

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



Formación Académica en la DCNE a Través de la Investigación Científica, Innovación y Emprendedurismo



Campus Guanajuato | División de Ciencias
Naturales y Exactas



DCNE Semana de
Innovación,
Emprendimiento
e Investigación

FORMACIÓN ACADÉMICA EN LA
DCNE A TRAVÉS DE LA
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA,
INNOVACIÓN Y
EMPRENDEDURISMO

*Formación Académica en la DCNE a Través de la Investigación Científica, Innovación y
Emprendedurismo*

2020

D.R. © Universidad de Guanajuato
Lascrain de Retana núm. 5,
Centro Guanajuato, Gto., México
C.P. 36000

Queda prohibida la reproducción o transmisión parcial o total de esta obra bajo cualquiera de sus formas, electrónica o mecánica, sin el consentimiento previo y por escrito del editor.

Créditos de portada y contraportada: Amaranta Pedraza Díaz

ISBN: En trámite

Hecho en México

Made in Mexico

COMITÉ EDITORIAL

Fernando Israel Gómez Castro

David Cruz Cruz

Juana Elizabeth Reyes Martínez

Gustavo Cruz Jiménez

Adriana Medina Ramírez

Nadia Romero Romero

Dennis Jack

Juan Pablo Torres Papaqui

Jesús Isaac Minchaca Mojica

Martha Alicia Deveze Álvarez

Patricia Nayeli Alva Murillo

Claudia Leticia Mendoza Macías

César Rogelio Solorio Alvarado

Marco Antonio Revilla García

Gustavo Alexis Niño Vega

Clarisa Villegas Gómez

César Augusto Caretta

Zeferino Gamiño Arroyo

María Aurora Montañez Frausto

Ma. Elvira Moreno Pulido

Antonio Murillo Salas

Suria Gisela Vázquez Morales

Tabla de contenido

LICENCIATURA	No. Página
1 ANÁLISIS DE LOS DETERMINANTES SOCIALES DE LA SALUD DE LOS ADULTOS MAYORES EN LA PANDEMIA DE COVID-19	01
2 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE MUESTRAS DE PLÁSTICOS MEDIANTE SIMULACIONES CON ELEMENTO FINITO	10
3 CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE <i>Sporothrix schenckii</i> CON DEFECTOS EN MELANIZACIÓN	16
4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS FÚNGICAS DEGRADADORAS DE POLÍMEROS	23
5 CONTAMINACIÓN POR FRAGMENTOS TIPO MICROPLÁSTICO EN PECES DE LA LAGUNA DE YURIRIA, GUANAJUATO	29
6 ELUCIDACIÓN DEL PERFIL METABOLÓMICO DE LA PLANTA <i>Cuphea aequipetala</i>	35
7 ESTANDARIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DIAGNÓSTICA DE MASTITIS SUBCLÍNICA EN CABRAS	41
8 ESTUDIO DE OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ELECTROPOLIMERIZACIÓN DE EDOT EN ULTRAMICROELECTRODOS DE PT PARA LA DETECCIÓN DEL ANIÓN RADICAL SUPERÓXIDO	47
9 EVALUACIÓN DE BIOSENSORES QUE RESPONDEN A DAÑO CELULAR CON COMPUESTOS QUE NO SE CONOCE SU MECANISMO PRIMARIO DE ACCIÓN	53
10 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANSIOLÍTICO DE GADERNINA A	59
11 EVIDENCIA DE FRAGMENTOS TIPO MICROPLÁSTICO EN AVES SILVESTRES: EL CORMORÁN NEOTROPICAL Y PELÍCANO BLANCO DEL ÁREA NATURAL PROTEGIDA PRESA “LA PURÍSIMA”, GUANAJUATO	66
12 NECESIDADES EMOCIONALES DE LAS MUJERES CON MASTECTOMÍA	72
13 OBTENCIÓN DE LAS PROPIEDADES REGISTRADAS EN LAS TABLAS DE VAPOR A PARTIR DE UNA INTERFAZ GRÁFICA DESARROLLADA EN PYTHON	77
14 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS Δ mutSL mfd Y Δ mutSL greA DE <i>Bacillus subtilis</i> EN EL FONDO GENÉTICO YB955	83
15 PROCESO INTEGRAL ELECTROQUÍMICO PARA TRATAMIENTO DE EFLUENTES CONTAMINADOS POR CROMO HEXAVALENTE	90
16 REMOCIÓN DE CROMO VI MEDIANTE EL USO DEL <i>Eichhornia crassipes</i> PARA SU POSIBLE APLICACIÓN EN TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.	95
17 SEXTING, DIFERENCIAS POR EDAD, GÉNERO E IDENTIDAD SEXUAL	101

18	USO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Lippia graveolens kuth</i> (VERMABENACEAE) COMO INHIBIDOR FÚNGICO, EN MIEMBROS DE LA FAMILIA ROSACEAE	106
19	VARIACIONES TEMPORALES SOBRE NIDOS ARTIFICIALES DE AVES EN LAS INMEDIACIONES DEL CERRO LE LA BUFA, GUANAJUATO	112

MAESTRÍA

20	DESEMPEÑO DINÁMICO DE ESQUEMAS DE PURIFICACIÓN INTENSIFICADOS INVOLUCRADOS EN LA PURIFICACIÓN DE 2,3- BUTANODIOL	118
21	DETERMINACIÓN DE LOS VALORES NUMÉRICOS DE LOS PARÁMETROS PARA UN MODELO DE CRECIMIENTO DE MICROALGAS	125
22	DETERMINACIÓN DEL DISEÑO ÓPTIMO PARA UN INTERCAMBIADOR DE TUBO Y CORAZA: UN ENFOQUE METAHEURÍSTICO	131
23	DISEÑO DE UN PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE ACEITES DE REÚSO	138
24	EL c-di-AMP EN LA REPARACIÓN DEL ADN Y LA MUTAGÉNESIS DE <i>Bacillus subtilis</i>	144
25	ELUCIDACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LA OXIDORREDUCTASA YhdA de <i>Bacillus subtilis</i>	150
26	ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN DE RH(III) POR MEDIO DE SISTEMAS ACUOSOS BIFÁSICOS.	154
27	EVALUACIÓN DE CATODOS DE CARBÓN ACTIVADO (CA) PARA SU APLICACIÓN EN SUPERCAPACITORES DE CA-PEDOT	160
28	GLICOSIDASAS EN <i>Acanthamoeba</i> : ESTUDIOS DURANTE LA FASE VEGETATIVA Y DE DIFERENCIACIÓN	167
29	MODELO TERMO-HIDRÁULICO PARA EL DISEÑO Y EL ANÁLISIS DEL DESEMPEÑO DE INTERCAMBIADORES DE CALOR DEL TIPO TWISTED- TUBES	173
30	OPTIMIZACIÓN DE LA CADENA DE SUMINISTRO PARA LA PRODUCCIÓN DE COMBUSTIBLES A BASE DE BIOMASA Y PRODUCTOS DE ALTO VALOR AGREGADO EN MÉXICO	178
31	PAPEL DE LA REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES EN LA ESPORULACIÓN DE <i>Bacillus subtilis</i>	184
32	PARTICIPACIÓN DEL GEN <i>EHASM4</i> EN LA RESPUESTA AL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO O CHOQUE TÉRMICO EN <i>Entamoeba histolytica</i>	189
33	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS: EFECTO DEL SOPORTE MESOPOROSO	196

DOCTORADO

34	ANÁLISIS DE LA PEPTIDORAMNOMANA DE LA PARED CELULAR DURANTE LA INTERACCIÓN DE <i>Sporothrix schenckii</i> CON EL HOSPEDERO	203
35	DESARROLLO DE UN ENTORNO VIRTUAL PARA EL DISEÑO RIGUROSO Y OPTIMIZACIÓN DE INTERCAMBIADORES DE CALOR DE TUBOS Y CORAZA	210
36	ESTUDIO DE ELECTRODOS DE CARBONO TIPO DROPSSENS MODIFICADOS CON POLI(EUGENOL) PARA LA DETECCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO	216
37	ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA DEL BIOCL BAJO ILUMINACIÓN UV Y SOLAR PARA LA DEGRADACIÓN DE COLORANTES	221
38	GESTIÓN COORDINADA DE RESIDUOS AGRICOLAS PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE ALTO VALOR AGREGADO: EN EL ESTADO DE GUANAJUATO	227
39	MODELADO Y SIMULACIÓN DE UN PROCESO DE GASIFICACIÓN DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE HIGUERILLA Y <i>Jatropha curcas</i> PARA LA OBTENCIÓN DE HIDRÓGENO	234
40	MODULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE NEUTRÓFILOS HUMANOS EN INTERACCIÓN CON <i>Trichomonas vaginalis</i>	239
41	OBTENCIÓN DE UNA CEPA RECOMBINANTE PARA LA SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Cdd-HIS6 DE <i>Bacillus subtilis</i>	244
42	PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Mfd Y GreA EN LA MUTAGÉNESIS ADAPTATIVA DE <i>Bacillus subtilis</i>	250
43	PARTICIPACIÓN DE LA ESFINGOMIELINASA ÁCIDA EN LA REPARACIÓN DE DAÑOS A LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE <i>Entamoeba histolytica</i>	256
44	REMOCIÓN DE ARSÉNICO DE AGUA DE MANANTIAL EN UN DISTRITO MINERO EN GUANAJUATO MÉXICO CON UN HIDRÓXIDO DOBLE LAMINAR Mg/Fe	263
45	SÍNTESIS DE BENZOFURANO SUSTITUIDO CON HETEROCICLOS TIPO BOND	269
46	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDRÓXIDOS DOBLES LAMINARES MG/AL Y SU APLICACIÓN COMO CATALIZADORES EN LA REACCIÓN DE FOTODEGRADACIÓN DE COLORANTE ROJO CONGO	275
47	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE SiO ₂ UTILIZANDO ARENA SÍLICA COMO PRECURSOR NATURAL	283
48	TRIENAMINE CATALYSIS FOR ORGANOCATALYTIC THIO-DIELS-ALDER/RING-CLOSING CASCADE REACTION FORMING THIO-PYRANO-PIPERIDONE FUSED RINGS	290

49	VALIDACIÓN DEL MODELO DE TRANSFERENCIA DE MASA PARA UNA COLUMNA DE DESTILACIÓN POR LOTES

297

ANÁLISIS DE LOS DETERMINANTES SOCIALES DE LA SALUD DE LOS ADULTOS MAYORES EN LA PANDEMIA DE COVID-19

Dra. Lucía Caudillo Ortega, E.L.E.O. Jorge Luis Chávez López^b

^a Departamento de Enfermería y Obstetricia, Universidad de Guanajuato, Noria alta S/N, Col. Noria alta, Guanajuato, Gto. 36050, MÉXICO.

lucia.caudillo@ugto.mx

^b Departamento de Enfermería y Obstetricia, Universidad de Guanajuato, Noria alta S/N, Col. Noria alta, Guanajuato, Gto. 36050, MÉXICO.

jl.chavezlopez@ugto.mx

Resumen

Los determinantes sociales de la salud repercuten en cualquier individuo y aumentan su impacto en grupos vulnerables como los adultos mayores, en conjunto con la pandemia que atraviesa el mundo. El objetivo fue identificar y analizar los determinantes sociales de la salud que giran en torno al adulto mayor en la actual pandemia por COVID-19. Para esto se realizó una búsqueda bibliográfica en las diversas plataformas de divulgación científica, portales de noticias, páginas oficiales de instituciones gubernamentales y no gubernamentales, con criterios de inclusión y exclusión específicos que ayudaran a filtrar la información relevante para la constitución del proyecto, los cuales eran: estudios realizados en los últimos 5 años sobre determinantes sociales de salud, adultos mayores, pandemias, documentos de las diversas instituciones de salud así como comunicados de las entidades gubernamentales que contuvieran información relevante sobre la COVID-19 y adultos mayores, estadísticas periódicas que aportaran datos significativos y documentos de apoyo. Se obtuvieron como resultados que, los determinantes sociales de la salud identificados en la pandemia en los adultos mayores fueron; el ingreso, el cual ha sido severamente afectado; las políticas públicas sociales y económicas, que hasta el momento no han podido lograr una contención de las consecuencias; la ocupación, siendo gravemente afectada a la par que el ingreso por la pérdida de empleos tanto por crisis económica como por la recomendación del confinamiento de los grupos vulnerables; el género, demostrando que los contagiados y fallecidos son en mayor porcentaje hombres; la educación, que repercute en la fragilidad del adulto mayor; las conductas y hábitos como la ingesta de alcohol, tabaquismo y dieta, y que se ven reflejados en las comorbilidades que influyen en el contagio del virus. Se concluyó que las desigualdades que viven los adultos mayores en la pandemia se han visto fuertemente afectadas por los determinantes sociales de salud adyacentes. La investigación proporciona información relevante que puede ayudar al planteamiento de soluciones y la consiguiente aplicación de intervenciones que coadyuven a mitigar o contener la problemática actual que vive el adulto mayor.

Palabras clave: *Determinantes sociales de la salud, adultos mayores, COVID-19.*

Introducción

En 1948 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el impacto de las condiciones sociales y políticas, en la salud, lo cual ya se aproximaba a la idea de que la salud, puede ser influenciada por otros factores ajenos al individuo mismo [1].

En el año 2005, se establece la Comisión sobre Determinantes Sociales de la Salud (CDSS) por la OMS, con la finalidad de reunir evidencias sobre inequidades, a fin de comprender los determinantes sociales de la salud (DSS), sus repercusiones sobre la equidad sanitaria, así como formular recomendaciones para la adopción de medidas. La equidad en salud es un principio ético que rige a la CDSS y se define como la ausencia de diferencias injustas y evitables o remediables, en la salud entre los grupos sociales. Los DSS fueron definidos como “las condiciones en que las personas, nacen, crecen, viven, trabajan y envejecen, y los factores estructurales de esas condiciones, o sea, la distribución del poder, el dinero y los recursos” [2].

El modelo de Diderichsen denominado “los mecanismos de desigualdad en salud” fue utilizado para explicar las inequidades en salud que son consecuencia de las diferencias en la posición social. La OMS tomó en cuenta este modelo para dar lugar al término “determinantes sociales de las inequidades en salud” (DSIS) y que surge de la integración de tres aspectos; el contexto, que incluye los mecanismos sociales y políticos que generan, configuran y mantienen jerarquías sociales: mercado laboral, sistema educativo, instituciones políticas y otros valores culturales y sociales. Entre estos factores contextuales que influyen más a la salud, se encuentran el estado de bienestar y las políticas retributivas (o su ausencia de dichas políticas). El segundo aspecto son, los mecanismos estructurales, que son los que generan estratificación y divisiones de clase social, y que a la vez definen la posición socioeconómica individual dentro de jerarquías de poder y acceso a los recursos, éste último siendo el tercer aspecto considerado. Los estratificadores estructurales más importantes son: ingresos, educación, ocupación, clase social, género y raza/etnia [1].

Históricamente en México ha habido ausencia de políticas públicas enfocadas a mejorar las condiciones de vida de los grupos vulnerables (GV), así como la falta de cobertura en servicios de salud. Esto ha llevado a una desigualdad en salud de los GV en el País, grupo del que forma parte el adulto mayor (AM) [3].

En la Ciudad de México (CDMX), durante la pandemia de COVID-19, se reportaron 220,000 empleos perdidos de los cuales un gran número pertenece a personas mayores de 55 años, esta edad puede considerarse cercana al retiro. Si bien existe también resurgimiento de oferta laboral, dicha oferta se da en sectores limitados por múltiples cuestiones como, requerimiento de más personal de salud, personal físicamente apto para desenvolverse en tiendas de autoservicio, y personas que cuenten con habilidades computacionales y digitales. Estos empleos son ocupados por personas jóvenes o con mayor preparación académica, por consiguiente, dejan fuera a un gran sector por la edad o habilidades, sin mencionar que son población de riesgo y el confinamiento es obligatorio para AM, personas con obesidad, aquellos que viven con hipertensión y diabetes. [4].

Aproximadamente 753 mil AM, tienen riesgo de perder su empleo. Una de las medidas que tomó la Secretaría del Bienestar para proteger a la población vulnerable fue el adelanto de la Pensión de Bienestar para Adultos Mayores (PBAM) correspondiente al bimestre mayo-junio de 2020, con esto el pago del bimestre marzo-abril llegó de \$5,240 pesos. No obstante, en la investigación que realizó el Centro de Investigación Económica y Presupuestaria (CIEP) señaló que estas medidas serían insuficientes para proteger a los AM, debido a que la PBAM no cubre a la totalidad de adultos mayores que dejaron de trabajar y por otro, que el monto que se entrega no es suficiente para cubrir las necesidades básicas de los adultos mayores. Otra situación que merma el apoyo es que el apoyo económico no contempla a adultos mayores que se encuentran entre 60 y 64 años (perteneciendo a una comunidad indígena) y a los comprendidos entre los 60 y 67 años (no pertenecientes a una comunidad indígena [5]. En la actualidad en México, persisten diversas problemáticas que atañen a los AM; violencia, discriminación, pobreza extrema, desigualdad, desempleo o empleo precario, falta de seguridad social y de un ingreso bajo e incluso nulo. La Secretaría de Gobernación (Segob) está al tanto de que es necesario trabajar en el desarrollo de políticas públicas para garantizar los derechos humanos de los AM. La Segob advierte que las problemáticas que giran en torno a los AM pueden agudizarse durante el confinamiento causada por la pandemia del SARS-Cov-2.

La presidenta de la Comisión de Puntos Constitucionales de la Cámara de Diputados advirtió que los derechos de las personas mayores son vistos como una carga incosteable y que esto lleva a una escasa acción por parte del gobierno y a la desarticulación de políticas públicas. [6].

Metodología

Se realizó una revisión de la literatura en las bases de datos científicas y académicas, con los criterios de inclusión que fueron artículos cuantitativos, que abordaran los determinantes sociales de la salud y adultos mayores, en español e inglés, en particular, los años de 2010 a 2020, para abarcar la literatura más reciente. También se realizó una búsqueda de documentos clave en páginas de gobierno, portales de noticias y entidades no gubernamentales, referentes a adultos mayores, Covid-19 y determinantes sociales de la salud. Todo esto fue organizado y colectado en el gestor bibliográfico Endnote.

Después de descartar algunos artículos, para el análisis de los electos, se vaciaron los datos de relevancia en una matriz de síntesis de artículos de investigación.

Resultados

La revisión literaria arrojó datos importantes respecto a los determinantes sociales de salud que afectan a los adultos mayores en general y en el contexto de la pandemia actual por COVID-19. Para tener una estructura mas organizada, los DSS se clasificaron en las siguientes categorías.

Determinante estructural: contexto socioeconómico y político

Retomando el estudio de la CIEP por Macías (2020), podemos encontrar que un DSS es la PBAM que otorga el gobierno. Esta investigación tuvo como objetivo presentar un panorama de vulnerabilidad económica del AM ante la pandemia. La investigación arrojó como resultado que dicha pensión resultaría insuficiente, debido a que no se podrían alcanzar a cubrir los gastos básicos y mucho menos los gastos extraordinarios (ver Tabla 1). Para cubrir las necesidades económicas se necesitaría incrementar en un 15% el presupuesto para PBAM que se autorizó para el año 2020. Por lo tanto, el gobierno tendría que valorar esta situación y plantear las posibles acciones que favorezcan o prevengan dicha vulnerabilidad en el AM.

Tabla 1. Cobertura Líneas del bienestar del PBAM

Línea de Bienestar	Monto	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Mínimo Rural	\$ 1,168	Suficiente	Suficiente	Suficiente	Suficiente
Mínimo Urbano	\$ 1,635	Suficiente	Suficiente	Suficiente	No suficiente
Rural	\$ 2,092	Suficiente	Suficiente	No suficiente	No suficiente
Urbano	\$ 3,217	Suficiente	No suficiente	No suficiente	No suficiente

Nota 1 Para mayo y junio se mantiene el precio promedio de las Líneas de Bienestar de marzo-abril.

FUENTE: Elaborado por el CIEP, con información de: CONEVAL e INEGI.

Determinante estructural: posición social

Las condiciones ocupacionales y laborales son parte de la posición social, y están fuertemente relacionadas con el ingreso. La CONEVAL realizó una estimación de pobreza donde se planteaban posibles panoramas. La pérdida de empleos traerá como consecuencia no solo la disminución en los ingresos de los hogares, sino la pérdida de prestaciones laborales que un empleo formal brinda. Los resultados de la estimación que realizó la CONEVAL fueron los siguientes:

- Incremento de personas en situación de pobreza por ingresos (personas cuyo ingreso es insuficiente para adquirir una canasta alimentaria, bienes y servicios básicos).
- Incremento de personas en situación de pobreza extrema (personas cuyo ingreso es insuficiente para adquirir una canasta alimentaria).
- Sin políticas públicas que atiendan a la población con ingreso medio, la cantidad de personas en situación de pobreza por ingreso puede aumentar.
- La crisis podría provocar que la población que en años pasados no era pobre o vulnerable, tenga afectaciones que los lleven a encontrarse en alguna de estas condiciones.

Tomando datos concretos, la Jefa de Gobierno de la CDMX informó que de abril a principios de junio se perdieron cerca de 220,000 empleos por la pandemia, siendo un alto número de tales empleos eran de personas mayores a 55 años. Esto puede repercutir directamente en la economía de los AM y aumentar su vulnerabilidad.

Ahora bien, la única salida que 1.7 millones de AM mayores de 68 años han encontrado para evitar caer en vulnerabilidad económica, ha sido continuar trabajando pese a la instrucción

de confinamiento voluntario, exponiéndose a contraer el virus por seguir saliendo y añadido a la exposición, también se considera que el AM es población de riesgo. Esto supone un dilema ya que, si el AM decide quedarse confinado, no tendrá un ingreso y si decide salir a seguir trabajando aumenta las probabilidades de contagio y consecuentemente de muerte si llegase a infectarse [4].

Tener un ingreso insuficiente se asocia a un mayor índice de fragilidad del AM, la prevalencia de fragilidad en el AM en Colombia según un estudio de Ocampo [7] fue de 17.9%.

Existe otro DSS en esta clasificación el cual corresponde al género o de manera específica al sexo, ya que este puede limitar las oportunidades en hombres y mujeres para la educación, empleo, entre otros, reforzando los riesgos y vulnerabilidades a la salud.

Partiendo de lo anterior y según los datos colectados por la Dirección General de Epidemiología (DGE) del gobierno federal de México se puede observar en la Tabla 2, que la prevalencia de contagios (casos confirmados) de Covid-19 en adultos mayores de 60 años es de un total de 87,642 casos positivos de los cuales el 43.7% son mujeres y 56.3%. La Gráfica 1 permite observar el contrastante existente de los casos confirmados en todo el rango de edades posible y donde las edades de AM muestran índices intermedios y bajos de casos positivos. Por el lado de las defunciones se puede observar en la Tabla 3 que existen un total de 27,714 personas fallecidas correspondientes a 31.6% de los casos positivos. El 62.4% de fallecidos por Covid-19 son hombres y el 37.6% mujeres. La Gráfica 2 muestra de manera evidente las diferencias de fallecidos por grupo etario. Esto deja bastante claro que existe una disparidad en las defunciones y que los mas afectados son los AM.

Tabla 2. Casos confirmados de COVID-19 por edad y sexo

Rango edad	Mujeres	Hombre	Total
60-64	12637	15759	28396
65-69	9408	12322	21730
70-74	6578	8877	15455
75-79	4563	6090	10653
80-84	2900	3675	6575
85-89	1488	1850	3338
90-94	566	586	1152
95-99	176	167	343
Total	38316	49326	87642
Porcentaje	43.7	56.3	100%

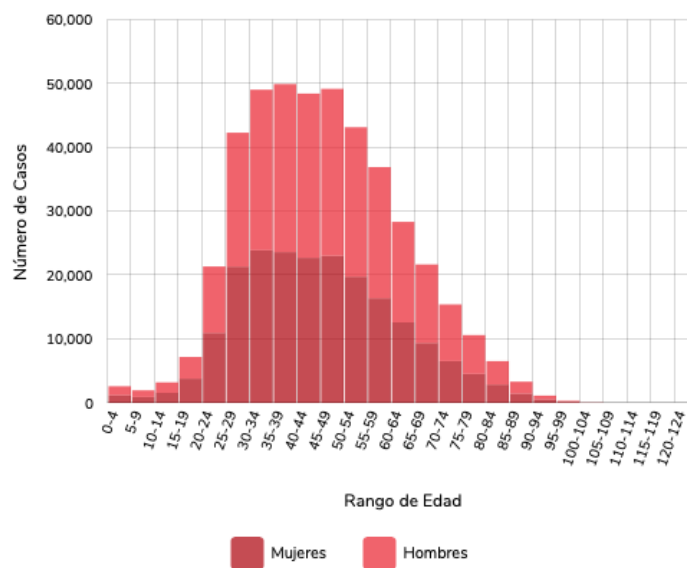
Fuente: Datos de la Dirección General de Epidemiología al 3 de agosto 2020 [8]

Tabla 3. Defunciones a nivel nacional por edad y sexo

Rango edad	Mujeres	Hombre	Total
60-64	2394	4192	6586
65-69	2381	4156	6537
70-74	2065	3475	5540
75-79	1598	2554	4152
80-84	1152	1680	2832
85-89	560	887	1447
90-94	218	281	499
95-99	50	71	121
Total	10418	17296	27714
Porcentaje	37.6	62.4	100%

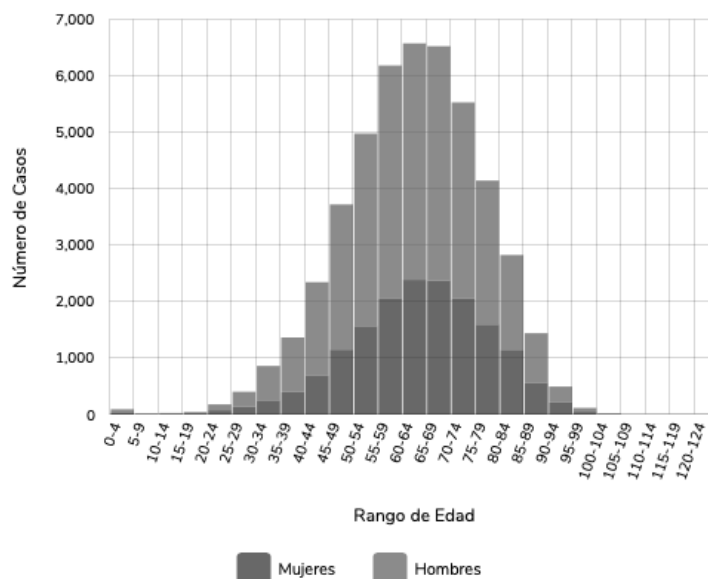
Fuente: Datos de la Dirección General de Epidemiología al 3 de agosto 2020 [8]

Gráfica 1. Histograma de casos confirmados a nivel nacional por edad y sexo



Fuente: Dirección General de Epidemiología al 3 de agosto 2020 [8]

Gráfica 2. Histograma de defunciones a nivel nacional por edad y sexo



Fuente: Dirección General de Epidemiología al 3 de agosto del 2020 [8]

De acuerdo a la OMS [9] en un documento de apoyo titulado “El genero y la Covid-19” hace mencion sobre la evidencia derivada de epidemias anteriores, como el brote de coronavirus causante del SRAS en 2002-2003, que muestra que es probable que los hombres y las mujeres tengan tanto sensibilidades diferentes al virus como vulnerabilidades diferentes a la infección como resultado de factores relacionados con el sexo y el género.

Otro DSS perteneciente a la posición social, es la educación. El estudio de González [10] sobre DSS, fragilidad y su asociación con las causas de muerte en el adulto mayor, tuvo un importante resultado referente a la educación. Los participantes que fallecieron tenían menos educación que los sobrevivientes los cuales tenían mayor grado de escolaridad, por lo que González concluyó que tener mayor educación mostraba una reducción de riesgo de morir. De la misma manera existe otro estudio con un resultado equivalente. Los resultados de la investigación de Ocampo [7], arrojaron que la baja educación como DSS se asocia significativamente con la fragilidad del AM.

Determinantes intermedios

Uno de los DSS pertenecientes a esta categoría son los factores biológicos y del comportamiento, en estos se encuentran los hábitos y conductas como ingesta de alcohol, tabaquismo, sedentarismo y dieta.

De acuerdo con los datos de la DGE sobre comorbilidades, que se publican en un portal web sobre todo lo referente a casos de Covid-19, arrojaron los porcentajes siguientes en casos confirmados; hipertensión (19.75%), obesidad (18.77%), diabetes (15.94%) y tabaquismo (7.22%). En los fallecidos los porcentajes fueron; hipertensión (43.61%), diabetes (37.82%),

obesidad (24.66%) y tabaquismo (8.16%). Estas comorbilidades vienen relacionándose directamente con este DSS puesto que son una consecuencia directa de un mal hábito o conducta de toxicomanías y alimentación.

Otro DSS de esta categoría es el denominado circunstancias materiales que son: las condiciones del ambiente físico, que rodean la vida cotidiana de las personas, tales como vivienda, saneamiento, transporte, entre otros. En el estudio de Anderson [11], los encuestados con un indicador positivo de una necesidad relacionada con el transporte (8%), tenían una salud general autoevaluada más baja e informaron una mayor depresión y ansiedad, menos significado y satisfacción en la vida, y un menor control y adaptabilidad percibidos que aquellos que fueron negativos.

Conclusiones

Las inequidades de salud en los adultos mayores son muy evidentes. La investigación arrojó bastante información al respecto sobre cuales determinantes sociales de salud repercuten al AM en condiciones generales, siendo mas las repercusiones negativas en este grupo etario. Esto a la vez deja clara la necesidad de actuación de los diferentes sectores para poder mitigar en la medida de lo posible dichas inequidades. Un factor clave que se agrega a esta problemática, es la actual pandemia ocasionada por SARS-Cov-2, la cual ha agravado considerablemente las disparidades que ya vivía el adulto mayor previo a la pandemia. Por lo tanto, es importante comenzar a plantear soluciones y aplicar intervenciones, sobre los DSS en la pandemia.

Bibliografía

- [1] World Health Organization (2010). A CONCEPTUAL FRAMEWORK FOR ACTION ON THE SOCIAL DETERMINANTS OF HEALTH. (p-75). Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44489>
- [2] Organización Panamericana de la Salud. Salud en las Américas: edición de 2012. Panorama regional y perfiles de País. Capitulo 2: determinantes e inequidades en salud. Disponible en: https://www.paho.org/salud-en-las-americas-2012/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=sa-2012-volumen-regional-18&alias=163-capitulo-2-determinantes-e-inequidades-salud-163&Itemid=231&lang=en
- [3] Juárez-Ramírez, C. (2014). La desigualdad en salud de grupos vulnerables de México: adultos mayores, indígenas y migrantes. In M. Márquez-Serrano (Ed.), (Vol. 35, pp. 284-290). México: Revista Panamericana de Salud Pública.
- [4] Pizano-Orsorio D. (2 de julio de 2020). El eslabón más débil del desempleo. Libre en el sur. Recuperado de: <https://libreenelsur.mx/el-eslabon-mas-debil-del-desempleo/>
- [5] Macías-Sánchez A., Pérez-Pacheco A. (2020). Adultos mayores y COVID-19. In (pp. 8): Centro de Investigación Económica y Presupuestaria, A.C.
- [6] Cirigo I. (20 de junio de 2020). Faltan políticas públicas para proteger a los adultos mayores. Contralínea. Recuperado de: <https://www.contralinea.com.mx/archivo-revista/2020/06/20/faltan-politicas-publicas-para-proteger-a-los-adultos-mayores/>
- [7] Ocampo-Chaparro, J. M. (2019). Frailty in older adults and their association with social determinants of Health. The SABE Colombia Study. In C. A. Reyes-Ortiz (Ed.), (Vol. 50, pp. 89-101). Colombia: Colombia Medica.

- [8] Gobierno federal (2020). Dirección General de Epidemiología; estadísticas de casos confirmados y defunciones por Covid-19. Consultados al 3 de Agosto de 2020. Disponible en: <https://coronavirus.gob.mx/datos/>
- [9] Organización Mundial de la Salud (mayo 2020). Documento de apoyo: El género y la Covid-19. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/332242/WHO-2019-nCoV-Advocacy_brief-Gender-2020.1-spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [10] González-Bautista, E., Manrique-Espinoza, B., Ávila-Funes, J. A., Naidoo, N., Kowal, P., Chatterji, S., & Salinas-Rodríguez, A. (2019, sep/oct 2019). Social determinants of health and frailty are associated with all-cause mortality in older adults. *Salud Pública de México*, 61(5), 9.
- [11] Anderson, J. K. E., Jain, P., Wade, A. J., Morris, A. M., Slaboda, J. C., & Norman, G. J. (2020). Indicators of potential health-related social needs and the association with perceived health and well-being outcomes among community-dwelling medicare beneficiaries. *Quality of Life Research*, 29(6), 1685-1696. doi:10.1007/s11136-019-02410-7

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE MUESTRAS DE PLÁSTICOS MEDIANTE SIMULACIONES CON ELEMENTO FINITO

Sara Danaé López Cabrera^a, Ana Magdalena Pineda Xoconoxtle^a, Mario Alberto Rodríguez Angeles^a,
Marisa Rivera Arredondo^b, Edilberto Murrieta Luna^a.

^a Ingeniería en Plásticos, Universidad Politécnica de Juventino Rosas, Calle Hidalgo 102, Comunidad de Valencia, 38253 Santa Cruz de Juventino Rosas, Gto. mrodriguez_ptc@upjr.edu.mx

Ingeniería en procesos alimentarios. Universidad Tecnológica del Suroeste de Guanajuato, Carretera Valle-Huanímaro km 1.2, 38400, Valle de Santiago, Gto.

Resumen

Cuando se diseña una pieza plástica, el análisis de las propiedades estructurales de los materiales son de suma importancia para asegurar que la pieza no falle durante su uso. El objetivo del presente trabajo fue realizar un análisis de las propiedades estructurales de diferentes tipos de plástico de uso común, para lo cual se analizaron las piezas mediante simulaciones con el software ANSYS STRUCTURAL. Se elaboraron geometrías de las probetas estándar que se utilizan normalmente en las pruebas experimentales de tracción, las cuales fueron discretizadas utilizando elementos hexaédricos. Se llevó a cabo un análisis de sensibilidad de malla para determinar el tamaño de celda adecuado para las simulaciones finales. Los resultados obtenidos fueron comparados con datos experimentales obtenidos mediante búsqueda bibliográfica con los que se sintonizaron las simulaciones. Tanto la metodología de análisis como la sintonización de las simulaciones se utilizarán en un trabajo futuro para el análisis estructural de biopolímeros, ya que se trabaja en un estudio de estos en un proyecto paralelo.

Palabras clave: *Pruebas de tracción, simulación, elemento finito, plásticos*

Introducción

Las propiedades de los materiales plásticos, son las responsables de su utilización en lugar de otros materiales y en algunos casos presentan propiedades únicas que los hacen insustituibles para ciertas aplicaciones [1]. Las propiedades mecánicas de los materiales poliméricos son datos característicos de cada material y suelen obtenerse mediante ensayos de tracción, compresión, flexión, dureza, etc. Uno de los ensayos más importantes que se realizan a estos materiales es el de tracción, el cual representa una medida de la respuesta de un material ante una fuerza que tiende a estirarlo; de este tipo de ensayos se suele obtener información sobre la resistencia a la tracción y elongación, así como la cuantificación de su resistencia máxima o rotura [2].

Una de las principales características por las que se usan los materiales plásticos es su flexibilidad y elasticidad, por lo que el ensayo de tracción se vuelve esencial. Por esta razón es que muchos investigadores realizan estas pruebas durante la etapa de caracterización de un nuevo plástico o al rediseñar las formulaciones de polímeros ya conocidos [3]. En años recientes, se ha encontrado que la forma de fabricación de las probetas utilizadas en los

ensayos de tracción puede influir en el resultado de la prueba, por lo cual varios autores han hecho extensos estudios experimentales sobre probetas elaboradas por métodos diferentes a la inyección, actualmente se trabaja mucho en aquellas fabricadas por manufactura aditiva [4].

