912	7460	1.94	+		-	-	-	-	-
	8	4820	4187	1.89	+		+	-	-	-	-
	9	4816	2225	1.82	+		-	-	-	+	+
	10	4838	8590	1.9	+		-	-	-	-	-
	11	4869	19705	1.66	+		-	-	-	-	-
	12	4879	6171	1.88	+		-	-	-	-	-
	13	4883	24.6	2.29	+		-	-	-	+	+

3	14	4920	17499	1.79	+		+	-	-	-	-
	15	4832	3104	1.87	+		+	-	-	-	-
	16	4828	4490	1.89	+		-	-	-	-	-
	17	4861	10306	1.9	+		-	-	-	-	-
	18	4855	10153	1.88	-		-	-	-	-	-
	19	4996	7801	1.84	-		-	-	-	-	-
	20	4929	7437	1.95	-		-	-	-	-	-
4	21	4888	4718	1.97	+		-	-	-	-	-
	22	4899	5499	1.84	+		-	+	-	+	+
	23	4909	11280	1.9	+		-	-	-	-	-
	24	4924	10902, 5398	1.88	+		-	-	-	-	-
	25	4847	7799	1.83	+		-	-	-	-	-
	26	4851	71.3	1.94	+		-	-	-	+	-
	27	5005	7759	1.92	-		-	-	-	-	-
5	28	4894	12520, 3498, 4157	1.84	+			-	-	-	-
	29	4905	18377	1.77	+			-	-	-	-
	30	4916	16064	1.84	+			-	-	-	-
	31	4824	19754	1.66	-			-	-	-	-
	32	4843	38.8	2.04	-			-	-	+	-
	33	4859	18862	1.71	-			-	-	-	-
	34	4874	7393	1.82	-			-	-	-	-
6	35	5014	11045	1.88	-			-	-	-	-
	36	4955	15891, 8761, 8125	1.84	-			-	-	-	-
	37	4976	5461	1.87	+			-	-	-	-
	38	4981	4445	1.9	+			-	-	-	-
	39	4963	7877	1.83	+			-	-	-	-

	40	4963	4883	1.89	-			-	-	-	-
4'	41	4960	9524	1.88	-		-	-	-	-	-
	42	5010	7974	1.92	-		-	-	-	-	-
	43	4936	0.4, 5, -4	-0.2	+		-	-	-	+	-
	44	4944	7595	1.9	-		-	-	-	-	-
Controles	45	AN5						+	+	+	+
	46	BCG						+	+	+	+
	47	Agua						-	-	+	-
	48	844						+	+	+	+

Galería fotográfica



Propiedades tecnofuncionales de harinas extrudidas de leguminosas.

Montante Arenas Valeria Siboney¹, Montoya Ramos Diana Karen², Gaytán Martínez Marcela³

¹Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería (vmontante.16@alumnos.uaq.mx)

²Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química (montoya_dianakaren@outlook.com)

³Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos (marcelagaytanm@yahoo.com.mx)

Abstract

Legumes are grains with a high protein and amino acid content, in addition, they are also rich in carbohydrates and vitamins. However, the thermal treatments used to obtain flours based on these products damage their original characteristics, thus generating a sub-product of lower quality. In the present work, it is proposed to use extrusion treatments at 140, 160 and 180°C prior to grain milling, to obtain better quality flours.

Once the extruded flours were obtained, the tests corresponding to the technofunctional properties of Water Absorption Rate, Oil Absorption Capacity and Gelling Capacity were carried out in order to give a proposal for the different uses of these flours in the food industry.

Key Words

Flour, extrusion, legume, bean, chickpea, soy

Resumen

Las leguminosas son granos con alto contenido proteico y de aminoácidos, además, también son ricas en carbohidratos y vitaminas. Sin embargo, los tratamientos térmicos que se utilizan para la obtención de harinas a base de estos productos dañan sus características originales, generando así un subproducto de menor calidad. En el presente trabajo, se propone utilizar la extrusión con una temperatura de 140, 160 y 180°C previo a la molienda de los granos, para obtener harinas.

Una vez que se obtuvieron las harinas extrudidas, se realizaron las pruebas de las propiedades tecnofuncionales de Índice de Absorción de Agua, Capacidad de Absorción de Aceite y Capacidad Gelificante para poder dar una propuesta de los diferentes usos de estas harinas en la industria alimentaria.

Palabras Clave

Harina, extrusión, leguminosa, frijol, garbanzo, soya

1. Introducción

La desnutrición es un estado de deficiencia de uno o varios nutrientes, asociado a diferentes condiciones que se relacionan con el exceso o deficiencia de peso. (Ortiz *et al.*, 2020) En América Latina y el Caribe el sobrepeso infantil sigue aumentando. En el 2019, la cifra fue 7.5%, por encima del promedio mundial de 5.6%, y 1 de cada 5 territorios se encuentra altamente rezagados ya sea por retraso del crecimiento o por sobrepeso (FAO, 2020)

Durante el desarrollo de los niños se requiere una cantidad importante de nutrientes; proceso que se ve beneficiado por la ingesta de proteínas. La deficiencia de proteínas puede producir desnutrición calórica proteica, impactando directamente en el desarrollo de los niños y provocando desde cambio en el peso, hasta insuficiencia en el crecimiento, disminución en la

masa muscular y cambios en la pigmentación de la piel (Naranjo *et al.*, 2020).

Las proteínas son macromoléculas formadas por aminoácidos que forman parte de la estructura básica de los tejidos del cuerpo; durante todos los procesos de crecimiento y desarrollo, crean, reparan y mantienen los tejidos corporales. El ser humano necesita un total de 20 aminoácidos, de los cuales, los no esenciales son sintetizados en el cuerpo. Los aminoácidos restantes, llamados esenciales, son aportados obligatoriamente en nuestra dieta. La falta de los aminoácidos esenciales es otra causa de la desnutrición. Y en el caso de los niños, el déficit de aminoácidos esenciales afecta mucho más que a los adultos (González-Torres *et al.*, 2007).

1.1 El papel de las leguminosas en la alimentación

Las leguminosas son plantas angiospermas, con flores y semillas encerradas en un fruto. Estas contienen entre el 55 y 65% de su peso total como carbohidratos, principalmente almidones, y entre 20 y 40% de proteína (peso seco) (Aparicio-Fernández *et al.*, 2015)

Tabla 1. Composición proximal de algunas leguminosas importantes

Nutriente	Soya	Garbanzo	Cacahuete	Chicharo	Haba	Lenteja	Frijol
Agua (%)	8.54	11.53	6.5	11.27	10.98	10.4	11.02
Proteína (%)	36.49	10.30	25.80	24.55	26.12	25.8	21.60
Grasa (%)	19.94	6.04	49.54	1.16	1.53	1.06	1.42
Cenizas (%)	4.87	2.48	2.33	2.65	3.08	2.67	3.60
Carbohidratos (%)	30.16	60.65	16.13	60.37	58.29	60.08	62.36
Fibra total (%)	9.30	17.4	8.50	25.5	25	30.50	15.2
Calcio (mg/100g)	277	105	92	55	103	56	123
Hierro (mg/100g)	15.70	6.24	4.58	4.43	6.70	7.54	5.02
Magnesio (mg/100g)	280	115	168	115	192	122	171
Potasio (mg/100g)	1797	875	705	981	1062	955	1483
Zinc (mg/100g)	4.89	3.43	3.27	3.01	3.14	4.78	3.65
Selenio (mg/100g)	17.8	8.2	7.2	1.60	8.2	8.3	3.2

El consumo regular de leguminosas se relaciona con la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes y síndrome metabólico y obesidad (Aparicio-Fernández *et al.*, 2015). Generalmente se utilizan en la preparación de platillos como guisos, sopas, ensaladas, y harinas, aportando diferentes texturas y sabores. La incorporación de estas semillas no sólo les da un valor agregado a los alimentos, también le confieren propiedades funcionales, mejorando la apariencia, el color, la jugosidad, sensación en la boca y la textura (Aguilar & Vélez, 2013).

1.1.1 Frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.)

Las propiedades nutritivas que posee el frijol están relacionadas con su alto contenido proteico y en menor medida a su aportación de carbohidratos, vitaminas y minerales. El contenido de proteínas varía del 14 al 33% según el tipo, siendo rico en aminoácidos como la lisina y la fenilalanina más tirosina. Además, este alimento también es una fuente de calcio, hierro, fósforo, magnesio y zinc y de vitaminas (tiamina, niacina y ácido fólico). La calidad de la proteína del frijol cocido puede llegar a ser de hasta el 70% (Ulloa *et al.*, 2011).

1.1.2 Soya (*Glycine max* L.)

La proteína de soya contiene todos los aminoácidos esenciales requeridos en la nutrición humana, sin embargo, su contenido de metionina y triptófano es bajo, pero se complementa al combinarse con cereales generando una proteína tan completa como la de origen animal. En la mayoría de los casos, se encuentra mezclada con otros componentes biológicamente activos que están presentes en la semilla como son los inhibidores de tripsina, los fenoles, los fitatos, entre otros (de Luna-Jiménez, 2006).

1.1.3 Garbanzo morado (*Cicer arietinum* L.)

La composición química del garbanzo muestra un alto contenido de grasa y fibra, mientras que la cantidad de proteína permanece alrededor del 22%. La calidad de la proteína del garbanzo resulta ser mejor que otras leguminosas tales como del frijol negro (*Vigna mungo* L.), judía mungo (*Vigna radiata* L.) y frijol rojo (*Cajanus cajan* L.) (Aguilar-Raymundo & Vélez-Ruiz, 2013).

1.2 Harinas de leguminosas

Las harinas de leguminosas son reconocidas como un alimento de primer orden por su riqueza en proteínas, fibra y perfil graso saludable. También son una buena fuente de minerales, como el magnesio o el hierro, y

de vitaminas del grupo B. Estas harinas contienen entre 20 y 36% más proteína que las de cualquier cereal (que van entre el 10 y 13%). Además, tienen un bajo índice glucémico. Es por esto, que se han ido estableciendo como un producto habitual en la alimentación (Olsen, 2018).

1.2.1 Propiedades tecnofuncionales de las harinas

Las propiedades tecnofuncionales son cualquier propiedad fisicoquímica de los polímeros que afecte y modifique ciertas características de un alimento, contribuyendo a la calidad final del producto. Las propiedades tecnofuncionales se pueden clasificar en tres grupos principales: las propiedades de hidratación (interacción proteína - agua), las propiedades de superficie (interacción proteína con dos fases inmiscibles: agua - aceite, agua - aire) y las propiedades dependientes de la interacción proteína - proteína (Guerrero *et al.*, 2003).

Estas propiedades proporcionan información acerca del comportamiento de los ingredientes dentro de un producto alimenticio, por lo que cada una permite determinar el campo de aplicación que tiene un producto en la industria agroalimentaria (García Pacheco *et al.*, 2019).

1.2.2 Efectos del tratamiento térmico en las propiedades tecnofuncionales

Los tratamientos térmicos que se utilizan en la elaboración de harinas afectan las propiedades tecnofuncionales de estas, ocasionando cambios en la estructura y dando lugar a variaciones en algunas propiedades de los productos elaborados con ellas. Las proteínas también son afectadas por los procesamientos térmicos, la desnaturalización debida al calor terminará en pérdida por agregación y precipitación, generando efectos de alteraciones en propiedades como la capacidad de retención de agua, aceite, espumante y emulsificante (García Pacheco *et al.*, 2019).