Actualmente, una forma alternativa de realizar pruebas de tracción, es utilizar software de simulación mecánica, en el cual se hace uso de las propiedades del material, modelos fisicomatemáticos y de algoritmos de discretización como el elemento finito, con los cuales se pueden reproducir los fenómenos físicos. Esto indica que, aunque no se pueda realizar la prueba en físico a materiales con propiedades desconocidas o mezclas de materiales, es posible utilizar esta herramienta para predecir su comportamiento cuando se le aplican fuerzas externas. Se debe de considerar al utilizar una simulación estructural que, debido a la naturaleza de los plásticos, sus propiedades dependen en gran medida de la velocidad de deformación a la que están sometidos, por lo que para realizar una simulación adecuada se requiere del uso de parámetros del material obtenidos en el rango de velocidades de deformación en el que se dan los esfuerzos que se desean simular [5]. Para esto, primeramente se deben sintonizar los métodos y parámetros que se usaran en las simulaciones garantizando resultados confiables.

En el presente trabajo, se realiza una comparación de las pruebas de tracción realizadas por medio de una simulación estructural, con las realizadas experimentalmente y reportadas en bibliografía. Las pruebas se basan en la norma ASTM D638-14:2014, haciendo uso de 3 diferentes probetas (tipo A, F y K) para la caracterización de piezas de material termoplástico ABS y PP. La comparación de los resultados ayudará a la sintonización de la simulación, mostrando la validez de los parámetros utilizados en el estudio.

Metodología

Para realizar pruebas de tracción en plásticos suelen utilizarse 3 tipos de probetas, la tipo A (ISO 527-2), la tipo F y la tipo K (ASTM 638-14), todas ellas poseen la misma forma en general (mostrada en la **Figura 1**) pero difieren en las dimensiones.

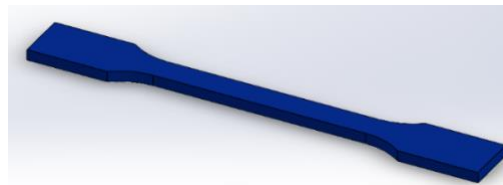


Figura 1. Probeta usada en ensayos de tracción de plásticos

Se crearon geometrías para cada uno de estos tipos de probeta utilizando el software DESIGN MODELER y posteriormente se discretizaron en el software MESHING, utilizando elementos hexaédricos. Para asegurar que la malla no afectara los resultados de las pruebas, se realizó un análisis de sensibilidad de malla a cada probeta, por lo que se crearon cuatro mallas diferentes para cada geometría, con diferente tamaño de celda y por lo tanto diferente

número de elementos. Cada malla se probó realizando simulaciones en ANSYS STRUCTURAL bajo condiciones idénticas de tensión y se graficaron los resultados de deformación contra el número de celdas para analizar si había correspondencia y, si fuera el caso, determinar cuál sería la mejor malla a utilizar. Las mallas con el tamaño de celda elegido se utilizaron para realizar dos series de simulaciones variando el tipo de material, para la primera serie se utilizó como material el ABS (acrilonitrilo butadieno estireno) mientras que para la segunda serie se utilizó el PP (polipropileno). Estos materiales fueron seleccionados debido a que son polímeros representativos y muy utilizados.

Para el estudio de tracción, las probetas fueron sometidas a esfuerzos entre 0.5 y 45 MPa para el ABS y entre 0.5 y 25MPa para el PP, considerando los límites superiores para no alcanzar el punto de cedencia [5]. Con los resultados obtenidos se realizaron gráficas de tensión/tiempo y tensión/deformación para cada material y probeta, considerando que las normas de pruebas de tracción especifican que la maquinaria de prueba de tensión debe programarse para estirar 5mm/min. Las gráficas finales fueron comparadas con las reportadas en la bibliografía mencionada.

Resultados

Las geometrías elaboradas para las probetas utilizadas en el ensayo de tracción se presentan en la **Figura 2**, se muestra que difieren el largo como en lo ancho de la zona de prueba, y además en el espesor.

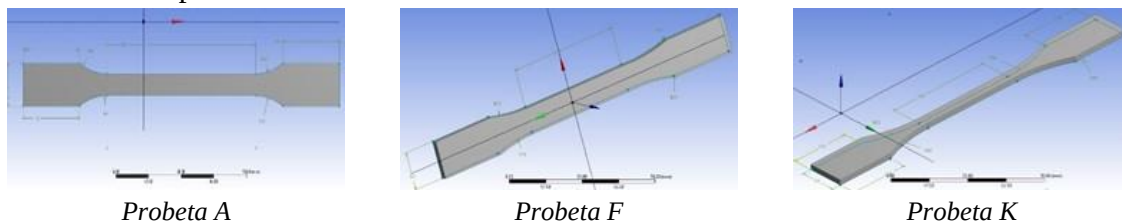


Figura 2. Geometrías representativas de las probetas

En la **Figura 3** se muestran mallas representativas usadas en las probetas. Como malla inicial, se tomó la elaborada según los parámetros de mallado proporcionados por el propio software, por lo que el número de celdas en es de 66 para la probeta A, 66 para la F y 69 para la W.

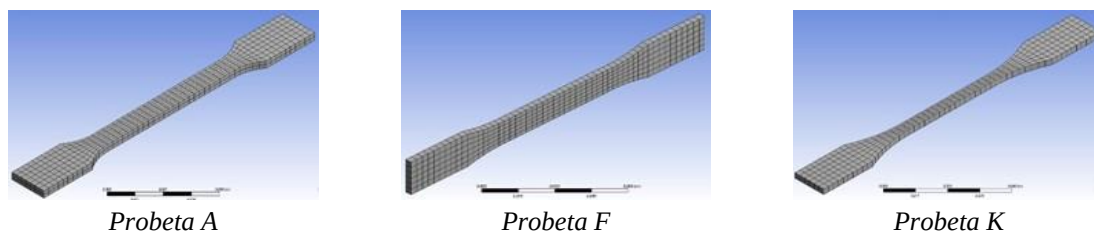


Figura 3. Malla representativa

Para el análisis de sensibilidad de malla en la probeta A se disminuyó el tamaño de las celdas a un 90%, 60% y 30% del tamaño inicial, aumentando con esto el número de celdas a 116,

770 y 3708 respectivamente. Se realizaron las simulaciones usando las 4 mallas para probar la deformación de las probetas utilizando el PP como material, debido a que es el más blando, además de que podría presentar una diferencia mayor en los resultados. Para la prueba se fijó una tensión de 10kPa. Con el fin de verificar los resultados del análisis de malla se realizó el mismo procedimiento para las probetas F y K.

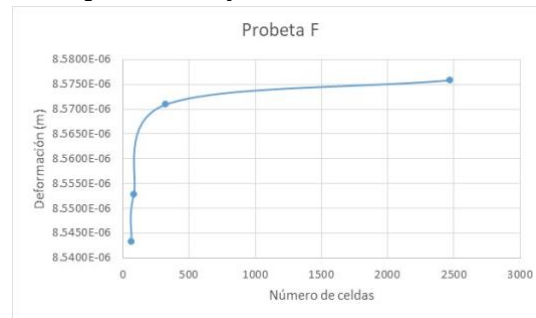


Figura 4. Resultados de análisis de malla

En la **Figura 4** se muestran los resultados del análisis de sensibilidad de malla para la probeta F, que fue la que presentó una mayor diferencia de deformación. Aunque en la gráfica pareciera que existe una diferencia significativa, es solo un efecto de la escala utilizada para visualizar los resultados, ya que la diferencia de deformación entre los puntos extremos de las gráficas es de menos del 0.4%. Este resultado indica que se puede utilizar cualquiera de las mallas, sin embargo, se utilizará la malla corresponde a 770 celdas para la probeta A con la cual se tiene una adecuada visualización y el coste computacional no es elevado, 324 para la probeta F y 330 para la probeta K.

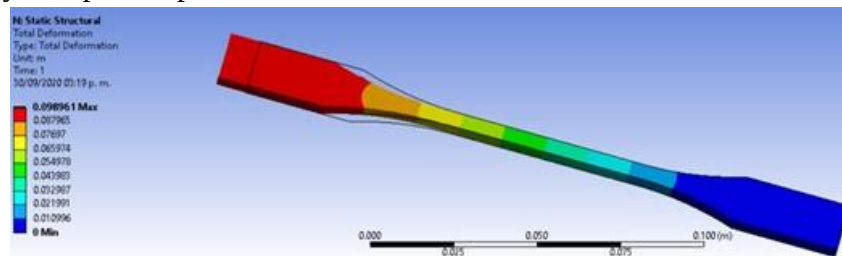


Figura 5. Perfiles de deformación obtenidos en la simulación de tracción.

La **Figura 5** muestra un esquema representativo de los perfiles de deformación de la probeta. Los resultados de las pruebas para el ABS se muestran en la **Tabla 1**, mientras que para el PP se muestran en la **Tabla 2**. Estos resultados fueron utilizados para realizar las gráficas del ensayo de tracción mostradas en la **Figura 6** para el ABS y **Figura 7** para el PP.

Tabla 1. Resultados de la prueba de tracción para el ABS

PROBETA A		PROBETA F		PROBETA K	
Tensión (MPa)	Deformación (m)	Tensión (MPa)	Deformación (m)	Tensión (MPa)	Deformación (m)
1	2.03E-04	0.73	1.64E-04	1.58	3.16E-04
2	4.06E-04	1.46	3.29E-04	3.17	6.32E-04
10	2.03E-03	7.31	1.64E-03	15.83	3.16E-03
20	4.06E-03	14.62	3.29E-03	31.67	6.32E-03
30	6.09E-03	29.23	6.57E-03	39.58	7.90E-03

40 8.13E-03 43.85 9.86E-03

Tabla 2. Resultados de la prueba de tracción para el PP

PROBETA A		PROBETA F		PROBETA K	
Tensión (MPa)	Deformación (m)	Tensión (MPa)	Deformación (m)	Tensión (MPa)	Deformación (m)
1	5.30E-04	0.73	4.29E-04	1.58	8.25E-04
2	1.06E-03	1.46	8.57E-04	3.17	1.65E-03
5	2.65E-03	7.31	4.29E-03	4.75	2.47E-03
10	5.30E-03	10.96	6.43E-03	7.92	4.12E-03
15	7.95E-03	14.62	8.57E-03	15.83	8.25E-03
20	1.06E-02	21.92	1.29E-02	23.75	1.24E-02

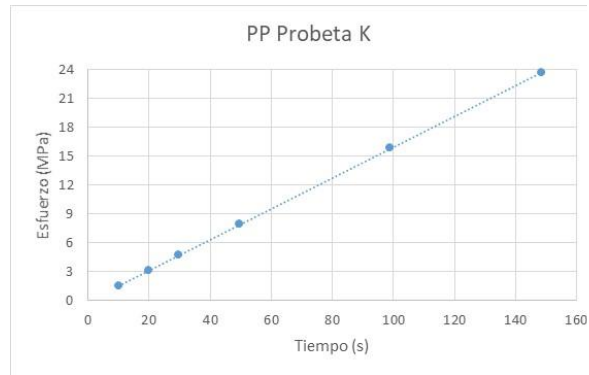
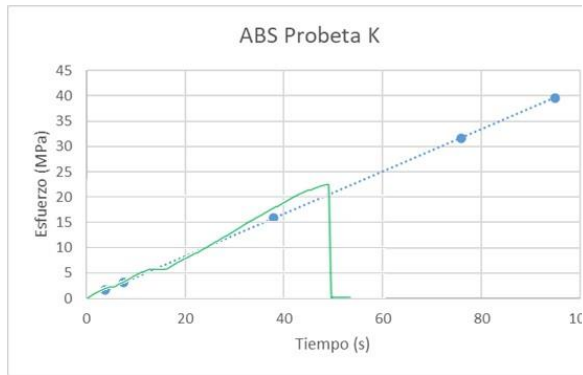
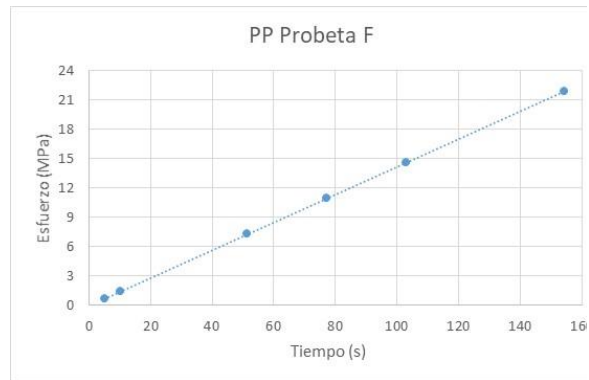
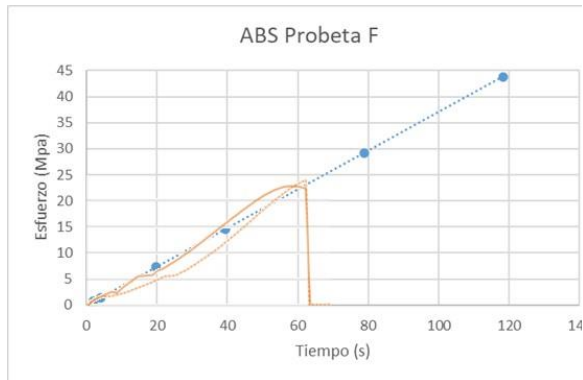
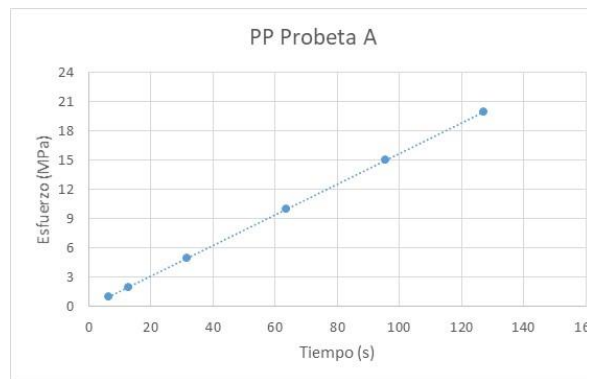
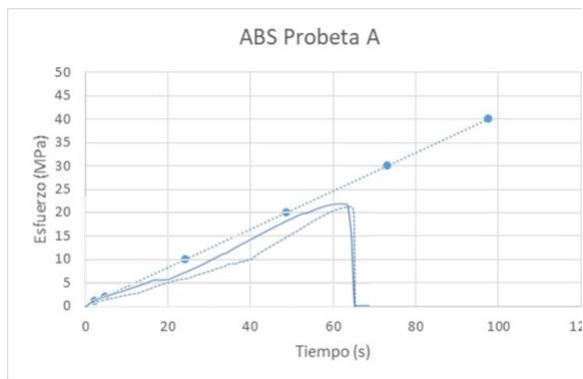


Figura 6. Gráficas de prueba de tracción para el ABS

Figura 7. Gráficas de prueba de tracción para el PP

En la **Figura 6**, los resultados de las pruebas de tracción de la simulación (línea recta) se comparan con los obtenidos por Rodríguez-Panes y col. [4], quienes realizaron el estudio para probetas hechas con manufactura aditiva. Como se puede observar, en todos los casos los resultados de las simulaciones ajustan muy bien a los datos experimentales. Cabe mencionar que el esfuerzo de cedencia reportado en la literatura es de alrededor de 45MPa para el ABS mientras que en [4] sólo llegan hasta 23MPa, lo cual se probablemente se debe al método de elaboración de las probetas, por lo cual en este estudio se muestran los puntos finales de la gráfica hasta valores entre 40 y 45 MPa. Para el caso del PP, no fue posible encontrar las mismas tablas comparativas por lo que solo se muestran los resultados que se obtendrían en una prueba de tracción. Sin embargo, la **Tabla 2** muestra un comportamiento lineal al igual que la **Figura 7**, mientras que las gráficas esfuerzo-deformación reportadas en literatura muestran un comportamiento no lineal, por lo que en este caso se requiere considerar un modelo para el comportamiento plástico.

Conclusiones

En este trabajo se presentó el análisis de ensayos de tracción para probetas de ABS y PP mediante el uso de software de elemento finito. Los resultados obtenidos de las simulaciones de las probetas de ABS mostraron un buen apego en comparación con los ensayos experimentales presentados en la literatura. El análisis realizado a las probetas de PP difiere con el análisis realizado a las probetas de ABS, cuando se someten ambos a las mismas condiciones de operación. Al comparar cualitativamente el comportamiento de PP a las pruebas de tracción con el reportado experimentalmente, se determina que no coincide, esto se supone sucede porque este material es más elástico. Para continuar con la sintonización de los métodos utilizados se requiere de realizar ensayos en una mayor cantidad de materiales, lo cual permitirá extender los resultados a materiales más elásticos como el PP y otros materiales plásticos con propiedades diferentes.

Bibliografía

- [1] González-Prolongo, M. (1997) “*Elementos Estructurales con Materiales Polímeros*”, 1ª. Ed., A coruña: universidade, España, 65-66
- [2] Beltrán-Rico, M., Marcilla-Gomis, A. (2012) “*Tecnología de Polímeros, Procesado y Propiedades*”, 1ª. Ed., Universidad de Alicante, España, 50-53
- [3] Castañeda, H., Hernández, R., Gómez, G., Zitzumbo, R., Sánchez, J., Alonso, S. (2010) “Análisis del Módulo Elástico y Resistencia a la Ruptura en Mezclas de Nanocompuestos de ABS/TPU” *Conc. Tec.* 39, 5-11
- [4] Rodríguez-Panes, A., Claver, J., Camacho, A. M., Sebastián, M. A. (2018). “Análisis normativo y evaluación geométrica de probetas para la caracterización mecánica de piezas obtenidas por fabricación aditiva mediante FDM”, *Actas del XXII Congreso Nacional de Ingeniería Mecánica*; CNIM: Madrid, España, 1-11
- [5] Aretxabaleta, L., Aurrekoetxea, J., Urrutibeascoa, I., Mateos, M., Castillo, G. (2007). “Simulación de ensayos de impacto tracción sobre probetas de plástico mediante el método de elementos finitos”, *Anales de la Mecánica de Fractura, Grupo Español de Fractura*, 24, 251-252

CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DE *Sporothrix schenckii* CON DEFECTOS EN MELANIZACIÓN

Juan Manuel Rangel Pérez ^a, Gustavo A. Niño Vega ^b, Tannia Razo Soria ^b

^a Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato, Carr. Irapuato-Silao Km 12.5, Irapuato, Gto., C.P. 36821, México. manne_rangel6@hotmail.com

^b Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, col. Noria Alta, Guanajuato Gto.,

^c C.P. 36250. México.

Resumen

Sporothrix schenckii es un hongo dimórfico, que presenta una fase saprófita micelial a temperaturas entre 25 – 28°C, y una fase infectiva patógena levaduriforme a temperaturas alrededor de 37°C, siendo uno de los agentes etiológicos de la esporotricosis, micosis subcutánea distribuida a nivel mundial. En un trabajo previo, se generó un banco de mutantes por mutagénesis insercional, que presentaban disminución de la virulencia del hongo en un modelo experimental. Se seleccionaron tres mutantes que presentaban disminución en su melanización para caracterizar. Se estudiaron características morfológicas a nivel microscópico y macroscópico de las tres mutantes *S. schenckii* y de manera indirecta, alteraciones en la composición de la pared celular usando agentes perturbadores de pared como rojo Congo y blanco de calcofluor. Se realizaron análisis bioinformáticos para identificar enzimas relacionadas al proceso de melanización en *S. schenckii*. De acuerdo con las enzimas identificadas por análisis de Blast en su genoma, la producción de melanina se produce a través de la vía 1,8- dihidroxinaftaleno (DHN). Las diferencias en morfología observadas entre las cepas mutantes y la parental, así como una mayor susceptibilidad a los agentes perturbadores de pared celular, indican que las mutantes estudiadas, además de una posible afectación en la ruta de melanización de la pared, presentan alterada la estructura de este organelo, ligada a morfología e integridad celular en hongos.

Palabras clave: *Sporothrix schenckii*, dimorfismo, melanización, fenotipo.

Introducción

Sporothrix schenckii es un hongo dimórfico cuya transformación es dependiente de la temperatura de cultivo: a 25°C se manifiesta su forma saprófita, mostrando crecimiento filamentoso o micelial; mientras que a 37°C se transforma en su forma patógena, exhibiendo una morfología levaduriforme [1]. La esporotricosis es una micosis subcutánea que se presenta en humanos y en algunos otros mamíferos que se caracteriza por la presencia de lesiones nodulares en la piel causada por el género *Sporothrix* donde *S. schenckii* es uno de los agentes infecciosos. Se ha reportado también la infección por contaminación de heridas abiertas, inhalación de conidios o por lesiones causadas por animales infectados [2]. Es una

infección emergente en pacientes inmunocomprometidos, y una enfermedad laboral en agricultores y trabajadores en estrecha contacto con el suelo, madera, corteza, forraje y paja [3].

Los microorganismos patógenos están dotados de ciertos componentes que les brindan la capacidad de poseer un fenotipo de virulencia esto nos dirige hacia el concepto de factores de virulencia que son componentes microbianos que favorecen el crecimiento o sobrevivencia del microorganismo durante la infección. La presencia de melanina en *S. schenckii* se ha reportado como un factor de virulencia, ya que aislados pigmentados tienen una mayor capacidad invasiva que la cepa albina mutante en un modelo experimental de esporotricosis en ratas [4]. Macroscópicamente, solo la fase micelial del hongo está melanizada [5], sin embargo, la producción de melanina en células de levadura se demostró in vitro durante la infección [4]. *S. schenckii* puede producir melanina utilizando compuestos fenólicos como la 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) como sustrato, tanto en forma micelial como en forma de levadura [5]. Los estudios in vitro indican que la melanización en *S. schenckii* está controlada por varios factores, como la temperatura, el pH y las condiciones de nutrientes [6].

En este trabajo, se reporta la caracterización morfológica de mutantes albinas de *S. schenckii* obtenidas en un trabajo previo por mutagénesis insercional [7]. El fenotipo albino de estas mutantes en comparación con la cepa parental nos induce a proponer un posible daño de la ruta de la melanización en el hongo. Por lo anterior, se exploró in silico la ruta metabólica de la melanización en *S. schenckii* mediante identificación en el genoma del hongo de posibles enzimas que participarían en dicha ruta usando para ello secuencias de genes ortólogos presentes en otros hongos.

Metodología

A. Obtención de conidios

Placas con medio YPD sólido, pH 4.5 fueron inoculadas con 30 μ L de un stock de conidios congelados a -70°C . Las placas se incubaron a 28°C de 7 a 8 días. Los conidios se cosecharon de cada placa. Los conidios recuperados en tubos falcon de 50 mL. Se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C . Las pastillas de conidios se lavaron y resuspendieron con PBS pH 7.4; y se utilizaron para la propagación de otras morfologías fúngicas.

B. Análisis del fenotipo Macroscópico

A partir de colonias del hongo crecidas sobre cajas de Petri se cortó con bisturí estéril un cuadro de 0.5 cm x 0.5 cm y se colocó en placas con medio YPD a pH de 4.5 y se incubaron a 28°C de 7 a 8 días para poder observar el crecimiento de colonias aisladas en placa.

Microscópico

Se hicieron diluciones 1:100 para poder observar la muestra al microscopio y posteriormente se colocaron 50 μ L de cada muestra en un portaobjetos se colocó el cubreobjetos y se observó en microscopio óptico con el objetivo 10X Y 40X.

C. Análisis de fluorescencia

Las mutantes se observaron al microscopio para verificar la fluorescencia, debido a la presencia del gen GFP en T-DNA que se integró al genoma de *S. schenkii*. Las mutantes se crecieron de 3 a 4 días para análisis de conidios y de 7 a 8 días para levaduras a 28°C y 37°C, y se tomaron 10µL de medio para observación al microscopio de fluorescencia. Las muestras fueron selladas y vistas en fresco en un microscopio con una luz UV acoplada para verificar la fluorescencia de las muestras. Se observaron bajo los objetivos 63X y 100X utilizando aceite de inmersión. Las muestras fueron documentadas con una cámara [AxioCam] acoplada al microscopio [ZEISS axioskop 40] se observaron con el objetivo de 10X y 40X.

D. Medición de la sensibilidad de agentes perturbadores de pared celular.

Se tomaron las células en fase logarítmica (~18h) y se cosecharon por centrifugación se realizaron dos lavados con H₂O mQ y se ajustó la densidad óptica a 600 nm= 0.05. Las células ajustadas se añadieron a la placa con los agentes: Blanco de Calcofluor y Rojo Congo. Se hicieron diluciones dobles seriadas de los agentes perturbadores se añadió un control de cada agente diluido. Se incubó la placa a 28°C/~48h de 3 a 4 días. Finalmente, se determinó la densidad óptica por pozo, utilizando un lector de microplacas EPOCH de Biotek con una longitud de onda de 600 nm.

E. Estudio Bioinformático

Se buscó la ruta metabólica de la melanogénesis, por medio de la plataforma Kegg, se determinaron enzimas que intervienen en este proceso y con ayuda de NCBI se encontró la secuencia de dichas enzimas, una vez obtenida la secuencia de a.a. se descargó el formato fasta y se realizó un blastp con la secuencia donde se encontró homólogos en otros hongos para elaborar una tabla comparativa de diferentes organismos donde se encuentra la enzima y al final se realizara el árbol filogenético de los microorganismos con la enzima de interés

Resultados

Se caracterizaron las mutantes de *S. schenkii* (M107, M111, M116) comparándolas con la cepa silvestre como control (ATCC MYA-4821). Tras la obtención de conidios de cada cepa se realizó un recuento en cámara de Neubauer obteniendo los siguientes resultados.

Para determinar la presencia o ausencia de fluorescencia, debido a la presencia del gen GFP presente en T-DNA en las mutantes de *S. schenkii*; se observaron al microscopio de fluorescencia. Para este caso se utilizaron cultivos frescos de células. Como control negativo se observó la cepa silvestre ATCC MYA-4821 y todas las cepas mutantes presentaron fluorescencias algunas más representativas que otras.

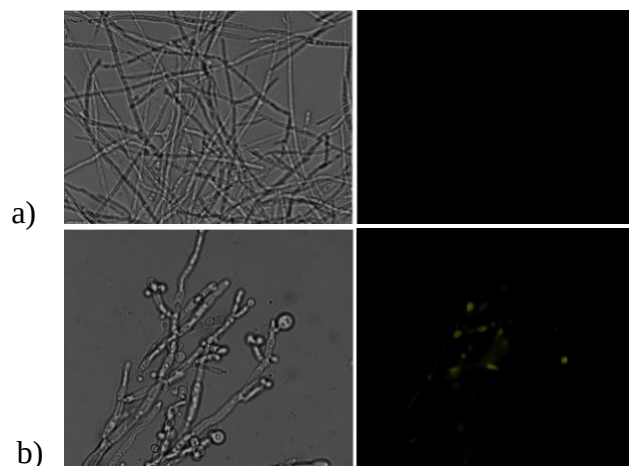


Fig. 1. Microscopia de fluorescencia. Objetivo 40X. [37°C, pH 4.5]
 a) Cepa silvestre 4821 control b) Cepa M107

Tabla 1. Descripción de morfología microscópica de las cepas mutantes a 28°C, pH 4.5

Cepa	Morfología	Cepa	Morfología
4821	Micelio delgado, alargado y definido con ramificaciones con presencia de abundantes conidios.	M111	Micelio muy ramificado, septado y aglomerado, sin conidios.
M107	Micelio fino y alargado un poco ramificado con presencia de muy pocos conidios de forma circular.	M116	Micelio fino alargado un poco ramificado y aglomerado, sin conidios.

Para llevar a cabo el estudio macroscópico de las cepas mutantes se hizo crecer una colonia en medio YPD a pH 4.5.



Fig. 2. Morfología macroscópica
 a) Cepa silvestre (control) b) Mutante M111.

Tabla 2. Descripción de la morfología macroscópica de las mutantes en medio YPD solido pH 4.5

Cepa	Características	Cepa	Características
MYA-4821	Forma: Filamentosa Elevación: Convexa Margen: Filamentoso Color: Beige mate Superficie: Rugosa, seca e invasiva	M111	Forma: Filamentosa Elevación: Convexa Margen: Filamentoso Color: Blanco mate Superficie: Rugosa, seca e invasiva
M107	Forma: Filamentosa Elevación: Convexa Margen: Filamentoso Color: Blanco mate Superficie: Rugosa, seca e invasiva	M116	Forma: Filamentosa Elevación: Convexa Margen: Filamentoso Color: blanco claro Superficie: Rugosa, seca e invasiva

Para la medición de la sensibilidad de agentes perturbadores de pared celular se utilizó Rojo Congo y Blanco de Calcofluor al hacer las respectivas diluciones en microplacas se obtuvieron los siguientes resultados:

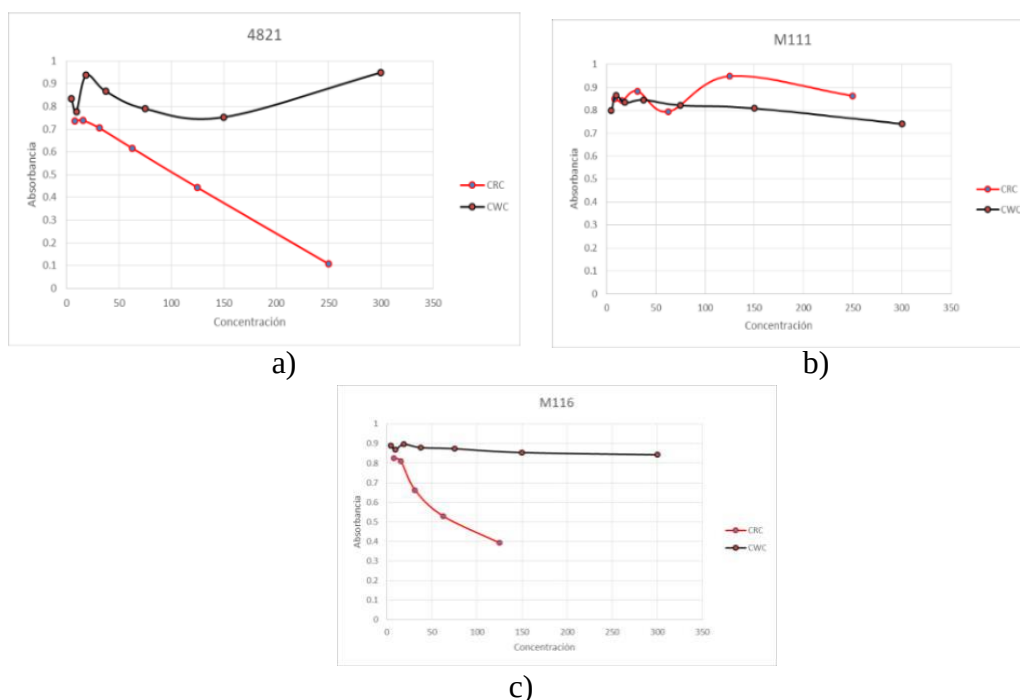


Fig. 3. Crecimiento de las células contra la concentración del agente perturbador. Rojo Congo (CRC, línea azul); Calcofluor White (CWC, línea roja) a) Cepa silvestre MYA-4821 b) M116 c) M111

Análisis bioinformático

El albinismo se produce por la falta de una enzima, la cual actúa en el proceso de formación de melanina a partir de tirosina

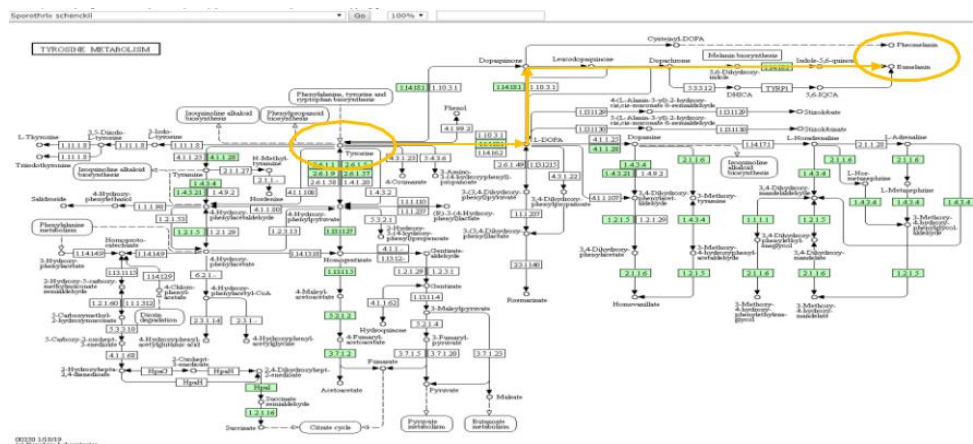


Fig. 4. Metabolismo de la tirosina KEGG. Consulta: 20/10/2019

Se observa que *S. schenckii* contiene 4 enzimas que participan en este proceso son las siguientes: No.1 SPSK_03114 K00505 tirosinasa [EC:1.14.18.1], No.2 SPSK_06304 K00505 tirosinasa [EC:1.14.18.1], No.3 SPSK_06317 K00505 tirosinasa [EC:1.14.18.1], No.4 SPSK_06500 K00505 tirosinasa [EC:1.14.18.1].

Tabla 3. Relación de ortólogos con las enzimas de interés el * indica la presencia de la enzima en el microorganismo

Microorganismo	Enzima 1	Enzima 2	Enzima 3	Enzima 4
<i>Neurospora tetrasperma</i>	*		*	
<i>Pyricularia oryzae</i> 70-15	*	*	*	
<i>Neurospora crassa</i>	*			*
<i>Sordaria macrospora</i>	*			
<i>Thermothielavioides terrestris</i>	*	*	*	
<i>Podospora anserina</i>	*	*	*	*
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	*			
<i>Botrytis cinerea</i>	*	*		
<i>Phialocephala scopiformis</i>	*	*	*	
<i>Colletotrichum fioriniae</i>	*			*

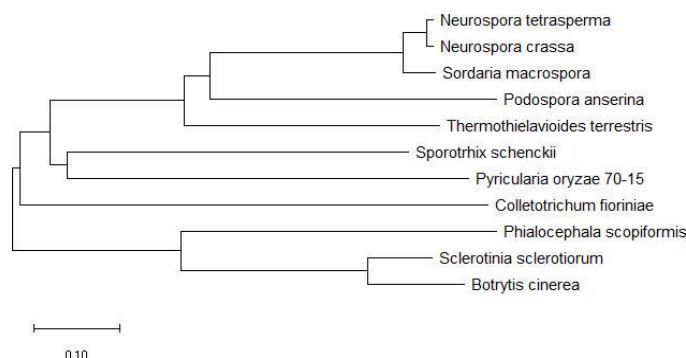


Fig.5. Árbol filogenético por distancia MEGA. Consultado 20/11/2019.

Conclusiones

Las cepas mutantes conservan resistencia a Higromicina, lo que sugiere que contienen el plásmido de inserción con el gen de resistencia a higromicina. Las diferencias en morfología observadas entre las cepas mutantes y la parental, así como una mayor susceptibilidad a los agentes perturbadores de pared celular, indican que las mutantes estudiadas, además de una posible afectación en la ruta de melanización de la pared, podrían tener afectada la estructura de este organelo, ya que la pared celular está ligada a la morfología e integridad celular en hongos. De acuerdo con las enzimas identificadas por análisis de Blast en su genoma, una serie de oxidaciones de la tirosina llevan a la constitución de dihidroxifenilalanina (DOPA), lo que origina la producción de dopaquinona. Esto lleva a la formación de eumelaninas y feomelaninas que son los diferentes tipos de melanina que se forman a partir de la tirosina. Al realizar este estudio se informó que *S. schenckii* tiene solo tirosinasas participando para la producción de melanina se comprobó que estas fueran distintas entre sí para poder hacer el análisis, en el árbol filogenético de distancia donde muestra que *S. schenckii* es cercano a *Pyricularia oryzae* 70-15 ya que vienen del mismo ancestro y muestra que este ha tenido un poco más de cambios que *S. schenckii*.