1.3 Extrusión

La extrusión es un proceso termomecánico, que transforma físicoquímicamente los materiales, mediante la temperatura, tensión mecánica y la presión. Es un tratamiento continuo donde se realizan las operaciones unitarias de transporte, mezcla, cocción y troquelado. Su principal ventaja, es la poca modificación que sufren los materiales que procesa. (Emin *et al.*, 2016).

En el caso de las harinas de leguminosas, las fracciones de almidón y proteína no se ven afectadas, mejoran las propiedades tecnofuncionales, digestibilidad y se produce inactivación de factores antinutricionales (Al-Ruwaih *et al.*, 2019; Mojica *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2008).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la temperatura de extrusión sobre las propiedades tecnofuncionales de harinas de frijol negro, garbanzo morado y soya, para la obtención de ingredientes de calidad que puedan ser incorporados en diversos productos alimenticios.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar análisis de densidad aparente, índice de absorción de agua, capacidad de absorción de aceite, viscosidad, y capacidad de gelificación en las harinas de extrudido de frijol negro, garbanzo morado y soya.

3. Metodología

Se utilizaron semillas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.), soya (*Glycine max* L.) y garbanzo morado (*Cicer arietinum* L.), obtenidas del mercado de abastos en la ciudad de Querétaro, Querétaro.

3.1 Obtención de harinas de leguminosas por el método de extrusión

Para la obtención de las harinas extrudidas se utilizó un extrusor de acero inoxidable de tornillo simple (Patente MX/a/2007/016262), que consta de dos zonas de calentamiento, con su respectivo controlador. El tornillo usado tenía un diámetro de 2.54 cm y 45 cm de largo, con una relación de compresión 1:1, una relación longitud/diámetro de 19 y una profundidad de hélice de 1/8 de pulgada. Se acopló un dado formador de salida de 5 mm. Los granos de leguminosas se alimentaron a una velocidad constante de 15 rpm. Las temperaturas de extrusión fueron de 140, 160 y 180°C para el frijol negro (**F**), el garbanzo morado (**G**) y la soya (**S**) y se realizaron por duplicado.

3.1.1 Harina de extrudido de leguminosas

La harina de frijol negro, soya y garbanzo morado se elaboraron usando la metodología empleada por Escobedo *et al.*, (2020). Las leguminosas limpias y seleccionados se acondicionaron a 50% de humedad. Con calentamiento a las temperaturas de: 140, 160 y 180 °C. Los extrudidos se deshidrataron a 50 °C durante 12 h. Posteriormente se molieron usando un molino tradicional (Pulvex S.A.) adaptado de una malla de 0.8 micras. Las harinas se empacaron en bolsas de plástico que se empacaron al vacío para ser almacenadas en refrigeración hasta su uso.

5.6 Evaluación de propiedades tecnofuncionales

5.6.1 Densidad aparente (DA)

Se utilizó el método 945-04 recomendado por la AOAC (2005) Se pesó 1 g de cada harina y se colocó en una probeta graduada, a cada probeta se le dieron 60 golpes y se observó el volumen que ocupan. La densidad se obtiene aplicando la relación peso/volumen (g/cm³).

5.6.2 Índice de absorción de agua (IAA)

Se siguió la metodología reportada por Anderson (1996). Se suspendieron 5 g de cada harina previamente deshidratada en 30 mL de agua destilada,

en un tubo de centrífuga de 50 mL (se registró el peso del tubo antes de la muestra), se agitó en un vórtex durante 1 min y se centrifugó a 3,000 g durante 10 min a 25 °C. El líquido sobrenadante se desechó y se drenaron los tubos durante 10 minutos en una toalla de papel. Para el cálculo se pesaron las muestras y el resultado se expresa como gramos de agua retenida por gramo de sólido seco (g/g).

5.6.3 Capacidad de absorción de aceite (CAA)

Se pesó 1 g de harina de cada muestra y se les agregó 10 mL de aceite vegetal en un tubo de centrífuga de 50 mL previamente pesado. La suspensión se agitó durante 2 minutos, reposó a 28 °C durante 30 minutos y después se centrifugó a 15,000 g durante 20 minutos. Se decantó el sobrenadante para su desecho. El resultado se expresa como el peso de aceite absorbido por gramo de harina.

5.6.7 Capacidad de gelificación

Se determinó la capacidad de gelificación mediante la metodología de Coffman & García, (1977). Se prepararon suspensiones al 4, 8, 12 y 14% (p/v) en agua destilada de las que se tomaron 5 mL en tubos de ensayo. Los tubos se colocaron en baño caliente a 100 °C por 1 h con agitación en vortex cada 10 min y posteriormente en un baño de hielo durante 1 h. La gelificación se determinó como la menor concentración a la cual la muestra del tubo invertido no cae o se desliza.

4. Resultados

4.1 Densidad aparente (DA)

La Tabla 2, muestra la DA correspondiente a cada tratamiento. Como se puede observar, las harinas de soya (**S**) son las que presentan una mayor densidad, seguidas de las de garbanzo morado (**G**) y frijol negro (**F**), lo que permite tener una idea de la porosidad de las mismas.

Tabla 2. Densidad aparente

Muestra	DA (ml/g)	DE
F140	1.25	0.07
F160	1.25	0.07
F180	1.30	0.00
G140	1.60	0.00
G160	1.55	0.07
G180	1.60	0.00
S140	1.75	0.07
S160	1.85	0.07
S180	1.75	0.07

Tabla 4. Capacidad de Absorción de Aceite

Muestra	CAA (%)	DE
F140	96.1	3.28
F160	81.55	0.30
F180	88.90	2.60
G140	97.28	2.99
G160	93.84	3.36
G180	94.00	3.39
S140	92.13	2.00
S160	107.51	3.65
S180	103.76	3.69

4.2 Índice de absorción de agua (IAA)

En la Tabla 3. Podemos observar el IAA de cada tratamiento a 25°C. La harina de garbanzo presentó el mayor IAA, en especial el tratamiento a 180°C, mientras que la harina de soya es la de menor IAA. En general, todos los tratamientos se encuentran en un rango parecido de valores, por lo que las harinas pueden presentar un mayor potencial de hidratación para formar masas que la harina de trigo, que según Sandoval *et al.* (2012), se encuentra entre 1.86 y 1.92.

Tabla 3. Índice de Absorción de Agua

Muestra	IAA (g/g)	DE
F140	2.88	0.10
F160	3.00	0.01
F180	3.11	0.07
G140	3.23	0.08
G160	3.21	0.10
G180	3.45	0.09
S140	2.98	0.10
S160	2.90	0.15
S180	2.63	0.05

4.3 Capacidad de absorción de aceite (CAA)

La CAA expresa la máxima cantidad de aceite que puede ser absorbida por gramo de material seco en presencia de exceso de aceite. De la Tabla 4, podemos observar que las harinas de frijol, en especial la extrudida a 160, tienen la menor CAA, por lo que podría ser una opción para ser utilizada como ingrediente en productos precocidos listos para freír, sin embargo, podría afectar el sabor. Es por esto que se recomendaría utilizar la harina de garbanzo o soya, las cuales presentan valores de CAA menores.

4.4 Capacidad de gelificación

Esta prueba se realizó por duplicado, una sin agitación durante el baño caliente y otra con agitación. Esto fue debido a que en la prueba sin agitación la solución se separó, por lo que todos los tubos se sedimentaron y no hubo variaciones entre ninguna concentración. En la prueba con agitación se gelificarón levemente las harinas de garbanzo al 12% mientras que las harinas de garbanzo y frijol al 14% formaron parcialmente un gel firme.

Tabla 5. Capacidad de gelificación

Muestra	Concentración			
	4%	8%	12%	14%
F140				x
F160				x
F180				x
G140			x	x
G160			x	x
G180			x	x
S140				
S160				
S180				

5. Discusión y conclusiones

Conocer las propiedades tecnofuncionales de las harinas de leguminosas, en este caso frijol negro, soya y garbanzo morado, nos permite tener una idea clara de las aplicaciones que este tipo de ingredientes puede tener en la industria alimentaria.

Podemos concluir que las harinas extrudidas de leguminosas representan un ingrediente con

potencial para dar cuerpo y viscosidad a productos como panes, pastas, galletas, sopas o embutidos. También podrían utilizarse como componente de productos precocidos listos para freírse, con menor cantidad de aceite.

Además de los beneficios fisicoquímicos que pudieran otorgar al alimento, al ser extrudidas sus proteínas no son dañadas, lo que las hace una opción alta en proteínas y aminoácidos, permitiendo generar productos más saludables para la población, en especial hacía los niños, sector en el que el alto consumo de productos a base de harinas puede generar desnutrición y sobrepeso.

6. Galería Fotográfica



Fig 1. Extrudido de frijol negro



Fig 2. Molienda del extrudido de garbanzo morado



Fig 3. Prueba para Densidad Aparente



Fig 4. Prueba para índice de Absorción de Agua



Fig 5. Prueba para Capacidad Gelificante

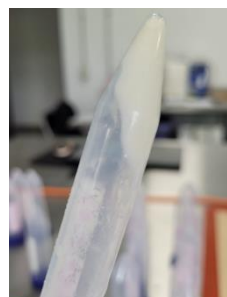


Fig 6. Formación de gel en harina de soja

7. Agradecimientos

Agradezco a mi familia, por su apoyo y ánimo durante este proceso de trabajo intenso y mucho esfuerzo. Gracias a la Dra. Marcela Gaytán por la oportunidad de participar en esta investigación llena de aprendizaje. Por último, agradezco a mis compañeras y amigas: Wendy, Sofía, Elisa, Andrea, Nancy, Javier, Aldo y Diana, porque me motivaron y enseñaron como seguir adelante a pesar de lo cansado o interminable que pueda parecer, y por tanta paciencia.

8. Referencias Bibliográficas

Aguilar-Raymundo, V., & Vélez-Ruiz, J. (2013). Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). *ResearchGate*. <https://www.researchgate.net/publication/319185894>

Aparicio-Fernández, X., Gabriela, L., & Alonso, E. (2015). *El consumo de leguminosas y su efecto sobre la salud*.

de Luna Jiménez, A. (2006). *Valor nutritivo de la proteína de soya*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67403606>

Emin, M. A., Teumer, T., Schmitt, W., Rädle, M., & Schuchmann, H. P. (2016). Measurement of the true melt temperature in a twin-screw extrusion processing of starch-based matrices via infrared sensor. *Journal of Food Engineering*, 170, 119–124.

FAO, FIDA, OPS, WFP, & UNICEF. (2020). Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional en América Latina y el Caribe. In *Panorama de la seguridad alimentaria y nutricional en América Latina y el Caribe 2020*. FAO, OPS, WFP and UNICEF. <https://doi.org/10.4060/cb2242es>

García Pacheco, Y., Cabrera Mercado, D., Ballestas Santos, J. A., & Campo Arrieta, M. J. (2019). Efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre las propiedades tecfuncionales de la harina de fríjol blanco (*Phaseolus lunatus* L.) y la determinación de su potencial uso agroalimentario. *INGE CUC*, 15(2), 132–142. <https://doi.org/10.17981/ingecuc.15.2.2019.13>

González-Torres, L., Téllez-Valencia, A., Sampedro, J. G., & Nájera, H. (2007). *Las Proteínas en la Nutrición*.