Bibliografía

- [1] Teixeira, M. M., de Almeida, L. G., Kubitschek-Barreira, P., Alves, F. L., Kioshima, É. S., Abadio, A. K., ... & Ruiz, J. C. (2014). Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. BMC Genomics, 15(1), 1.
- [2] Nancy E. , Sergio C, Jose A. , Luz A. , Leila M. , Hector M. .(2018) Generation of *Sporothrix schenckii* mutants expressing the green fluorescent protein suitable for the study of host-fungus interactions. Fungal Biology
- [3] Lopez-Romero, E., Reyes-Montes Mdel, R., Perez-Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagomez-Castro, J. C., Mora-Montes, H. M., et al. (2011). *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. Future Microbiol. 6, 85–102. doi: 10.2217/fmb.10.157
- [4] Ramos-e-Silva,M.,Vasconcelos,C.,Carneiro,S. and Cestari,T.(2007). “*Sporotrichosis*” clinics in Dermatology 25(2):181-187
- [5] Prieto MA, Díaz E, Garcia JL. (1996) Molecular characterization of the 4- hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster.
- [6] Bastos, Monica. (2011) *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. American Society for Microbiology. National School of Public Health, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. Standart
- [7] Nancy E. , Sergio C, Jose A. , Luz A. , Leila M. , Hector M. .(2018) Generation of *Sporothrix schenckii* mutants expressing the green fluorescent protein suitable for the study of host-fungus interactions. Fungal Biology.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS FÚNGICAS DEGRADADORAS DE POLIMEROS

Martha Lizeth Pérez Méndez ^a; Luis Mauricio Salazar García ^a; Lérica Liss Flores Villavicencio ^a;
Alberto Flores Martínez ^a, Patricia Ponce Noyola ^a y Julio César Villagómez Castro ^{a*}

^a Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad de Guanajuato. Noria Alta S/N; Col. Noria Alta; C.P. 36050; Guanajuato, Gto., México (*castroj@ugto.mx)

Resumen

Los hongos han desarrollado gran diversidad de enzimas para la adquisición de sus nutrientes, su metabolismo y la regulación del crecimiento. En el laboratorio contamos con cepas aisladas de un consorcio que se desarrolló en una suspensión acuosa de PET pulverizado. Dos de estos aislados ya fueron caracterizados por su morfología colonial y conidial como hongos de los géneros: *Penicillium*, *Trichoderma* o *Talaromyces*. En este trabajo se caracterizaron molecularmente 6 de los aislados recuperados y se determinó su potencial para degradar derivados de celulosa y PET. Se realizó la caracterización morfológica y molecular, la cual después de la búsqueda bioinformática se determinó que 3 cepas pertenecen al género *Penicillium* y las otras a los géneros *Leptobacillium*, *Talaromyces* y *Lecanicillium*. Al analizar su potencial degradador, con sustratos sintéticos fluorogénicos, se observó que 4 secretan glicosidasas y solo 2 secretan esterases (posibles degradadoras de PET).

Palabras claves: PET, celulosa, hongos, identificación, enzimas.

Introducción

La elevada producción de los polímeros sintéticos, utilizados con un sinnúmero de propósitos, desde almacenamiento de comida y medicamentos, hasta su implementación en artículos electrónicos; aunada a su gran durabilidad y un inadecuado destino final, ha ocasionado grandes problemas ambientales. Entre ellos, la pérdida de especies por su ingesta, la propagación de especies invasoras y la pérdida de ecosistemas [1]. Actualmente existen alternativas para evitar que estos polímeros lleguen a los ecosistemas: reciclado físico y químico, empaquetamiento para relleno sanitario, incineración y, recientemente, protocolos de biodegradación. Desafortunadamente, algunas de estas alternativas también ocasionan daños al ambiente, ya sea por la producción de gases nocivos o por la formación de micropartículas que contaminan tierra, aire y/o agua. Si bien, los polímeros naturales como la celulosa y la lignina son degradados en el ambiente por los microorganismos presentes, esta degradación es relativamente lenta, de tal forma que se han implementado protocolos biotecnológicos que permiten acelerar este proceso y recuperar productos intermediarios o sus monómeros para utilizarlos en otras aplicaciones industriales. El éxito en algunos procesos de biorremediación para evitar la acumulación de polímeros naturales aprovechando microorganismos, hongos y bacterias principalmente, ha conducido a la búsqueda de protocolos aplicados ahora para la degradación de polímeros sintéticos, entre ellos el polietilentereftalato o PET [2]. El PET puede ser degradado por algunos hongos y

bacterias que secretan hidrolasas como la petasa (enzima específica) [3] o esterasas y cutinasas (enzimas inespecíficas) [4]. Por otro lado, para la degradación de polímeros naturales de celulosa o sus derivados se han descrito una gran cantidad de enzimas celulolíticas (celulasas, celobiohidrolasas, glicosidasas, lacasas, etc.) de diversos orígenes [5].

En el laboratorio de Biología Celular de Hongos y Protozoarios (K-102) del departamento de Biología en la DCNE de la Universidad de Guanajuato, se cuenta con un consorcio de microorganismos capaces de desarrollarse en una suspensión acuosa de PET pulverizado. Al cultivar el consorcio en diferentes medios de cultivo, se lograron aislar 6 cepas fúngicas diferentes, con base a sus características de crecimiento colonial. Dos de los aislados fúngicos, capaces de crecer en medio mínimo adicionado de PET o PET-S (PET funcionalizado con sorbitol), se caracterizaron morfológicamente (morfología colonial y conidial) como hongos de los géneros: *Penicillium* y *Talaromyces* [6]. Sin embargo, no se determinó la especie a la que pertenecían. Adicionalmente, se determinó si los aislados podrían utilizar otros polímeros, como la celulosa o sus derivados [7] y se purificó parcialmente, una proteína secretada por uno de los aislados, actividad de β -glucosidasa inducida en medio mínimo de Mathur adicionada con celofán como fuente de carbono [8]. En este trabajo se describe la caracterización molecular de los seis aislados fúngicos y su perfil de actividad hidrolítica sobre polímeros naturales y sintéticos utilizando sustratos fluorogénicos (derivados de 4-metilumbeliferona) y colorimétricos (derivados de *p*-nitrofenol).

Metodología

Mantenimiento de los aislados fúngicos. El mantenimiento de las cepas fúngicas se realizó en medio YPG líquido o agar-YPG, pH 4.5 e incubados a 28°C. Para su mantenimiento se sembraron periódicamente en el mismo medio utilizando bocados de 4 mm de diámetro [6].

Caracterización morfológica macro y microscópica de los aislados fúngicos. La morfología colonial se analizó utilizando cultivos en medio Papa-Dextrosa (PDA), medio extracto de malta, medio Sabouraud y medio de extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD); todos ellos a pH 4.5. Las cepas fúngicas se sembraron por bocado central y se incubaron a 28°C durante 6 días. Para el análisis microscópico se realizaron microcultivos de todas las cepas, los cuales se observaron bajo microscopio después de teñirlos con azul de algodón. El resultado obtenido se comparó con reportes en la literatura [7, 9].

Perfil enzimático de los aislados fúngicos. Para el análisis de la actividad hidrolítica y cinética de secreción de los aislados, las cepas se incubaron en medio mínimo de Mathur, pH 4.5, utilizando cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, 0.1% (p/v) de glucosa, para inducir el crecimiento fúngico y, diferentes sustratos al 2% (p/v) como fuente de carbono: PET, PET-S, celofán, carboximetilcelulosa, celulosa cristalina (Avicel) o glucosa (control). Los cultivos se incubaron a 28 °C durante 2 semanas. Al término del periodo, se centrifugaron las muestras a 3000 x *g* y en el sobrenadante se determinó la proteína secretada y la actividad enzimática, en amortiguador pH 5, empleando derivados de 4-MU-umbeliferona [10] (5 μ M

de 4-MU-glucósido, 10 μ M de 4-MU-celobiósido o 4-MU-xilósido, 0.1 μ M de 4-MU-acetato) conforme a técnicas estándar [8].

Caracterización molecular de los aislados fúngicos. Para la caracterización molecular los aislados fúngicos se cultivaron en medio YPD sobre celofán para recuperar el micelio y realizar la extracción de ADN por el método fenol-cloroformo. El ADN recuperado se utilizó como templado para la reacción de PCR utilizando como cebadores las secuencias de los oligonucleótidos ITS 1-4, NS 1-4, NS 5-8 y RPB2-5F-RPB2-7cR (para la cepa 4 exclusivamente). Las condiciones de reacción fueron: 3 minutos a 94°C, 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72 °C durante 35 ciclos y finalmente a 72°C durante 5 minutos. Al término de la PCR, se analizaron los productos de la amplificación en geles de agarosa, se cortaron las bandas correspondientes y se purificó el ADN con el uso de una columna de afinidad de la marca DNeasy. Una vez purificado el ADN y se mandó a secuenciar. Una vez secuenciados los amplicones, se procedió a realizar una búsqueda bioinformática mediante el programa blast para reconocer la identidad de las cepas fúngicas de interés y a su vez se usó de apoyo los resultados obtenidos por la caracterización micro y macroscópica de las cepas [9].

Figura 1

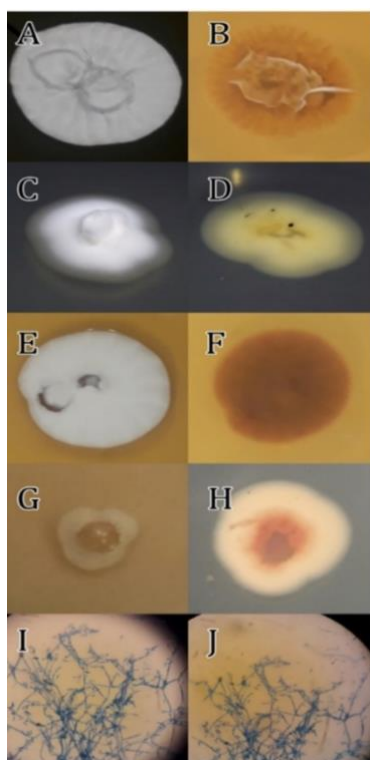


Figura 2

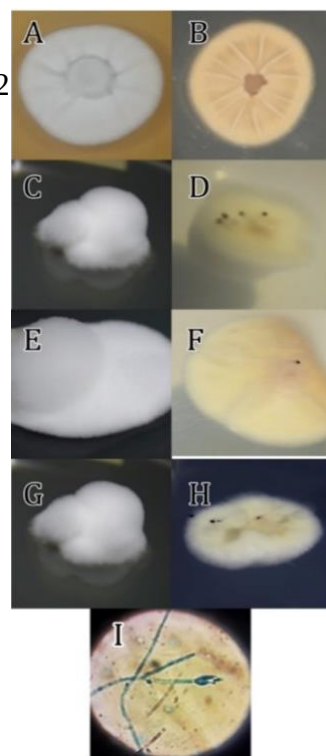


Figura 1. Caracterización macroscópica y microscópica de la cepa 2 en diferentes medios de cultivo, pH 4.5, incubado a 28°C durante 5 días. (A) anverso y (B) reverso en YPD. Colonia filamentososa redonda con bordes irregulares ondulados. Elevación crateriforme de color blanco y textura algodonosa. Reverso color amarillo de textura rugosa. **(C) anverso y (D) reverso en agar malta.** Colonia filiforme con borde ondulado y elevación convexa plana de color blanco. Reverso color crema con borde de textura lisa y color opaco. **(E) anverso y (F) reverso en agar Sabouraud.** Colonia redonda con bordes irregulares y ondulados. Presenta elevación crateriforme y es de color blanco. El reverso es rugoso y de color naranja. **(G) anverso y (H) reverso en PDA.** Colonia redonda con borde suave (completo), elevación pulvinada de color blanco y textura

algodonosa. El reverso es plano de color amarillo con borde opaco. **(I) y (J) tinción de azul de algodón 100x.** Se observa una cepa con pseudo hifa. Presenta didimospora.

Figura 2. Caracterización macroscópica y microscópica de la cepa 3 en diferentes medios de cultivo, pH 4.5, incubado a 28°C durante 5 días. (A) anverso y (B) reverso en YPD. Colonia filamentosas irregular con borde ramoso, colonia elevada, textura algodonosa y color blanco. Presenta esporas similares a pequeñas gotas transparentes. El reverso es de color amarillo oscuro, de textura rugosa y orilla más clara. **(C) anverso y (D) reverso en agar Malta** Colonia de forma rizoide blanco con borde ramoso, elevación umbonada y textura algodonosa liso. Su reverso es de textura lisa con el centro oscuro. **(E) anverso y (F) reverso en agar Sabouraud.** Colonia filamentosas circular con borde suave (entero), elevación elevada, color blanco y de textura algodonosa. Su reverso es rugoso con borde más claro. **(G) anverso y (H) reverso en PDA.** Colonia de forma irregular con borde ramoso y elevación convexo. Presenta una textura algodonosa y color blanco. Presenta esporas en forma de gotas grandes de color amarillo-naranjado. En el reverso presenta textura algodonosa y color blanco. **(I) tinción de azul de algodón 100x.** Presenta hifa generativa con talo septado hialino, conidióforo simple y blastoconidios.

Resultados

Los 6 aislados son hongos filamentosos. Dos de las cepas presenta colonias terrosas de elevación plana y formación de pseudohifas (Figura 1) mientras que las cuatro restantes presentan colonias algodonosas e hifas hialinas septadas con conidioforos compuestos (Figura 2.). Solo se muestran un ejemplo de cada una de las cepas.

Al determinar la hidrólisis de los 4 sustratos ensayados por los 6 aislados analizados cultivados en presencia de diferentes inductores (donde el aislado creció), se observó que fue mayor la actividad secretada de β -glucosidasa en las cepas inducidas con celofán como fuente de carbono (cepas 4>7>6>3) con respecto al uso de CMC como inductor (cepas 6>4>3) y que el PET también favorece la secreción de la enzima, si bien de manera inespecífica (cepa 6>8>2>3). Con respecto a la actividad de celobiohidrolasa, solamente la cepa 4 mostro buena actividad cuando se indujo con celofán y en la cepa 3 cuando se usó CMC (Tabla 1.). Las determinaciones de actividad con el sustrato para xilosidasa y esterasa dieron resultados no significativos.

Tabla 1. Actividad enzimática secretada por los aislados fúngicos cultivados en medio mínimo adicionado de diferentes sustratos como inductores de la actividad.

Cepa	Inductor	Actividad secretada (U/ensayo)			
		β -glucosidasa	Celobiohidrolasa	Xilosidasa	Esterasa
2	PET	169	0	0	0
3	Celofán	401	1	0	0
	CMC	24	147	0	0
	PET	85	0	0	0
4	Celofán	995	203	0	0
	CMC	202	4	0	0
6	Celofán	422	23	0	0
	CMC	783	0	0	0
	PET	428	0	0	0

7	Celofán	478	0	0	0
8	PET	318	0	0	0

Las casillas sombreadas representan la mayor actividad en cada condición de inducción

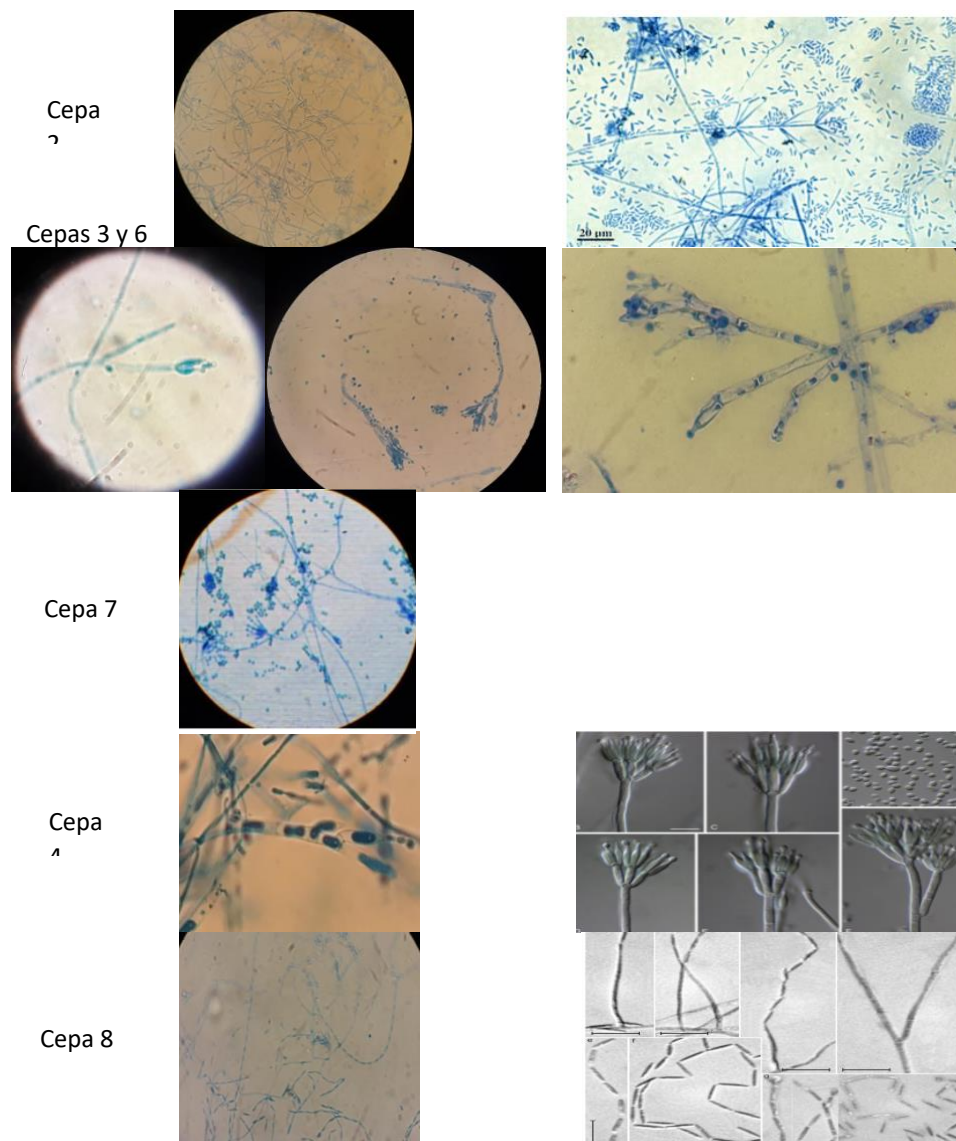


Figura 3. Comparación morfológica de aislados (izquierda) y hongos reportados en la literatura (derecha). *Lecanicillium*, cepa 2; *Penicillium*, cepas 3, 6 y 7; *Talaromyces*, cepa 4; y *Leptobacillium*, cepa 8.

Discusión y conclusión

En la caracterización molecular, con base a la homología de las secuencias recuperadas de las reacciones de PCR con los diferentes cebadores se puede concluir que se recuperaron hongos pertenecientes a 4 géneros diferentes: *Lecanicillium*, cepa 2; *Penicillium*, cepas 3, 6 y 7; *Talaromyces*, cepa 4; y *Leptobacillium*, cepa 8; (Figura 3.), corroborando la

caracterización morfológica inicial en las cepas 4 y 6, reportadas como *Talaromyces* y *Penicillium*, respectivamente.

Los 6 aislados recuperados en el laboratorio son hongos filamentosos que pertenecen a cuatro géneros diferentes (*Lecanicillium*, cepa 2; *Penicillium*, cepas 3, 6 y 7; *Talaromyces*, cepa 4; y *Leptobacillium*, cepa 8). Si bien crecen en medio mínimo adicionado de polímeros naturales o sintéticos, el agente inductor empleado en su cultivo no parece ser determinante en las actividades enzimáticas secretadas por ellos. No se observó actividad de esterasas a 2 semanas; sin embargo, se considera que algunos de los aislados secretan estas enzimas debido a la disminución visual de PET y aumento del crecimiento de las cepas en el medio después de 5 semanas.

Los aislados 4 y 6, conforme a la actividad enzimática secretada, podrían utilizarse en biorremediación de residuos celulósicos y el aislado 8 en la de residuos plásticos. Si bien, es necesario realizar un análisis más detallada de la actividad enzimática secretada, purificarla y estudiar su genoma para caracterizar las especies involucradas y la presencia de los genes correspondientes a petasas, esterasas y celulasas.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado con recursos de la DAIP de la Universidad de Guanajuato en el convenio 056/2020 y del investigador responsable.

Bibliografía

- [1] Jenna R. Jambeck, Roland Geyer, Christ Wilcox, Theodore R. Siegler, Miriam Perryman, Anthony Andrady, Ramani Narayan, Kara LAvender Law. (2018). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347, 768-771. doi: 10.1126/science.1260352
- [2] Hayden K. Webb, Jaimys Arnott, Russell J. Crawford, Elena P. Ivanova. (2013). Plastic Degradation and Its Environmental Implications with Special Reference to Poly (ethylene terephthalate) . *Polymers*, 5, 1-18. Doi: 10.3390/polym5010001
- [3] Davies, G., Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853–859. doi:10.1016/s0969-2126(01)00220-9
- [4] Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506– 739
- [5] Ivonne Gutiérrez-Rojas, Nubia Moreno-Sarmiento, Dolly Montoya. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1-12.
- [6] Silva-Rodríguez, A.V.; 2019, Caracterización de microorganismos degradadores de PET. Tesis de Licenciatura, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México, 10-22.
- [7] Ruano Najarro, Madeline Janette , Villagómez Castro, Julio César . (2018). Jóvenes en la ciencia. Estudio de la degradación de PET por consorcios fúngicos II, 4, 1076-1082.
- [8] Ruano Najarro Madeline Janett, Cruces González David Francisco, Navarro Rangel Cynthia Alejandra, Regla León, Gabriela Quetzally, Villagómez Castro Julio César. (2019). Caracterización de enzimas secretadas por hongos que crecen sobre una suspensión acuosa de PET y su potencial uso en biorremediación. *Veranos de la ciencia*, 5, 1056-1062.
- [9] Pinto, F. C. J., Lima, D. B. de, Agustini, B. C., Dallagassa, C. B., Shimabukuro, M. F., Chimelli, M. Bonfim, T. M. B. (2012). Morphological and molecular identification of filamentous fungi isolated from cosmetic powders. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(6), 897–901.

[10] Zverlov, V. V., Velikodvorskaya, G. A., & Schwarz, W. H. (2002). A newly described cellulosomal cellobiohydrolase, CelO, from *Clostridium thermocellum*: investigation of the exo-mode of hydrolysis, and binding capacity to crystalline cellulose. *Microbiology*, 148, 247–255.

CONTAMINACIÓN POR FRAGMENTOS TIPO MICROPLÁSTICO EN PECES DE LA LAGUNA DE YURIRIA, GUANAJUATO

Diana Guadalupe Amezcua-Hernández^{1*}, Jorge Andrés Morales Rico¹, Patricia Nayeli Alva-Murillo¹, María del Pilar González-Muñoz², Juan Pablo Huchin-Mian¹.

¹Departamento de Biología. División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Guanajuato, 36050, México.

²Departamento de Química. División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Guanajuato, 36050, México.

*Correo electrónico: dg.amezcuahernandez@ugto.mx

Resumen

Los microplásticos (MPs) son partículas muy pequeñas que apenas pueden verse a simple vista (< 5 mm) estos pueden ser desprendidos de materiales plásticos como productos de higiene personal, empaques de alimentos y materiales industriales. Se ha reportado la presencia de MPs en casi todo tipo de ecosistemas y se sugiere que pueden afectar la salud de los seres vivos, como los peces. En el estado de Guanajuato no existen estudios sobre MPs en peces. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue aislar, cuantificar y caracterizar fragmentos tipo microplástico del tracto digestivo de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) y la carpa común (*Cyprinus carpio*) provenientes de la Laguna de Yuriria. Se estandarizó un protocolo de aislamiento de MPs mediante la digestión de la materia orgánica con peróxido de hidrógeno (30%). En total se analizaron 154 peces (n=154), (100 tilapias y 54 carpas). Los análisis revelaron que el 92.2% de los peces presentaban fragmentos tipo microplástico en el tracto digestivo. Los MPs tipo filamento y de color azul fueron los más comunes. La abundancia relativa de MPs no estuvo asociada a la especie, sexo o talla de los peces ($p > 0.05$); pero sí a la temporada de muestreo ($p < 0.05$), los peces capturados en otoño tenían significativamente mayor número de MPs en el estómago, (media $\pm$ S.D: 6.1 ± 4.86), comparado con los peces muestreados en el invierno (media $\pm$ S.D: 2.8 ± 2.02), sugiriendo una estacionalidad en la abundancia de MPs. Este estudio representa el primer reporte de contaminación por fragmentos tipo microplástico en peces de importancia comercial en la Laguna de Yuriria.

Palabras clave: *Contenido estomacal, Aislamiento, Tilapias, Carpas.*

Introducción

Por su versatilidad y bajo costo de producción, el plástico está presente en la vida cotidiana de todos los seres humanos. Polímeros como: cloruro de polivinilo (PVC), poliestireno (PS), polietileno (PE), polipropileno (PP), polietileno tereftalato (PET) y nylon [1,2] son ubicuos, sin embargo, al tener un largo proceso de degradación terminan acumulándose y

contaminando muchos ecosistemas [3]. Bajo condiciones ambientales como foto oxidación, abrasión mecánica entre otros procesos, los plásticos pueden fragmentarse y originar de acuerdo con su tamaño pequeños fragmentos de plástico desde los 25 mm hasta los 20 μ m [4,5,6], estos pueden fragmentarse en forma de fibras, fragmentos, pellets, films o espumas [7].

Los ecosistemas de agua dulce son uno de los más ignorados respecto a la contaminación plástica [8]; sin embargo, existen estudios que comprueban la presencia de MPs flotando en la superficie de las columnas de agua o en los sedimentos de dichos sistemas, afectando de forma directa o indirecta a la fauna [9,6]. Las vías de contaminación son los efluentes descargados de plantas residuales y el agua filtrada de ecosistemas terrestres, los desechos plásticos pueden acumularse y permanecer ahí por largos periodos de tiempo [10,11,12]. Los MPs pueden ser ingeridos intencional y/o accidentalmente por una amplia variedad de especies, en el caso de los peces, les puede causar obstrucciones de los canales alimenticios, estrés oxidativo, cambios conductuales, incapacidad reproductiva, decremento de la población, abrasiones por objetos afilados, así como intoxicación química y física [13,14,15]; en ocasiones los MPs pueden ser eliminados por medio de las heces o ser retenidos por el pez para su bioacumulación [14].

La laguna de Yuriria es un cuerpo de agua artificial sumamente importante en el estado de Guanajuato. La pesca es una de las principales actividades económicas del municipio; sin embargo, el exceso de descargas sobre ella ha eutrofizado las aguas [16,17]. En este trabajo se aisló y caracterizó fragmentos tipo microplástico en el contenido estomacal de dos especies de importancia comercial en la laguna [18]: tilapia (*Oreochromis niloticus*) y Carpa (*Cyprinus carpio*). Los protocolos más utilizados para el aislamiento de MPs en tractos digestivos de peces son mediante ácidos, álcalis y los agentes oxidantes [19,20,21,22,23]; sin embargo, no existe un protocolo universal útil para todos los organismos; por lo tanto, se estandarizó un protocolo de aislamiento de MPs. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar fragmentos tipo microplástico en el contenido estomacal de peces de importancia comercial de la Laguna de Yuriria, Guanajuato.

Metodología

Se realizaron dos muestreos aleatorios de los desembarcos de peces de la Laguna de Yuriria en septiembre y diciembre de 2019, y febrero de 2020. Se colectaron tilapias (*O. niloticus*) (Fig. 1A) y Carpas (*C. carpio*) (Fig. 1B). Los peces fueron transportados en una hielera al laboratorio de ecología en la División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

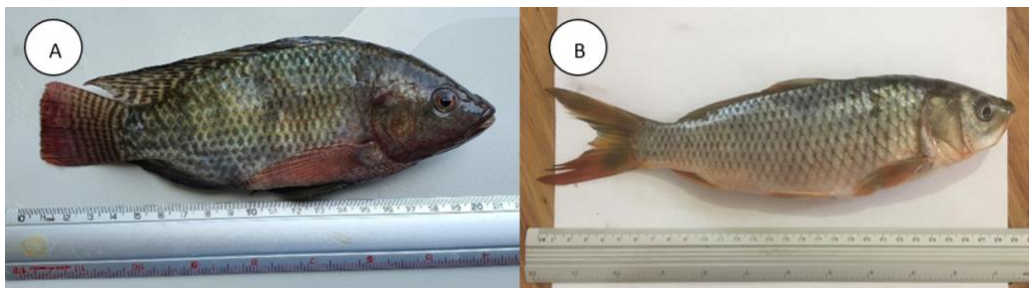


Figura 1. Ejemplares de A) *Tilapia nilótica* (*O. niloticus*), y B) *Carpa común* (*C. carpio*) capturados en la Laguna de Yuriria Guanajuato.

Los peces fueron medidos (longitud total, caudal y ancho máximo en mm) y se determinó el sexo de cada pez; finalmente fueron sacrificados y el tracto digestivo de los peces fueron extraídos y depositados individualmente en papel cera y guardado en bolsas ziploc a -20°C para su posterior análisis.

Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se separó el contenido digestivo de los tejidos blandos bajo un microscopio estereoscópico (Motic SMZ-171). Al contenido recuperado se le adicionaron 20 mL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (30%) por cada gramo de contenido del tracto digestivo recuperado, siguiendo el protocolo modificado de [24]. La muestra se calentó a 50°C durante 2 h, en una parrilla (DLAB MS-H280-Pro) con agitación durante 1 min, posteriormente, las muestras se agitaron esporádicamente.

Las muestras digeridas se filtraron en un sistema, “SIBATA filter system kit”, con la ayuda de una bomba de vacío y papel Whatman. Los filtros se analizaron en un microscopio estereoscópico (6.7x a 40.5x) en busca de fragmentos tipo microplástico. Cada fragmento de MPs aislado se caracterizó cualitativamente en forma y color. Adicionalmente, durante el procesamiento de muestras se usaron dos tipos de controles para analizar la contaminación cruzada de MPs del entorno, i) una caja petri abierto con un filtro de papel Whatman y la filtración frecuente de los reactivos utilizados.

Resultados

Se analizó un total de 154 tractos digestivos (100 de tilapias y 54 de carpas), los cuales revelaron que el 92.2% de los peces ($n=142$) presentaban fragmentos tipo microplástico. Se obtuvo un total de 770 fragmentos, de los cuales 740 fueron filamentos y 30 gránulos. El color del filamento más abundante fue el azul, seguidos por los negros y rojos (Fig 2.)

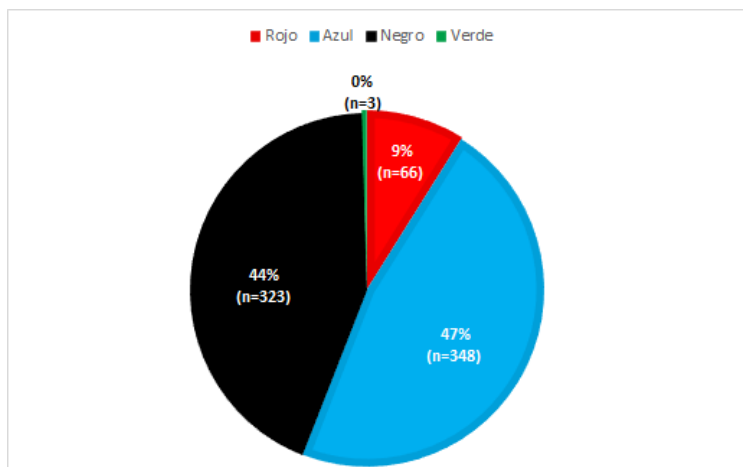


Fig 2. Colores de microplásticos tipo filamento aislados en el tracto digestivo de tilapias y carpas (datos combinados) de la Laguna de Yuriria

La abundancia relativa de microplásticos en el contenido estomacal de carpas y tilapias no fue significativamente diferente ($p = 0.883$). La media de microplásticos fue de 4.9 y 4.8 piezas respectivamente (Fig. 3).

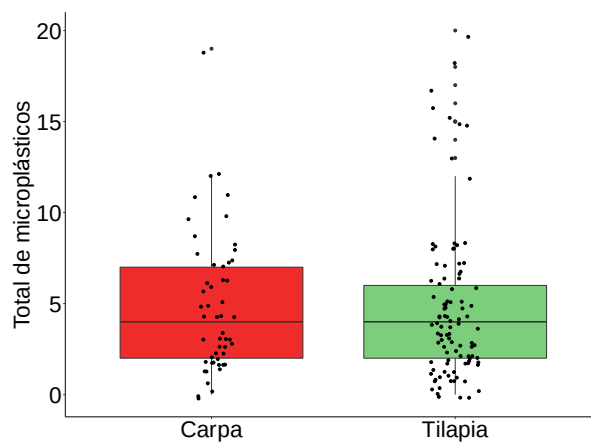


Figura 3. Fragmentos tipo microplásticos en carpas y tilapias colectadas en la laguna de Yuriria.

En el caso de la tilapia *O. niloticus*, se observó que la abundancia relativa de microplásticos fue significativamente mayor en el otoño ($p < 0.05$) con una media de 6.1 fragmentos por individuo, comparado con los muestreados en invierno que mostraron una media de 2.8 fragmentos (Fig. 4). La alta abundancia de fragmentos tipo microplásticos durante el otoño puede deberse a la entrada de altos volúmenes de agua a la laguna de Yuriria, ya sea a través de lixiviados o por el aporte del río Lerma, durante la temporada de lluvia en el verano.

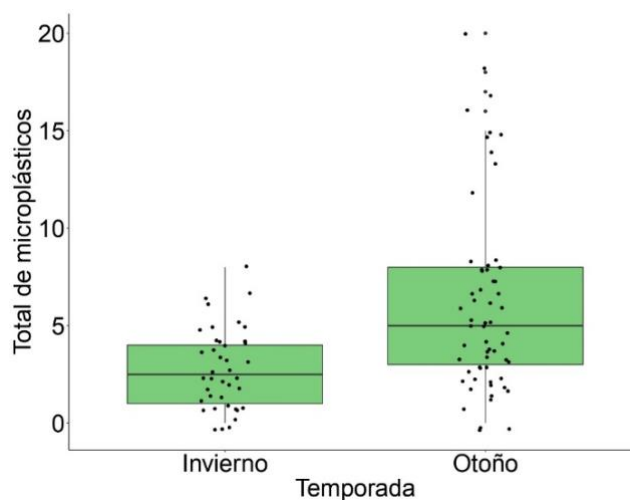


Figura 4. Total de microplásticos en tilapias (*O. niloticus*) en invierno y otoño de 2019.

La abundancia de microplástico no fue significativamente diferente en machos y hembras de tilapias ($p = 0.361$) y carpas ($p = 0.574$). Tampoco se encontró una asociación positiva entre la talla de los peces (longitud total) y la presencia de fragmentos tipo microplásticos en el contenido estomacal ($p < 0.05$).

Conclusiones

Los microplásticos son una amenaza emergente en los ecosistemas acuáticos. Este estudio evidenció fragmentos tipo microplástico en el contenido estomacal de tilapias y carpas, dos especies de importancia comercial, en la laguna de Yuriria. Este trabajo representa el primer reporte de caso de microplásticos en peces en el estado de Guanajuato. Se desconoce actualmente el impacto que puede tener los fragmentos de microplástico en la salud de esas dos especies de peces y es un aspecto que debe considerarse en futuros estudios.

Entre las perspectivas de este trabajo se encuentra realizar la caracterización química de los fragmentos aislados para conocer el tipo de polímero que lo compone.

Bibliografía

- [1] Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv*, 3(7), e1700782.
- [2] Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.-H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., & Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure. Appl. Chem*, 84(2), 377–410.
- [3] Gewert, B., Plassmann, M. M., & MacLeod, M. (2015). Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environ. Sci.-Proc. Imp*, 17(9), 1513–1521.