Guerrero, L. A. C., Ríos, L. C., & Ancona, D. A. B. (2003). Estructura y propiedades funcionales de proteínas de

leguminosas. *Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán*, 227, 34–43.

Naranjo, A. E., Alcivar, V. A., Villamar, T. S., & Betancourt, F. A. (2020). Desnutrición infantil kwashiorkor. *RECIMUNDO*, 4(1), 24–45.

Olsen, M. F. (2018). *Informe de Comercio Exterior: Harinas de Legumbres*.

Ortiz, D. O., Pinzón, O., & Aya, L. B. (2020). Prevalencia de desnutrición en niños y adolescentes en instituciones hospitalarias de América Latina: una revisión. *Duazary: Revista internacional de Ciencias de la Salud*, 17(3), 70–85.

Ulloa, J. A., Ulloa, P. R., Ramírez-Ramírez, J. C., & Ulloa-Rangel, B. E. (2011). *El frijol (Phaseolus vulgaris): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos*.

La ausencia de clíticos en el discurso directo para expresar pensamiento en el habla de jóvenes queretanos.

Vanessa Díaz Rodríguez, Universidad Autónoma de Querétaro. vdiaz30@alumnos.uaq.mx

Juliana De la Mora Gutiérrez, Universidad Autónoma de Querétaro juliana.delamora@uaq.edu.mx

Resumen — El discurso directo es un campo enorme que propicia a la investigación de la variación lingüística. En el español existen diversos tipos de citas, siendo los verbos dicendi su forma más canónica; además, hay diversas funciones que pueden ejercer estas citas: la realis, la situacional y la hipotética. El objetivo de este trabajo es analizar las diferencias de estas tres funciones cuando se usa el verbo dicendi y señalar la existencia de un marcador sintáctico para la función hipotética. Las diferencias principales son la presencia de clíticos según su función, asimismo las personas gramaticales que aparecen y el tipo de cita que permite el uso de una función. Se requieren estudios adicionales para definir la presencia de los clíticos.

Palabras clave — Citas directas, categorías de realización, verbos dicendi.

Abstract — The study of quotatives is a wide field that favors the research and understanding of language variation. In Spanish there are different kinds of quotatives, the most canonically form being the *dicendi* verbs. Furthermore, there are several functions that these quotations can perform: realis, situational, and hypothetical. This paper's aim is to analyze the differences between these functions when the verbs are being used and to pinpoint the existence of a syntactic marker for

the hypothetical function. The main differences are the presence or absence of clitics according to the function, the grammatical person and the quotation type that allows the use of a function. Further studies are required in order to determine the presence of the clitics.

Keywords — clitic, direct quotation, quotatives, verbum dicendi.

INTRODUCCIÓN

Es común en el habla el hacer constante referencia a otras cosas que existen en el mundo ya sean acontecimientos que hayan pasado, cosas que pueden pasar, personas, incluso actos de habla previos. El discurso directo ha sido un elemento de la gramática que se ha abordado desde diversos puntos de vista, como puede serlo el periodismo. En la sociolingüística, este tipo de recursos del habla son un todo un tema de investigación para analizar la variación y cambio lingüístico (Fairclough, 1999; Fernández, 2012; Tagliamonte, 2016). El lenguaje siempre ha estado en constante evolución, y elementos como el discurso directo no es excepción a este cambio. Cabe resaltar que no sólo el español, sino que otros idiomas tales como el inglés también presentan formas innovadoras las cuales unas se van implementando permanente en la lengua como es el caso de *be like* en el inglés (Tagliamonte, 2016).

La facultad de referenciar o reproducir un discurso es algo compartido universalmente en las lenguas tal y como lo plantea Maldonado (1999). Tradicionalmente, se distinguen dos tipos de cita: el discurso directo (DD) y el discurso indirecto (DI). El primero se define como la reproducción literal de las palabras propias o ajenas y está constituido por una ‘expresión introductora’ (EI) que contiene un verbo de ‘decir’ flexionado y una ‘cita directa’ (CD) marcada tipográficamente por guiones o comillas y que es siempre la reproducción literal de un enunciado (1999: 3554). Por su parte el discurso indirecto se refiere a la reproducción de las palabras desde el sistema de referencias deícticas del hablante y, a comparación del discurso directo, en vez de que la cita

sea marcada por comillas, esta se marca con la conjunción de *que*, demostrando subordinación al verbo de la expresión introductora. (1999: 3551).

- **DD.** Mi profesora me dijo “¡hiciste muy buen trabajo!”
- **DI.** Mi profesora me dijo *que* hice muy buen trabajo.

Enfocándonos más en las citas directas, Maldonado comenta sobre la literalidad de las citas directas reconociendo que estas mismas pueden ser reales o imaginarias. Buchstaller (2011) plantea tres funciones, denominadas categorías de realización, de las citas directas: 1) reales, aquellas citas que reproducen un acto de habla real y se encuentran comúnmente insertadas en una situación comunicativa definida; 2) situacionales, aquellas situaciones comunicativas localizadas en el presente, que se les puede entender como un comentario en la circunstancia actual; y por último tenemos a las citas 3) hipotéticas que se usan para mostrar, compartir o indicar el estado mental del hablante, en pocas palabras, los pensamientos. Este tipo de citas directas, cuya función es la expresar un juicio o una opinión del hablante, son características de la conversación en español y se revelan como construcciones muy frecuentes a la hora de evaluar el contenido de nuestros relatos cotidianos (Camargo, 2005). Las citas directas, por lo tanto, no sólo citan actos de habla reales, sino que también juegan un rol importante y común en el momento de expresar pensamientos.

Una de las estrategias introductorias del discurso directo que frecuentemente se observa en las lenguas es el uso de los verbos *dicendi*, o verbos de comunicación (De la Mora, 2018), por ejemplo:

. Fuimos a comer y mi compañera de cuarto me *dijo* “llegando tenemos que recoger la casa”

a. *Le pregunté* a mi amiga “¿Ya pusiste a cargar tu teléfono?”

Sin embargo, si bien los verbos *dicendi* son los más comunes no son la única estrategia que existe en el español que se usa para hacer una cita directa, también existen nuevas formas innovadoras como las

que propone Cameron (1988), tal es el marcador nulo o Y (frase nominal abreviada como FN).

OBJETIVOS

Objetivo general

Tomando en cuenta todo lo anterior, en este trabajo se plantea analizar el uso de las citas directas en su función de pensamiento, así como la comparación entre las funciones reales y situacionales a partir de los datos del habla joven de Querétaro.

Objetivos específicos

- Analizar los mecanismos que diferencian los actos de habla reales, situacionales y de pensamiento en los marcadores dicendi.
- Buscar por un elemento sintáctico que introduzca el pensamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Corpus y entrevistas

Las muestras con las que se ha trabajado en este proyecto corresponden al corpus CORSO UAQ que se conforma de 16 entrevistas realizadas por estudiantes de la Universidad Autónoma de Querétaro a otros estudiantes de licenciatura de ambos sexos, durante los años de 2016-2021.

Extracción, codificación y análisis de datos.

Se extrajeron de las entrevistas fragmentos donde se presentaban citas directas, dando un total de 299, y se les etiquetó por tipo de cita, estas fueron las categorías, denominadas variables lingüísticas:

. Dicendi. Verbos que definen un acto de habla (decir, sugirió, preguntó)

(1) ya él *dice* “ese ya tiene años”

(2) ya *dije* “ah sí ¿cuándo es?”

b) Y (FN). Aquellas que se introducen por una frase nominal, léxica o pronominal acompañada por la conjunción (Y). (De la Mora, 2018)

(3) y mi hermana “sí ésa cuéntaselo”

(4) y yo así de / “lo interesante es que el se quiso escalar el muro y quiso lanzarse de la tirolesa a los cincuenta y cuatro”

c) Marcador nulo. No hay marca lingüística que introduzca la cita, pero si hay cambio de entonación y una breve pausa (De la Mora,2018)

(5) a mí me dio miedo ¿no? “papá se está poniendo el cielo verde”

(6) la puso en altavoz “¿por qué te detuviste?”

d) Marcador *así*. así como, así de (que)

(7) se me baja todo el alcohol llegó sobrio, *así como* “wiii”

(8) pero Juan así de “no es que yo no quería”

e) Marcador como.

(9) pero ya después de eso es como “lo que sea”

f) Marcador ser

(10) y es de “¡ah! sí por supuesto”

g) Otros

(11) no tuve ese// etapa de/ “ah/ ¿qué voy a estudiar? / y ¿qué quiero hacer?”

(12) sentí mis ojos de “nhuuuuuu”

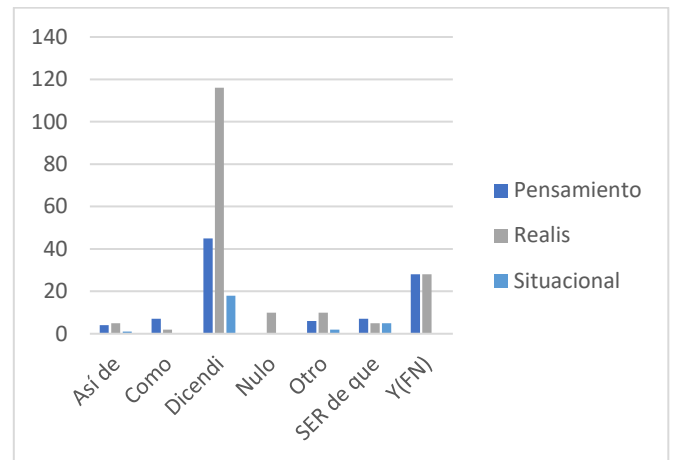
Además de estas variaciones, también se incluyeron las funciones de Buchstaller (2011) que se mencionaron previamente, así como el tiempo gramatical, la persona, el clítico en cuestiones más lingüísticas. Por la parte de las variables sociales, se considero el sexo, nivel de educación y edad, aunque en si no hay variación en estas últimas dos ya que todos los participantes corresponden al mismo grupo de edad y nivel educativo.

RESULTADOS

Distribución general

Los resultados de la Gráfica 1, muestran el tipo de cita separada por las funciones que se han mencionado previamente. Aquí se puede observar que, si bien existen y se usan diversos tipos de citas, la mayoría de ellas se concentra de mayor manera en los verbos dicendi, independientemente de la función,

seguido de Y(FN), y por último se encuentra el marcador SER como.



Gráfica 1. Distribución general del tipo de cita por función

En *realis*, la forma canónica es *dicendi* con un 65.91%; para hipotético también es *dicendi*, pero con un 45.36%, seguido de la frase nominal con 29.9%. Y por último tenemos que la forma más canónica para el situacional también es *dicendi* con 69.23%.

Cabe resaltar ni el marcador nulo ni el marcador SER presentan la función hipotética.

La presencia del clítico

En la Gráfica 2, se observa la presencia y ausencia de clíticos en función del contenido de la cita. Mientras que las citas que introducen actos de habla reales (función *realis* y *situacional*) ocurren siempre con clíticos, las citas que introducen pensamiento carecen totalmente de ellos. Si bien, un buen porcentaje de *realis* tampoco tiene clítico, es solo en pensamiento que no se presenta ningún clítico en ninguna circunstancia.

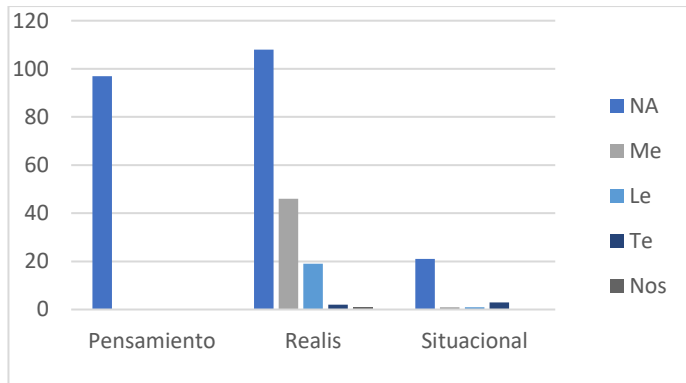


Gráfico 2. Clíticos según la función de manera general.

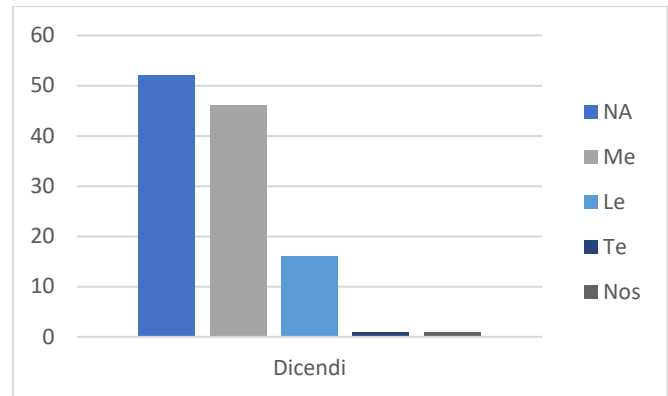
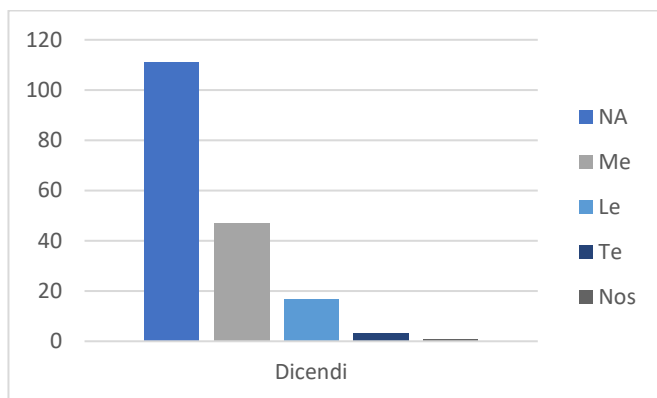


Gráfico 4. Clíticos en dicendi con función realis.

La presencia del clítico en los verbos dicendi

Con la finalidad de indagar sobre el rol de los clíticos en el discurso directo introducido por los verbos dicendi, se llevó a cabo un análisis de estas formas. La Gráfica 3, muestra que en las citas introducidas por verbos dicendi más del 60% de los datos no incluye un clítico. Cuando aparece un clítico, las formas que predominan son el clítico *me*, seguido de *le* y en muy poca proporción, *te* y por último *nos*.



Gráfica 3. Distribución de clíticos en discurso directo introducido por verbos *dicendi*.

Al comparar como se manifiestan los clíticos en diferentes funciones, se puede apreciar que la cantidad de veces que se usa *me* (39.66%) en realis es mucho mayor que en la situacional (5.56%). Pero en ambas la ausencia de clítico es la más prevaleciente.

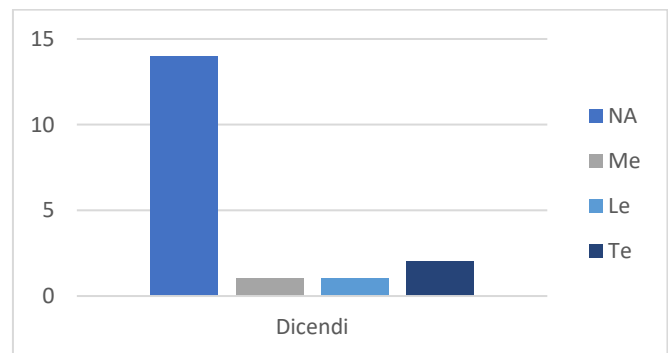


Gráfico 5. Clíticos en dicendi con función situacional.

La ausencia de clítico es prevalente en todas las personas, y de manera concordante, cuando no hay ninguna persona gramatical tampoco existe clítico. En el caso de la 3ra persona, el clítico *me* es el que más se presenta.

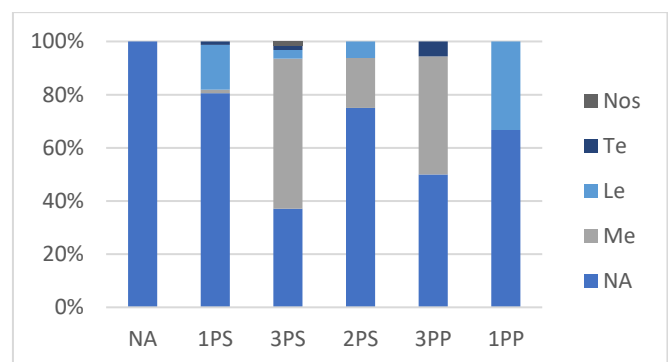


Gráfico 6. Presencia de clíticos por persona gramatical en el discurso directo introducido por verbos *dicendi*.

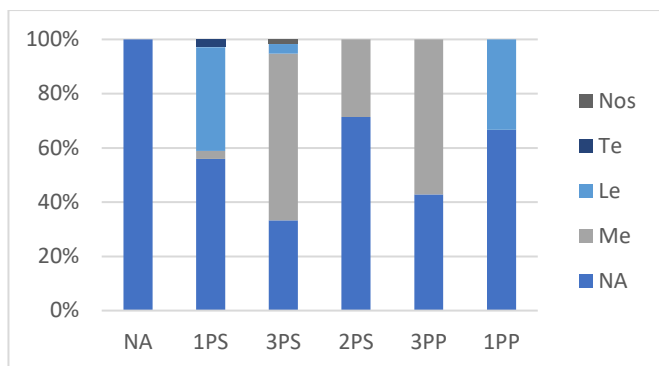


Gráfico 7. Presencia de clíticos por persona gramatical en dicendi en función realis.

Previamente vimos los clíticos de manera aislada, ahora con las personas podemos ver que en realis, me predomina en la segunda y tercera persona del singular y primera persona del plural, mientras que *le* sobresale en la primera de singular y segunda de plural.

Es particular ver que en la función situacional no haya clítico *me*, pero si *te* y *le*. Sin muchos cambios, la ausencia de clítico predomina en todas las personas.

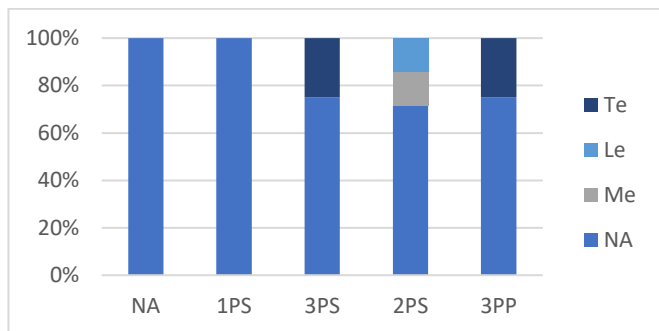


Gráfico 8. Presencia de clíticos por persona gramatical en dicendi en la función situacional.

La persona gramatical en el discurso directo introducido por verbos dicendi

Al comparar las Gráficas 9, 10 y 11, se observa un fenómeno muy particular: mientras que realis acepta casi todas las personas gramaticales, no es el mismo caso para la función situacional o hipotética. *Dicendi* como pensamiento aparece mayormente en las formas de singular.

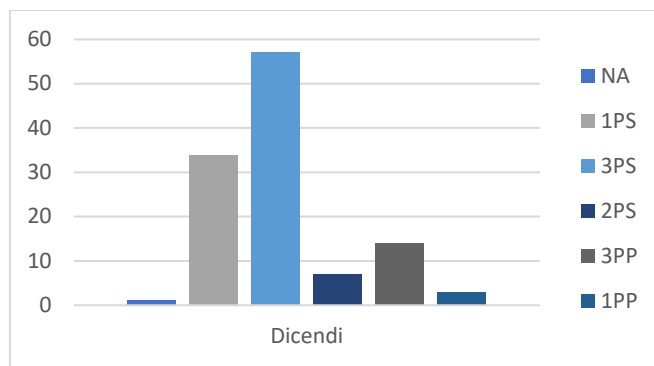


Gráfico 9. Persona gramatical en dicendi en función realis.

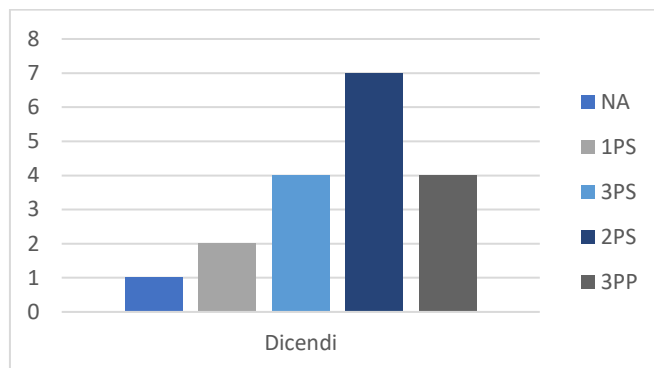


Gráfico 10. Persona gramatical en dicendi en función situacional.

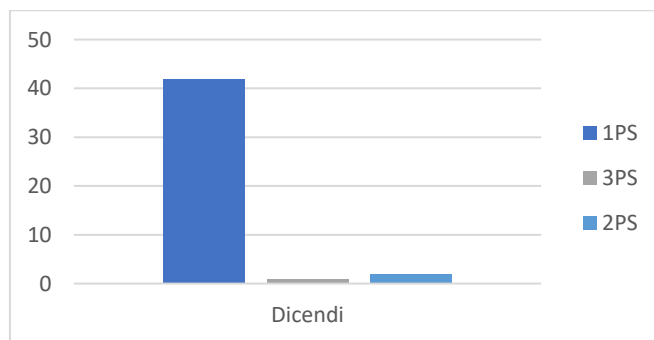


Gráfico 11. Persona gramatical en dicendi en función hipotética.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Dirigiendo de manera más clara los resultados, pudimos observar que existen diferencias bastante claras entre cada tipo de función en los verbos de comunicación, haciendo énfasis en la función hipotética, en el pensamiento, pudimos notar que, si bien no hay un marcador sintáctico que sea exclusivo de este, la ausencia total de clíticos, y la poca aparición de estos en la función situacional,

demuestra que la presencia de clíticos inmediatamente referencia a un acto de habla real. Esto se puede comprobar al añadir un el clítico más común de la persona gramatical que se vaya a usar en una situación hipotética, una vez que se ponga, la situación pasará a sentirse como una realis:

- A. Dije “ya valió”
- B. *Le* dije “ya valió”

La razón por la cual en la función hipotética no se presentan clíticos es porque, como plantea Labov (1997) el contenido de estas citas reproduce un comentario que el narrador se dirigió a sí mismo como personaje de la acción, en el momento de los acontecimientos que relata, por lo que no sería muy factible que alguien pueda pensar por otra persona, o dirigirle sus pensamientos. El hecho que estas citas estén dirigidas para uno mismo evita el uso del pronombre *me* en la primera persona singular, ya que simplemente sería repetitivo, además que al agregarlo parecería un acto de habla real.