- [4] Duis, K., & Coors, A. (2016). Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: Sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environ. Sci. Eur*, 28(1), 2.
- [5] Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R. C., & Thiel, M. (2012). Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environ. Sci. Technol*, 46(6), 3060–3075.
- [6] Wagner, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., Fries, E., Grosbois, C., Klasmeier, J., Marti, T., Rodriguez-Mozaz, S., Urbatzka, R., Vethaak, A. D., Winther-Nielsen, M., & Reifferscheid, G. (2014). Microplastics in freshwater ecosystems: What we know and what we need to know. *Environ. Sci. Eur*, 26(1), 12.
- [7] Li, L., Geng, S., Wu, C., Song, K., Sun, F., Visvanathan, C., Xie, F., & Wang, Q. (2019). Microplastics contamination in different trophic state lakes along the middle and lower reaches of Yangtze River Basin. *Environ. Pollut*, 254, 112951.
- [8] Blettler, M. C. M., & Wantzen, K. M. (2019). Threats Underestimated in Freshwater Plastic Pollution: Mini-Review. *Water. Air. Soil. Pollut*, 230(7), 174.
- [9] Rezania, S., Park, J., Md Din, M. F., Mat Taib, S., Talaiekhosani, A., Kumar Yadav, K., & Kamyab, H. (2018). Microplastics pollution in different aquatic environments and biota: A review of recent studies. *Mar. Pollut. Bull*, 133, 191–208.
- [10] Horton, A. A., Walton, A., Spurgeon, D. J., Lahive, E., & Svendsen, C. (2017). Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Sci. Total. Environ*, 586, 127–141.
- [11] Schwarz, A. E., Ligthart, T. N., Boukris, E., & van Harmelen, T. (2019). Sources, transport, and accumulation of different types of plastic litter in aquatic environments: A review study. *Mar. Pollut. Bull*, 143, 92–100.
- [12] Yuan, W., Liu, X., Wang, W., Di, M., & Wang, J. (2019). Microplastic abundance, distribution and composition in water, sediments, and wild fish from Poyang Lake, China. *Ecotoxicol. Environ Saf*, 170, 180–187.
- [13] Barboza, L. G. A., Lopes, C., Oliveira, P., Bessa, F., Otero, V., Henriques, B., Raimundo, J., Caetano, M., Vale, C., & Guilhermino, L. (2019). Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. *Sci. Total. Environ*, 134625.
- [14] Eerkes-Medrano, D., Thompson, R. C., & Aldridge, D. C. (2015). Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritization of research needs. *Water. Res*, 75, 63–82.
- [15] Pozo, K., Gomez, V., Torres, M., Vera, L., Nuñez, D., Oyarzún, P., Mendoza, G., Clarke, B., Fossi, M. C., Baini, M., Příbylová, P., & Klánová, J. (2019). Presence and characterization of microplastics in fish of commercial importance from the Biobío region in central Chile. *Mar. Pollut. Bull*, 140, 315–319.
- [16] Cárcamo Solís, M. de L., Martín Carbajal, M. de la L., Ortega Hernández, A., & Pedroza Gutiérrez, M. del C. (2012). Desarrollo local y empresa. Universidad de Guanajuato.
- [17] Pedroza-Gutiérrez, C. (2014). Informalidad e intermediación en el sector primario: Un estudio comparativo de pesca marina y continental. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(3), 233–247.
- [18] Helfman, G. S., & Helfman, G. S. (Eds.). (2009). *The diversity of fishes: Biology, evolution, and ecology* (2nd ed). Blackwell, 291-322.
- [19] Avio, C. G., Gorbi, S., & Regoli, F. (2015). Experimental development of a new protocol for extraction and characterization of microplastics in fish tissues: First observations in commercial species from Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res*, 111, 18–26.
- [20] Bessa, F., Barría, P., Neto, J. M., Frias, J. P. G. L., Otero, V., Sobral, P., & Marques, J. C. (2018). Occurrence of microplastics in commercial fish from a natural estuarine environment. *Mar. Pollut. Bull*, 128, 575–584.
- [21] Biginagwa, F. J., Mayoma, B. S., Shashoua, Y., Syberg, K., & Khan, F. R. (2016). First evidence of microplastics in the African Great Lakes: Recovery from Lake Victoria Nile perch and Nile tilapia. *J. Great Lakes Res*, 42(1), 146–149.
- [22] Lusher, A. L., Welden, N. A., Sobral, P., & Cole, M. (2017). Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates. *Anal. Methods*, 9(9), 1346–1360.

- [23] Mizraji, R., Ahrendt, C., Perez-Venegas, D., Vargas, J., Pulgar, J., Aldana, M., Patricio Ojeda, F., Duarte, C., & Galbán-Malagón, C. (2017). Is the feeding type related with the content of microplastics in intertidal fish gut? *Mar. Pollut. Bull*, 116(1–2), 498–500.
- [24] Renzi, M., Specchiulli, A., Blašković, A., Manzo, C., Mancinelli, G., & Cilenti, L. (2019). Marine litter in stomach content of small pelagic fishes from the Adriatic Sea: Sardines (*Sardina pilchardus*) and anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *Environ Sci-Pollut. Res*, 26(3), 2771–2781.

ELUCIDACIÓN DEL PERFIL METABOLÓMICO DE LA PLANTA *Cuphea aequipetala*

Michelle Romero Hernández^a, Eunice Yáñez Barrientos^b

^a División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Guanajuato, 36050, MÉXICO. m.romerohernandez@ugto.mx

^b Departamento de Química, Universidad de Guanajuato, Pueblito de Rocha S/N, Guanajuato, Guanajuato, 36050, MÉXICO.

Resumen

Se realizó el bosquejo de una parte del perfil metabolómico de la planta *Cuphea aequipetala*, la determinación se llevó a cabo mediante el análisis de extractos con MeOH 80% de biomasa liofilizada de esta planta por HPLC-ESI-QTOF-MS/MS, los datos obtenidos tanto cromatográficos como de espectrometría de masas fueron analizados mediante el uso de los programas MS-Dial y MS-Finder, los cuales están asociados a múltiples bases de datos gratuitas.

Palabras clave: *Cuphea aequipetala*; perfil metabolómico; efecto biológico.

Introducción

En México hay una gran diversidad de plantas con diferentes propiedades y características, muchas de ellas pueden ejercer ciertos efectos farmacológicos deseables, por lo que el estudio de estas cada vez toma más relevancia en el ámbito científico. Las plantas se han utilizado en la medicina tradicional mexicana desde tiempos prehispánicos para el tratamiento de diversas dolencias y enfermedades; en este trabajo nos enfocaremos en estudiar y evaluar el perfil fitoquímico de la planta *Cuphea aequipetala* (Lythraceae), una especie altamente valorada por sus propiedades medicinales, usada para tratar dolencias e infecciones estomacales, úlceras gástricas bacterianas y no bacterianas, diarrea, disentería y diferentes tipos de tumores y hematomas, además de poseer cualidades antiinflamatorias y antioxidantes debido a la presencia de xilenos en su tallo [1]. Esta planta tiene todos los recursos para manejarse como una fitomedicina en la industria farmacéutica [2], sin embargo, actualmente su consumo de basa en té, decocciones, infusiones y cataplasmas [3].

Cuphea aequipetala es estudiada en el tratamiento para erradicar la bacteria *Helicobacter pylori* [4] que es causante de los trastornos gastrointestinales; se ha determinado la presencia de flavonoides, específicamente quercetina, a partir de ensayos colorimétricos y mediante el método Folin-Ciocalteu y ALC en extractos acuosos y metanólicos en las puntas de sus raíces. Esta maravillosa planta, además tiene efectos antiproliferativos y apoptóticos contra células tumorales del carcinoma en el colon y próstata humano [5], debido al alto contenido de compuestos fenólicos totales, principalmente ácido gálico y manitol; además, se ha reportado la presencia de trolox en su flor, así como taninos alcaloides y sesquiterpenos.

Cuphea aequipetala podría ser un sustituto del aceite de almendra de palma y de coco debido al alto contenido de ácido caprílico, ácido mirístico, ácido láurico y ácido linoleico, pero también podría servir como una fuente natural de ácido caprílico, que actualmente proviene principalmente de productos petroquímicos [6]; las propiedades térmicas de los lípidos se obtienen utilizando DSC [7].

Metodología

Los datos con los cuales se trabajó en este proyecto se obtuvieron a partir de extractos metanólicos (80% metanol, 50mg) de la biomasa liofilizada de *Cuphea aequipetala*. El análisis se llevó a cabo en el espectrómetro maxis impact ESI-QTOF-MS equipado con Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics) el cual está acoplado al sistema 3 000 RLSCnano operado por Hystar 3.2 software (Thermo Scientific Dionex). Previo a la columna cromatográfica la muestra pasó por una trampa capilar ZORBAX 300 SB-C18 (5 x 0.3 mm, 5µm), la columna utilizada fue ZORBAX 300-Extend -C18 capilar (150 X 0.3 mm x 3.5µm); Se inyectaron 10µL del extracto de la planta diluido (12% de metanol) el cual pasó a la trampa capilar con un flujo 15 µL min⁻¹; después de 2 min, el flujo en columna fue de 3.5 µL min⁻¹. Las fases utilizadas móviles fueron: (A) ácido fórmico 0.1% v/v y (B) ácido fórmico en acetonitrilo 1% v/v 4° C, el gradiente de elución fue 0 - 35 min de 8%-98% de (B), de 36 - 38 min 98% de (B); 38 -40 min 8% de (B), se aplicó un lavado de 10 min con (B) al 8%, el tiempo total

de la corrida cromatográfica por muestra fue de 50 min. El rango de adquisición fue 100-1400 de (m/z).

Procedimiento de identificación.

La identificación de los posibles metabolitos presentes en los extractos obtenidos de la planta *Cuphea aequipetala* se realizó a partir de los resultados cromatográficos y de espectrometría de masas, utilizando los programas de acceso gratuito MS-Dial y Ms-Finder.

El programa MS-Dial es un visor de datos de espectrometría de masas gratuito, que tiene funciones como la desconvolución identificación de características moleculares, alineación de cromatogramas, análisis estadístico y extracción de datos en formatos comunes como .CVS para su manejo en cualquier sistema de cómputo. La interfase de este programa es la que se muestra en la *figura 1*, bastante amigable.

Una vez realizado el proceso de alineación de cromatogramas y desconvolución, se llevó a cabo la selección de las principales características moleculares, las cuales fueron exportadas al programa MS-Finder para la búsqueda de la fórmula, estructura y nombre de los candidatos más probables.

El programa MS-Finder al igual que el MS-Dial es de acceso gratuito; es un elucidador de estructuras, en el cual las fórmulas moleculares de los iones precursores son determinadas a partir de la masa exacta, relación isotópica y la información de los iones producto; por otro lado las estructuras son clasificados de acuerdo a la ponderación del score en el cual se consideran las energías de disociación, exactitud de las masas, fragmentación de enlaces y las 9 reglas de reacomodo de hidrógenos. Las principales funciones de este programa son: la predicción de fórmulas, realización de anotaciones de fragmentos y elucidación de estructuras con base en espectros de masas desconocidos.

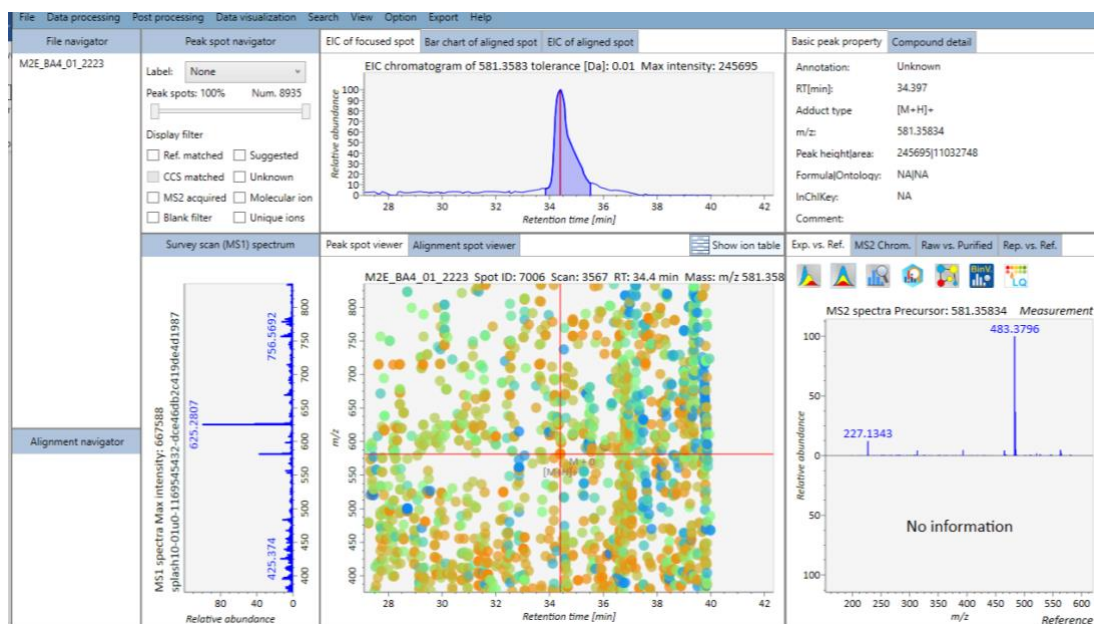


Figura 1. Programa universal para metabolómica no dirigida, MS-Dial. Versión 135802067. Muestra cargada: Extracto de *Cuphea aequipetala* en MeOH al 80%.

Se realizó la identificación de los compuestos seleccionados en el programa MS-Finder (Figura 2), con el fin de generar una fórmula molecular, nombre y estructura; se escogieron los candidatos que mostraron mayor concordancia con los compuestos de las bibliotecas (un mayor valor de score, y un error menor a 5 ppm); MS-Finder realiza una comparación de los compuestos con su biblioteca, de manera que proporciona una posible fórmula molecular, su nombre y el tipo de compuesto o metabolito. Finalmente se identificó la familia del compuesto elegido, y se confirmó su origen natural realizando una investigación sobre el compuesto en bases de datos como Scopus, Science Direct y Web of Science. Se enlistaron los datos obtenidos, identificando en cada compuesto su valor de relación m/z, fórmula generada, nombre del candidato y error (ppm).

Resultados

Tomando en cuenta los criterios de selección anteriormente descritos, se presentan los resultados obtenidos.

Para la mayoría de estos compuestos se han reportado múltiples efectos en la salud del ser humano y animales, como lo es para los flavonoides, péptidos y taninos hidrolizables los cuales se han caracterizados por su capacidad antioxidante, efectos antimutagénicos, anticarcinogénicos y propiedades antimicrobianas; los alcaloides por sus efectos analgésicos y hormonales.

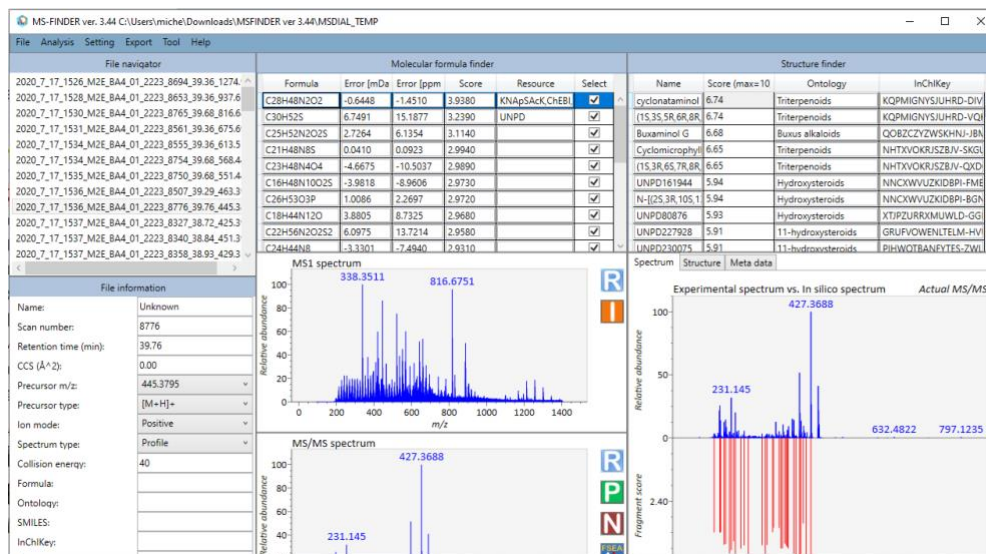


Figura 2. Programa universal para la anotación compuesta, MS-Finder. Versión 263160464. Punto cargado con masa exacta de 581 y tiempo de retención de 34.4 min.

Por otro lado los terpenos del tipo triterpenoides y sesquiterpenoides se les han atribuido propiedades antioxidantes, efectos analgésicos y antiinflamatorios; la piperina influye en el aumento de la secreción de jugos digestivos, y mejora la digestión de los alimentos; el

aminoácido prolina involucrado en la producción de colágeno, fundamental para la reparación, curación y mantenimiento del tejido muscular, conectivo y óseo; finalmente, las quinoxalinas y la artemisia se han estudiado de acuerdo con sus actividades citotóxicas contra diversas líneas celulares.

Tabla 1. Candidatos de Compuestos encontrados por MS-Finder

m/z	Fórmula	Tipo de compuesto propuesto	Error ppm
274.09	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₂	Flavonoides	-1.3195
569.3954	C ₃₄ H ₅₂ N ₂ O ₅	Sesquiterpenoides	-0.8811
743.3145	C ₃₈ H ₆₃ O ₁₂ P	Artemisininas	-0.6863
522.3657	C ₂₇ H ₄₇ N ₅ O ₅	Péptidos híbridos	-1.3501
445.3261	C ₂₃ H ₄₄ N ₂ O ₆	Prolina y derivados	2.5063
299.2658	C ₁₃ H ₃₀ N ₈	Piperazinas	2.7473
445.3779	C ₂₈ H ₄₈ N ₂ O ₂	Triterpenoides	2.1496
443.186	C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O ₃ S	Hidroquinolinas	-0.0314
743.4104	C ₃₆ H ₅₄ N ₈ O ₉	Oligopéptidos	-2.3548
427.3155	C ₂₃ H ₄₂ N ₂ O ₅	Ésteres de ácidos grasos	2.695
893.7745	C ₆₂ H ₁₀₀ O ₃	Colesterol y derivados	0.0263
365.115	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₅	Xantenos	-4.9488
505.19	C ₂₉ H ₂₈ O ₈	Taninos hidrolizables	1.1787
583.1052	C ₂₄ H ₁₈ N ₆ O ₁₂	Quinoxalinas	0.5953
429.3844	C ₂₈ H ₄₈ N ₂ O	Alcaloides	-1.0724

Cuphea aequipetala ha sido empleada como infusión para el tratamiento de diversos padecimientos a lo largo de la historia, pues exhibe efectos gastroprotectores, antibacterianos y antiinflamatorios, útiles para el tratamiento de úlcera gástrica bacteriana o no bacteriana; además presenta una actividad citotóxica significativa y selectiva contra las células de carcinoma de próstata humano, por lo que podría considerarse como una opción terapéutica contra el cáncer. Diversos autores han estudiado los diferentes compuestos presentes en la planta, mencionando la presencia de alcaloides, flavonoides, glucósidos y lactonas en extractos metanólicos de la planta.

Conclusiones

En la actualidad las sustancias derivadas de plantas se han vuelto de gran interés debido a su procedencia natural y sus versátiles aplicaciones; en este trabajo se logró la identificación de algunos tipos de compuestos que conforman una parte del perfil metabolómico de la planta *Cuphea aequipetala*, mediante el uso de los programas MS-Dial y MS-Finder. Algunos de los tipos de compuestos identificados fueron: flavonoides, péptidos, taninos hidrolizables, alcaloides, terpenos, quinoxalinas, piperinas y el aminoácido prolina; de los cuales se han descrito efectos biológicos en la salud del ser humano como propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerígenas, efectos analgésicos y gastro protectores, debido a lo anterior, se afirma que las plantas son una gran fuente de fitoquímicos con propiedades terapéuticas.

Bibliografía

- [1] Bye R, Romero I (2014) “Evidence of the anti-Helicobacter pylori, gastroprotective and anti-inflammatory activities of *Cuphea aequipetala* infusion”, *J Ethnopharmacol* 151, (2),990–998.
- [2] Jacobo-Herrera Nadia J, Jacobo-Herrera Frida E, Zentella-Dehesa Alejandro, Andrade-Cetto Adolfo, Heinrich Michael, Pérez-Plasencia Carlos (2016) “Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer”, *Journal of Ethnopharmacology* 179,(1),391-402.
- [3] Martínez-Bonfil, B.P., Cruz-Hernández, A., López-Laredo, A.R. (2014) “Effects of culture medium and auxins on growth of adventitious root cultures of *Cuphea aequipetala* Cav. and their ability to produce antioxidant compounds”, *Plant Cell Tiss Organ Cult* 118, 401–408.
- [4] Asghar Sharifi, Mohsen Azizi, Parastoo Moradi-Choghakabodi, Shapour Aghaei, Arsalan Azizi, (2019) “In vitro anti-Helicobacter pylori activity of aqueous extract from Persian Oak testa”, *Chinese Herbal Medicines* 11, 394-399.
- [5] Aguilar-Rodríguez, S., Echeveste-Ramírez, N.L., López-Villafranco, M.E., Aguilar-Contreras, A., Vega-Ávila, E. & Reyes-Chilpa, R. (2012), "Ethnobotany, analytical micrograph of leaves and stems and phytochemistry of *cuphea aequipetala* cav. (Lythraceae): A contribution to the herbal pharmacopoeia of the united mexican states (FHEUM)", *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 11,(4), 316-330.
- [6] Hirsinger, F. (1985) Agronomic potential and seed composition of *cuphea*, an annual crop for lauric and capric seed oils”, *J Am Oil Chem Soc* 62,76–80.
- [7] Crane, J., Miller, A.L., Van Roekel, J.W. (2003)"Triacylglycerols determine the unusual storage physiology of *Cuphea* seed” *Planta* 217,699–708.

ESTANDARIZACION DE UNA TÉCNICA DIAGNOSTICA DE MASTITIS SUBCLINICA EN CABRAS

Esthela Jaqueline Alatorre Ornelas¹, Daniel Fernando Carreón Delgado¹, Dania Verónica Villegas Quintero¹, Paulina Irais Aguilar Pérez², Francisco Javier Rangel Mata³, Juan Pablo Huchin Mian³, Patricia Nayeli Alva Murillo³

¹Licenciatura Biología Experimental, División en Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto. México. C.P. 36000. jaqueline.e.a.o@gmail.com

²Ingeniería en Agronomía, Instituto Tecnológico del Valle de Morelia, Carretera Morelia Salamanca km 6.5, Col. Los Ángeles, Morelia, Michoacán, México. C.P. 58100

³Departamento de Biología, División en Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto. México. C.P. 36000. pn.alva@ugto.mx

Resumen

Guanajuato es el 2do estado productor de leche caprina en México, este ganado sufre de enfermedades como la mastitis caprina (MC), principalmente de origen bacteriano. Hay técnicas diagnósticas rápidas estandarizadas para el ganado lechero bovino, pero aún no se cuenta con una técnica específica para las cabras. El objetivo de este estudio fue estandarizar una técnica diagnóstica de MC. Se realizaron modificaciones de la prueba de Wisconsin (PW): en un tubo especial se mezcló un volumen de leche con un volumen del reactivo de california, se agitó 10, 15 y 20 s, y se midió el volumen remanente (volumen restante después de mezclar la leche con el reactivo e invertir los tubos). Se aislaron las células somáticas (CS) de la leche y se contaron con hemocitómetro y/o citómetro de flujo. Se consideró al cultivo bacteriano (CB) como la prueba de oro. Se muestrearon al azar 50 cabras (99 muestras) de tres municipios distintos. De acuerdo con el CB, 19 muestras provenían de ubres sanas y 80 de enfermas (mastitis clínica o subclínica). La comparación estadística de las medianas del volumen remanente (agitando 15 s) por grupo (cabras sanas, sin signos clínicos y con signos clínicos) no mostró diferencia significativa ($p=0.114$), pero sí al aumentar la agitación a 20s ($p=0.022$). No se observó una asociación significativa entre el volumen remanente (mm) y el conteo de CS (células/mL) en muestras agitadas durante 10 y 15 s pero sí en muestras agitadas a 20 s ($p < 0.001$; $R^2= 0.43$). Los datos sugieren que existe una relación significativa entre el volumen remanente de la PW y el número de CS cuando se incrementa el tiempo de agitación de la muestra.

Palabras clave: *prueba de Wisconsin, Guanajuato, rebaño de traspatio*

Introducción

El inventario nacional de caprinos en México asciende a cerca de 8.7 millones de cabezas, que producen 167,000 toneladas de leche (1.1% de producción mundial) y 48,000 toneladas de carne (0.89% producción mundial) [1]. Este sector se concentra principalmente en zonas áridas y semiáridas que corresponden al 60% del país, extendiéndose de sur a norte. Siendo los principales estados según censos: Puebla, Oaxaca, San Luis Potosí, Guerrero, Coahuila, Zacatecas, Guanajuato y Michoacán [1]. El estado de Guanajuato es el segundo mayor productor de leche caprina a nivel nacional con 43,767 toneladas [2].

A pesar de esta importancia económica, existen pocos estudios sobre la prevalencia de enfermedades en el ganado caprino que puedan afectar el rendimiento productivo. Después de las condiciones de manejo y métodos para ordeñar existen otros factores que merman la calidad y la producción de leche en caprinos, estos son diferentes enfermedades, que alteran el estado corporal normal del animal y por lo tanto la producción de leche. Dentro de las principales enfermedades que atacan a la cabra se encuentra la mastitis, paratuberculosis, fiebre de embarque, tétanos, queratoconjuntivitis, brucelosis y enfermedades parasitarias. La mastitis caprina es uno de los principales factores que afectan directamente a la producción de leche. La etiología de la mastitis puede ser infecciosa o traumática y se describe como una inflamación de la glándula mamaria que provoca cambios físicos en la ubre y en la composición de la leche [3]. La enfermedad se presenta en forma clínica y subclínica. En su forma clínica se caracteriza por signos, como inflamación con calor, enrojecimiento, aumento y dolor de la ubre al tacto, así como grumos, pus o sangre en la leche. En la subclínica, los signos clínicos pasan inadvertidos, por lo cual es más difícil detectarla, solamente se percibe una disminución en la calidad y en la producción de la leche. La mastitis subclínica es una infección latente que no produce una alteración visible en las ubres, pero podría causar la disminución del rendimiento productivo del animal. La afección subclínica puede representar hasta un 70% de los casos [4].

La detección de la mastitis subclínica, en otros animales de interés pecuario, como el ganado lechero bovino se realiza mediante la prueba de Wisconsin, la cual ya está validada, pero su aplicación en el ganado caprino no ha sido estandarizada, ya que factores como la raza, edad, etapa de lactancia, nivel de producción, condiciones de manejo, infecciones intramamarias y el tipo de secreción apocrina de la glándula mamaria, son los causantes de la mayor presencia de células somáticas en leche de cabra [5]. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue optimizar una prueba rápida para el diagnóstico de la mastitis caprina en rebaños lecheros de Guanajuato, correlacionar el conteo de células somáticas (CS) con la presencia de microorganismos patógeno para su validación en esta especie.

Metodología

Sitio de estudio y toma de muestras de leche de cabra.

La toma de muestra se llevó a cabo en dos localidades del municipio de Guanajuato: Nochebuena (20°59' 3", N; -101° 18' 29" W) y Barrio de la presa (21°00'14.8"N; -101°15'06.2" W), con clima cálido subhúmedo y temperatura media anual de 18°C, siendo la temperatura más alta 30°C en los meses de mayo y junio, y la más baja de

5.2°C en el mes de enero. Tienen una precipitación anual promedio de 650 mm. También se tomaron muestras en la localidad de Álvaro Obregón, municipio de León, Guanajuato (21°00'14.8" N; 101°15'06.2" W), con clima templado, temperatura media anual de 19.2°C, y una precipitación pluvial media anual de 697.6 mm.

El muestreo se llevó a cabo de junio a noviembre de 2019. Se tomaron las muestras de 50 cabras (las dos ubres), 25 del hato ubicado en Nochebuena, 14 cabras del Barrio de la presa y 11 de Álvaro Obregón. Los animales se seleccionaron al azar (sanos o no) y se hizo una validación externa de la glándula mamaria del animal. Después se limpió la ubre con una solución antiséptica (Sanitor Forte, Aranda) y se descartó el primer chorro de leche para evitar contaminación cruzada. Posteriormente, se tomó la muestra de leche y se colocó en un tubo de 15 mL para realizar la prueba modificada de Wisconsin. Además, se colectaron 7 mL de leche en tubos cónicos de 50 mL previamente estériles, y se almacenaron en hielo (~5°C) hasta llevarse al laboratorio (Laboratorio de Inmunomicrobiología Molecular y Laboratorio de Ecología del Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato) en donde fueron procesadas el mismo día.

Prueba modificada de Wisconsin.

La prueba modificada de Wisconsin se realizó según las especificaciones del proveedor (Diagmastein, Sanfer). Se colocaron 3 mL de leche en tubos especiales para esta prueba (con marcas en cada mm). Se adicionó el reactivo de California (el reactivo se diluyó con agua destilada en proporción 1:1). Se taparon los tubos con un corcho perforado con una abertura en el centro de 1 mm y posteriormente se agitó vigorosamente durante 10, 15 o 20 s dependiendo del tratamiento. Se dejaron reposar los tubos durante 10 s, se voltearon verticalmente y se dejó que saliera la mezcla durante 15 s. Se regresó la gradilla a posición normal y se hizo la lectura del volumen remanente.

Análisis Microbiológico.

El análisis microbiológico se realizó para corroborar que la leche provenía de un animal sano o enfermo. Para ello, las muestras de leche se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento. Se agitaron con vórtex (baja velocidad) y 100 µL se inocularon en cajas de Petri con agar sangre (MCD Lab), Mac Conkey, (MCD Lab) o Luria Bertani (LB, 5 g NaCl, 10 g peptona de caseína, 5 g extracto de levadura, 15 g agar bacteriológico, para 1 L), distribuyéndolo homogéneamente. Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche. Una vez cumplido el tiempo, se realizó el análisis macroscópico de las colonias, las colonias distintas se criopreservaron en glicerol (al 30%). Adicionalmente, se llevó a cabo la tinción de Gram para identificar si las bacterias recuperadas eran Gram positivas o negativas. Actualmente se continúa trabajando en la caracterización de los aislamientos bacterianos.

Aislamiento de células somáticas de leche y conteo por citometría de flujo.

Se tomaron 5 mL de la muestra de leche en tubos estériles de 15 mL, se centrifugó (2200 rpm por 5 min) y se decantó el sobrenadante. El paquete celular se re suspendió en 2 mL de buffer fosfato salino (PBS) y se pasó a un tubo nuevo. Se lavó la pastilla 4 veces con PBS estéril (pH 7.4), luego se centrifugó a 2,200 rpm por 5 min y se re suspendió en 200 μ L de PBS con EDTA (10 mM). Se adicionaron 200 μ L de paraformaldehído al 8% en una relación 1:1 (concentración final de paraformaldehído al 4%). Se incubaron 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2,200 rpm por 5 min y se lavó la pastilla 2 veces con PBS estéril. Posteriormente, se resuspendió la pastilla en 200 μ L de PBS filtrado y se guardó a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo (MoFlo XDP de Beckman Coulter). Adicionalmente, se contaron las células en una cámara de Neubauer.

Resultados

Los resultados mostraron que el 14% (n= 7) de los animales analizados presentaron mastitis clínica, resultados que coincidieron con la prueba microbiológica. Algunos autores se basan en el cultivo bacteriano para el diagnóstico de la infección en la glándula mamaria [6]. En este estudio 19 muestras (19.2%) fueron negativos al análisis microbiológico en los medios de cultivo de agar LB, sangre y McConkey. Las muestras restantes (80.8%) fueron positivas, entre ellas las 7 provenientes de cabras con mastitis clínica, ya que se observó crecimiento bacteriano en al menos uno de los medios de cultivo. Esto sugiere que las 73 glándulas restantes pudieran estar cursando un cuadro de mastitis subclínica ya que dieron positivo a la prueba microbiológica. Además, se recuperaron 228 aislamientos bacterianos con distintas características macroscópicas y microscópicas, los cuales se están caracterizando.

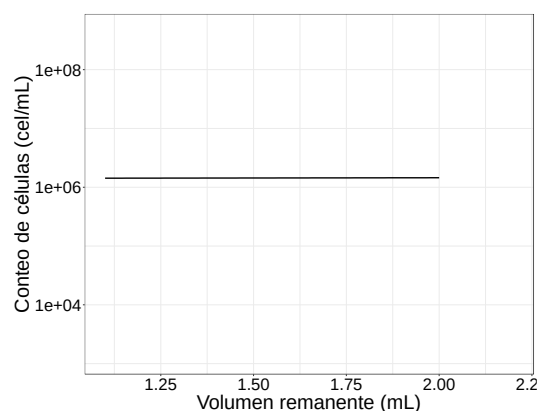
Existen pruebas diagnósticas de mastitis aplicadas en el campo para el ganado bovino que permiten determinar si el animal presenta mastitis subclínica como la prueba de Wisconsin, en donde se le añade a la muestra de leche que se quiere evaluar un detergente, el cual produce una reacción de lisis en las células somáticas (CS) presentes en la muestra, a mayor cantidad de células mayor cantidad de producto lisado y por lo tanto una mayor viscosidad de la leche [7]. Sin embargo, esta prueba no está estandarizada en cabras. Basados en el análisis microbiológico como prueba de oro de la mastitis subclínica, se comparó estadísticamente a las medianas del volumen remanente registrado en la prueba de campo por grupo (cabras sanas, sin signos clínicos y con signos clínicos). Cuando la leche y el reactivo de california se agitan por 15 s no existe diferencia significativa entre los grupos ($p = 0.114$), esto puede deberse a la dispersión de los datos obtenidos. Al aumentar el tiempo de agitación de la mezcla a 20 s, se observó diferencia significativa ($p = 0.022$) entre las medianas del grupo con signos clínicos y el sano.

Sin embargo, existen reportes que cuestionan la validez del cultivo microbiológico como la prueba de oro en rumiantes [6]. Al considerar esto, se estableció el supuesto de que las cabras con mastitis clínica se podían distinguir de aquellas que no presentaran signos clínicos, sin saber si estos últimos animales son sanos o tienen mastitis subclínica. Se realizaron análisis estadísticos entre los grupos de cabras (i) sin signos clínicos y (ii) con signos clínicos. Se observó diferencias significativas entre los grupos ($p = 0.012$) al comparar las medias del

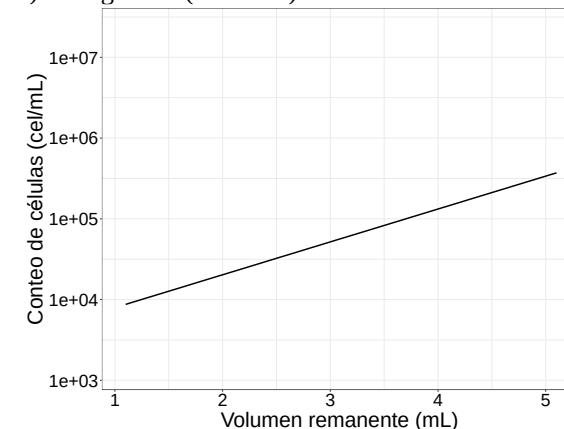
conteo de CS/mL. La media de las cabras sin signos clínicos y con signos clínicos fue de 1,647,610 y 5,523,125 células/mL, respectivamente.

Al realizar las regresiones lineales simples entre el volumen remanente (mL) y el conteo de CS (células/mL) en los distintos tiempos de agitación, se observó que conforme aumenta el tiempo de agitación aumenta la asociación entre las variables (Figura 1). Lo que nos lleva a sugerir que si el tiempo de agitación se sigue incrementando es probable que mejore la relación entre las variables. Por lo cual, proponemos, a futuro, aumentar el tamaño de muestra y un tiempo de agitación mayor a 20 s.

A) 10 segundos ($R^2 = 0.08$)



B) 15 segundos ($R^2 = 0.20$)



C) 20 segundos ($R^2 = 0.43$)

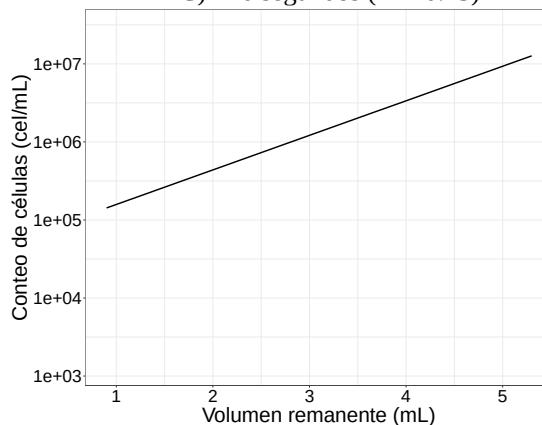


Figura 1. Relación entre el volumen remanente (mL) y el conteo de células (células/mL). El volumen remanente se obtuvo después de mezclar la muestra de leche y el reactivo de California por (A) 10 s, (B) 15 s y (C) 20 s.