En conclusión, no hay un marcador sintáctico para las citas hipotéticas como se esperaba encontrar al inicio de la investigación, pero si uno para realis; los verbos dicendi varían enormemente dependiendo de su función. Se abre ahora posibilidad de estudiar de manera más detallada ausencia o presencia de los clíticos en las citas directas para definir mejor las condiciones de su aparición con los verbos dicendi, tomando en cuenta su función.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de ninguna manera está hecho por una sola persona. Detrás del autor, del estudiante, hay una institución educadora capaz y maestros que comparten el amor a la investigación, aquellos que alimentan a la curiosidad y sed de saber, que fomentan activamente el estudio. No olvidar a investigadores previos a nosotros que forman parte de nuestras citas, que pavimentaron el camino que ahora recorreremos. Se les agradece a las personas que desarrollan, planean y participan en eventos como este, el Verano de la

Ciencia UAQ, ya que plantea una experiencia que muchos de nosotros nunca habían tenido. De manera personal, se les agradece a padres y tutores por su constante apoyo, al igual que a amigos, compañeros y parejas.

Espero esta institución, profesores, investigadores, organizadores y familia sigan viendo el crecimiento de sus estudiantes, a los investigadores que están ayudando a formar.

REFERENCIAS

- BUCHSTALLER, I. (2001). He goes and I'm like: The new quotatives re-visited. *New Ways of Analyzing Variation in English (NWAYE)*, 30, 11-13.
- CAMARGO, L. (2005). Cuando decir equivale a pensar. La función evaluadora de las citas directas en la conversación en español. *Interlingüística*, 15, 237-246
- CAMERON, R. (1998), “A variable syntax of speech, gesture, and sound effect: Direct quotations in Spanish”, *Language Variation and Change*, 10:1, pp. 43-83.
- DE LA MORA, J. (2018). Las citas directas en el habla de la Ciudad de México. *Anuario de Letras. Lingüística y Filología*, 6:2, 145-171.
- FAIRCLOUGH, M. (1999). Discurso directo vs. discurso indirecto en el español hablado en Houston. *Bilingual Review / La Revista Bilingüe*, 24:3, 217-229. <http://www.jstor.org/stable/25745663>
- FERNÁNDEZ, M. F. (2012). Discurso directo e indirecto en el español de Mérida. *Lengua y Habla*, 16(1), 71-85.
- LABOV, W. (1972). The transformation of experience in narrative syntax. *Language in the inner city*, 354-396.
- MALDONADO, C. (1999), “Discurso directo y discurso indirecto”, en I. Bosque y V. Demonte (dirs.), *Gramática descriptiva de la lengua española*, Madrid, Espasa Calpe, 3, 3549-3596.
- TAGLIAMONTE, S. (2016). *Teen talk: The language of adolescents*. Cambridge University Press.

GALERÍA DE FOTOS



Caracterización nutracéutica y tecnofuncional de harinas leguminosas.

Ortiz Escamilla Wendy Patricia ¹, Gaytán Martínez Marcela ², Romero Ortiz Mirna Sofia ³

¹Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Química. (wortiz21@alumnos.uaq.mx)

²Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Química. Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos (marcelagaytanm@yahoo.com.mx)

³Universidad Autónoma de Querétaro Facultad de Química (romerortiiz@gmail.com)

Summary

Legumes are characterized by being a great source of nutrition, so in this investigation it is proposed to make the nutraceutical and technofunctional characterization of chickpea, black bean and soybeans and flours with the aim of formulating a healthy snack. Water and oil absorption capacities of black bean were obtained 2.155 g/ g of flour and 0.9004 g/ g of flour respectively, for chickpea flour 2.874 g/g of flour and 0.949 g/ g of flour respectively were obtained, finally for soy flour 2.528 g/g of flour and 0.9969 g/g flour respectively were obtained. In the determination of condensed tannins, total phenols and flavonoids, the total phenol values of soybean seed were highlighted (1,573 mg a. gallic/ml), also black bean was outstanding in flavonoids value (17.84 mg rutin/ml) and bean flour was remarkable in tannins concentration (1,843 mg catechin/ml). This nutraceutical and functional characterization of leguminous flours help us to know more about the applications they could have due to the benefits that food production with these flours could

generate, as is the case of the snack that is formulated in this work.

Key words: Legumes, nutraceuticals, soybean, black bean, chickpea.

Resumen

Las leguminosas forman parte de la alimentación ya que se considera una fuente de proteína, importante para la nutrición. Por lo anterior, se propone hacer la caracterización nutracéutica y tecnofuncional de las semillas y harinas de garbanzo, frijol negro y soya con el objetivo de formular una botana saludable. Se obtuvieron capacidades de absorción de agua y aceite de frijol 2.155 g/ g de harina y 0.9004 g/ g de harina respectivamente, para la harina de garbanzo presentaron un 2.874 g/g de harina y 0.949 g/ g de harina respectivamente, por último, para la harina de soya se obtuvieron 2.528 g/ g de harina y 0.9969 g/g harina respectivamente. En la determinación de taninos condensados, fenoles totales y flavonoides se destacaron los valores de fenoles totales de la semilla de soya (1.573 mg ac gálico/ml) en los flavonoides el frijol (17.84 mg rutina/ml) y en taninos la harina de frijol (1.843 mg catequina/ml). Esta caracterización nutracéutica y funcional de las harinas leguminosas nos ayudan a conocer más sobre las aplicaciones que podrían tener por los beneficios que podría generar la producción de alimentos con estas harinas como es el caso de la botana que se formula en este trabajo.

Palabras clave: Leguminosas, nutracéuticos, frijol, soya, garbanzo.

Introducción

Los alimentos nutracéuticos y funcionales como lo describen Biurete y colaboradores (2009) se caracterizan por ejercer un efecto benéfico en la salud del consumidor, por lo tanto en este proyecto se realizó la evaluación nutracéutica de harinas de frijol negro, soya y garbanzo obtenidas por cocción

tradicional debido a que las leguminosas se distinguen por su aporte de proteínas (de 17 al 35%), fibra dietética (aproximadamente un 20%), carbohidratos, compuestos fenólicos, minerales, vitaminas, un aporte de grasas menor al 4% (Aguilera, 2009; Ríos et al, 2018). Las leguminosas también se caracterizan por tener un índice glicémico bajo lo que permite una regularización de los niveles de glicemia en la sangre, también por su alta cantidad de fibra se han observado beneficios en el sistema digestivo (Ríos et al, 2018). Así mismo las leguminosas tienen la ventaja de adaptarse a crecer incluso en suelos con pocos nutrientes, estos cultivos no suelen necesitar el uso de fertilizantes o plaguicidas, por lo que el cultivo de leguminosas se convierte en una fuente de alimentos nutritiva y sostenible (Ríos et al, 2018).

Entre las características nutraceuticas evaluadas a las semillas y harinas de las leguminosas se encuentran la cantidad de fenoles totales, taninos condensados y flavonoides. También se realizó la caracterización tecnofuncional de absorción de agua y aceite en las harinas.

En este proyecto se observó que en el mercado de las botanas no existe gran cantidad de productos que sean saludables por lo que se propone usar las harinas de frijol, garbanzo y soya para formular un producto que aporten mayor cantidad de nutrientes en comparación a las botanas tradicionales, por lo que se espera obtener una formulación, donde la botana resultante no requiera el uso de sellos de advertencia al consumidor y que sea sensorialmente aceptable.

Objetivos

Evaluar la caracterización nutraceutica y tecnofuncional de las harinas leguminosas de frijol negro, garbanzo y soya.

Desarrollar la formulación de la botana mediante un diseño de mezclas de harinas de leguminosas.

Metodología

Para la obtención de las harinas, se limpiaron y enjuagaron con agua potable los granos de frijol, soya y garbanzo, posteriormente se cocieron por 3 horas a 94°C, se escurren y se pusieron a secar en el deshidratador por 24 hr a 50°C, una vez que las semillas estuvieron secas se molieron en un molino pulvex para finalmente empacar las harinas al vacío.

A continuación, para obtener la capacidad de absorción de agua (CAA) y aceite (CAL) de las harinas se realizó la metodología de acuerdo a Beuchat (1977) con algunas modificaciones. Se tomó un gramo de muestra en un tubo para centrífuga previamente pesado y se añadieron 10 ml de agua o aceite de soya respectivamente, los tubos se agitaron en un vortex durante 15 s y se dejaron reposar 1h a 30 °C, seguidamente se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos. Por último, se decantó y pesó el precipitado.

Con relación a la evaluación de las propiedades nutricionales se obtuvieron los extractos metanólicos de las semillas y harinas de frijol, soya y garbanzo diluyendo 50 mg de cada harina y semilla en 1.5 ml de metanol al 80%, esta disolución se agitó por 30 minutos y posteriormente se sonicaron por 20 minutos. Por último, se centrifugaron por 5 min a 5000 rpm y se recuperó el sobrenadante.

A continuación, para la medición de flavonoides se utilizó la metodología de (Páramo,2020), se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones de rutina 50, 25, 10, 5, 2.5, 1 ug/ml con una solución stock de 50 ug/ml, en las placas se colocaron 50 ul de las diferentes concentraciones por triplicado y se les añadió 180 ml de metanol y 20 ul de la solución 2-amino-etil fenil borato al 1%, esto se leyó a 404 nm. Una vez obtenida la curva se cuantifican los flavonoides totales en los extractos poniendo en los pozos 50 ul de los extractos, 180 ul de metanol con 20 ul de la solución 2-amino-etil fenil borato al 1% y se leyó a 404 nm.

Para la medición de taninos condensados se usó la metodología de Deshpande y Cheryan (1985) empleando vainilla. Se realizó una curva de calibración con catequina a 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/ml. En la placa se colocaron 50 ul de las diferentes concentraciones y se les añadió 200 ul de la solución 1:1 HCl con vainillina, para el blanco se añadieron 50 ul de metanol con 200 ul de la solución de vainillina con HCl, por último, se midió a 492 nm. Para las muestras se sustituyeron los 50 ul de metanol por 50 ul de extracto.

Por otra parte, para la medición de fenoles totales (TPC) se utilizó el método de Folin-Ciocalteu adaptado a microplaca. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico a concentraciones de 0 a 1 mg/mL. Para las muestras se colocaron 20 ul de cada extracto, se agregaron 200 ul del reactivo Folin-Ciocalteu y se dejó reposar por 6 minutos, por último se agregaron 80 ul de carbonato de sodio al 7.5% . Posteriormente se dejó incubar la placa en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente y a 50 rpm para próximamente medir la absorbancia a 760 nm.