Al llevar a cabo la toma de muestras en las tres granjas, se realizó una breve entrevista a cada encargado con la finalidad de recolectar los siguientes datos: número de identificación del animal, edad, número de parto, periodo de lactancia (meses), cantidad de leche producida, dieta, episodios de mastitis que ha tenido el animal, tratamiento que han empleado, y finalmente mediante la valoración médica se determinó si la cabra tenía mastitis clínica. Los datos obtenidos mostraron que lamentablemente en el sistema de producción de traspato

(ordeña manual) no se cuenta con un control en cuanto a la salud, alimentación y producción de los animales, debido a que la mayoría de la información solicitada no fue brindada adecuadamente, por lo que no se pudieron establecer factores de riesgo asociados con la mastitis en cabras. No obstante, esta es un área de oportunidad que se puede explorar para brindarle herramientas al caprinocultor y que mejore así la producción e higiene en la granja.

Conclusión

La prueba rápida de Wisconsin estandarizada en este estudio no permitió discernir entre una infección de mastitis subclínica y animales sanos. Sin embargo, los resultados sugieren que un aumento en el tiempo de agitación de la muestra de leche y el reactivo de California incrementa la asociación entre el conteo de células somáticas y el volumen remanente de leche, el cual es un indicador de mastitis. Por lo tanto, para diagnosticar infecciones subclínicas se sugiere seguir estandarizando la prueba aumentando el tamaño de muestra analizada y el tiempo de agitación, así como la inclusión de otra prueba de oro: prueba enzimática de N-acetyl- β -d-glucosaminidasa (NAGasa), debido, a que la cantidad de ADN bacteriano en muestras de leche puede ser asociado con concentraciones de NAGasa, reflejando la reacción inflamatoria de la glándula mamaria (sus concentraciones aumentan al incrementar la gravedad de infección). Estos ensayos son útiles para complementar un diagnóstico de mastitis por análisis bacteriológico.

Bibliografía

- [1] Andrade-Montemayor.H.M, (2017), Producción de Caprino en México, *Tierras caprino*, p, 18-24. Recuperado de: <https://www.ces.ncsu.edu/wp-content/uploads/2017/07/Produccion%CC%81n-de-Caprino-en-Me%CC%81xico.pdf? fwd=no>
- [2] Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, SAGARPA, 2018. Tomado de: <https://www.gob.mx/pronabive/prensa/coahuila-lider-en-leche-de-caprino?idiom=es>
- [3] Philpot, W. N., & Nickerson, S. C. (1992). *Mastitis: el contra ataque* (No. SF 967. M3. P5418 1992).
- [4] Plummer, P. J., & Plummer, C. (2012). Diseases of the mammary gland. In *Sheep and Goat Medicine* (pp. 442–465).
- [5] Marín, MP, Fuenzalida, MI, Burrows, J, & Gecele, P. (2010). Recuento de células somáticas y composición de leche de cabra, según nivel de producción y etapa de lactancia, en un plantel intensivo de la zona central de Chile. *Archivos de medicina veterinaria*,
- [6] Koop, G., Nielen, M., & van Werven, T. (2012). Diagnostic tools to monitor udder health in dairy goats. In *Veterinary Quarterly*.
- [7] Vázquez, Hugo & Wilfried, Wolter & Cedeño Carlos, Bedolla. (2007). Métodos de detección de la mastitis.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo brindado por el Dr. Bernardo Franco Bárcenas al utilizar el citómetro de flujo. Este trabajo fue apoyado por la Secretaría de Innovación, Ciencia y Educación Superior dentro de la convocatoria de Empuje Científico y Tecnológico para el Ejercicio Fiscal de 2019 Modalidad: Apoyo a Investigadores Jóvenes (IJ-19-119).

ESTUDIO DE OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ELECTROPOLIMERIZACIÓN DE EDOT EN ULTRAMICROELECTRODOS DE Pt PARA LA DETECCIÓN DEL ANIÓN RADICAL SUPERÓXIDO

Cinthy Ximena Luna González^a, Cristina Corona Elizarrarás^a, Silvia Gutiérrez Granados^a, Sophie Griveau^b, Mario Alpuche-Avilés^c

^a Departamento de Química, Universidad de Guanajuato, Cerro de la Venada s/n Col. Pueblito de Rocha, Guanajuato, Guanajuato, 36040, MÉXICO. cx.lunagonzalez@ugto.mx

^b Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS), Chimie Paris Tech-PSL Recherche Université, 11 Rue Pierre et Marie Curie, Paris, Île de France, 75005, FRANCIA.

^c Department of Chemistry, University of Nevada, 1664 N Virginia St, Reno, Nevada, 89557, EEUU.

Resumen

Se optimizaron las condiciones de electropolimerización para llevar a cabo la modificación de la superficie de un ultramicroelectrodo de Pt con un polímero conductor (poli-3,4-etilendioxitiofeno) PEDOT. Este ultramicroelectrodo modificado presenta características de permoselectividad para peróxido de hidrógeno, a la vez que actúa como barrera al paso de posibles interferentes redox como, por ejemplo: ácido úrico, ácido ascórbico, xantina y superóxido de potasio. Para posteriormente inmovilizar la enzima superóxido dismutasa y detectar el anión radical superóxido.

Palabras clave: *Polímeros conductores, PEDOT, ultramicroelectrodos modificados.*

Introducción

Los polímeros conductores (PCs) son considerados una nueva generación de materiales orgánicos que se distinguen por la presencia o alternancia de enlaces simples y dobles entre los átomos de carbono a lo largo de la cadena principal del polímero [1]. Los polímeros conductores pueden sintetizarse electroquímicamente, sólo está limitado a sistemas en los cuales el monómero puede oxidarse al aplicarse un potencial de formación de iones radicales intermedios para la polimerización; además es posible sintetizar películas delgadas, atrapar moléculas en el polímero conductor, así como un dopaje simultáneo de la película.

Se deben considerar un número importante de variables, incluyendo el tiempo de deposición y temperatura, el solvente, electrolito, sistema de electrodos y la carga para la deposición. Cada uno de estos parámetros tiene un efecto en la morfología de la película (grosor y topografía), mecánica, conductividad, propiedades que impactan directamente en la utilidad del material para la aplicación deseada [2].

El polímero poli (3,4-etilendioxitiofeno) (PEDOT) es un polímero conductor estándar que puede ser sintetizado electroquímicamente. Es un polímero muy conductor de bajo potencial

de oxidación, altamente estable (térmica y ambientalmente) [3,4] y electroquímicamente activo; altamente insoluble en casi todos los disolventes, cambia de color dependiendo del potencial aplicado, es prácticamente transparente bajo la forma de una fina película oxidada, ofrece estructuras superficiales únicas para la inmovilización de biomoléculas, como proteínas y excelentes propiedades electroquímicas para la detección [5]. Un revestimiento de PEDOT muestra el efecto más marcado y la mejor repetibilidad de una señal.

La mayoría de los estudios relacionados con la electropolimerización del EDOT se han llevado a cabo en disolventes orgánicos, debido a la baja solubilidad del monómero en el agua, a pesar de esto, el agua sigue siendo el medio ideal por razones económicas y ambientales.

Los PCs se utilizan ampliamente como transductores que integran las señales producidas por los elementos de detección biológica. Un elemento sensorial biológico, en este caso se utilizará la enzima superóxido dismutasa (SOD), que detecta un analito específico, el anión radical superóxido, produciendo una señal bioquímica que se transfiere al transductor, que es el PEDOT, finalmente produce una señal digital electrónica que es proporcional a la cantidad de analito presente. Así el PC media la transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo, sin embargo, el mecanismo exacto no se comprende completamente.

El uso de microelectrodos para llevar a cabo la detección tiene ciertas ventajas analíticas debido a su dimensión, en comparación con los electrodos convencionales. El pequeño tamaño de la interfaz ayuda a aumentar la tasa de transferencia de electrones entre la enzima y el electrodo. Debido a la mayor tasa de transferencia de electrones, la presencia de incluso una especie de interés a nivel nanomolar (nM) puede ser cuantificada con mayor precisión.

El uso de electrodos modificados a base de PEDOT y la SOD puede ser muy efectivo, debido a su alta selectividad, especificidad y sensibilidad para la detección del superóxido [6, 7].

Metodología

Caracterización electroquímica

Como sistema electroquímico se utilizó una celda convencional de tres electrodos, empleando como electrodo de trabajo un ultramicroelectrodo de Pt ($d = 25 \mu\text{m}$) modificado con PEDOT, alambre de platino como contraelectrodo y como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl. Los experimentos electroquímicos se realizaron en un potenciostato galvanostato Epsilon BAS, con el uso de una caja de Faraday, para suprimir el ruido de fondo. Se utilizó una solución de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mM, como electrolito soporte se usó buffer de fosfatos PBS 0.01 M (tabletas de PBS de Sigma-Aldrich) pH 7.4; velocidad de barrido 25 mV/s y variando v (5, 10, 15, 20 y 25 mV/s).

Electropolimerización de EDOT

Se empleó una solución 5 mM de 3,4-etilendioxitiofeno (EDOT), en sulfonato estireno de sodio (NaSS), 0.05 M.

Los electrodos de Pt ($d = 25 \mu\text{m}$) fueron modificados con el polímero conductor PEDOT. La película de PEDOT fue depositada usando voltamperometría cíclica entre -0.6 y 1.2 V vs Ag/AgCl a una velocidad de 200 mV/s por 10 ciclos.

Efecto de interferentes

Debido a la complejidad de los sistemas biológicos se eligieron especies que se encuentran principalmente en sistemas biológicos y se caracterizaron por diferentes cargas y tamaños. Se seleccionaron: ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU), superóxido de potasio (KO_2), xantina oxidasa (XA) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (30% en agua).

Se prepararon soluciones de todas las especies seleccionadas como interferentes: AA, AU, XA, H_2O_2 y KO_2 . Estas especies se probaron a una concentración de $500\ \mu\text{M}$, en PBS 0.01M .

Resultados

El ultramicroelectrodo se caracterizó electroquímicamente. Se usó voltamperometría cíclica, en una ventana de potencial de 0 a 500 mV, variando la velocidad, en una solución de ferrocianuro de potasio 5 mM. En el voltamperograma (figura 1) se puede distinguir el estado estacionario, propio del comportamiento de los ultramicroelectrodos. La señal se observa a un potencial de 225 mV. Al incrementar la velocidad, incrementa la corriente.

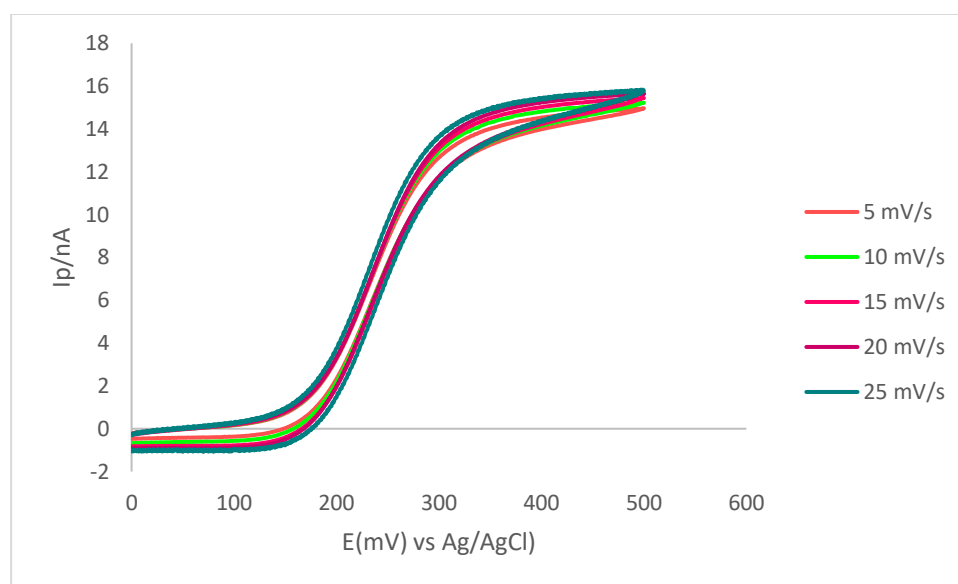


Figura 1. Voltamperograma cíclico del UME-Pt, en una sonda de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mM en PBS 0.01M , barrido de potencial (5 – 25 mV/s).

El monómero, EDOT, se oxida a un potencial mayor a 1.0 V vs Ag/AgCl y después polimerizado a su forma PEDOT en una solución acuosa de 4-vinilbencensulfonato de sodio, que además sirve como electrolito soporte. La corriente anódica se incrementa de ciclo en ciclo debido al crecimiento de la película conductora de PEDOT, lo que confirma la formación de polímero y su conductividad. Además, la superficie activa del electrodo se incrementó con el proceso de polimerización, lo que resulta en un aumento de corriente. El PEDOT es muy estable en electrolitos acuosos y no se puede despegar de la superficie del Pt hasta después de un largo proceso electroquímico.

La oxidación del monómero se hace evidente a 1.2 V con una corriente máxima de 50 nA (figura 2). Con este potencial la polimerización procede, proporcionando un material azul oscuro en la superficie conductora.

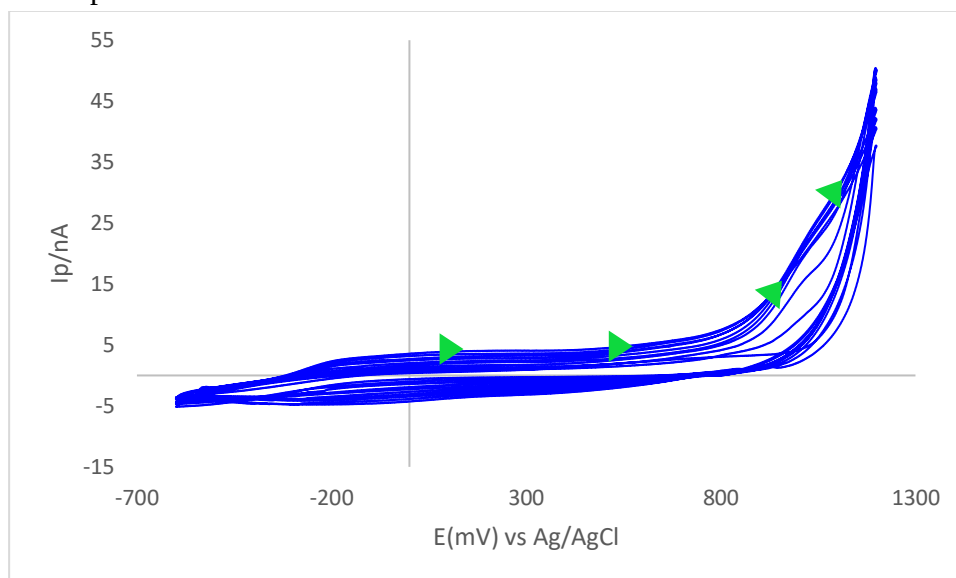


Figura 2. Voltanperograma cíclico de la electropolimerización de EDOT en el ultramicroelectrodo de Pt.

El compuesto PEDOT:NaSS resultante obtenido del proceso de electropolimerización es insoluble en agua y tiene una alta conductividad iónica y eléctrica.

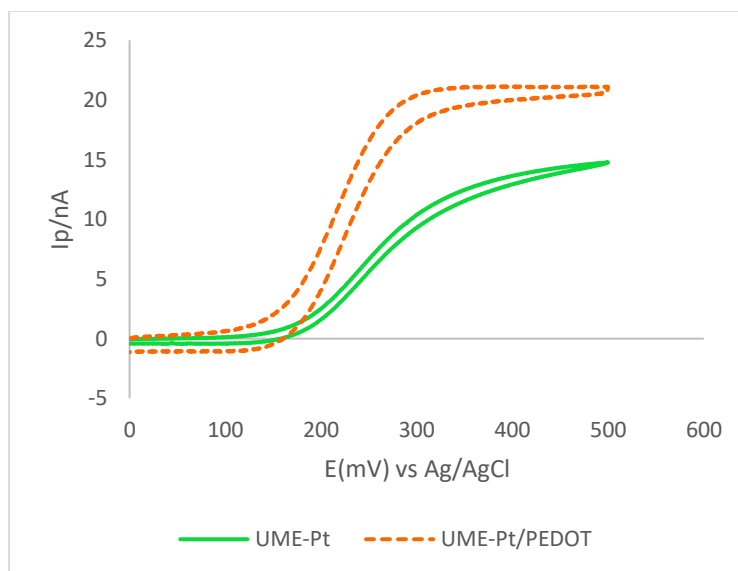


Figura 3. VC del ultramicroelectrodo modificado con PEDOT y sin modificar, velocidad de barrido 25 mV/s.

La modificación se caracterizó por un VC en una solución de PBS 0.01 M (pH 7.4) que contenía 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$. La figura 3 muestra la respuesta redox del PEDOT/Pt a los iones $Fe(CN)_6^{4-}$ en solución, que probablemente se atribuyeron a la película de PEDOT con carga positiva. La corriente obtenida en los voltamperogramas del electrodo sin modificar y

modificada con PEDOT, es diferente en la intensidad. La corriente obtenida con el electrodo modificado es definitivamente mayor que la que se obtiene con el electrodo sin modificar (figura 3). Lo que indica que la película de PEDOT no tiene efecto catalítico en $K_4[Fe(CN)_6]$, pero ayuda en la transferencia de electrones, que puede verificarse en el voltamperograma (figura 3), ya que no se produjo ningún desplazamiento positivo o negativo del potencial de media onda según la comparación entre esas dos curvas de VC.

Debido a la complejidad de los sistemas biológicos se eligieron especies que se encuentran principalmente en sistemas biológicos y se caracterizaron por diferentes cargas y tamaños. Se seleccionaron: ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU), superóxido de potasio (KO_2), xantina (XA) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (30% en agua).

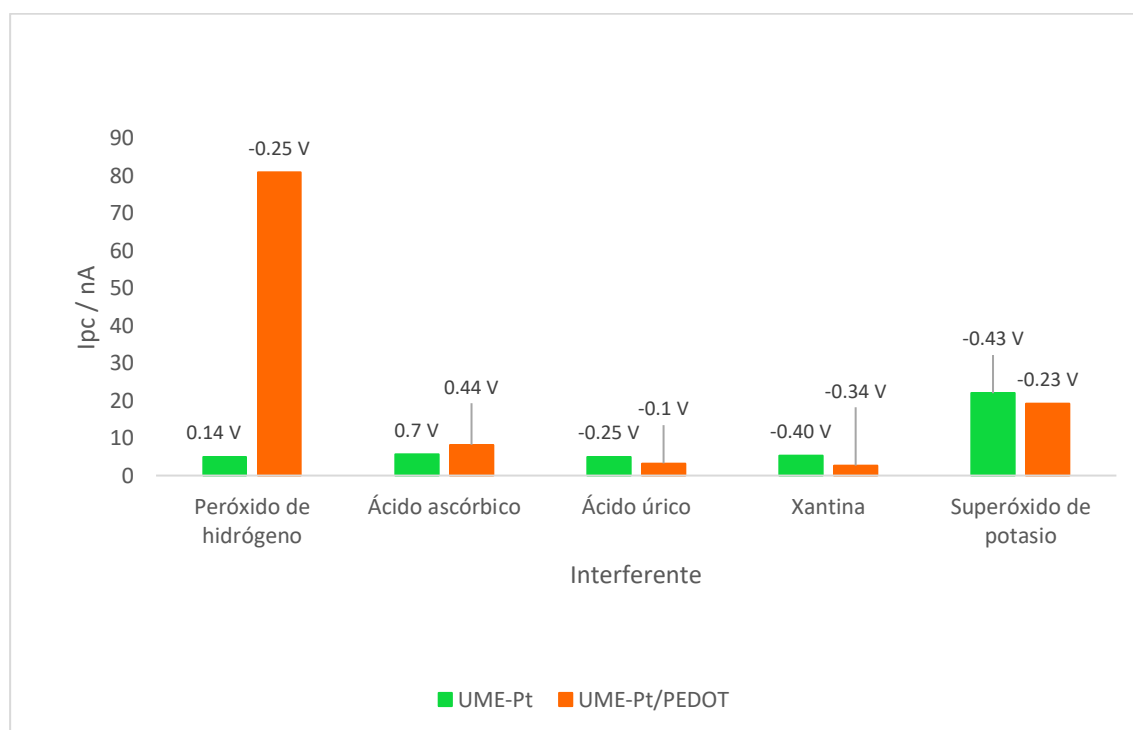


Figura 4. Estudio electroquímico de posibles compuestos interferentes tales como ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA), xantina (XA) y superóxido de potasio (KO_2) en un UME-Pt/PEDOT.

Se empleó voltamperometría cíclica para evaluar el comportamiento electroquímico de los UME-Pt y los UME-Pt/PEDOT en presencia de cada uno de los interferentes de manera individual y registrar su proceso redox en cada caso. Los datos electroquímicos se obtuvieron para cada compuesto a una concentración de 500 μ M. Como se observa, la superficie del material sustrato de Pt es capaz de detectar por sí sola el H_2O_2 como analito de interés, la desventaja es que detecta casi con la misma intensidad los demás analitos, en el caso del ácido úrico es la misma intensidad, en el caso del KO_2 lo detecta con 5 veces más intensidad. De acuerdo con estos resultados se continuó con la evaluación del UME modificado UME-

Pt/PEDOT en presencia de cada uno de los posibles interferentes y H_2O_2 bajo las mismas condiciones.

En la figura 4 se muestra el comportamiento que desempeña el recubrimiento de PEDOT como una barrera al paso de AU, XA y KO_2 ya que se registra una señal redox disminuida para estas especies interferentes. Debido al rango de potencial de trabajo, las mediciones amperométricas para la detección de peróxido de hidrógeno se realizan a potencial fijo de -0.25 V cerrando de esta manera la ventana de potencial y al mismo tiempo la posibilidad de efectuar cualquier otra reacción electroquímica en el medio.

Estas observaciones (figura 4) confirman la permoselectividad de la membrana electrodepositada hacia cuatro especies interferentes en un rango de concentración biológica importante (0.5 mM) y validando las condiciones usadas de electropolimerización de PEDOT en ultramicroelectrodos de Pt. Es importante que el peróxido de hidrógeno sea la señal que más alta corriente presente, ya que es el producto de interés una vez que la enzima superóxido dismutasa dismute al anión superóxido.

Conclusiones

El recubrimiento de PEDOT actúa al mismo tiempo como una capa permoselectiva al paso de H_2O_2 y como barrera para evitar el paso de especies interferentes como ácido úrico, ácido ascórbico, xantina y superóxido de potasio. Se optimizaron las condiciones de electropolimerización de PEDOT. Se utilizó una solución 5 mM del monómero EDOT en 0.05 M de sulfonato estireno de sodio. La electropolimerización se llevó a cabo por voltamperometría cíclica a una velocidad de 200 mV/s, por 10 ciclos.

Bibliografía

- [1] Tamburri, E., Orlanducci, S., Toschi, F., Terranova, M. L., & Passeri, D. (2009). Growth mechanisms, morphology, and electroactivity of PEDOT layers produced by electrochemical routes in aqueous medium. *Synthetic Metals*, 159, (5-6), 406-414.
- [2] Guimard, N. K., Gomez, N., & Schmidt, C. E. (2007). Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science*, 32, (8-9), 876-921.
- [3] Ning, X., Xiong, Q., Wu, T., Zhang, F., & He, P. (2019). A dual signal amplification strategy based on scanning electrochemical microscopy for DNA biosensing using a PEDOT-modified ultramicroelectrode and long self-assembled DNA concatamers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 290, 371-377.
- [4] Sotzing, G. A., Reynolds, J. R., & Steel, P. J. (1997). Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) Prepared via Electrochemical Polymerization of EDOT, 2,2'-Bis(3,4-ethylenedioxythiophene) (BiEDOT), and Their TMS Derivatives. *Advanced Materials*, 9, (10), 795-798.
- [5] Gu, Y., & Lai, M.-T. (2012). The potential application of a poly(3,4-ethylenedioxythiophene) modified platinum DNA biosensor in mutation analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 31, (1), 124-129.
- [6] Olmos Moya, P. M.; Gutiérrez Granados, S.; Bedioui, F.; Griveau, S.; (2020); PEDOT/Superoxide Dismutase Electrode Surface Modification for Superoxide Bioelectrochemical Sensing; *Electroanalysis*, 32, 29-36
- [7] Corona Elizarrarás, C. (2020), “Electrodos modificados con PEDOT y poli(eugenol) para la detección del anión radical superóxido y óxido nítrico”, Tesis de Maestría, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México, 53-85.

EVALUACIÓN DE BIOSENSORES QUE RESPONDEN A DAÑO CELULAR CON COMPUESTOS QUE NO SE CONOCE SU MECANISMO PRIMARIO DE ACCIÓN

Sergio Rodrigo Muñoz Carranza ^a, Dr. Luis Felipe Padilla Vaca ^b, Dra. Nauru Idalia Vargas Maya ^b y Dr.
Bernardo Franco Bárcenas ^b

^a Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta
S/N, Guanajuato, Gto., C.P. 36050, MÉXICO. 2s5r6m9c6@gmail.com

^b Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria
Alta S/N, Guanajuato, Gto., C.P. 36050, MÉXICO.

Resumen

Como respuesta a la reciente crisis de antibióticos, causada por el surgimiento de microorganismos patógenos resistentes a uno o más antibióticos, en el siguiente trabajo se buscó evaluar los mecanismos de acción de la clorpromazina, para su posible reposicionamiento en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos patógenos. Mediante el uso de tres distintos biosensores de célula completa, que presentan plásmidos basados en los promotores *uspA* (daño general), *fabA* (daño a membrana) y *recA* (daño al ADN), que regulan la expresión de una cromoproteína morada, la cual es expresada si existe daño en el componente celular al que responde cada biosensor.

Palabras clave: Biosensores, clorpromazina, AmilCP, reposicionamiento.

Introducción

En los últimos años la biotecnología ha tenido un gran progreso gracias a la mejora constante de los métodos de manipulación genética, marcadores de selección, plásmidos y el diseño e implementación de nuevos genes reporteros. La manipulación genética ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias para utilizar componentes celulares para monitorear metabolitos, contaminantes y otras moléculas de interés [1]. La tecnología de detección usando componentes celulares o células completas, ha sido beneficiada también por todas las técnicas de ingeniería genética que todo el tiempo se están revolucionando. Los genes reporteros codifican para un producto que permite la detección o medición de la expresión de un gen de interés, ya sea por detección directa o por detección de productos específicos generados de una reacción catalizada por el producto reportero [1,2].

Por todo lo anterior, es importante desarrollar nuevas herramientas de fácil detección para evaluar la presencia de agentes de daño celular o bien metabolitos de interés. En el presente proyecto se evaluó la practicidad de tres biosensores para evaluar el daño celular con un

compuesto antimicrobiano novedoso para el cual se desconoce su mecanismo de acción, la clorpromazina.

La clorpromazina (compuesto derivado de las fenotiazinas), es un medicamento tradicionalmente usado como antidepresivo y antipsicótico, ya que bloquea los receptores de dopamina postsinápticos en las áreas corticales y límbicas del cerebro, evitando así el exceso de dopamina en el cerebro, conduciendo a una reducción de los síntomas psicóticos, como alucinaciones y delirios. Es utilizada para el tratamiento de la esquizofrenia, náuseas y alivio de la aprensión antes de cirugías; en el tratamiento a corto plazo de niños con hiperactividad y para controlar las manifestaciones del tipo maniaco de la enfermedad maniaco-depresiva [3].

La clorpromazina ha mostrado tener actividad antimicrobiana que, al ser una droga aprobada para su uso en humanos, que el grupo del Dr. García Contreras (de la facultad de medicina, UNAM) ha encontrado, que potencialmente puede ser empleada en esquemas de infección con microorganismos *Acinetobacter baumannii* multirresistente [8], una bacteria catalogada como prioritaria por su esquema de multiresistencia y ser una enfermedad oportunista emergente [4].

Se ha demostrado que las fenotiazinas inhiben los procesos de transporte activo como la salida de compuestos xenobióticos. Además de posiblemente tener efectos inhibitorios en *A. baumannii*, ya que en dosis subletales promueven el alargamiento celular, de manera similar a como lo hacen los antibióticos β -lactámicos.

Este hallazgo proviene de la necesidad de buscar nuevos compuestos y fármacos con actividad antimicrobiana, para su uso como una alternativa al tratamiento actual con antibióticos. Una de las estrategias para lograr esto es el reposicionamiento de fármacos. Esta estrategia se basa en la búsqueda de fármacos que ya están en el mercado, que tienen la aprobación de instancias reguladoras y que presentan un uso en específico ya descrito, pero que, además, potencialmente pueden presentar actividad antimicrobiana, antiviral o incluso anticancerígena [5,6].

Para este tipo de estrategias, los biosensores bacterianos son una herramienta útil para evaluar la respuesta de daño y estrés en este tipo de células. Los biosensores de célula completa en *Escherichia coli* son herramientas para la fácil detección de moléculas dañinas para las células bacterianas que, con la ingeniería adecuada, permiten la fácil detección de metabolitos primarios y secundarios, siendo herramientas fáciles de usar y de relativo bajo costo para su uso y aplicación.

Metodología

Se utilizó la cepa de *E. coli* JM109 para los experimentos realizados, esta cepa fue transformada con diferentes plásmidos que contienen la cromoproteína morada AmilCP bajo el control de los promotores de genes inducidos con daño, como lo son *uspA* (detección de

daño general), *fabA* (detección de daño a membrana celular) y *recA* (detección de daño a ADN) [7].

Se prepararon cultivos en medio LB liquido suplementados con ampicilina (200 µg/mL), de las cepas de *E. coli* con los plásmidos reporteros de daño general (*uspA*), daño a membrana (*fabA*) y daño a ADN (*recA*), y se dejaron incubando a 37°C durante toda la noche.

La evaluación del daño celular se realizó mediante ensayos en placa, los cuales consistieron en el recubrimiento de la superficie de una placa con medio LB y ampicilina, con un tapete de uno de los tres biosensores. Para esto se fundió medio agar suave (medio LB con 0.6% de agar) suplementado con ampicilina, el cual se colocó dentro de tres tubos separados y estériles. Una vez mezclados y a una temperatura de 37°C, se agregaron 200µl de cultivo celular con los biosensores de *uspA*, *fabA* y *recA* (crecidos en medio LB suplementado con ampicilina). Se mezclaron y se vertieron en cajas Petri con medio LB solido con ampicilina y se dejó solidificar el agar suave por 30 minutos.

Una vez solidificado el medio se agregaron los controles positivos junto con las diluciones de clorpromazina. Se utilizó mitomicina-C como control positivo para las pruebas con *recA*, y para *uspA* y *fabA* se usaron 3µL de SDS al 20% como control positivo. Los compuestos y controles positivos se colocaron siguiendo el siguiente patrón sobre la superficie de la placa, como se puede observar en la **Figura1**.

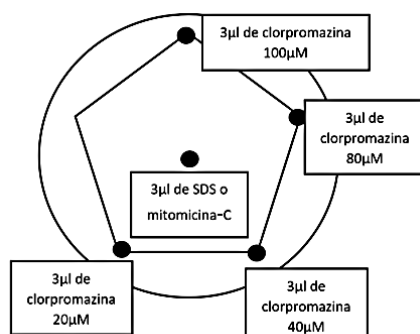


Figura 1. Esquema de distribución de la clorpromazina utilizada en las pruebas de sensibilidad y activación de los genes reporteros utilizados en este trabajo. Se indican las concentraciones que fueron usadas y las cantidades colocadas.

Una vez que se colocada la clorpromazina en el medio de cultivo, se dejaron 30 minutos para su absorción en la placa, y luego se colocaron en incubación a 37°C entre 18 y 24 horas, para que se observaran tanto los patrones de inhibición del crecimiento como los halos de activación.

Resultados

Los ensayos con estos reporteros permitieron evaluar dos cosas, la inhibición del crecimiento en el punto donde se depositó la clorpromazina y, al difundir en el medio, este compuesto va

bajando su concentración, permitiendo que el reportero crezca, pero si presenta un halo morado oscuro indica activación de este.

A partir de las pruebas realizadas con los tres biosensores (*fabA*, *recA* y *uspA*), a concentraciones elevadas de 80 y 100 μM , se logró la observación de áreas con muerte celular de manera muy marcada, presentando estas una falta de coloración en comparación con el resto del medio de cultivo, además de lograr observarse la generación de halos de color violáceo (causado por la activación del biosensor), en la periferia del área con muerte celular.

A concentraciones de 40 μM , de igual manera, se observó la generación de áreas con muerte celular, siendo apenas visibles, y sin estar tan marcadas y definidas, como en concentraciones más altas. También en esta concentración no se observó la formación de halos de activación en ninguno de los tres biosensores, como se observa en la **Figura 2**.

Mientras que a las concentraciones probadas de 20 μM , no hubo la generación de áreas con muerte celular en ninguna de las pruebas realizadas con los tres biosensores, ni la generación de halos de activación, de ninguno de los tres biosensores, como se observa en la **Figura 2**.

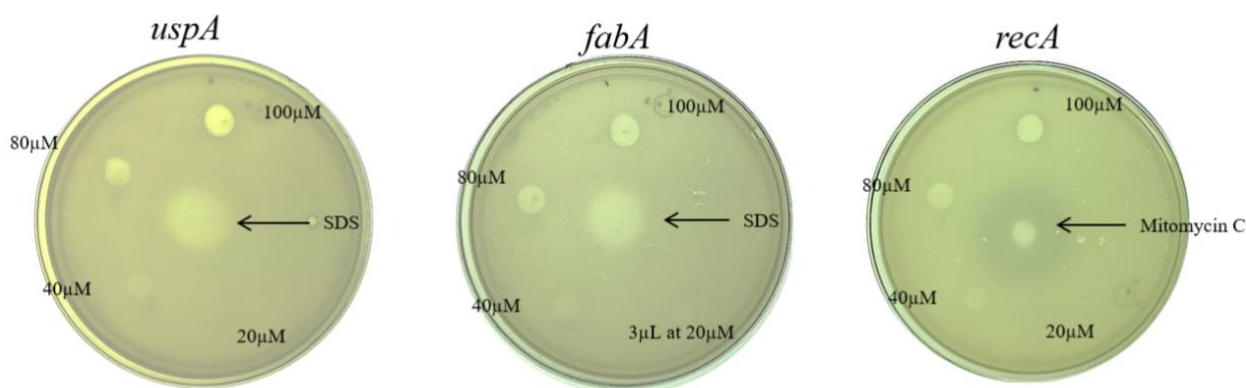


Figura 2. Determinación del mecanismo primario de la clorpromazina, basado en el uso de biosensores. Los indicadores utilizados se basaron en las secuencias promotoras de los genes *uspA*, *fabA* y *recA* fusionados con la cromoproteína AmilCP. Se colocaron 3 μL de clorpromazina a diferentes concentraciones en una placa cubierta con una mezcla de 100 μL de un cultivo nocturno de cada biosensor y 3 mL de agar blando. En el centro de la placa se incluyeron 3 μL de control positivo. El área clara indica la muerte celular y el halo violáceo más oscuro indica la activación del biosensor.

Es posible que la actividad inhibitoria de la clorpromazina se deba a distintos mecanismos, siendo principalmente la generación especies reactivas de oxígeno uno de estos [8]. Las especies reactivas de oxígeno generan daño de manera generalizada dentro de la célula, ya que interactúan con la membrana celular y el ADN causando daño o alteraciones en sus estructuras. En el caso del ADN, el daño estructural a la cadena puede generar mutaciones.

Como parte de este trabajo, se demostró que la actividad de la clorpromazina muestra efecto antimicrobiano contra *Acinetobacter baumannii* en concentraciones de 100 μM (*in vitro*),

además, de aumentar la sensibilidad de este microorganismo a otros antibióticos [8], lo que está en concordancia con lo observado con los biosensores bacterianos

En otras investigaciones del grupo de trabajo del Dr. García Contreras, realizadas con larvas de *Galleria mellonella* infectadas con distintas cepas de *A. baumannii* resistentes a las cefalosporinas (y a otros antibióticos) [8], se inyectó a las larvas con clorpromazina, mostrando no tener efectos dañinos sobre las larvas, pero sin reducir la mortalidad de las larvas, cómo se observa en la **Figura 3A**. Al realizarse más pruebas con clorpromazina junto con Ceftazidima, antibiótico de la familia de las cefalosporinas, se observan efectos sinérgicos entre la clorpromazina y el antibiótico, como se muestra en la **Figura 3B**. Posiblemente este sinergismo entre ambos compuestos se debe a la capacidad de la clorpromazina de inhibir las bombas de eflujo de la célula, evitando la expulsión del antibiótico del interior de la célula.