Para la formulación de las botanas se tomaron 3 mezclas de las harinas de leguminosas en diferentes proporciones cada una obtenidas previamente de un diseño de mezclas, a estas se les adiciona sal, ajo, cebolla, maseca y polvo para hornear en diferentes proporciones. Una vez que se tuvieron las formulaciones se llevaron al extrusor de acero inoxidable de tornillo simple construido por CICATA-IPN, adaptado de un tornillo sin fin L/D de 21 pulgadas a una velocidad de 20 rpm, con dos zonas de calentamiento a 100 °C. Para dar la forma de "churrito" a la botana se usó un dado de 6mm de diámetro. Por último, las botanas precocidas fueron llevadas a un horno eléctrico a 350 °C por 12 minutos.

Resultados

Compuestos fenólicos

El contenido de fenoles totales, flavonoides y taninos condensados de las semillas de frijol negro, garbanzo y soya, así como de sus respectivas harinas se muestra en la Tabla 2. Los valores fueron obtenidos usando la ecuación de la recta obtenida de las curvas de calibración realizadas.

Los fenoles son un grupo de compuestos que le confiere la capacidad antioxidante a las plantas, este se divide en isoflavonas, flavonoides y carotenos, los fenoles en la dieta son reconocidos por su ayuda en la prevención de procesos inflamatorios, ataques cardíacos, cáncer entre otros (Biurete. et al, 2009).

Los flavonoides son pigmentos en su mayoría rojizos, azules y violetas encontrados en vegetales, estos compuestos se distinguen por ayudar en la prevención de problemas cardiovasculares y cáncer, por lo que su consumo es altamente recomendado (Biurete et al., 2009).

Los taninos condensados muestran propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas, sin embargo, también se ha encontrado que estos compuestos pueden tener efectos antinutricionales (Olivas et al., 2015).

Como se puede observar en la Tabla 1, las muestras de semilla de garbanzo para taninos se obtuvieron 0.184 ± 0.06 mg de catequina/ ml (3.69 ug/100g de semillas), en flavonoides 7.92 ± 2.11 mg de rutina/ ml (158.59 ug/100g de semillas) y en fenoles totales 0.593 ± 0.009 mg de ácido gálico/ ml (11.86 ug/100g de semillas). Rebello et al. (2014) en cantidad de fenoles totales obtuvieron 20.5 ug/100 g de semillas, su cantidad de flavonoides es de 604.4 ug/100 g de semillas, alrededor de 4 veces más que lo que nosotros obtuvimos.

Con respecto a los resultados obtenidos de la semilla de frijol se muestra una concentración de taninos de 1.843 ± 0.05 mg de catequina/ ml, en flavonoides 17.84 ± 2.23 mg de rutina/ ml y en fenoles totales 1.41 ± 0.19 mg de ácido gálico/ ml.

Por otro lado, Herrera y Cruz (2019) obtuvieron 0.28 ± 0.47 de eq. de ácido gálico para la concentración de fenoles

En cuanto a las semillas de soya obtenidas mostraron una concentración de taninos de 0.209 ± 0.002 mg de catequina/ ml, en flavonoides 6.43 ± 1.99 mg de rutina/ ml y en fenoles totales 1.57 ± 0.002 mg de ácido gálico/ ml. Malencic et al. (2012) reportan taninos 0.93 ± 0.20 de equivalentes de ácido gálico/ g, en flavonoides obtuvieron 0.48 ± 0.02 equivalentes de rutina/ g, con respecto a los fenoles totales obtuvieron 2.68 ± 0.47 equivalentes de ácido gálico/g.

material proteico, en este caso las harinas de leguminosas (Aguilar, 2013). Para obtener la capacidad de absorción de agua y de aceite (CAA Y CAL) se calculó la diferencia de peso entre la muestra antes y después de la absorción de agua o aceite.

En el experimento se observó que la cantidad de absorción de agua y aceite del frijol negro es de 2.16 ± 0.08 g/ g de harina y 0.90 ± 0.05 , cifras que se aproxima a las obtenidas por Siddiq et al. (2010) con una absorción de agua de 2.23 ± 0.14 g/g de harina y una absorción de aceite de 1.34 ± 0.11 .

Por otro lado la capacidad de absorción de agua en la harina de garbanzo obtenida fue de 2.87 ± 0.10 g/g de harina, dato que podemos comparar con Kaur y Singh (2005) ya que ellos obtuvieron una absorción de agua de 1.33 g/ g de harina, sin embargo Aguilera et al. (2011) reportan un aumento de hasta 3.1 veces en la absorción de agua en las harinas de garbanzo que pasan por un proceso de remojo, cocción y deshidratado, pasos que a excepción del remojo llevamos a cabo para la obtención de nuestras harinas. En la absorción de aceite Kaur y Singh (2005) obtuvieron $1.24 \pm .08$ g/ g de harina mientras que nosotros obtuvimos 0.949 ± 0.07 g/ g de harina.

Con respecto a la harina de soya, se obtuvo una absorción de agua de 2.53 ± 0.06 g/g de harina (252.88%) y en la absorción de aceite 0.997 ± 0.04 g/g harina (99.69%), Mamah (2001) obtuvo un 150% de absorción de agua y un 125% en absorción de aceite en harinas crudas, sin embargo, como se mencionó anteriormente Aguilera et al. (2011) mencionan que la absorción de agua puede aumentar al procesar la harina con cocción y deshidratación, pasos que conlleva la creación de la harina de leguminosa planteada en este proyecto.

Tabla 1. Compuestos fenólicos de las leguminosas

Muestra	Fenoles totales mg/ml	Flavonoides mg/ml	Taninos condensados mg/ml
Frijol negro	1.40 ± 0.18	17.84 ± 2.23	1.84 ± 0.05
Garbanzo	0.59 ± 0.009	7.92 ± 2.10	0.18 ± 0.05
Soya	1.57 ± 0.002	6.43 ± 1.98	0.20 ± 0.01
Harina de frijol negro	0.72 ± 0.04	13.19 ± 1.11	0.56 ± 0.03
Harina de garbanzo	0.48 ± 0.03	17.75 ± 0.37	0.25 ± 0.19
Harina de soya	1.03 ± 0.03	10.91 ± 1.11	0.23 ± 0.03

Tabla 2. Capacidad de absorción de agua y aceite (g de aceite o agua/g de harina)

Muestra	CAA	CAC
Harina de frijol negro	2.15 ± 0.08	0.90 ± 0.05
Harina de garbanzo	2.87 ± 0.10	0.96 ± 0.06
Harina de soya	2.52 ± 0.01	0.99 ± 0.03

CAA: Capacidad de absorción de agua CAC: Capacidad de absorción de aceite.

La capacidad de absorción o aceite de agua es la cantidad de agua/ aceite absorbida por gramo del



Figura 1. Botana obtenida por extrusión

Cómo se observa en la Figura 1, se obtuvieron las botanas saludables en forma de churro por medio del extrusor. En total se obtuvieron tres diferentes prototipos de las botanas con las características deseadas.

Discusión y conclusiones

La caracterización nutraceutica y funcional de las harinas leguminosas representan un primer paso para conocer los beneficios que podría traer el desarrollo de una botana formulada con éstas, por sus cantidades de compuestos fenólicos, los flavonoides o taninos y los beneficios que aportan a la salud. También se pudo observar que las características como la absorción de agua pueden aumentar o disminuir según el tratamiento que se siga para obtener las harinas, factor que se debe tener en cuenta para la manipulación de estas harinas.

Agradecimientos

Agradezco a la Doctora Marcela Gaytán, a la UAQ, a la Ingeniera Sofía y a la Doctora Elisa, así como a mis compañeros de laboratorio Diana, Valeria y Aldo por permitirme colaborar en este proyecto, por apoyarme y tenerme paciencia ya que el proyecto llevado a cabo fue sobre un área en la que yo no tenía mucho entendimiento. Así mismo, también agradezco a mi familia y a Omar por su apoyo.

Referencias bibliográficas

- Aguilar-Raymundo, V. G., & Vélez-Ruiz, J. F.. "Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.)". *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2), 25-34. 2013. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Vicky-Aguilar/publication/319185894_Propiedades_nutricionales_y_funcionales_del_garbanzo_Cicer_arietinum_L/links/5999e8dbaca272e41d3ec59c/Propiedades-nutricionales-y-funcionales-del-garbanzo-Cicer-arietinum-L.pdf [Consultado en 2022]
- Aguilera G. "Harinas de leguminosas deshidratadas: Caracterización nutricional y valoración de sus propiedades tecnofuncionales". [PhD tesis] Universidad Autónoma de Madrid. 2009
- Aguilera, Y., Benítez, V., Mollá, E., Esteban, R. M., & Martín-Cabrejas, M. A.. "Influence of dehydration process in castellano chickpea: changes in bioactive carbohydrates and functional properties". *Plant foods for human nutrition*, 66(4), 391-400. 2011. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11130-011-0259-8#Tab4> [Consultado en 2022]
- Anderson, R. A. "Water absorption and solubility and amylograph characteristics of roll-cooked small grain products". 1982. Disponible en: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/25267> [Consultado en 2022]
- Biruefe Guzmán, A., Juárez Hernández, E., Sieiro Ortega, E., Romero Viruegas, R., & Silencio Barrita, J. L. . "Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. Revista Mexicana de pediatría, 76(3)". 2009. Disponible en:<https://www.medigraphic.com/pdfs/pediat/sp-2009/sp093h.pdf> [Consultado en 2022]
- Herrera Mayra, Cruz Raquel. "Contenido de fenoles totales en harinas de frijol negro San Luis". Universidad Autónoma de Chapingo. 2019. Disponible en: https://congresorebiza.mx/wp-content/uploads/2019/11/REBIZA_2019.pdf#page=117 [Consultado en 2022]
- Kaur, M., & Singh, N. . "Studies on functional, thermal and pasting properties of flours from different chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars". *Food chemistry*, 91(3), 403-411. 2005. Disponible en: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814604004650?casa_token=dMSLcdhGWrAAAAA:2aroydfhvQVOYmJ5DT5BfdY0ro1xwPqSFi3dP8OMHVsqgc4LvoJRtHZJZEFg__NORMMmNLVUbMU [Consultado en 2022]
- Mamah, L. O. E.. "Functional properties of raw and processed pigeonpea (*Cajanus cajan*) flour". *International journal of food sciences and nutrition*, 52(4), 343-346. 2001. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09637480120057549> [Consultado en 2022]
- Malenčić, D., Cvejčić, J., & Miladinović, J. "Polyphenol content and antioxidant properties of colored soybean seeds from Central Europe". *Journal of medicinal food*, 15(1), 89-95.2021 Disponible en:<https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jmf.2010.0329> [Consultado en 2022]

Olivas-Aguirre, F. J., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G. A., López-Díaz, J. A., Álvarez-Parrilla, E., Rosa, L. A., & Ramos-Jimenez, A.. "Taninos hidrolizables: bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud". *Nutrición hospitalaria*, 31(1), 55-66. 2015. Disponible en: <https://scielo.isciii.es/pdf/nh/v31n1/05revision05.pdf> [Consultado en 2022]

Rebello, C. J., Greenway, F. L., & Finley, J. W. . "A review of the nutritional value of legumes and their effects on obesity and its related co-morbidities". *Obesity reviews*, 15(5), 392-407. 2014. Disponible en: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/obr.12144?casa_token=YJn2mHppq4FoAAAAA:EDEjDCbWb9QZel7HLX17-_TbjgbLyfVmvR2lRre2rkdbI5WR-o4T2yQqWcl6pgelAx-uAshKUpchPicz [Consultado en 2022]