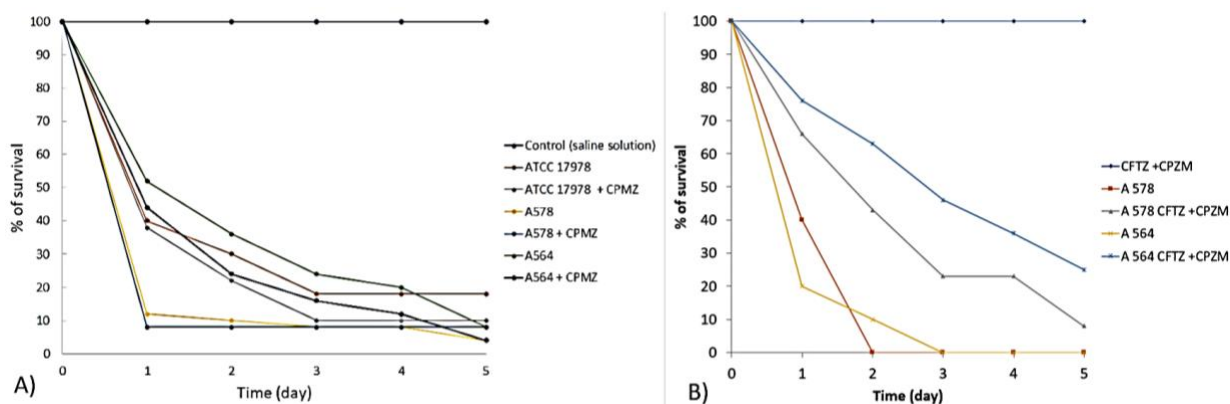


Figura3. Grafica mostrando el porcentaje de supervivencia a lo largo de 5 días, de larvas de *G. mellonella* infectadas con cepas de *A. baumannii* resistentes a las cefalosporinas. **A)** larvas de *G. mellonella* infectadas, tratadas con y sin Ceftazidima. **B)** larvas de *G. mellonella* infectadas, tratadas con y sin Ceftazidima y clorpromazina [8].

Gracias a simulaciones de unión molecular (molecular docking), es posible que la clorpromazina pueda unirse a las proteínas de unión de penicilina (PBP por sus siglas en ingles), de forma similar a como lo hace la penicilina [8], como se puede observar en la **figura 4**, promoviendo la elongación de las células de manera similar a como lo hacen los antibióticos β -lactámicos y posiblemente alterando la formación de peptidoglicanos de la pared celular.

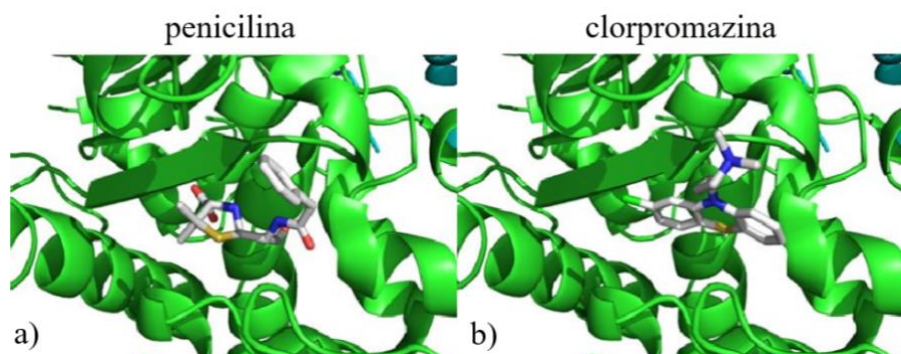


Figura 4. Comparación de la penicilina y la clorpromazina en la forma de unión a las proteínas de unión de penicilina (PBP por sus siglas en inglés). a) Forma de unión de la estructura tridimensional de la penicilina a las PBP. b) Forma de unión de la estructura tridimensional de la clorpromazina a las PBP [8].

Conclusión

Se confirmó la actividad inhibitoria del crecimiento celular de la clorpromazina a distintas concentraciones. Además de confirmarse el daño a la membrana celular, al ADN y daño general en la célula. Los datos *in vivo* muestran poco efecto antimicrobiano de la clorpromazina, probablemente por el metabolismo del hospedero, pero en conjunto con un antibiótico, es capaz de eliminar a *Acinetobacter baumannii*.

Cabe recalcar que la clorpromazina, causó una inhibición el crecimiento celular y presentó daño celular a una concentración alta (80 y 100 μM).

Por lo anterior, el reposicionamiento de fármacos es una potencial alternativa para el tratamiento de infecciones con bacterias multirresistentes.

Con estos datos, sabemos que la clorpromazina daña de manera generalizada a la célula, haciéndola más susceptible a otros agentes antimicrobianos, como se demostró en el modelo *Galleria mellonella*, confirmando su posible uso como terapia complementaria a antibióticos ya de uso generalizado. La determinación con los biosensores diseñados es cualitativa, pero se planea cuantificar el nivel de respuesta mediante la obtención del extracto total de las células expuestas a la clorpromazina y cuantificar espectroscópicamente la cantidad de proteína expresada. Por todo lo anterior, el reposicionamiento de fármacos es una potencial alternativa para el tratamiento de infecciones con bacterias multirresistentes.

Bibliografía

- [1] Biosensor-based engineering of biosynthetic pathways. Rogers JK, Taylor ND, Church GM. Curr Opin Biotechnol. 2016 Dec;42:84-91.
- [2] Reporter Gene Assays recuperado de <https://www.thermofisher.com> el 1 de Julio de 2017.
- [3] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Chlorpromazine, CID=2726, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2726> (accessed on July 27, 2020)
- [4] WHO, 2017. descargado de: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

- [5] Poroikov V, Druzhilovskiy D. Drug Repositioning: New Opportunities for Older Drugs. In *Silico Drug Design: Repurposing Techniques and Methodologies*, 2019:3-17. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816125-8.00001-8>
- [6] Pushpakom S, Iorio F, Eyers P, Escott K, Hopper S, Wells A, Doig A, Williams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseau P, Cavalla D & Pirmohamed M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018;18(1):41-58. Descargado de <https://www.nature.com/articles/nrd.2018.168>
- [7] Mora-Garduño Josué Daniel. Tesis: Desarrollo de un biosensor de fácil detección para evaluar agentes que causen daño al ADN, 2019, Universidad de Guanajuato, Guanajuato.
- [8] Aguilar-Vega Laura, López-Jácome Luis Esaú, Franco Bernardo, Muñoz-Carranza Sergio, Naurú Vargas-Maya Naurú, Franco-Cendejas Rafael, Hernández-Durán Melisa, Otero-Zúñiga Miguel, Campo-Beleño Cristhian, Jimenez-Cortez J. Guillermo, Martínez-Vázquez Mariano, Rodríguez-Zavala José Salud, Maeda Toshinari, Zurabian Rimma, García-Contreras Rodolfo. Antibacterial properties of phenothiazines against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Applied Microbiology* (artículo en revision)

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANSIOLÍTICO DE GARDENINA A

Laura Vianey Cortés Mendoza¹, Ángel Josabad Alonso Castro¹, Deisy Gasca Martínez², Clara Alba Betancourt¹.

¹Departamento de Farmacia. DCNE. Universidad de Guanajuato.

²Unidad de Análisis Conductual. Instituto de Neurobiología. UNAM.

Resumen

En este trabajo se describe la actividad ansiolítica de Gardenina A (GAD, 5-hidroxi, 6,7,8,30,40,5-hexametoxi flavona), flavonoide encontrado en la resina de la planta *Gadernia Gummifera*. Los efectos ansiolíticos se evaluaron en ratones de la cepa CD1 mediante tres pruebas no condicionadas: laberinto en cruz elevado, prueba de transición luz-oscuridad y campo abierto. Estas pruebas buscan medir la respuesta conductual o fisiológica ante estímulos estresantes o nuevos. Se probaron 3 diferentes concentraciones (1, 10 y 25 mg/kg de peso) de GAD, no se observaron diferencias entre los efectos ansiolíticos de las concentraciones probadas de GAD, comparadas con el clonazepam (fármaco ansiolítico) ni entre las mismas, pudiendo proponerse este compuesto como una nueva alternativa para los tratamientos de ansiedad.

Palabras clave: *Gardenina A, Pruebas no condicionadas, Efecto ansiolítico.*

Introducción

La ansiedad es un estado emocional que se caracteriza por sensaciones subjetivas de nerviosismo, irritabilidad, anticipación desasosegada y aprensión, a menudo, pero no siempre, con un contenido temático preciso y los acompañantes fisiológicos de una emoción intensa, es decir, uno o más de los signos o síntomas de disnea, sensación de opresión retroesternal, sensación de ahogo, palpitaciones, mayor tensión muscular, mareo, temblores, sudoración excesiva y rubor. [1] Los tratamientos comúnmente recomendados para este tipo de trastornos incluyen terapia cognitivo-conductual (CBT) y medicamentos, usualmente

antidepresivos y benzodiacepinas, [2] pero están relacionados con una variedad de efectos adversos. [3]

La utilización de tratamientos alternativos, en particular remedios herbales, conocidos como medicina tradicional, han tomado una gran importancia en el tratamiento de este tipo de desórdenes.

En México, el uso de plantas medicinales se considera como parte del conocimiento tradicional que ha sido transmitido de generación en generación. En los últimos años ha habido un interés particular hacia el uso de plantas para el tratamiento de distintos padecimientos, como los son la ansiedad y la depresión [4]

Hoy en día hay poca información o investigación sobre el uso y manejo de plantas medicinales mexicanas. Una validación científica exhaustiva de la eficacia de las plantas medicinales garantizaría la fiabilidad de su uso y también ayudaría a identificar aquellas plantas que son ineficaces [5]

Gadernia Gummifera (Planta)

Gardenia gummifera Linn. pertenece a la familia Rubiaceae. Es comúnmente conocido como gardenia gomosa [6].

Dikamali es la resina de goma obtenida de los brotes de hojas de *G. gummifera*. Es una rica fuente de flavonoides, la mayoría de ellos son flavonas polimetoxiladas. Diecisiete flavonas como acerosina, apigenina, 30,4'-dimetoxifogonina, 30,4'-dihidroxifogonina, gardenina A-E y nevadensina se han reportado de esta planta [7].

Se afirma que esta resina posee propiedades medicinales como antihelmíntico, antiespasmódico, carminativo, diaforético, expectorante, cardiotónico, *G. gummifera* muestra además diversas bioactividades como antioxidante, antimicrobiano, insecticida, citotóxico, hepatoprotector, anti-aterogénico, antiulceroso, cardioprotector, analgésico, antiinflamatorio, antipirético. [8]

Gardenina A

Gardenina A (GA, 5-hidroxi, 6,7,8,30,40,5-hexametoxi flavona) es una de las flavonas polimetoxiladas que se encuentran en la goma de dikamali en cantidad sustancial (1.3e1.5%). Carece de actividad citotóxica contra células de cáncer de colon humano (Li et al., 2007), ejerce efecto antihiperlipidémico y hepatoprotector contra la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Toppo et al., 2017). [7] Recientemente, se descubrió que ejerce efectos vasorelajantes y exhibe acciones antioxidantes (Abdallah et al., 2019).

La GA es un componente importante de las plantas medicinales con efectos ansiolíticos y antidepresivos, como *Dracocephalum moldavica*, *Agastache mexicana ssp. mexicana* y *Agastache mexicana ssp. xolocotziana* (López-Rubalcava y Estrada-Camarena, 2016). [9]

Modelos animales para el estudio de la ansiedad

La ansiedad ha sido estudiada extensamente en modelos animales y existen más de treinta utilizados y aunque los hay basados en respuestas fisiológicas y en respuestas inducidas con fármacos, [10]algunos recurren a respuestas condicionadas y otros modelos que utilizan

respuestas más naturales de la especie por lo cual son considerados modelos etológicos o de respuestas no condicionadas. [11]

Modelos condicionados. Se basan en la capacidad de responder ante un estímulo con la respuesta específica a otro estímulo. Generalmente se presenta un estímulo aversivo, comúnmente un choque eléctrico, aplicado al animal quien debe emitir una respuesta determinada. Estos modelos permiten un control bastante preciso de los niveles de conducta basal por parte del experimentador, pero casi permanentemente requieren que los sujetos de experimentación sean entrenados y se incluyan en el diseño experimental varios grupos de sujetos control para descartar los efectos no específicos del tratamiento sobre aspectos como el aprendizaje, la memoria, apetito y las funciones motoras y perceptuales. [11]

Modelos no condicionados. Buscan medir la respuesta conductual o fisiológica ante estímulos estresantes o nuevos. Algunos evalúan el miedo ante situaciones novedosas, en donde el sujeto es expuesto a un espacio abierto, alto o luces brillantes. En estos modelos se evita hacer privación de agua o comida, así como la administración de choques eléctricos y no se requiere de periodos largos de entrenamiento (Cruz- Morales et al., 2003). Pellow, Chopin, File & Briley (1985) mencionan que estos modelos poseen ciertas ventajas para su utilización: tiene cierta validez ecológica al ser una prueba rápida y sencilla, es económica al no implicar equipos costosos, tiene cierta sensibilidad bidireccional, en cuanto a las manipulaciones de ansiedad y no se requiere de largos procedimientos de formación que impliquen la privación de alimento/agua, y/o descargas eléctricas. [11]

En el presente estudio, se utilizaron tres pruebas no condicionadas: Laberinto en cruz elevado, Transiciones luz- oscuridad y campo abierto para evaluar el efecto ansiolítico de la Gardenina A.

Metodología

Se probaron tres concentraciones de un extracto de Gardenina A (1, 10 y 25 mg/kg de peso) en 3 grupos de 8 ratones de la cepa CD1, administradas por vía oral.

Los resultados se compararon con un control positivo de clonazepam (fármaco ansiolítico) y un control negativo de solución salina.

1. Laberinto en cruz elevado

El aparato consta de cuatro brazos cruzados (35 cm de largo x 6 cm de ancho) y una región central (zona de decisión) (5 cm x 5 cm), además, el laberinto está elevado a 41 cm de altura. Dos brazos están cubiertos por paredes de acrílico opacas (zona segura), y dos brazos abiertos (zona de ansiedad). Pasada una hora de la administración del compuesto, el ratón fue colocado en el centro del laberinto y se evaluó su actividad durante 5 minutos utilizando el software SMART 3.0 (Panlab, Barcelona, España). Para esta prueba ha sido determinante de ansiedad la menor entrada en brazos abiertos, de manera que hay mayor ansiedad cuando hay menor exploración en estos brazos debido a la preferencia de permanecer en los brazos más protegidos (cerrados)

2. Transiciones luz-oscuridad

El aparato consiste en una caja con dos compartimentos comunicados entre sí. Uno de los espacios es de acrílico color negro, que bloquea todo tipo de luz (zona segura 18 cm x 27 cm) y otro con paredes de acrílico color blanco y un sistema de iluminación tipo LED (zona de ansiedad 27 cm x 27 cm). Pasada una hora de la administración, el ratón se coloca en el espacio iluminado y se evalúa por 5 minutos, el tiempo de permanencia y número de entradas a los dos diferentes compartimentos. El principal factor ansiogénico se fundamenta en el conflicto entre el comportamiento exploratorio del ratón y la aversión natural hacia el área abierta e iluminada (brillante) de esta prueba.

3. Campo abierto

El aparato consiste en una caja de acrílico transparente de 42 cm x 42 cm y paredes con 30 cm de altura, el cual contiene un sistema de actividad SuperFlex Fusion. De igual manera, pasada una hora de la administración del compuesto, el ratón es colocado en el centro de la caja y se evalúa durante 5 minutos el tiempo de duración y la distancia recorrida en el área central y en el área periférica (el área central le causa ansiedad al verse desprotegido)

Resultados

1. Laberinto en cruz elevado

Los ratones tratados con el compuesto Gardenina A mostraron un comportamiento similar a los ratones tratados con clonazepam al explorar los brazos abiertos, tanto en número de veces (Figura 1A) como en el tiempo de exploración (Figura 1B). La reducción en los niveles de ansiedad se refleja en aumentos en la frecuencia y tiempo de exploración en los brazos abiertos, como fue observado con el clonazepam y las diferentes concentraciones de Gardenina. No se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de Gardenina A.

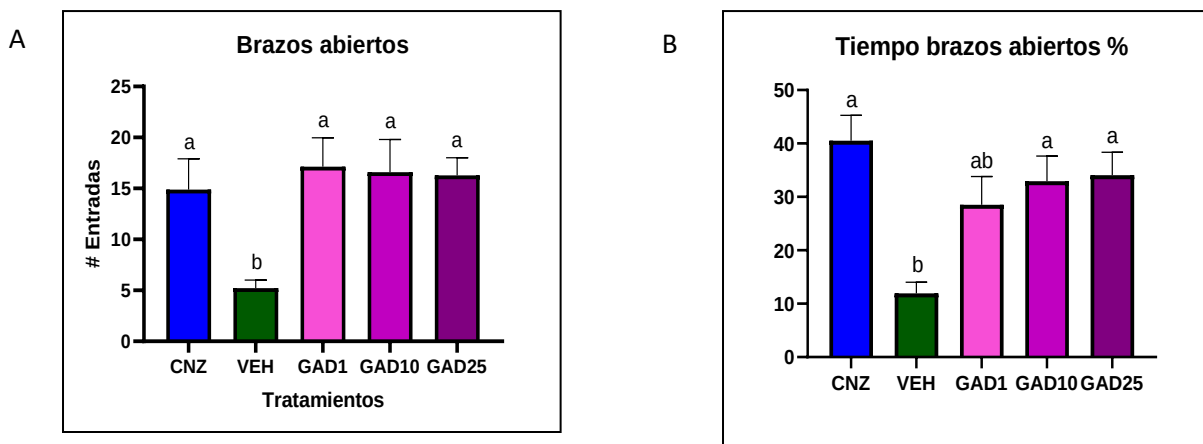


Figura 1. Resultados del laberinto en cruz elevado. A) Número de entradas en los brazos abiertos (zona de ansiedad) del laberinto. B) Tiempo de exploración en los brazos abiertos.

Corroborando el efecto ansiolítico, los ratones tratados con Gardenina A presentaron un comportamiento similar al clonazepam con respecto a la exploración y el tiempo de

permanencia en los brazos cerrados del laberinto, los cuales corresponden a la zona segura y un animal ansioso tenderá a resguardarse ahí, como se observa en los ratones tratados con solución salina.

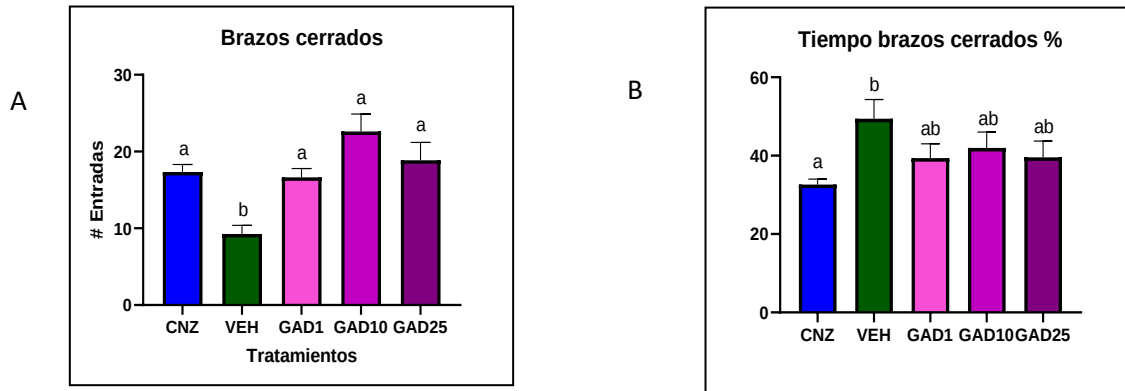


Figura 2. Resultados del laberinto en cruz elevado. A) Número de entradas en los brazos cerrados (zona segura) del laberinto. B) Tiempo de exploración en los brazos cerrados.

2. Transiciones luz-oscuridad

En la figura 4 se observa que los ratones tratados con el compuesto mostraron un mayor número de entradas en la parte iluminada de la cámara (figura 3A), así como también permanecieron un mayor tiempo en la misma (figura 3B), lo que refleja un menor estado de ansiedad, medido con esta prueba.

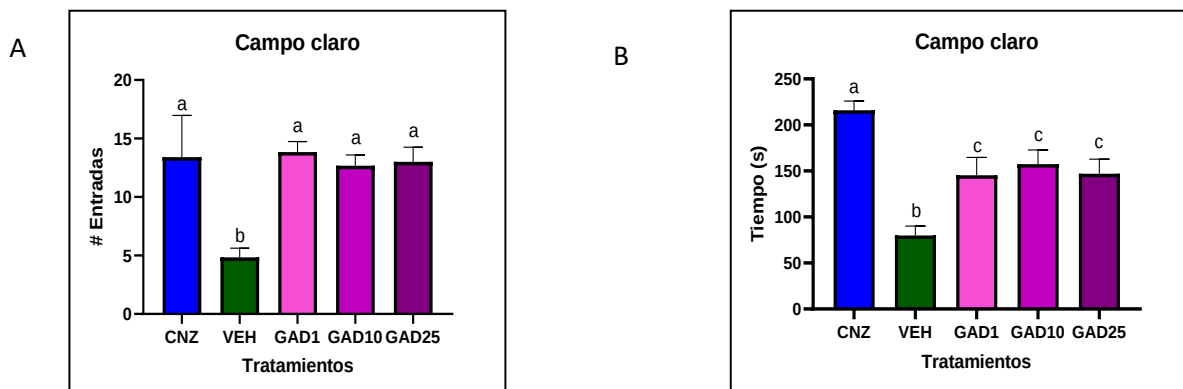


Figura 3. A. Número de entradas en la zona iluminada de la prueba. B. Tiempo de permanencia en la zona iluminada.

Por otro lado, el número de entradas en la parte cubierta y oscura (Figura 4A) también son mayores respecto a los ratones tratados con solución salina y el tiempo en esta zona (Figura 4B) disminuyó en los ratones tratados con el compuesto, respecto a los tratados con solución salina.

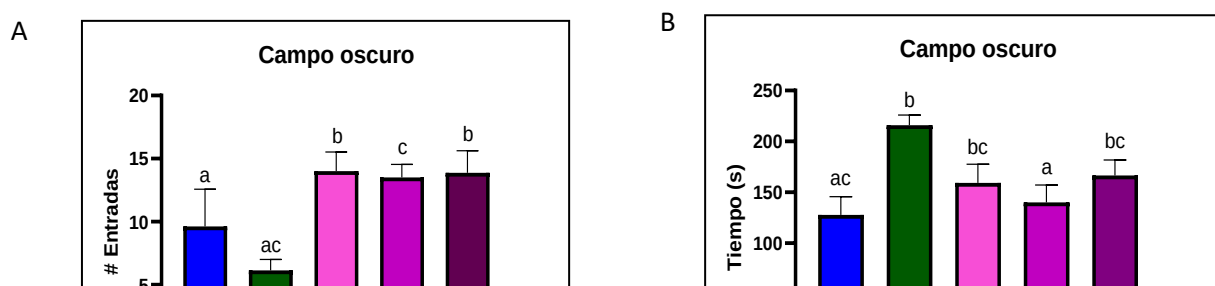


Figura 4. A. Número de entradas a zona oscura de la prueba. B. Tiempo de permanencia en la zona oscura

3. Campo abierto

Los ratones tratados con Gardenina A mostraron un comportamiento similar a los tratados con clonazepam, al permanecer más tiempo en la zona central (Figura 5A) y explorarla un mayor número de veces (Figura 5B) obtenido por la distancia recorrida en esta zona. La parte central corresponde a la zona de ansiedad de la prueba.

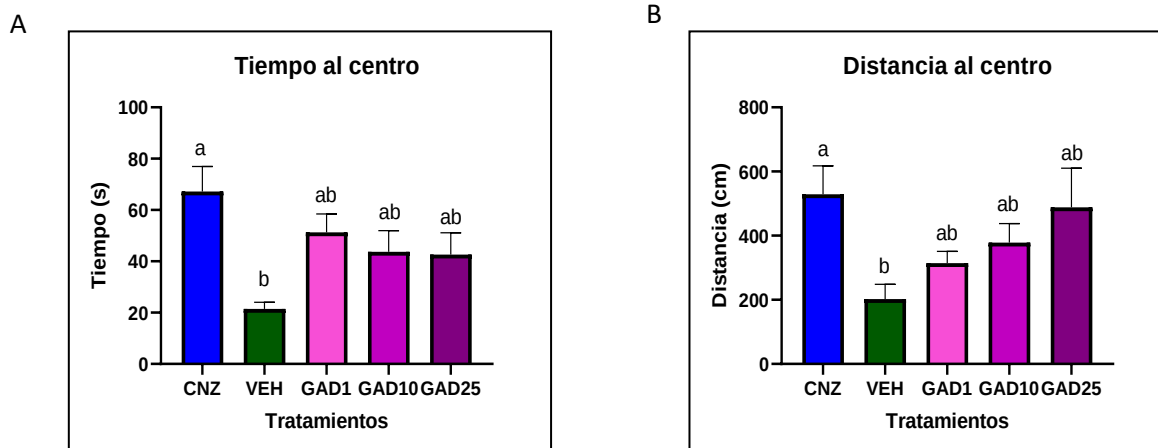


Figura 5. Resultados obtenidos de la prueba de campo abierto. A. Tiempo de permanencia en la zona central. B. Distancia recorrida (cm) en la zona central de la prueba.

Por otro lado, en la zona segura de la prueba que corresponde a la periferia o la zona al margen (Figura 6), no se observan diferencias significativas en tiempo y distancia recorrida, entre los compuestos respecto a los controles, indicando que no hay una preferencia por esta zona.

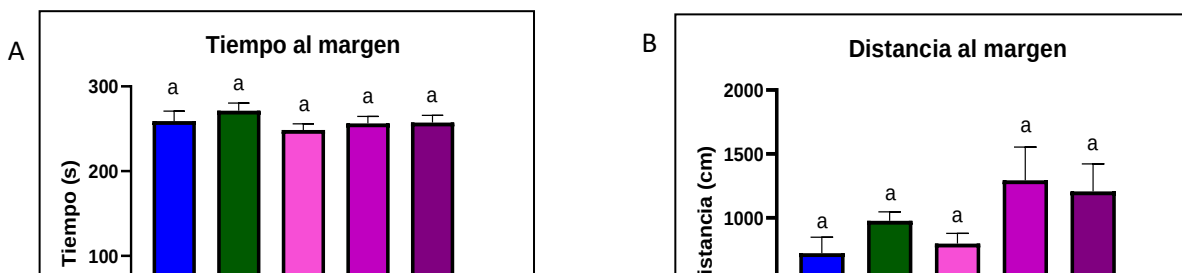


Figura 6. Resultados obtenidos de la prueba de campo abierto. A. Tiempo de permanencia en la zona periférica o al margen. B. Distancia recorrida (cm) en la zona periférica de la prueba.

Conclusiones

Los resultados sugieren que Gardenina A, extraída de la planta *Gardenia gummifera*, induce efectos de tipo ansiolítico en ratones sometidos a pruebas no condicionadas, ya que se observaron comportamientos similares al clonazepam (agente ansiolítico). Así como también se determinó que el efecto ansiolítico de Gardenina A no es dependiente de la dosis, al no observarse diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas

Bibliografía

- [1] Organización Mundial de la Salud. Salud mental un estado de bienestar. Diciembre 2013. Disponible en: http://www.who.int/features/factfiles/mental_health/es/
- [2] Hidalgo RB, Tupler LA, Davidson JR. (2007) An effect-size analysis of pharmacologic treatments for generalized anxiety disorder. J Psychopharmacol. 21:864–72
- [3] Ashton, H. (2005). The diagnosis and management of benzodiazepine dependence. Curr. Opin. Psychiatry. 18: 249–255
- [4] Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B., Weimann, C., Sticher, O., 1998a. Medicinal plants in Mexico: healers' consensus and cultural importance. Soc. Sci. Med. 47, 1859–1871.
- [5] Lopez-Rubalcava, C., & Estrada-Camarena, E., (2016). Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. *Journal of Ethnopharmacology*, 186. 377- 391.
- [6] Vindhya, k., Leelavathi, S. (2015) Evaluation of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of *Gadernia gummifera* Linn. Sci. Rev. Res., 32(1), Article No. 42, Pages: 255-261
- [7] Toppo, E., Darvin, S. S., Esakkimuthu, S., Stalin, A., Balakrishna, K., Sivasankaran, K., ... Al-Dhabi, N. A (2017) Antihyperlipidemic and hepatoprotective effects of *Gadernin a* in celular and high fat diet fed rodent models. *Chemico-Biological Interactions*, 269. 9-17.
- [8] Prashith-Kekuda T. R., Raghavendra H. L., Shilpa M., Pushpavathi D., Tejaswini Petkar, Ayesha Siddiqha. (2017) Antimicrobial, Antiradical and Insecticidal Activity of *Gardenia gummifera* L. F. (Rubiaceae). *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 9, Issue 10, 265-272
- [9] Alonso-Castro, AJ, Gasca-Martínez, D, Cortez-Mendoza, LV, Alba-Betancourt, C, Ruiz-Padilla, AJ, Zapata-Morales, JR. Evaluation of the neuropharmacological effects of Gardenin A in mice. *Drug Dev Res*. 2020; 1– 9. <https://doi.org/10.1002/ddr.21659>

- [10] Gómez, C., Saldívar-González, J. A., & Rodríguez, R. (2002). Modelos animales para el estudio de la ansiedad: una aproximación crítica. *Salud Mental*, 25(1), 14-24.
- [11] Polanco, L., C. Vargas-Irwin y M. Góngora (2011), “Modelos animales: una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad”, *Suma psicológica*, 18:141-148.

EVIDENCIA DE FRAGMENTOS TIPO MICROPLÁSTICO EN AVES SILVESTRES: EL CORMORÁN NEOTROPICAL Y EL PELÍCANO BLANCO DEL ÁREA NATURAL PROTEGIDA PRESA “LA PURÍSIMA”, GUANAJUATO

Jorge Andrés Morales-Rico, Diana Guadalupe Amezcua-Hernández, Roberto David Contreras-Vargas, Juan Pablo Huchin-Mian*

Departamento de Biología. División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Guanajuato, 36050, México.

*Correo electrónico: andresz9755@gmail.com

Resumen

La contaminación por plásticos es un problema que va en aumento, especialmente en ecosistemas acuáticos. En los últimos años, ha aumentado la preocupación por la presencia de fragmentos de plásticos muy pequeños (<5 mm), llamados microplásticos (MPs), que son apenas perceptibles a simple vista. En general, existen pocos estudios sobre MPs en aves acuáticas, y actualmente, en Guanajuato no existen reportes de casos. El objetivo de este estudio fue aislar fragmentos tipo microplásticos en muestras de heces del cormorán neotropical (*Phalacrocorax brasilianus*) y pelícano blanco (*Pelecanus erythrorhynchos*) del Área Natural Protegida (ANP) Presa “La Purísima”. Debido a la alta movilidad de las especies y la dificultad para obtener muestras de heces libres de contaminación, se estandarizaron múltiples métodos de colecta: plataformas flotantes, tapetes y porterías. En total se obtuvieron 47 muestras: 39 cormoranes y 8 pelícanos. Las muestras fueron digeridas con peróxido de hidrógeno al 30%, se filtró al vacío con filtros de papel Whatman y se caracterizó bajo el microscopio estereoscópico. Se encontraron fragmentos tipo microplástico en el 97.8% de las muestras, solamente una muestra de heces de cormorán estaba libre de MPs. Se halló un total de 307 piezas de MPs: el 96% (n= 296) de ellos fueron filamentosos, y el color más abundante fue el azul, negro y el transparente, con el 55%, 20% y 13%, respectivamente. La contaminación por microplásticos es una amenaza para la salud y conservación de las aves acuáticas del ANP presa “La Purísima”, la cual representa un hábitat vital para esas aves migratorias en el estado de Guanajuato.

Palabras clave: Contaminación, Aves Acuáticas, Aislamiento, Heces.

Introducción

Los microplásticos (MPs) son una amenaza emergente en los ecosistemas acuáticos y en los seres vivos que lo conforman [1]. Se considera microplástico a cualquier fragmento o pieza de plástico de pequeño tamaño (< 5 mm) que son escasamente percibidos a simple vista [2]. De acuerdo a su función y naturaleza, los microplásticos se clasifican en primarios y secundarios. Los MPs primarios se refieren a las partículas plásticas sintetizadas en un tamaño de < 5 mm para una función específica. Por ejemplo, exfoliantes en los productos de salud y belleza, como algunos limpiadores y pastas dentales. Mientras que los MPs secundarios se refiere a los desechos plásticos más grandes que se degradan en piezas cada vez más pequeñas. por ejemplo, la fragmentación de bolsas o envoltorios debido a factores ambientales como la temperatura y la radiación solar o las fibras plásticas arrojadas al drenaje durante el lavado de telas sintéticas [3].

La ingestión de productos plásticos se ha estudiado más en aves que en cualquier otro grupo de animales. Las primeras observaciones de piezas de plástico dentro de las aves marinas se remontan a la década de 1960 [4]. Este interés particular en las aves se debe a diversos motivos; a su constante monitoreo, a la facilidad y accesibilidad del muestreo, así como a su uso como indicadores biológicos de ecosistemas marinos [5]. Si bien los desechos antropogénicos pueden ser consumidos por diferentes ordenes de aves, su vulnerabilidad depende de múltiples factores, siendo los principales el hábitat y la estrategia de alimentación empleada por la especie [6]. Los microplásticos pueden entrar en toda la cadena alimenticia y pasar de una especie a otra mediante el consumo o depredación. Las aves acuáticas, así como otros vertebrados acuáticos pueden ingerirlos indirectamente cuando consumen presas como peces que han sido contaminados ya sea por ingestión o porque los microplásticos se encuentran adheridos a ellos. Otra manera de ingerirlos es de forma directa, al tragar agua o sedimento contaminado e inclusive por su inhalación cuando se encuentran suspendidos en el aire [7].

La presa “La Purísima” y su zona de influencia, ubicada al suroeste del municipio de Guanajuato, declarada como Área Natural Protegida en el 2005, es una importante zona de recarga del acuífero, la cual cuenta con una alta diversidad de aves acuáticas y terrestres. Es un sitio de arribo de 191 especies de aves residentes y migratorias, de las cuales nueve se encuentran bajo un estatus de protección; ocho especies semi-endémicas y, una especie endémica. Pese a las condiciones favorables del Área Natural Protegida, presenta problemas por la extracción de arena y roca, cacería furtiva, sobrepastoreo y mal manejo de aguas residuales y una gran cantidad de residuos sólidos que en su mayoría son plásticos derivados de petroquímicos [8]. En este estudio se pretende examinar las heces de aves dos especies de aves silvestres: cormorán neotropical (*Phalacrocorax brasilianus*) y pelícano blanco americano (*Pelecanus erythrorhynchos*), para evidenciar la presencia de microplásticos, esto como primer paso para plantear futuros estudios para conocer las fuentes, los mecanismos de transferencia, y el posible flujo trófico de los microplásticos en el ecosistema.

Metodología

Sito de estudio

Debido a que la Presa de la Purísima cuenta con una alta diversidad de aves, primero se observó la comunidad de aves para identificar aquellas especies dominantes. Además, se caracterizó el tipo de hábitat de las aves más dominantes, las cuales fueron las especies objetivo para este estudio de microplásticos. Para determinar el sitio de muestreo se calculó la riqueza observada y abundancia por el método de conteo en punto de radio fijo: estableciendo un radio de entre 25 a 30 metros y durante un periodo de entre 5 a 10 minutos [9]. Cada punto de conteo tuvo un mínimo aproximado de 250 metros de separación entre sí. Con los datos obtenidos se calculó la diversidad específica usando el Índice de Shannon-Weaver y el Índice de Simpson a modo de comparativa. Una vez que se identificó el hábitat preferencial de las especies dominantes, se procedió a la estandarización de la colecta de heces libres de contaminación por microplásticos.