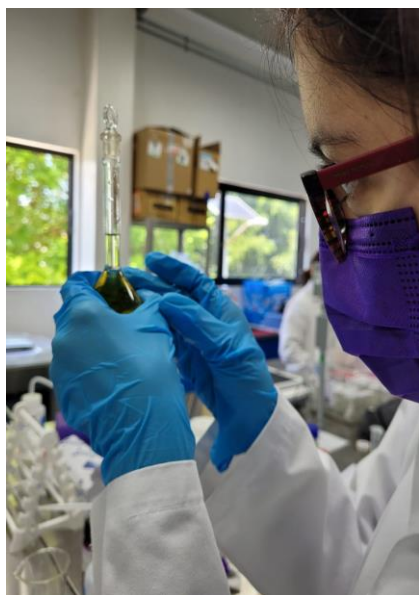
Ríos-Castillo, I., Acosta, E., Samudio-Núñez, E., Hruska, A., & Gregolin, A. "Beneficios Nutricionales, Agroecológicos y Comerciales de las Legumbres". *Revista chilena de nutrición*, 45, 8-13. 2018. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182018000200008&script=sci_arttext [Consultado en 2022]

Siddiq, M., Ravi, R., Harte, J. B., & Dolan, K. D. "Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours". *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 232–237. 2010. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643809002047>[Consultado en 2022]

S. S. Deshpande; M. Cheryan . "Evaluation of Vanillin Assay for Tannin Analysis of Dry Beans". , 50(4), 905–910. 1985. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb12977.x> [Consultado en 2022]

Beuchat L.R.. "Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein". *J. Agr. Food Chem.* 25:258-261 1977. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jf60210a044> [Consultado en 2022]

Galería fotográfica



Implementación de pruebas físicas en gutapercha de uso endodóntico.

Janeht Lizbeth González-Toralla¹, Lilia Sánchez-Ugalde¹, Rubén Abraham Domínguez-Pérez².

1. Licenciatura en Odontología, Facultad de Medicina, UAQ. jgonzalez171@alumnos.uaq.mx, odonto.lily1206@gmail.com.

2. Laboratorio de Investigación Odontológica Multidisciplinaria. Facultad de Medicina, UAQ. dominguez.ra@uaq.mx.

Resumen

Introducción: La gutapercha es el material más utilizado para obturar el conducto radicular durante un tratamiento de endodoncia. Sus propiedades físicas pueden variar dependiendo de su composición química y condiciones externas, lo que podría beneficiar o perjudicar su manejo clínico. **Objetivo:** Implementar, estandarizar y evaluar dos pruebas físicas que puedan ser aplicadas a las puntas de gutapercha de uso endodóntico que permitan evaluar algunas de sus propiedades físicas. **Materiales y Métodos:** Se utilizaron puntas de gutapercha calibre 45, conicidad 0.2, de diferentes marcas, así como un microdureómetro y una máquina universal de pruebas. **Resultados:** Se implementaron, estandarizaron y evaluaron dos pruebas para estudiar propiedades físicas en puntas de gutapercha de uso endodóntico; microdureza superficial y resistencia a la tracción. **Conclusiones:** Las pruebas implementadas permiten evaluar propiedades físicas de las puntas de gutapercha.

Palabras clave: Gutapercha, Propiedades físicas, Resistencia a la tracción, Microdureza superficial.

Summary

Introduction: Gutta-percha is the most widely used material to fill the root canal during endodontic treatment. Its physical properties may vary depending on its chemical composition and external conditions, which could benefit or harm its clinical management. **Objective:** To implement, standardize and evaluate two physical tests that can be applied to gutta-percha tips for endodontic use that allow evaluating some of their physical properties. **Materials and Methods:** Gutta-percha tips number 45 caliber, taper 0.2, of different brands, as well as a microdureometer and a universal testing machine were used. **Results:** Two tests were implemented, standardized and evaluated to know physical properties in gutta-percha tips for endodontic use; surface microhardness and tensile strength. **Conclusions:** The implemented tests allow evaluating physical properties of the gutta-percha tips.

Keywords: Gutta-percha, Physical properties, Tensile strength, Superficial microhardness.

Introducción

La gutapercha (del malayo “gatah” que significa goma y “perja” que es el nombre del árbol del que se obtiene) es un tipo de goma parecida al caucho, translúcida, sólida y flexible, fabricada a base del látex proveniente de árboles del género *Palaquium*, originario del Archipiélago Malayo conformado por las islas de Malasia, Indonesia, Borneo, Timor, Java y Papúa (Maniglia-Ferreira et. al, 2005).

Su descubrimiento se atribuye al inglés John Tradescant (1608-1662) que en uno de sus viajes transportó esta resina natural junto con numerosas plantas a Inglaterra, pero el descubrimiento con más referencias escritas publicadas se refiere al Dr. William Montgomerie en Singapur que junto con el Dr. José Almeida, fueron sus descubridores y observadores de sus características especiales y posibles aplicaciones comerciales (Alvarez, 2009).

Su introducción en Odontología fue en 1847 por el Dr. Asa Hill como un material restaurador usado en una mezcla con Carbonato de Calcio. Sin embargo, gracias a Bowman en el año de 1867 empezó a ser utilizado en el área de Endodoncia en forma de conos de gutapercha.

Desde que se propuso como material para uso endodóntico, las puntas de gutapercha han sido el material más utilizado para la obturación de los conductos radiculares (Gatewood, 2007).

Las puntas de gutapercha están compuestas de materiales orgánicos e inorgánicos (Hauman y Love, 2003). La parte orgánica está compuesta principalmente por gutapercha que representa la matriz de la punta (19-22%) y cera/resina como agente plastificante (1-4%) ambos contribuyen a que la punta sea flexible y comprimible (Friedman et al. 1975). Su parte inorgánica está compuesta por óxido de zinc que se considera un material de relleno (50-70%) y sales de metales pesados que le proveen la radiopacidad para que pueda ser observada en las radiografías (1-17%) pero que disminuyen la resistencia a la tracción y aumentan su fragilidad.

Se espera que las puntas de gutapercha tengan ciertas características que las haga ideales para su uso en la clínica, propiedades físicas como la fluidez, rigidez, fragilidad, plasticidad, radiopacidad, entre otras (Tagger y Gold, 1988).

Desde hace varios años los fabricantes de puntas de gutapercha han realizado distintas combinaciones de sus componentes para obtener puntas de gutapercha que tengan las mejores propiedades, sin embargo, existen pocas alternativas para evaluar la influencia de las distintas composiciones químicas en las propiedades físicas de estas puntas.

Es bien sabido que cualquier método que manipule las puntas de gutapercha utilizando calor o solventes provocará una contracción del 1-2% de su volumen. La contracción del material no es deseable en la

obturación de un conducto radicular (Frantzeska et. al, 2017; Benjamín et. al, 2015).

La microdureza superficial es la resistencia de una sustancia a ser rayada o a sufrir deformaciones de cualquier índole motivadas por presiones a nivel micrométrico (Craig, 1996).

Los materiales poseen la propiedad para resistir la deformación plástica, elástica y destrucción en sus superficies, en presencia de esfuerzos de contacto locales, inferidos por otro cuerpo más duro, el cual no sufre deformaciones residuales, como con un penetrador o interdental de forma determinada y dimensiones. Existen diferentes métodos para determinar los valores de microdureza de un material duro como; Rockwell, Knoop, Brinell y Vickers (Santos, 2001), sin embargo, estas pruebas no son aplicadas comúnmente a materiales de superficies blandas.

Por otra parte, la resistencia a la tracción es un ensayo que tiene por objetivo definir la resistencia elástica y plasticidad de un material cuando se le somete a fuerzas uniaxiales. Esta prueba requiere de una maquina universal de pruebas para llevarla a cabo en donde se debe montar de forma que el material sea “traccionado” mientras se documenta la fuerza aplicada.

Ambas pruebas pueden aportar información sobre las propiedades de las puntas de gutapercha y estas podrían ser traspoladas al desempeño que se espera que tengan durante la práctica clínica.

Objetivos

Implementar, estandarizar y evaluar dos pruebas físicas que puedan ser aplicadas a las puntas de gutapercha de uso endodóntico que permitan evaluar algunas de sus propiedades físicas. Específicamente la prueba de microdureza superficial y la prueba de resistencia a la tracción.

Metodología

El presente estudio se dividió en dos grandes etapas, la primera consistió en la implementación y estandarización de dos pruebas para evaluar propiedades físicas de las gutaperchas, microdureza superficial y resistencia a la tracción. La segunda etapa consistió en la evaluación de la funcionalidad de dichas pruebas.

Etapa 1.- Implementación y estandarización de las pruebas.

Después de realizar una revisión bibliográfica profunda y no encontrar protocolos previos para realizar estas dos pruebas en puntas de gutapercha se decidió comenzar por desarrollar los protocolos para implementarlas y estandarizarlas en este material.

Pruebas de microdureza superficial.

El primer requisito necesario para realizar esta prueba es que el material posea una superficie plana y lisa que permita por un lado montarlas en la base del microdurómetro y por el otro lado se permita la indentación con la punta de diamante. Para lograr esto se realizaron varias pruebas, finalmente se observó que prensar las puntas de gutapercha a 400 Newton utilizando una maquina universal de pruebas era la mejor opción para lograr en las puntas que son cónicas, dos superficies planas y lisas.

El segundo requisito para esta prueba es que el material pueda reflejar la cantidad de luz adecuada que permita observar y medir la indentación que será realizada. Para lograr esto, se realizaron varias pruebas y se determinó que impregnar la superficie de la gutapercha con polvo de carbón de lápiz permitiría observar adecuadamente.

Finalmente se realizaron distintas pruebas para establecer la carga y el tiempo adecuados para lograr una indentación que se pueda observar y medir claramente. Se determinó que la mejor opción sería

aplicar una carga HV0.1 durante 10 segundos (figura 1).

Prueba de resistencia a la tracción

Para esta prueba se realizaron distintos ensayos para sujetar de diferentes formas y en diferentes puntos a las puntas de gutapercha. Se estableció la mejor forma

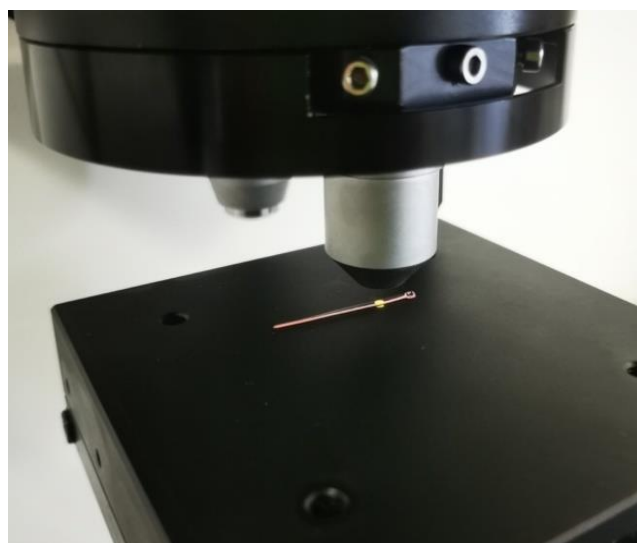


Figura 1. Punta de gutapercha en el microdurómetro

como sigue: Puntas de gutapercha previamente aplanadas bajo el mismo protocolo ya descrito.

En los 10 mm correspondientes a la parte más delgada de la punta se colocó un centímetro de cinta de papel para facilitar su montaje en la prensa de la maquina universal de pruebas, la parte más gruesa de la punta de gutapercha se presio directamente utilizando un chuck montado en la prensa inferior de la maquina universal de pruebas dejando exactamente 10 mm de la punta de gutapercha libre entre la prensa superior y el chuck montado en la prensa inferior (figura 2).

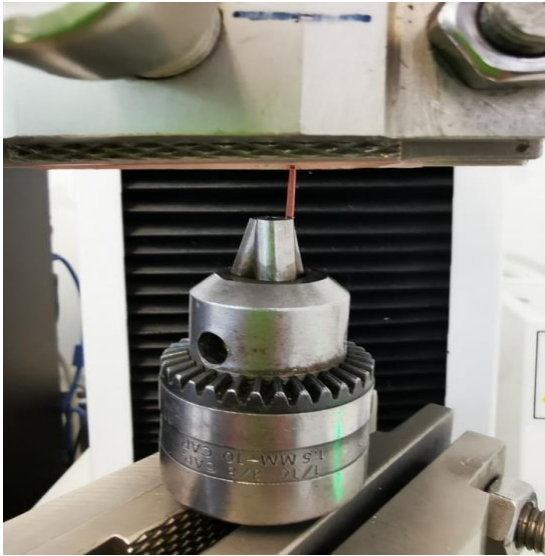


Figura 2. Punta de gutapercha montada en la maquina universal de pruebas.

Se realizaron diferentes ensayos para determinar la velocidad a la que debía realizarse la tracción estableciéndola finalmente en 1mm/min sin límite de tiempo y hasta la ruptura de la punta de gutapercha.

Para ambas pruebas se utilizaron puntas de distintos calibres y de diferentes marcas y se realizaron a la misma temperatura ambiente 25-26°C.

Etapa 2.- Evaluación de la funcionalidad de las pruebas desarrolladas.

Para determinar si las pruebas para evaluar microdureza superficial y resistencia a la tracción son funcionales y pueden ser utilizadas para evaluar estas propiedades en puntas de gutapercha con distintas condiciones se realizó un ensayo con dos marcas de puntas de gutapercha ambas con ligeras diferencias en su composición química, pero del mismo calibre y conicidad.

Se utilizaron 40 puntas de gutapercha calibre 45, conicidad 0.2. 20 de la marca Hygienic y 20 de la marca Metabiomed.

Se prensaron en una maquina universal de pruebas a 400 Newtons para obtener dos superficies planas.

Inmediatamente después de ser aplanadas se registró su grosor en milímetros midiendo tres diferentes puntos, en la punta, en tercio medio y en la base (figura 3) y también se pesaron en una balanza analítica. El registro del peso y medidas de las puntas se realizó para verificar criterios de inclusión y que todas las puntas pesaran y midieran lo mismo, en caso de que alguna tuviera diferencias marcadas por defectos de fabricación, esta fue eliminada.

Se impregnó uno de sus lados con polvo de carbón de lápiz y cada punta se montó en el microdurometro, en donde se aplicó una carga HV0.1 durante 10 segundos para crear una indentación en su superficie. Se midió la indentación y se calculó la dureza Vickers la cual fue registrada en una base de datos. Se realizaron tres indentaciones en cada punta y se obtuvo el promedio de las tres (figura 4).



Figura 3. Medición en tres puntos de las puntas de gutapercha

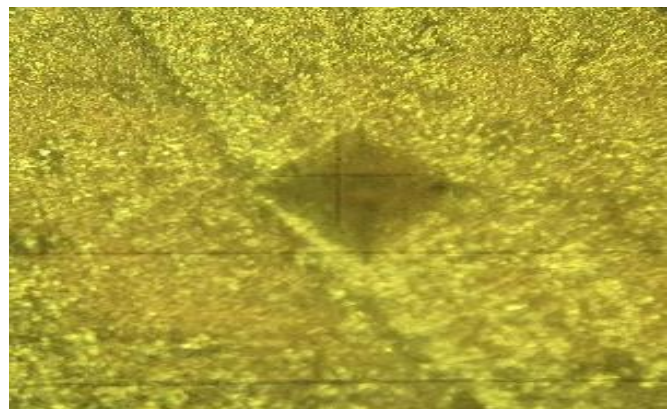


Figura 4. Micrografía de una indentación realizada en una punta de gutapercha

Una vez concluida la prueba de microdureza, se colocó sobre los 10 mm de la punta un centímetro de cinta de papel y se marcó con un marcador una línea que indicaba 10 mm desde la cinta de papel a la base de la punta, ambos indicadores fueron utilizados para montar cada punta en la maquina universal de pruebas, la punta hacia arriba sujeta por la prensa de la maquina universal de pruebas y la base hacia abajo sujeta por el chuck. El ensayo de tracción se realizó a una velocidad de 1mm/min. El valor máximo de tracción se registró en Newtons en la base de datos.

Los resultados fueron analizados y se presentan promedio, desviación estándar y rango. Para determinar si existía diferencia estadísticamente entre los grupos se realizó la prueba de t de student, Se consideró que existe diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$.

Resultados

Se lograron desarrollar y estandarizar dos pruebas para evaluar propiedades físicas en puntas de gutapercha de uso endodóntico; microdureza superficial y resistencia a la tracción. Ambas pruebas fueron evaluadas a través de la realización de un protocolo en donde se evaluaron dos marcas comerciales (Metabiomed e Hygienic).

Los resultados de la aplicación de ambas pruebas se muestran a detalle en el cuadro 1.

Cuadro 1. Comparación de la Microdureza superficial (Vickers) y resistencia a la tracción (Newtons) de puntas de gutapercha de dos marcas comerciales

	Metabiomed (n=20)	Hygienic (n=20)	Valor de p
	X ±DE (Rango)		
Microdureza superficial	34.65±3.38 (29-40)	38.51±6.49 (31-51)	0.0237
Resistencia a la tracción	2.58 ± 0.43 (1.8-3.3)	5.11±0.57 (4.1-6.1)	<0.0001

X: Promedio; DE: Desviación estándar.
Prueba t de Student.

Se pudo observar que las puntas de gutapercha Hygienic mostraron valores más elevados en ambas pruebas en comparación con las puntas de la marca Metabiomed.

Discusión

Las puntas de gutapercha tienen un gran contenido en gutapercha y óxido de zinc ambos en proporciones variables, según los métodos de fabricación. Ya se ha documentado que estas diferencias en sus composiciones pueden afectar sus propiedades físicas y biológicas (Tagger y Gold, 1988).

Se ha asociado que mayor contenido de óxido de zinc tiende a aumentar la fragilidad y reducir la fluidez del material (Friedman, 1977). Por otro lado, se ha mencionado que la plasticidad de una punta se debe al contenido relativamente bajo de gutapercha, mientras que el aumento de ese contenido conduce a la fragilidad de la punta (Marciano y Michailesco, 1989).

La propuesta aquí descrita logró implementar dos pruebas que permiten estudiar propiedades físicas de las puntas de gutapercha. El ensayo que se realizó permitió conocer que ambas pruebas permiten encontrar diferencias entre grupos y podrán ser utilizadas para realizar diferentes investigaciones en donde se modifiquen los componentes de las puntas, o en donde las puntas sean sometidas a diferentes situaciones, intentando simular sobre todo situaciones clínicas. Por ejemplo, no se sabe el impacto que tienen diversas soluciones (hipoclorito de sodio, EDTA, clorhexidina) que se usan durante un tratamiento de conductos sobre las puntas de gutapercha. Esto ya podrá ser evaluado. Por lo pronto y aunque no era el objetivo de este estudio, se puede mencionar que derivado de la evaluación de la funcionalidad de las pruebas se tienen resultados con respecto a dos marcas comerciales de puntas de gutapercha que se encuentran en el mercado. Las puntas de gutapercha de la marca Hygienic mostraron valores más altos en comparación con las Metabiomed.

Conclusión

Las pruebas de microdureza superficial y de resistencia a la tracción que fueron implementadas, estandarizadas y evaluadas en este trabajo permitirán conocer algunas características físicas de las puntas de gutapercha de uso endodóntico, lo cual resultará útil para estudiar a estas puntas bajo distintas condiciones y predecir su comportamiento clínico.

Agradecimientos

Agradecemos al Programa de Verano de la Ciencia UAQ 2022 por permitirnos participar y al CONCYTEC por el apoyo brindado para la realización de esta estancia de verano.

Referencias bibliográficas

- Álvarez C. (2009). Gutapercha: pasado y presente. *Gaceta Dental*. 126-139.
- Benjamin B, Thomas W, Dennis S, Brita W. (2015). Thermoplastoc properties of Endodontic Gutta-percha; A Thermografic In Vitro Study. *J Endod*. 1(41); 79-82.
- Briseño Marroquin, B., Wolter, D., & Willershausen-Zonnchen, B. (2001). Dimensional variability of nonstandardized greater taper finger spreaders with matching gutta-percha points. *International Endodontic Journal*. 34(1), 23–28.
- Cantincus E. (2021). Desarrollo de un textil técnico para minimizar el impacto de golpes, utilizando el caucho recuperado de los neumáticos fuera de uso. (PhD Thesis). Universidad Técnica del Norte. Ecuador.
- Craig, O`brien, Powers. (1996). *Materiales dentales: propiedades y manipulación*. España: Elsevier.
- Frantzeska K, Christopoulos D, Chondrokoukis P (2017). Gutta Percha and Updated Obturating Techniques. *J Dent Health Oral Disord Ther*. 8(2); 1-5.
- Friedman CM, Sandrik JL, Heuer MA, Rapp GW (1975). Composition and mechanical properties of gutta-percha endodontic points. *Journal of Dental Research*. 54, 921-25.
- Friedman C.E., Sandrik J.L., Heuer M.A., Rapp G.W. (1997). Composition and physical properties of gutta-percha endodontic filling materials. *J Endod*. 3:304–308.
- Gatewood RS. (2007). Endodontic materials. *Dental Clinics of North America*. 51, 695-712.
- Hauman C, Love R (2003). Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. *International Endodontic Journal*. 36, 147-60.
- Maniglia-Ferreira C, Silva JBA, Jr, Paula RCM, Feitosa JPA, Cortez DGN, Zaia AA, et al. (2005). Brazilian gutta-percha points. Part I: chemical composition and X-ray diffraction analysis. *Braz Oral Res*.19:193–197.
- Marciano J, Michalesco P. (1989). Dental Gutta- Percha. chemical compoSition, x-ray identification, enthalpic studies and clinical implications. *J Endod*.15:149–53.
- Santos E, Yenque J, Rojas O, Rosales V. (2001). Notas Científicas Acerca del Ensayo de Dureza. *Industrial Data*. 4(2): 73- 80.
- Tagger M, Gold A. (1988). Flow of various brands of gutta-percha cones under in vitro thermomechanical compaction. *J Endod*. 14:115–120.