Métodos de colecta

Se probaron tres métodos diferentes de colecta de heces: (1) Porterías de madera: debido a que se ha observado la preferencia de los cormoranes por reposar sobre troncos, se construyeron porterías con madera de aproximadamente 1.5 m de largo y 0.3 m de altura, además de colocar cartón debajo de ella para así colectar las heces cuando las aves se posen sobre esta y evitar su contaminación con la tierra. (2) Plataformas flotantes: Algunos de los sitios en los cuales se conglomeran la comunidad de aves, constan de árboles que se encuentran parcialmente sumergidos dentro de la presa, por lo cual, para lograr colectar las heces se diseñaron plataformas construidas con azulejos de espuma EVA de aproximadamente 1 m², cubiertos con cartón por la parte superior y sujetos a flotadores de polietileno para finalmente ser enlazados debajo de los árboles de interés. (3). Tapetes de cartón con un cebo (semillas o peces juveniles): consta en colocar en las zonas frecuentadas por las aves, cartones de aproximadamente 1.5 m de largo y 0.5 de ancho sujetos con estacas metálicas clavadas en la tierra. De estos 3 métodos de colecta, dos fueron seleccionados por su efectividad, se usaron las plataformas flotantes para la recolección de heces de cormoranes y los tapetes de cartón para los pelícanos. Al día siguiente de instalar los colectores, las muestras de heces se envolvieron individualmente en papel encerado utilizando una espátula metálica previamente limpia con agua destilada. Posteriormente se colocaron en bolsas herméticas etiquetadas para almacenarse en un refrigerador a -20°C hasta su procesamiento.

Procesamiento de muestras

Para procesar las muestras se realizó una digestión química, colocando cada muestra en un vaso de precipitado de 200 ml y se agregaron 20 mL de solución de Fe (II) 0.05 M y 20 mL de peróxido de hidrógeno al 30%. La muestra se calentó en una parrilla con agitación mínima a una temperatura máxima de 75°C durante 30 minutos para degradar la materia orgánica

presente. Posteriormente la solución fue filtrada con equipo de filtrado al vacío, usando filtros de papel Whatman [10].

Cuantificación y caracterización cualitativa de microplásticos.

Todos los papeles filtro Whatman que se obtuvieron durante el proceso de filtrado se observaron en el microscopio estereoscópico (6.7x a 40.5x) para identificar partículas tipo MPs. Los criterios para considerar como microplásticos a las partículas analizadas fueron: no presenta estructuras orgánicas o biológicas visibles, el grueso de las fibras es el mismo a lo largo de esta y la partícula tiene un color homogéneo. Para aquellas piezas de difícil identificación adicionalmente se realizó la prueba de la aguja caliente, cuando la pieza se deforma al acercar la aguja se consideró como microplástico [11]. Finalmente, cada uno de los microplásticos encontrados fue clasificado por sus características físicas: tipo, estado y color. Durante el procesamiento de muestras siempre se portó bata blanca de algodón y guantes de nitrilo para evitar la posible contaminación por fibras pertenecientes a la vestimenta.

Resultados

El sitio de muestreo fue determinado en los meses de octubre y noviembre de 2019, en estos meses la temporada de lluvias está por terminar o ya ha cesado en su totalidad. El gran volumen de agua recibida y los desniveles en el terreno propician la formación de pequeños islotes, así como de la cobertura parcial de algunos arboles sumergidos en la presa, este fenómeno temporal genera un cambio en el paisaje el cual afecta el comportamiento de la comunidad de aves en la presa, a su vez que se coordina con los movimientos migratorios de algunas especies de aves como el pelicano blanco americano, facilitando la toma de muestras de heces de estas aves (Fig. 1).

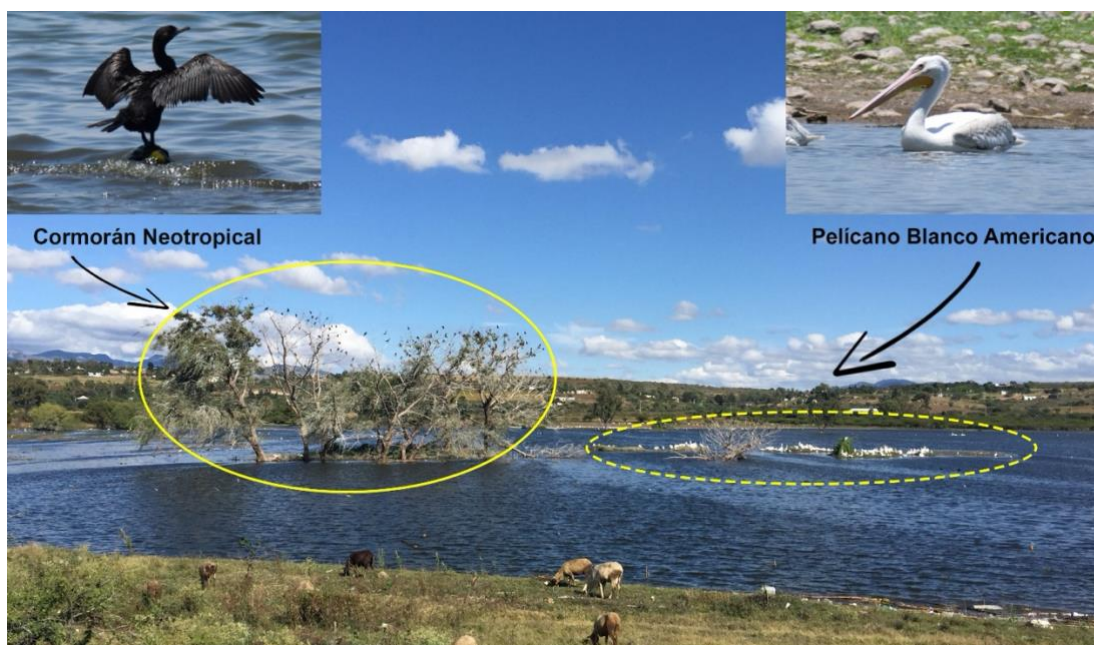
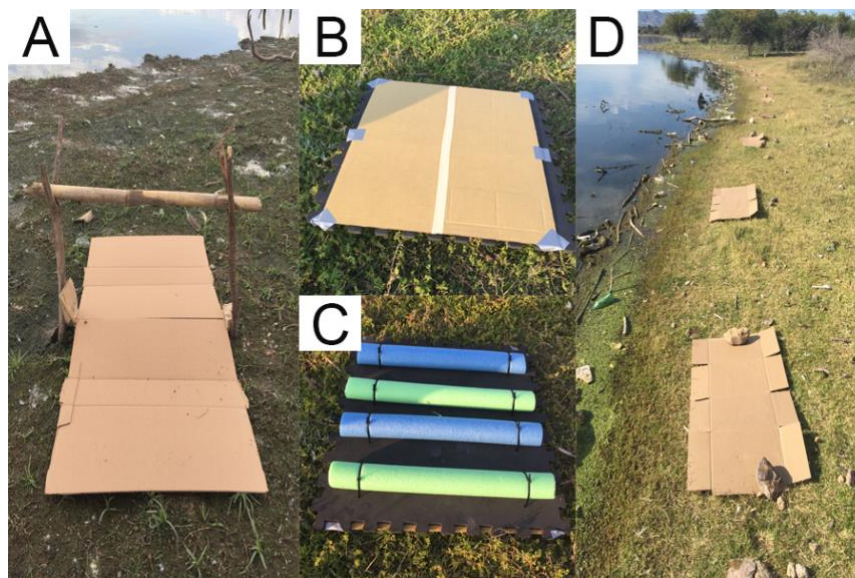


Figura 1. Presa de la Purísima. Preferencia de hábitat del pelícano blanco americano (*Pelecanus erythrorhynchos*) y cormorán oliváceo (*Phalacrocorax brasilianus*). Después de la temporada de lluvias, los cormoranes prefieren hábitats estructurados como árboles altos e inundados, aprox. 2-6 m de altura (línea continua); mientras que los pelícanos prefieren hábitats no estructurados tipo islotes (línea discontinua).



Los métodos de colecta fueron utilizados de manera específica: para colectar las heces de cormoranes se utilizaron las plataformas flotantes mostrando una gran eficacia en un lapso de tiempo corto, para los pelícanos los tapetes fueron el método más eficiente sin la necesidad de emplear un sebo o carnada. Las porterías fueron colocadas en zonas cercanas al sitio de muestreo, tuvieron una eficacia mínima además de que no se tiene la certeza a que especie pertenecen las muestras obtenidas (Fig. 2).

Se analizaron un total de 47 muestras: 39 pertenecientes a cormoranes y 8 a pelícanos. Se encontraron fragmentos tipo microplástico en el 97.8% de las muestras, solamente una muestra de heces de cormorán estaba libre de MPs. Se hallaron un total de 307 piezas de MPs: el 96% (n=296) de ellos fueron filamentosos, y el color más abundante fue el azul, negro y el transparente, con el 55%, 20% y 13%, respectivamente (Fig. 3).

Figura 2. Métodos de colecta. Portería de madera (A), Plataforma flotante; vista superior e inferior (B y C) y tapetes de cartón (D).

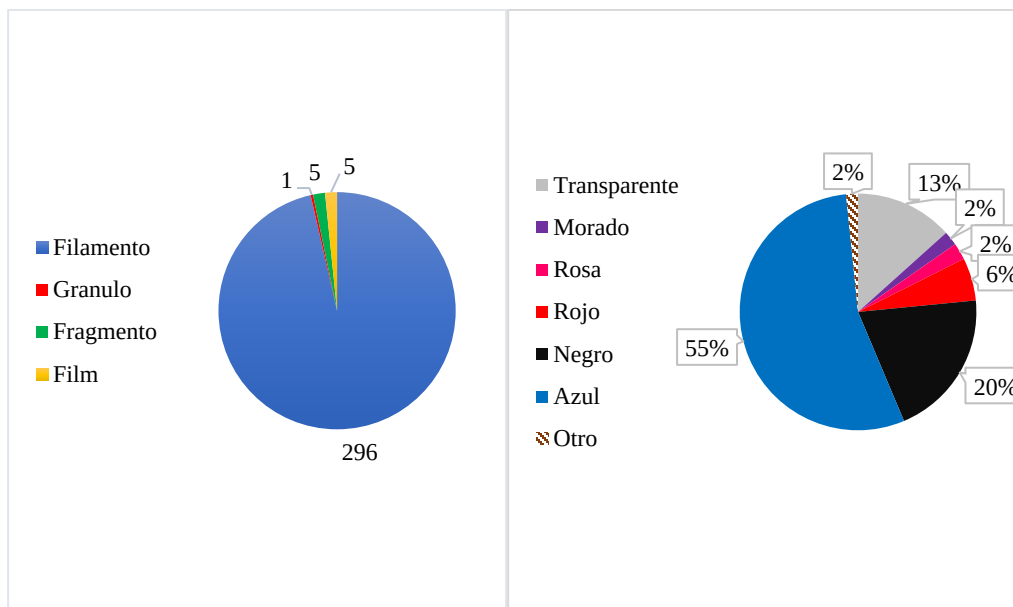


Figura 3. Caracterización de microplásticos. Tipo de microplásticos encontrados (izquierda) y sus principales colores (derecha).

Conclusiones

Los filamentos son el principal tipo de microplástico encontrado en estudios sobre aves. Varios estudios sostienen que los microfilamentos plásticos derivan principalmente del lavado de prendas textiles las cuales pueden contaminar cuerpos de agua por la descarga de aguas residuales o de aguas tratadas ya que la mayoría de las tratadoras de agua no retienen microplásticos [12].

Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar la razón por la cual se encuentran más microplásticos con determinadas características físicas y químicas. Si bien no tenemos la certeza del mecanismo y flujo por el cual los microplásticos son ingeridos por las aves en la presa, es muy probable que se lleve de manera indirecta; por la alimentación con presas que los ingieren, y de manera directa: por el consumo de agua contaminada, así como de la inhalación de partículas suspendidas en el aire. La presa de la purísima, al ser un área importante tanto para aves residentes como para las aves migratorias, representa un punto clave en el estado de Guanajuato para su conservación, así como la de un sin número de especies, incluyendo a todas las personas que dependen de ella como fuente de agua y alimento.

Entre las perspectivas de este estudio se encuentra la caracterización química de los fragmentos tipo microplásticos aislados para saber el tipo de polímero que las componen.

Bibliografía

[1] Wang, W., and Wang, J. (2018). Investigation of microplastics in aquatic environments: An overview of the methods used, from field sampling to laboratory analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 108, 195–202.

- [2] Anderson, J.C., Park, B.J., and Palace, V.P. (2016). Microplastics in aquatic environments: Implications for Canadian ecosystems. *Environ. Pollut.* 218, 269–280.
- [3] Li, J., Liu, H., and Paul Chen, J. (2018). Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Res.* 137, 362–374.
- [4] Lavers, J.L., Bond, A.L., and Hutton, I. (2014). Plastic ingestion by Flesh-footed Shearwaters (*Puffinus carneipes*): Implications for fledgling body condition and the accumulation of plastic-derived chemicals. *Environmental Pollution* 187, 124–129.
- [5] Provencher, J.F., Bond, A.L., Avery-Gomm, S., Borrelle, S.B., Bravo Rebolledo, E.L., Hammer, S., Kühn, S., Lavers, J.L., Mallory, M.L., Trevaill, A., et al. (2017). Quantifying ingested debris in marine megafauna: a review and recommendations for standardization. *Anal. Methods* 9, 1454–1469.
- [6] Roman, L., Schuyler, Q.A., Hardesty, B.D., and Townsend, K.A. (2016). Anthropogenic Debris Ingestion by Avifauna in Eastern Australia. *PLOS ONE* 11, e0158343.
- [7] Carlin, J., Craig, C., Little, S., Donnelly, M., Fox, D., Zhai, L., and Walters, L. (2020). Microplastic accumulation in the gastrointestinal tracts in birds of prey in central Florida, USA. *Environmental Pollution* 264, 114633.
- [8] Secretaría de Medio Ambiente y Ordenamiento Territorial - Guanajuato (2007). Programa de Manejo Presa La Purísima y su Zona de Influencia. Recuperado: septiembre 2020.
- [9] Gallina, S., and López, C. (2011). Métodos para contar aves terrestres. In *Manual de Técnicas Para El Estudio de La Fauna*, pp. 90–99.
- [10] Masura, J., Baker, J., Foster, G., and Courtney, A. (2015). Laboratory Methods for the Analysis of Microplastics in the Marine Environment: Recommendations for quantifying synthetic particles in waters and sediments.
- [11] Barrows, A.P.W., Neuman, C.A., Pieper, C., Berger, M.L., and Shaw, S.D. (2017). Guide to Microplastics Identification, A Comprehensive Methods Guide for Microplastics Identification and Quantification in the Laboratory.
- [12] Browne, M.A., Crump, P., Niven, S.J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., and Thompson, R. (2011). Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9175–9179.

NECESIDADES EMOCIONALES DE LAS MUJERES CON MASTECTOMÍA.

Ma. Elvira Moreno Pulido. María Aurora Montañez Frausto. Lucía Caudillo Ortega.

Gloria Guadalupe Ortega Ramírez

División de Ciencias Naturales y Exactas. Departamento de Enfermería y Obstetricia.

Colonia Noria Alta S/N CP. 36050 Guanajuato, Guanajuato México. Contacto: elvira.moreno@ugto.mx.

RESUMEN.

Objetivo general: Identificar y analizar las emociones de las mujeres con mastectomía lateral y bilateral. **Metodología-Diseño de estudio.** Cualitativo -fenomenológico. **Recolección de datos:** Se ejecutó muestreo no probabilístico por conveniencia, diario de campo, observación participante y se aplicaron entrevistas semi-estructuradas (FACIT, 2010), **Análisis de los datos:** Se transcribieron las grabaciones y las notas de campo estableciendo una codificación inicial y axial de las cuales resultaron grandes categorías. **Resultados:** Para esta investigación se contemplaron cinco pacientes con cáncer de mama, de las cuales se descartaron dos entrevistas, Para su identificación se colocaron código M1, M2 y M3 la edad de las mujeres es de 27, 41 y 51. Respecto a las necesidades emocionales

expresaron tener sentimientos positivos que se categorizaron como felicidad, tranquilidad, bienestar, motivación, satisfacción, actitud y autopercepción, sentimientos negativos como desmotivación, dolor, tristeza e incomodidad. **Conclusiones:** Es de suma importancia que la práctica del cuidado de enfermería tome más conciencia en el ámbito emocional porque es uno de los factores más importantes para la mejoría de los pacientes además de que ayuda a enfermería a conocer más a fondo el estado actual del paciente al que se le brindan cuidados.

Palabras clave: mastectomía, necesidades emocionales, aspecto físico, apoyo.

Introducción.

Durante los primeros años de vida de una persona, las células normales se dividen más rápidamente para facilitar el crecimiento. Una vez que se llega a la edad adulta, la mayoría de las células sólo se dividen para remplazar las células desgastadas o las que están muriendo y para reparar lesiones. El cáncer se origina cuando en alguna parte del cuerpo las células comienzan a crecer de manera descontrolada. Existen muchos tipos de cáncer, pero todos comienzan debido al crecimiento sin control de células anormales. El cáncer de mama es un tumor maligno que se origina en las células del seno [1].

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, según la Organización Mundial de la Salud, en 2012 se reportaron 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer. Los tipos de cánceres diagnosticados con mayor frecuencia fueron en el hombre, los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado, mientras que en la mujer el de mama, colon, recto, pulmón, cuello uterino y estómago. A nivel mundial el cáncer de mama es el de mayor prevalencia en las mujeres, así mismo el número de nuevos casos se incrementa principalmente en países en desarrollo [2].

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2012), el cáncer más frecuente entre las mujeres es el de mama, que a nivel mundial representa 16% de todos los cánceres femeninos, cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos. La Organización Panamericana de la Salud (OPS), señala que el cáncer de mama es el más frecuente en las mujeres de América Latina y el Caribe; estima que en 2008 se diagnosticaron poco más de 320 mil mujeres con este padecimiento y calcula que para 2030 se incrementará 60 por ciento [3].

En 2015 la Secretaría de Salud en México registro 291,637 defunciones en mujeres de las cuales 40,537 (13.9 %) correspondieron a tumores malignos y 15.4% defunciones que correspondió a cáncer de mama el 9.9% a cáncer de cuello de útero y 5.9% a cáncer de ovario. El INEGI, 2018 refiere que durante 2016, el cáncer de mama fue la primer causa de mortalidad con un 18,7 % en la población mexicana mayor de 20 años, es decir tres de cada diez mujeres presentan esta enfermedad. Así mismo en algunos estados la incidencia de cáncer de mama en mujeres de 20 y más años es superior a la nacional 28.9 %. En el 2014, se observó un aumento en los casos nuevos de tumores malignos de mama asociado al

incremento de la edad de la mujer, situación semejante con la mortalidad. La Secretaria de salud [4].

Entre los tratamientos actuales para el cáncer de mama se encuentran el farmacéutico y el quirúrgico. En lo farmacéutico se encuentra la quimioterapia con fármacos anticancerígenos, la terapia endocrina, así como la radioterapia; en lo quirúrgico se realiza la escisión completa del tumor o una mastectomía conservadora o radical, sin embargo son las características del tumor las que limitan el tratamiento que cada paciente requiere, haciendo uso de uno o dos métodos anticancerígenos [5].

Objetivo general: Identificar y analizar las emociones de las mujeres con mastectomía lateral y bilateral.

Metodología- Diseño de estudio: Cualitativo –fenomenológico la **Recolección de datos:** Se ejecutó muestreo no probabilístico por conveniencia, será seleccionada toda mujer que se le haya realizado mastectomía total o radical en una o ambas mamas no importando la edad de la mujer. **Diario de campo:** Se utilizó como instrumento de registro de datos, donde se anotaron las observaciones de forma completa, precisa y detallada. **Observación participante:** Se utilizó a través del contacto del investigador con las personas investigadas con el fin de obtener información sobre la realidad del contexto.

Análisis de los datos: Se transcribieron las grabaciones y las notas de campo estableciendo una codificación inicial y axial de las cuales resultaron grandes categorías que dieron explicación y sustento a los resultados. **Participantes:** Toda mujer que se le haya realizado mastectomía total o radical en una o ambas mamas. **Instrumentos de obtención de información:** Para el estudio se utilizó una cedula de datos sociodemográficos elaborada por el autor de la investigación. El segundo instrumento solo se utilizó la dimensión bienestar emocional con preguntas semi estructuradas de la escala Functional Assessment of Cancer Therapy-Breast FACT-B por sus siglas en inglés (FACIT, 2010).

Procedimiento metodológico: En primer lugar se realizó la exposición del protocolo a los directivos del grupo RETO una vez obtenido su visto bueno se procedió a la petición de los expedientes y/o datos de las mujeres con mastectomía que asisten y/o asistieron en algún momento al grupo. Se procedió a contactar a las mujeres vía telefónica, el día en que se aplicaron los instrumentos a través del uso de las tecnologías electrónicas video-llamada se leyó de nuevo el consentimiento.

Resultados

A continuación, se presentan los hallazgos identificados en los testimonios de las mujeres entrevistadas. Para su identificación colocaremos el código M1, M2 y M3 para resguardar la identidad de nuestras participantes, se contemplaron cinco pacientes con cáncer de mama, de las cuales se descartaron dos entrevistas una porque la paciente se negó a responder todas

las preguntas y otra porque proporciono datos insuficientes para el análisis, la edad de las mujeres es de 27, 41 y 51 años, con estado civil es casada, unión libre, divorciada, todas tienen hijos y escolaridad primaria, secundaria y licenciatura trunca. Desarrollan actividades como el ser amas de casa y empleada en el ámbito privado. Dentro de los antecedentes clínicos se pueden mencionar que el tiempo transcurrido post mastectomía es un mes, un año y más de cinco años, solo una mujer con tratamiento de radioterapia. La mastectomía para dos de ellas fue realizada en la mama izquierda y la otra tiene mastectomía bilateral.

Respecto a las necesidades emocionales expresaron tener sentimientos positivos que se categorizaron como felicidad, sentimiento de tranquilidad, bienestar, motivación, satisfacción, actitud y autopercepción positiva M1 ***“yo me siento bien hasta emocionalmente, al principio te digo que no me quería ni levantar, que no me quería bañar, como que me daba flojera pero de un tiempo para acá como que me he sentido bien y no me siento como cuando inicie”***, M2 ***“me levantaba y pensaba en que tenía mi hijo chiquito y pues siempre tuve en mi mente el que me necesitaban en casa, el estar con mi hijo más años, estar con mi pareja, ver contenta a mi mama, sentirme yo que estaba dando todo para el día de mañana que me dieran una respuesta negativa pues decir por lo menos que lo intente, o sea puse todo de mi parte y pues afortunadamente salió todo bien”***. M3 ***“todo esto lo he hecho por mis hijas, pues antes estaba sola, al principio no tenía a mis hijas, fue cuando recibí la primera mastectomía y ahorita pues con más ganas ¿no? Para que ellas estén bien también”*** Es de notarse que la familia es una parte fundamental en el proceso de la enfermedad, adquiriendo mayor relevancia los hijos y la pareja quienes brindan la mayor motivación para afrontar los cambios emocionales y fisiológicos que se desarrollan en este periodo.

A través del acercamiento a la realidad que experimentan estas mujeres se categorizaron sentimientos negativos como desmotivación, dolor, tristeza e incomodidad, M2 ***“a veces si me siento mal porque ya no me pongo mi ropa, mis brasieres y se me hace un poquito triste, inclusive me enoja porque pues ahorita en si tampoco la prótesis me la puedo comprar porque es reciente y es de silicón pues me lastima”***, M3 ***“era muy incómodo para mi andar con un solo pecho”*** Es importante que el personal de enfermería mantenga continuo la promoción y prevención del cáncer de mama en todas las etapas del desarrollo de la mujer y siempre tomar en cuenta los antecedentes familiares de cáncer de mama, el buscar estrategias para convencer a todas las mujeres para realizarse la autoexploración mensual y acudir a su mastografía o estudios correspondientes según la etapa de reproducción en la que se encuentren. M1 ***“como mi mamá falleció de esto también entonces a lo mejor pues a mí, yo me, yo imaginaba que me iba a pasar como a ella, entonces cuando a mí me dieron la noticia pues si este... si estaba yo triste”***.

El aspecto físico afectado vulnera las emociones de las mujeres a quienes se les ha extirpado uno de los aspectos más importantes para el atractivo femenino. El enfrentarse día con día a

su nuevo aspecto físico denota los sentimientos de tristeza e incomodidad al verse reflejadas en un espejo, al no poder utilizar la misma ropa e incluso al tratar de igualar las mamas con otras alternativas para que visualmente no haya una diferencia. Otra de las grandes categorías encontradas fue denominada como Apoyo ya que las mujeres refieren que su entorno social representa un soporte para sobrellevar las diferentes etapas en el transcurso de la enfermedad. M1 ***“También influye el apoyo de mis hijos, de mi nuera, de mis nietos que vienen a verme, mucha más gente, mis amigos, mis compañeros de la secundaria, del trabajo y eso me motiva a estar mejor, a pesar de que ya no estamos juntos pues recibo mucho su apoyo”***, M2 ***“pues tuve mucho apoyo de mi familia, sobre todo de mi pareja, como que se me fue pasando la tristeza, pues te digo realice mis actividades normales”***.

El creer en algo o alguien es primordial para fortalecer la fe y confianza para salir adelante de todas las dificultades que se les presentan a estas mujeres, mencionan tener un Dios que les permite seguir adelante para cumplir diferentes metas y objetivos en la vida y con su familia. M1 ***“Dios me dejó para todavía cumplir otros tantos, este proyectos o no sé lo que sea, este por algo Dios me dejó ¿verdad?”***, M2 ***“gracias a Dios salí muy bien, nunca me sentí así como muchas me habían dicho que se sentían de la fregada y que no iba a tener hambre, que no iba a tener ganas de nada y si hubo días en los que si me sentí mal pero a pesar de eso me levantaba”***. La comunicación de las emociones en el cuidado de enfermería que se brinda a las mujeres con extirpación de mama debe de ser sensible a la identificación de las emociones mediante un ambiente de confianza utilizando diferentes dinámicas de comunicación para fortalecer el cuidado que se brinda por enfermería en la actualidad a las mujeres con cáncer de mama.

Conclusiones:

Al realizar esta investigación identifique que las necesidades emocionales de las pacientes son importantes para poder brindarles un cuidado de enfermería integral que no solo se base en el aspecto físico, sino que ayude a las mujeres a expresar realmente lo que sienten y necesitan, mientras realizaba las entrevistas me percaté de que las mujeres en ciertas ocasiones sentían pena de expresar lo que sentían o las experiencias por las que habían pasado, además de limitarse un poco en sus respuestas. Es importante que la práctica del cuidado de enfermería tome conciencia en el ámbito emocional porque es uno de los factores más importantes para la mejoría de los pacientes además de que ayuda a conocer más a fondo el estado actual del paciente. Como enfermera en formación recomendaría que enfermería tomara más en cuenta las teorías del cuidado de enfermería, como es el caso de la teoría del cuidado humanizado de enfermería de Jean Watson ya que esta filosofía aborda la conexión que va más allá del campo médico y que comprende el ámbito emocional y espiritual de los pacientes en el contexto salud enfermedad.

Bibliografía.

- [1] Copyright American Cancer Society (2018). Cáncer de seno (mama).
<https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>
- [2] Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016). Cáncer de mama: prevención y control. Disponible en
<http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>
- [3] Instituto Nacional de Estadística y Geografía Aguascalientes, Ags (2014). Estadísticas a propósito del día internacional contra el cáncer de mama. Desde:
<https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2014/mama0.pdf>
- [4] Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2018). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Disponible en:
https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf
- [5] Guía de práctica clínica.(2009) Diagnóstico y Tratamiento de Cáncer de Mama en segundo y tercer nivel de atención. Disponible en
http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/232_IMSS_09_Ca_Mama_2oN/GRR_IMS_S_232_09.pdf

OBTENCIÓN DE PROPIEDADES REGISTRADAS EN LAS TABLAS DE VAPOR A PARTIR DE UNA INTERFAZ GRÁFICA DESARROLLADA EN PYTHON

Abraham Rodarte de la Fuente^a

^aDCNE, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Guanajuato, 36050, MÉXICO. a.rodartedelafuente@ugto.mx

Resumen

El siguiente trabajo muestra una alternativa muy vanguardista para poder obtener valores acerca de las propiedades de sustancias puras, en este caso del agua, lo que podría hacer que los estudiantes y la gente interesada en general se acerque a este tipo de proyectos que impulsarían a la Universidad de Guanajuato como una de las universidades más emprendedoras del país al tener una interfaz en la que solo se tenga que ingresar una serie de condiciones para obtener propiedades termodinámicas tan solo dando clic en el botón Enter, ya que se llevaría a cabo una interpolación de los valores reportados por bibliografías y artículos que exploran el mundo de la Termodinámica.

Palabras clave: Programación, Interpolación, Módulos, Propiedades Termodinámicas.

Introducción

Los avances tecnológicos avanzan exponencialmente, específicamente se puede observar que las computadoras que usamos actualmente son más pequeñas y poderosas que las que se

usaban hace 20 años. Junto con esta optimización del volumen que ocupan también se mejoró la potencia con la que se trabajan estos equipos. Normalmente cuando se toman los cursos de Termodinámica en los primeros semestres, se nos enseña a usar el manejo de tablas para poder obtener valores, dichas tablas normalmente contienen datos a condiciones de temperatura y presión específicas por lo que se recurría el uso de métodos de interpolación para encontrar los valores específicos que se necesitaban para resolver los problemas, por ejemplo, de balance de energía.

La interfaz gráfica que se propone para poder tener un avance tecnológico para esta forma de trabajo está desarrollada en el lenguaje de programación Python 3.8 el cual es un lenguaje de alto nivel bastante expresivo por lo que escribir programas es más sencillo a comparación con lenguaje orientado a objetos, como podría ser el lenguaje C. Otra ventaja de trabajar en este lenguaje es la importación de Módulos, los cuales ayudarán en el aspecto de que no se tendrá que programar la mayor parte de las funciones que serán necesarias para que el programa pueda funcionar.

Aunque existen una gran cantidad de aplicaciones en línea que permiten determinar propiedades termodinámicas en un amplio rango de condiciones, esta propuesta se diferencia en que no es necesario instalarlo en el equipo que se va a usar, no necesita internet para su funcionamiento y también es gratuito, cabe aclarar que no es necesario instalar Python 3.8, además de que el código estará disponible para cualquiera que quiera estudiarlo.

El primer módulo que se usará será el llamado “Tkinter” el cual es un paquete con el cual se pueden crear interfaces de manera muy sencilla y en poco tiempo, aunque su estética no es muy agradable a comparación con la de otros lenguajes.

Para el desarrollo de los cálculos numéricos se usará el módulo “Numpy” es un paquete que se usa para ciencia de datos ya que crea vectores y matrices con los que se puede obtener un código más eficiente en los cálculos y en el tiempo de ejecución.

Los datos serán extraídos del trabajo de Cengel [1] los cuales harán referencia a los valores obtenidos para el vapor saturado en base a la temperatura, el vapor saturado con base en la presión, el vapor sobrecalentado y el líquido comprimido, aunque la bibliografía se hace mención del hielo saturado, en este proyecto no se usarán sus datos ya que no es frecuente consultarlos para resolver problemas de carácter didácticos.

Al tener una gran cantidad de datos y con el objetivo de obtener un valor aceptable se hace uso de la técnica de interpolación de Newton el cual nos genera un polinomio a partir de los datos reportados.

$$f(x) = a_1 + a_2(x - x_1) + a_3(x - x_1)(x - x_2) + \dots + a_n(x - x_1)(x - x_2)(x - x_3) \dots (x - x_{n-1}) \quad (1)$$

En la **Ecuación 1** podemos ver que “a” es un coeficiente obtenido por las tablas de diferencias divididas. Dependiendo del número de punto obtenidos el grado del polinomio dependerá de este valor.[2]

Metodología

Se empezará a escribir el código en el editor de texto “Visual Studio Code”, en una carpeta llamada, en este proyecto, “Interfaz gráfica Tablas de Vapor” se introducirá un block de notas con del tipo “.txt” para posteriormente cambiarlo a “.py” y se abrirá con el editor de textos para primeramente generar la interfaz gráfica importando el módulo Tkinter el cual es un poco pesado si se llama por completo, ya que contiene una gran cantidad de “Widgets”, los cuales son los componentes que se pueden usar en una interfaz como: botones, cuadros de textos, etc. Como este programa no será de una gran extensión se le llamará completamente para agilizar la programación. A continuación, se muestra la base de la interfaz gráfica definida como root, junto con el código para crearlo.



```
PY ejemplo grafica.py
PY ejemplo grafica.py > ...
1  from tkinter import *
2  root = Tk()
3  root.title("Ejemplo")
4  root.resizable(1,1)
5
6  root.mainloop()
7
```

Figura 1. Ejemplo de Interfaz Gráfica en Python 3.8.

Como se puede observar al importar el paquete aparece con una advertencia, esto es porque se llama completamente y hay funciones que no se están usando, como ya se mencionó.

Una vez obtenida la interfaz ingresaremos las funciones con las cuáles podremos realizar las interpolaciones de Newton necesarias para poder obtener los datos que se necesitan. La primera función será para realizar la Interpolación de Newton como se muestra en la **Figura 2**. Donde también se indica cuando se realizará la Tabla de Diferencias divididas y en la línea 64 el término “return” nos indica que cuando se llame la función se obtendrán el valor de la interpolación para un vector “y” a partir de un dato “xint” en un vector “x”. Estos vectores contendrán 4 valores seleccionado a partir de una gran lista de valores con lo que se generan 2 vectores con los que se podrá realizar la interpolación. Estos vectores serán definidos conforme que tan grande es el valor de xint en la lista x, ya que si por ejemplo es mayor al valor mayor de la lista se usan los últimos cuatro valores en el vector, y si es menor se usan los últimos cuatro valores de la lista para generar los valores, **Figura 3**.


```

39 #Interpolación de Newton
40 def InterNewton(x,y,xint):
41     n = len(x)
42     a = np.zeros(n)
43     difDiv = np.zeros((n-1,n-1))
44
45     a[0] = y[0]
46     #Comienza la tabla de diferencias divididas
47     for i in range(0,n-1):
48         try:
49             difDiv[i,0] = (y[i+1]-y[i])/(x[i+1]-x[i])
50         except ZeroDivisionError:
51             difDiv[i,0] = (y[i+1]-y[i])/0.000000001
52             print("Varios valores en el eje x son iguales")
53     for j in range(1,n-1):
54         for i in range(0,n-j-1):
55             difDiv[i,j] = (difDiv[i+1,j-1]-difDiv[i,j-1])/(x[j+i+1]-x[i])
56     for i in range(1,n):
57         a[i] = difDiv[0,i-1]
58     #Evaluar el Polinomio
59     yint = a[0]
60     prodx = 1
61     for l in range(1,n):
62         prodx = prodx*(xint-x[l-1])
63         yint = yint + a[l]*prodx
64     return yint

```

Figura 2. Código función Interpolación de Newton.

```

17 def Vectores(xData,yData,x_int):
18     i=0
19     Lon = len(xData)
20     for x in xData:
21         if x_int <= x:
22             if i==1 or x <= xData[0]:
23                 xint=[xData[0],xData[1],xData[2], xData[3]]
24                 yint=[yData[0],yData[1],yData[2], yData[3]]
25                 break
26             if i==Lon-1:
27                 xint=[xData[Lon-4],xData[Lon-3],xData[Lon-2],xData[Lon-1]]
28                 yint=[yData[Lon-4],yData[Lon-3],yData[Lon-2], yData[Lon-1]]
29                 break
30             xint=[xData[i-2], xData[i-1],xData[i], xData[i+1]]
31             yint=[yData[i-2], yData[i-1],yData[i], yData[i+1]]
32             break
33         i=i+1
34     if x_int >= xData[-1]:
35         xint=[xData[Lon-4],xData[Lon-3],xData[Lon-2],xData[Lon-1]]
36         yint=[yData[Lon-4],yData[Lon-3],yData[Lon-2], yData[Lon-1]]
37     return xint, yint

```

Figura 3. Código función Vectores de 4 datos.

Al introducir todos los valores a manos en las listas del programa de realizarán varias inspecciones de los valores para que coincidan con los de la literatura.

- Inspección suave: Se graficarán los valores en hojas de Excel para ver su comportamiento y si algún punto se sale de la curva generada se revisa el valor y si es diferente se cambia.
- Inspección rigurosa: Se hará un checklist por lo que se revisará dato por dato marcando como correcto los valores que coincidan los valores de la lista con los de la referencia.

Se tratarán cuatro tablas:

- a) Tabla de vapor saturado (Tabla de Temperaturas)
- b) Tabla de vapor saturado (Tabla de Presiones)
- c) Tabla de vapor sobrecalentado
- d) Tabla de líquido comprimido.

No se explicará detalladamente la programación para introducir los componentes o “widgets” en la interfaz, pero se trató de realizarla amigablemente para el usuario, así para evitar el uso de un botón “Calcular” y solo dar clic en Enter para poder realizar los cálculos a partir de un dato en un cuadro blanco y obtener un valor en un cuadro negro. El evento de realizar el cálculo presionando Enter estará administrado por una serie de “RadioButtons” que indicaran en que Tabla se desea trabajar. Así no se tendrá que estar volviendo a abrir la interfaz, Para validar los resultados obtenidos de la interfaz se comparan con los valores obtenidos para la presión de saturación utilizando la Ecuación de Antoine, con la cual calcularemos la presión de saturación. Dicha ecuación tiene la siguiente forma:

$$\ln(P_{sat}) = A - \frac{B}{T + C} \quad (2)$$

Donde A, B y C son constantes y T es la temperatura del agua en Kelvin.

Tabla 2. Constantes Ley de Antoine para el agua[3]

A	B	C
16.54	3985	-39

Resultados.

A continuación, se muestra la comparación entre los resultados obtenidos con el algoritmo implementado en el programa con los resultados obtenidos en la **Ecuación 2** en Excel.

Tabla 3. Comparación de resultados

T °C	Psat (Ecuación 1) kPa	Psat (Interfaz) kPa	%Error
95	84.18846161	84.609	0.49703742
96	87.33304479	87.771	0.49897485
97	90.57502103	91.031	0.50090515
98	93.9167311	94.391	0.5024514
99	97.36055329	97.853	0.50325152
100	100.9089036	101.42	0.50394043

Realizando la programación adecuada, usando buena sintaxis y haciendo buen uso de los módulos obtenemos la siguiente interfaz mostrada en la **Figura 3**.

Propiedades Tablas de Vapor

Agua Saturada

Tabla de temperaturas

Temperatura:

Pres. sat.:

Volumen específico

Líquido saturado:

Vapor saturado:

Energía interna

Líquido saturado:

Evaporación:

Vapor saturado:

Entalpía

Líquido saturado:

Evaporación:

Vapor saturado:

Entropía

Líquido saturado:

Evaporación:

Vapor saturado:

Limpiar

Tabla de presiones

Presión:

Temp. sat.:

Volumen específico

Líquido saturado:

Vapor saturado:

Energía interna

Líquido saturado:

Evaporación:

Vapor saturado:

Entalpía

Líquido saturado:

Evaporación:

Vapor saturado:

Entropía

Líquido saturado:

Evaporación:

Vapor saturado:

Limpiar

Vapor de agua sobrecalentado

Temperatura:

Presión:

Volumen específico:

Energía interna:

Entalpía:

Entropía:

Limpiar

Agua líquida comprimida

Temperatura:

Presión:

Volumen específico:

Energía interna:

Entalpía:

Entropía:

Limpiar

Figura 4. Interfaz gráfica obtenida.

También se muestran todos los calculos que pueden efectuarse el programa:

Propiedades Tablas de Vapor

Agua Saturada

Tabla de temperaturas

Temperatura:

Pres. sat.:

Volumen específico

Líquido saturado:

Vapor saturado:

Energía interna

Líquido saturado:

Evaporación:

Vapor saturado:

Entalpía

Líquido saturado:

Evaporación:

Vapor saturado:

Entropía

Líquido saturado:

Evaporación:

Vapor saturado:

Limpiar

Tabla de presiones

Presión:

Temp. sat.:

Volumen específico

Líquido saturado:

Vapor saturado:

Energía interna

Líquido saturado:

Evaporación:

Vapor saturado:

Entalpía

Líquido saturado:

Evaporación:

Vapor saturado:

Entropía

Líquido saturado:

Evaporación:

Vapor saturado:

Limpiar

Vapor de agua sobrecalentado

Temperatura:

Presión:

Volumen específico:

Energía interna:

Entalpía:

Entropía:

Limpiar

Agua líquida comprimida

Temperatura:

Presión:

Volumen específico:

Energía interna:

Entalpía:

Entropía:

Limpiar

Figura 5. Resultados efectuados por todos los algoritmos del programa en la interfaz.

Cabe resaltar que la interfaz respeta el número de decimales usadas en la bibliografía para mostrar los resultados.

Conclusiones

La interfaz gráfica presentada junto con la metodología para realizar las interpolaciones podría usarse como medio didáctico para comparar los resultados de las interpolaciones realizadas por los alumnos o incluso podría dar paso a crear una base de datos de propiedades para todo tipo de sustancias propias de la Universidad de Guanajuato y así no depender de referencias bibliográficas ni simuladores a los que se les tiene que estar pagando grandes cantidades de dinero por las licencias ya que Visual Studio Code y Python no tienen costo alguno por lo que son accesibles para cualquier alumno.

Se puede notar en la comparación con los valores de la **Ecuación 2** que se obtiene valores muy bajos en los porcentajes de error por lo que estos valores se pueden tomar como aceptables, además de que, si se comparan con los valores reportados en la referencia bibliográfica consultada, los valores tabulados, se tendría un porcentaje de error nulo.

El único problema que se tendría que tomar en cuenta es que los alumnos podrían perder el interés al buscar información confiable ya que el acceso a estos valores sería muy fácil y no investigarían en artículos científicos, libros, etc.

Bibliografía

- [1] Cengel, Y., (2012). “*Termodinámica*”, 7ª Ed., Editorial Mc Graw Hill, México, 914-922
- [2] Leithold, L., (1999). “*El Cálculo*”, 7ª Ed., Oxford University Press, México, 275-278.
- [3] Martínez, I., (1992). “*Termodinámica Básica y Aplicada*”, 1ª Ed., Editorial DOSSAT, España, Apéndice 3.

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS $\Delta mutSL$ Δmfd y $\Delta mutSL \Delta greA$ DE *Bacillus subtilis* EN EL FONDO GENÉTICO YB955.

¹Andrea Cantador Gámez, ¹Hilda Leyva Sánchez, ¹Suria G. Vásquez Morales ¹Mario Pedraza Reyes
Departamento de Biología. Universidad de Guanajuato. Noria Alta S/N. Guanajuato, Guanajuato. 36050.
México.

a.cantadorgamez@ugto.mx; pedrama@ugto.mx

Resumen

La mutagénesis adaptativa o de fase estacionaria (MFE) es un fenómeno mediante el cual las células que no se dividen adquieren mutaciones benéficas como respuesta a la aplicación de una presión selectiva no letal prolongada. Este fenómeno está íntimamente asociado con la reparación acoplada a la transcripción (TCR), involucrada en la detección y reparación de

daños en el ADN en genes transcripcionalmente activos. En estudios previos, utilizando el sistema de reversión a las auxotrofías cromosómicas *hisC952 metB5* y *leuC427* en la cepa *Bacillus subtilis* YB955, se demostró que la pérdida o disminución de la actividad del Sistema Mismatch (MMR) durante la fase estacionaria afectó la producción de revertantes en estos alelos. Se conoce que en condiciones que saturan o inactivan al sistema MMR, Mfd el factor que acopla la reparación con la transcripción y la ADN glicosilasa MutY tienen un mecanismo en común para generar revertantes en alelo *leuC427*. Aunado a esto, se ha descrito la participación del factor de transcripción GreA en promover mutaciones en células de *B. subtilis* estresadas nutricionalmente. Por lo que, es de interés investigar si el procesamiento de lesiones de ADN que son sustratos del Sistema MMR contribuye en modular los eventos mutagénicos dependientes de los factores de transcripción Mfd y GreA que ocurren en células en crecimiento y en fase estacionaria en la cepa *B. subtilis* YB955.

Palabras clave: Mutagénesis adaptativa, TCR, MMR. Mfd, GreA.

Introducción

El ADN es la unidad básica de herencia por lo que, la preservación de la información de la secuencia genómica en los organismos vivos es importante para la perpetuación de la vida. La importancia de esto último encuentra su máxima expresión en el desarrollo y la perfección evolutiva de la respuesta al daño del ADN por parte de los organismos vivos [1, 2]. Las mutaciones genéticas pueden provocar cambios en la estructura de una proteína codificada o una disminución o pérdida completa de su expresión [3].

En la naturaleza, las poblaciones microbianas se enfrentan constantemente a entornos variables y estresantes. La mutagénesis adaptativa, es un proceso que permite a las células que no se dividen adquirir mutaciones beneficiosas como respuesta a la aplicación de una presión selectiva no letal prolongada, por ejemplo, la limitación de nutrientes [4, 5, 6, 7]. Este fenómeno celular permite a organismos de toda la escala filogenética modificar su genoma para promover la diversidad genética con un impacto directo en la evolución bajo condiciones de estrés [8].

En las bacterias de crecimiento lento o que no se dividen, donde la replicación del ADN está dramáticamente disminuida o incluso ausente, el proceso de transcripción permanece activo. Existe evidencia sustancial que indica que las células con crecimiento detenido experimentan altos niveles de daño en el ADN [9, 10]. Es bien sabido que el daño genético se repara con mayor prontitud en genes transcripcionalmente activos, más específicamente en la cadena que está siendo transcrita. Este proceso de reparación se conserva entre los tres dominios de la vida y se conoce como reparación acoplada a la transcripción (TCR) [11]. Ahora se sabe que más de una docena de diferentes tipos de daños en el ADN se eluden con diversos grados de eficiencia y capacidades de codificación errónea por parte de la maquinaria de alargamiento transcripcional [9]. Estudios previos con *E. coli* y *B. subtilis* han asociado el proceso de transcripción con la capacidad de las células para adquirir mutaciones en condiciones de estrés [11]. De acuerdo con lo anterior, es posible que

durante condiciones de estrés o en células con nutrientes limitados se activen mecanismos que sesguen los eventos mutagénicos hacia genes altamente transcritos, aumentando así el potencial adaptativo de las mutaciones mejorando la supervivencia de las poblaciones celulares que sufren estrés nutricional [8 y 12]. Además, es probable que los factores de transcripción afecten los niveles de transcripción y, por lo tanto, la tasa de mutación, al disociar los complejos de elongación estancados y permitir nuevos intentos de transcripción [10].

Estudios anteriores utilizando el sistema de reversión a tres auxotrofías cromosómicas (*hisC952*, *metB5*, *leuC425*) en la cepa *Bacillus subtilis* YB955, han descrito que, uno de los mecanismos para la generación de revertantes en este microorganismo es la pérdida o disminución de la actividad del Sistema de reparación de ADN Mismatch (MMR) durante la fase estacionaria [4, 5]. Se sabe que en condiciones que saturan o inactivan el sistema MMR, la ADN glicosilasa MutY promueve la generación de revertantes en el alelo de leucina. Así mismo, Mfd (factor que acopla la reparación con la transcripción) y MutY tienen un mecanismo en común para generar revertantes en este alelo [8, 13]. Aunado a esto, se ha descrito la participación del factor de transcripción GreA en promover mutaciones en células de *B. subtilis* estresadas nutricionalmente [8]. Por lo que, se ha teorizado que el procesamiento de lesiones en el ADN que son sustratos del Sistema MMR contribuye en modular los eventos mutagénicos dependientes de los factores de transcripción Mfd y GreA que ocurren en células en crecimiento y en fase estacionaria en la cepa YB955 de *B. subtilis*.

Para abordar esta hipótesis se buscó generar y caracterizar a nivel molecular las mutantes de *B. subtilis*, $\Delta mutSL$ Δmfd y $\Delta mutSL \Delta greA$ en el fondo genético YB955. El presente documento describe de forma general los procedimientos empleados para la obtención de las triples mutantes de *B. subtilis* mencionadas. Así mismo, se muestran los resultados obtenidos.

Metodología

Tabla 1: Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este estudio

CEPAS		PLÁSMIDOS
B. subtilis		
PERMYB151	YB955 $\Delta MutSL$ Cm ^R	
PERM1724	YB955 $\Delta MutSL \Delta mfd$ Cm ^R Neo ^R	pPERM1538-mfd (Cepario del laboratorio del Dr. Mario Pedraza Reyes)
PERM1723	YB955 $\Delta MutSL \Delta greA$ Cm ^R Neo ^R	pPERM1191-greA (Villegas-Negrete y col. (2017))

^aMarcador de selección en paréntesis: Cm, cloranfenicol; Neo, neomicina.

Tabla 2: Reactivos y Equipo

REACTIVOS		EQUIPO
Medio Luria Bertani	Regulador de lisis	Incubadora con agitación Thermo Scientific MAQ 440
Medio A3	Lisozima	Centrífuga THERMO, Germany
Antibióticos: Cloranfenicol y Neomicina	Agarosa	Centrífuga Eppendorf 5418
Mezcla Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1)	Bromuro de etidio	Termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemania)
Mezcla Cloroformo:Alcohol Isoamílico (24:1)		Espectrofotómetro
Dodecil Sulfato de Sodio 20% (p/v)		Incubadora

Generación y caracterización las mutantes de *B. subtilis* $\Delta mutSL$ Δmfd y $\Delta mutSL$ $\Delta greA$ en el fondo genético YB955.

- Extracción de ADN plasmídico de las cepas de *E. coli* PERM1538 y PERM1191:** Se inocularon de 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico de selección con una colonia de la cepa respectiva de *E. coli*, se creció a saturación a 37 °C con agitación constante y se cosecharon las células mediante centrifugación 2 minutos a 10000 rpm en tubos Eppendorf, una vez colectadas las células, para la obtención de ADN plasmídico a mediana escala se emplearon columnas de intercambio iónico QIAGEN-tip 100 (Valencia, CA. USA). El procedimiento se realizó de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Se visualizó el ADN plasmídico en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.25 µg/mL).
- Transformación de células competentes de *B. subtilis*:** Para la obtención de la mutante $\Delta mutSL$ Δmfd se prepararon células competentes de la cepa PERMYB151 $\Delta mutSL$ de *B. subtilis* y se adicionó el plásmido extraído por columna de la cepa *E. coli* PERM1538 transformadas con el vector pPERM1538-*mfd*. Se seleccionaron las transformantes por resistencia a cloranfenicol y neomicina. La preparación y transformación de las células competentes de *B. subtilis* se realizó mediante el método descrito por Boylan y col. (1972) [14]. Para la obtención de la mutante $\Delta mutSL$ *greA* se siguió el mismo procedimiento, pero utilizando el plásmido extraído por columna pPERM1191-*greA* de la cepa *E. coli* PERM1191.
- Extracción de ADN genómico de las transformantes de *B. subtilis* $\Delta mutSL$ Δmfd y $\Delta mutSL$ $\Delta greA$:** Para la lisis de las células se siguió el protocolo de lisis descrito por Cutting y Vanderhorn (1990) [15]. Una vez lisadas las células, la obtención del ADN se

realizó mediante extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) según el protocolo de extracción descrito por Cutting y VanderHorn (1990) [15].

4. **Corroboración de transformantes $\Delta mutSL \Delta mfd$ y $\Delta mutSL \Delta greA$ por PCR:** Para corroborar la correcta inserción de las construcciones en los genes de interés, se utilizó el ADN cromosomal extraído de las transformantes de *B. subtilis*, mediante el método previamente descrito y se realizó una PCR. Para $\Delta mutSL mfd$ se utilizó un oligonucleótido directo que alinea en el gen *yabK* el cual se encuentra río arriba del gen *mfd* y un oligonucleótido reverso que alinea en el gen *mfd* contenido en el vector pPERM1538-*mfd*. En el caso de $\Delta mutSL \Delta greA$ se utilizó un oligonucleótido directo que alinea en una región interna del gen *greA* y un oligonucleótido reverso que alinea en una región interna del gen *lacZ* contenido en el vector pPERM1191-*greA*.

Resultados

Obtención y caracterización molecular de una cepa mutante deficiente de *mutSL* y *mfd* en el fondo genético *B. subtilis* YB955.

Con la finalidad de corroborar la interrupción de *mfd* mediante un evento de recombinación homóloga doble, se realizó una PCR utilizando como templado el ADN genómico de las transformantes obtenidas, y oligonucleótidos que alinean desde una región interna del ORF de *mfd* hasta una región interna del ORF de *yabK*. La banda de amplificación esperada de 2501 pb mostrada en la Figura 1A y 1B confirma la correcta interrupción del gen *mfd*.

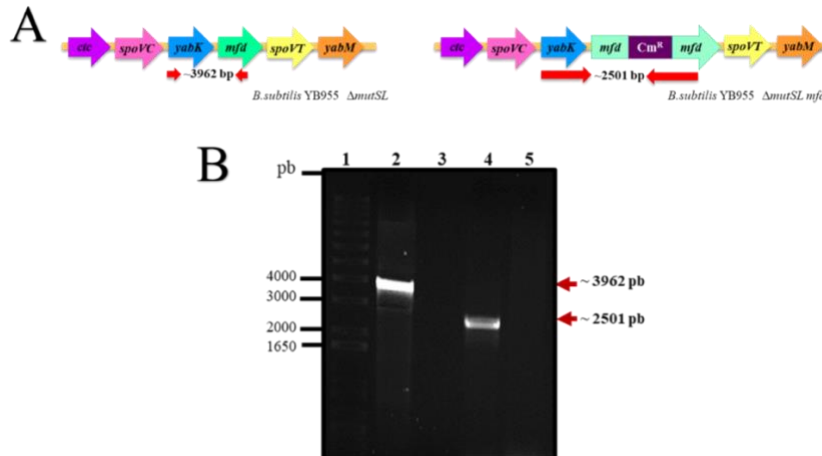


Figura 1. Corroboración molecular de la triple mutante $\Delta mutSL \Delta mfd$. A) Esquema donde se muestra con flechas el fragmento que comprende parte del gen *mfd* sin interrumpir y un fragmento interno del gen *yabK* de ~2501 pb y de ~3962 pb correspondiente a *mfd* interrumpido. B) Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio al 0.1% (p/v). Carril 1, marcadores de tamaño molecular de ADN de 1 Kb. Carril 2, producto de amplificación del plásmido pPERM1538 (control negativo). Carril 3, 4 y 5 producto de amplificación esperado en transformantes seleccionadas (PERM1724).

Obtención y caracterización molecular de una cepa mutante deficiente de *mutSL* y *greA* en el fondo genético *B. subtilis* YB955.

Con la finalidad de corroborar la interrupción de *greA* mediante un evento de recombinación homóloga sencilla, se realizó una PCR utilizando como templado el ADN genómico de las transformantes obtenidas, y oligonucleótidos que alinean desde una región interna del ORF de *greA* hasta una región interna del ORF de *lacZ*. La banda de amplificación esperada de ~900 pb mostrada en Figura 2A y 2B confirma la correcta interrupción del gen *greA*.

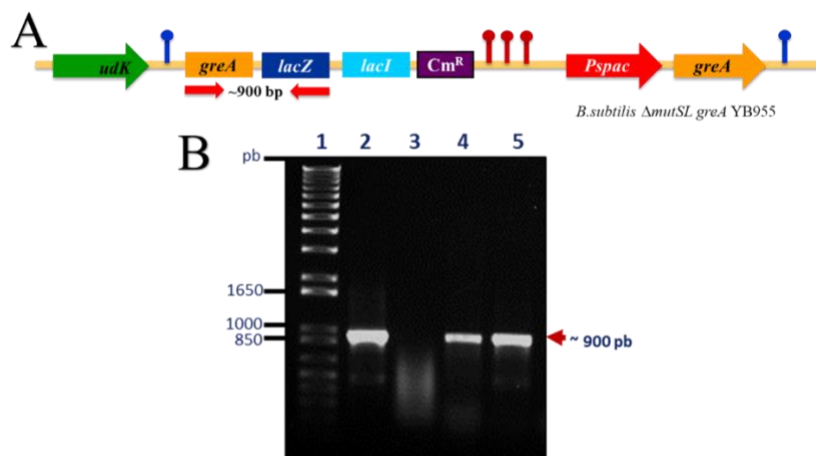


Figura 2. Corroboración molecular de las triples mutantes $\Delta\text{mutSL } \Delta\text{greA}$. A) Esquema donde se muestra con flechas el fragmento de ~900 pb que comprende parte del gen *greA* y un fragmento interno del gen *lacZ*. B) Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio al 0.1% (p/v). Carril 1, marcadores de tamaño molecular de ADN de 1 Kb. Carril 2, producto de amplificación del plásmido pPERM1191 (control positivo). Carril 3, 4 y 5 producto de amplificación esperado en transformantes seleccionadas (PERM1723).

Conclusiones

Como es posible apreciar en las imágenes mostradas, los productos de amplificación de ambas reacciones muestran el tamaño esperado para cada una, indicándonos de esta forma la correcta interrupción del gen *mfd* y *greA* (de forma independiente) en la doble mutante PERMYB151 ΔmutSL en el fondo genético YB955. Indicándonos que la obtención de las triples mutantes $\Delta\text{mutSL } \Delta\text{mfd}$ y $\Delta\text{mutSL } \Delta\text{greA}$, fué exitosa.

Trabajo financiado por CONACyT (Subsidio A1-S-27116) y la UG (Subsidio CIIC 228/2019 y 178/2020). ACG, agradece la beca otorgada por CONACyT para la realización de este trabajo.

Bibliografía

- [1] Chatterjee, N., y Walker, G. C. (2017). "Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagénesis". *Environ. Mol. Mutagen.*, 58(5), 235–263.
- [2] Sáez, G. T. (2018). "DNA Injury and Repair Systems". *Int. J. Mol. Sci.*, 19(7), 1902.
- [3] Lodish, H., Berk, A. y Zipursky, S.L. (2000). "*Molecular Cell Biology*", 4th Ed., W. H. Freeman, New York, Section 8.1, Mutations: Types and Causes.

- [4] Sung, H. M., y Yasbin, R. E. (2002). “Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis*”. *J. Bacteriol.*, 184(20), 5641–5653.
- [5] Pedraza-Reyes, M., y Yasbin, R. E. (2004). “Contribution of the mismatch DNA repair system to the generation of stationary-phase-induced mutants of *Bacillus subtilis*”. *J. Bacteriol.*, 186(19), 6485–6491.
- [6] Pybus, C., Pedraza-Reyes, M., Ross, C. A., Martin, H., Ona, K., Yasbin, R. E. y Robleto, E. A. (2010). Transcription-associated mutation in *Bacillus subtilis* cells under stress. *J. Bacteriol.*, 192: 3321–3328
- [7] Débora, B. N., Vidales, L. E., Ramírez, R., Ramírez, M., Robleto, E. A., Yasbin, R. E. y Pedraza-Reyes, M. (2011). “Mismatch repair modulation of MutY activity drives *Bacillus subtilis* stationary-phase mutagenesis”. *J. Bacteriol.*, 193: 236–245.
- [8] Gómez-Marroquín, M., Martin, H. A., Pepper, A., Girard, M. E., Kidman, A. A., Vallin, C., Yasbin, R. E., Pedraza-Reyes, M., y Robleto, E. A. (2016). “Stationary-Phase Mutagenesis in Stressed *Bacillus subtilis* Cells Operates by Mfd-Dependent Mutagenic Pathways”. *Genes*, 7(7),
- [9] Doetsch, P. W. (2002). “Translesion synthesis by RNA polymerases: occurrence and biological implications for transcriptional mutagenesis”. *Mutat. Res.*, 510(1-2), 131–140.
- [10] Robleto, E. A., Yasbin, R., Ross, C. y Pedraza-Reyes, M. (2007). “Stationary phase mutagenesis in *B. subtilis*: a paradigm to study genetic diversity programs in cells under stress”. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 42: 327-339.
- [11] Leyva-Sánchez, H. C., Villegas-Negrete, N., Abundiz-Yañez, K., Yasbin, R. E., Robleto, E. A. y Pedraza-Reyes M. (2020). “Role of Mfd and GreA in *Bacillus subtilis* Base Excision Repair-Dependent Stationary-Phase Mutagenesis”. *J. Bacteriol.*, 202 (9):e00807-19.
- [12] Ross, C., Pybus C., Pedraza-Reyes, M., Sung, H. M., Yasbin, R. E. y Robleto, E. A. (2006). “Novel role of *mfd*: effects on stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*”. *J. Bacteriol.*, 188: 7512–7520.
- [13] Martin, H. A., Porter, K. E., Vallin, C., Ermi, T., Contreras, N., Pedraza-Reyes, M., y Robleto, E. A. (2019). “Mfd protects against oxidative stress in *Bacillus subtilis* independently of its canonical function in DNA repair”. *BMC microbiology.*, 19(1), 26.
- [14] Boylan R.J., Mendelson N.H., Brooks, D. y Young, F.E. (1972). “Regulation of the bacterial cell wall: analysis of a mutant of *Bacillus subtilis* defective in biosynthesis of teichoic acid”. *J. Bacteriol.*, 110(1), pp. 281-290.
- [15] Cuttings, S.M. y Vander Horn, P.B. (1990). “*Molecular biological methods for Bacillus*”, 1ra Ed., John Wiley and Sons, Sussex, UK. 27–74.

PROCESO INTEGRAL ELECTROQUÍMICO PARA TRATAMIENTO DE EFLUENTES CONTAMINADOR POR CROMO HEXAVALENTE

Karla Yuritzi Álvarez Rivera^{1*}, Guillermo Manuel González Guerra¹, Martín Alejandro Alatorre Ordaz¹.

**México. Universidad de Guanajuato. Departamento de Química.*

ky.alvarezrivera@ugto.mx, gm.gonzalezguerra@ugto.mx, alatorre@ugto.mx

**(+52) 473 732 0006 Ext. 5408*

Resumen

El cromo es muy utilizado en el sector industrial relacionado con procesos metalúrgicos, galvanizados, textiles, material fotográfico y en la fabricación de pinturas, cerámicas, vidrios y curtido de pieles, que deja efluentes contaminados con cromo trivalente y hexavalente. El cromo hexavalente es considerado como tóxico y carcinógeno. A niveles altos de cromo VI pueden superar la capacidad reductora del ambiente y persistir como contaminante. Una alternativa como tratamiento de efluentes contaminadas por Cromo hexavalente es la electro-reducción directa en reactores tipo filtro-prensa. Sin embargo, este tratamiento no es costeable, debido a que se requieren reactivos caros para adquirir las condiciones de pH y se opera con energía eléctrica. En este trabajo se implementó un reactor tipo filtro-prensa en el cual se generan los insumos a partir de la electrolisis del agua; el cátodo fue de acero inoxidable y un ánodo dimensionalmente estable de Ti/IrO₂ donde se circuló la solución de K₂Cr₂O₇ y Na₂SO₄ obteniendo un pH de 3.0. El analito pasó al reactor 2 encargado de reducir el Cr (VI) a Cr (III) alcanzando una conversión del 95.25%, 83.56% y 75.87%, en los tres

ciclos que se realizaron con la misma solución, pues la solución remanente se reutilizó. La solución alcalina fue usada para precipitar el cromo trivalente.

Palabras clave: *Electro-reducción, Electrolisis, Cromo.*

Introducción

El cromo es un elemento que se encuentra presente en la naturaleza en varios estados de oxidación, principalmente en los números +2, +3 y +6 [1]. Gracias a esto los compuestos de cromo poseen diversas propiedades implicando así su uso en un diferentes industrias por ejemplo, en la galvanoplastia, como base de numerosos pigmentos, en la curtiduría de pieles, como mordientes, como catalizadores, en aleaciones, como oxidantes, para la fabricación de materiales refractarios, entre otros [2,3]. Desafortunadamente, estas actividades producen un aumento significativo en las concentraciones de dicho elemento en el medio ambiente. Más aún, en diversas industrias no se cuenta con las medidas adecuadas para el manejo de residuos, lo que ocasiona problemas de contaminación y riesgos en la salud humana [4].

La contaminación se da principalmente por la presencia de cromo hexavalente, ya que esta especie es tóxica y, al ser altamente soluble en toda condición de pH, adquiere una gran movilidad en el suelo, en el agua y en el aire [5].

Los efectos que causa la exposición prolongada a los compuestos de cromo hexavalente son graves en los seres humanos: debido a sus propiedades altamente oxidativas, afectan principalmente la piel, el tracto respiratorio y el sistema digestivo causando lesiones como dermatitis y úlceras [1-7].

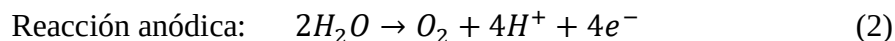
Como ya se mencionó anteriormente, no todas las industrias disponen de algún método de remoción, reducción y/o sorción de cromo hexavalente para tratar los residuos que generan sus procesos, debido a que no cuentan con los recursos que se requieren para la implementación de las tecnologías, tales como: intercambio iónico, ósmosis inversa, adsorción, electrodiálisis, electrocoagulación y reducción-precipitación química; ni con la solvencia que se necesita para la capacitación del personal.

Los tratamientos electroquímicos, ofrecen muchas ventajas para el tratamiento de los efluentes industriales. Dichos procesos son limpios, trabajan a temperatura ambiente y en la mayoría de los casos no necesitan de la adición de reactivos [8].

Dentro de los tratamientos electroquímicos se encuentra el electro-reducción directa, la cual es una opción viable para disminuir la toxicidad en los efluentes contaminados con cromo hexavalente. Ya que es un proceso muy efectivo, no genera lodos y, emplea como principal reactivo al electrón que les brinda la característica de ser procesos amigables con el medio ambiente [9].

El principio del método de electro-reducción directa es la reducción del cromo (VI) en medio ácido sobre la superficie del cátodo. Este proceso se rige con las siguientes reacciones:





Una vez que se tiene a la especie reducida Cr (III), no tóxica, se hace un ajuste de pH para que precipite como $Cr(OH)_3$.

Se han realizados diversos estudios de la electro-reducción directa en reactores tipo filtro-prensa. Particularmente, G. Almaguer Busso [1], propuso una configuración con la cual se logró prácticamente el 100% de la conversión de Cr (VI) a Cr (III) [10].

Hasta ahora, este método luce muy atractivo y, probablemente podría competir con la reducción química que, actualmente, es el tratamiento más empleado en diversas industrias para descontaminar los efluentes.

1. Se consumen reactivos de precios considerables para las etapas de reducción (H_2SO_4) y de precipitación ($NaOH$).
2. Para la operación del reactor se consume energía eléctrica.

Por esta razón, en este trabajo se desarrolló la adaptación de un sistema que, mediante la electrólisis del agua en un reactor tipo filtro-prensa, se obtienen, simultáneamente, los insumos que se requieren en las etapas de electro-reducción y precipitación; usando únicamente como reactivo Na_2SO_4 .

Metodología

Se diseñó el reactor tipo filtro-prensa donde se llevó al cabo la electrólisis del agua. De ahora en adelante no referiremos a este reactor como “Reactor 1”.

Se elaboró el ánodo dimensionalmente estable de Ti/IrO_2 (DSA, por sus siglas en inglés) siguiendo el método de Pechinni [8]: se cortó una placa de titanio y posteriormente se limpió sumergiéndola en HCl concentrado durante 1 hora a $70^\circ C$ y luego en HNO_3 al 10% en ebullición durante 15 minutos. Se enjuagó con H_2O destilada y se dejó secar. En seguida se preparó el precursor polimérico: se mezclaron los reactivos etilenglicol (EG) y ácido cítrico (AC) en las proporciones molares 16EG:0.12AC, la mezcla se calentó a $60^\circ C$ y se agitó constantemente hasta que se homogenizó. Se adicionó a la mezcla ácido hexacloroirídico hidratado (0.0296 moles) y se aumentó la temperatura a $75^\circ C$, se agitó constantemente hasta que se homogenizó y se dejó enfriar. Con la ayuda de un pincel de pelo muy suave, se cubrió con el precursor polimérico la superficie de la placa. Se dejó secar y se introdujo en la mufla a $100^\circ C$ durante 5 minutos. Se sacó y se dejó enfriar. Se aplicaron 4 capas de precursor repitiendo los pasos anteriores. Finalmente, el electrodo se introdujo en la mufla durante 1 hora a $550^\circ C$.

Todos los elementos que se utilizaron para la fabricación del reactor se dispusieron de tal manera que el arreglo final resultó en un reactor tipo filtro- prensa FM01-LC (Ver ejemplo Fig. 1), con la peculiaridad de contener dos celdas separadas por la membrana.

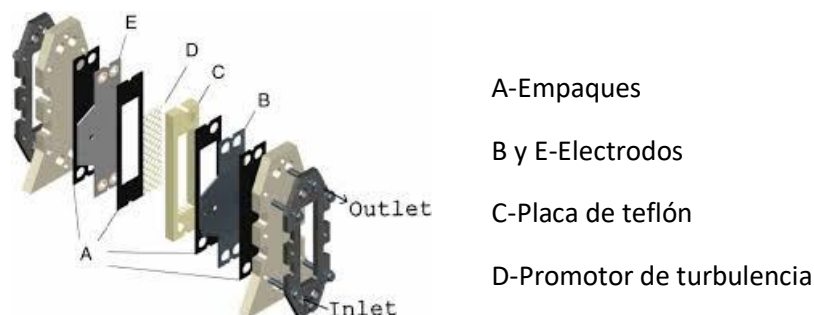


Figura 1. Reactor electroquímico tipo filtro-prensa FM01-LC de una sola celda.

El reactor se conectó por medio de mangueras a dos bombas peristálticas y se realizó el estudio de las variables para controlar el Reactor 1. Se prepararon soluciones del electrolito Na_2SO_4 . Posteriormente se realizaron diferentes electrólisis variando flujos, potenciales, tiempo y concentraciones para analizar su efecto en el pH del analito y del catolito respectivamente.

En la siguiente etapa se integró el Reactor 1 al sistema de electro-reducción directa [1].

Se prepararon soluciones sintéticas de dicromato de potasio (100 ppm $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y se les agregó el electrolito Na_2SO_4 de concentración previamente determinada; esta solución se alimentó por el lado del ánodo en el Reactor 1, cuando alcanzó la acidez adecuada se pasó al reactor RFP 2C3M donde se redujo el Cr (VI). Del lado del cátodo solamente se alimentó el electrolito Na_2SO_4 de concentración previamente determinada, donde aumentó el valor de pH y se vertió en la solución resultante de la electro-reducción para precipitar el Cr (III). Se filtraron los cristales de $\text{Cr}(\text{OH})_3$, se hizo recircular el electrolito recuperado (Na_2SO_4) y se realizaron dos ciclos más del proceso; finalmente se realizaron análisis de espectrometría UV-Vis para determinar el porcentaje de conversión.

Resultados

Como es posible apreciar en la Figura 2 de ajuste de pH de las soluciones, se logró exitosamente el ajuste de pH correspondiente para las soluciones precursoras del proceso de electro-reducción, soluciones del analito y catolito respectivamente, las cuales debían alcanzar un valor de 11 aproximado para el caso de catolito, mientras se lograba la acidificación del analito hasta logra un valor de pH mínimo de 3.

Cabe señalar que, tanto en el segundo como en el tercer ciclo, se hizo recircular la solución de Na_2SO_4 resultante de la solución básica en la etapa de precipitación del cromo trivalente recuperado del primer ciclo. Esto con la finalidad de lograr el máximo aprovechamiento de los reactivos químicos y de esta manera contribuir en el ahorro de recursos monetarios enfocados al sistema de electro reducción.

Posteriormente con los ajustes de pH respectivos, logrados en el primer reactor, la solución del analito se transportó al segundo reactor, donde se llevaría a cabo la reacción de electro-reducción directa, en el reactor tipo filtro prensa, y cómo es posible apreciar en la Figura 3 del porcentaje de conversión de Cr(VI) , los tres ciclos marcados como 1, 2 y 3, lograron porcentajes máximos de reducción equivalentes a 95.25%, 83.56% y 75.87% respectivamente. Con estos datos se confirma la efectividad del proceso, se aprueba la recirculación de la solución de Na_2SO_4 para la sostenibilidad del método y el correcto aprovechamiento de los recursos o reactivos. Estos resultados se obtuvieron del análisis de los espectros generados en espectrofotometría UV-Vis, Figura 3, así como de la respectiva curva de calibración de los datos que permitió el cálculo de la concentración de las especies.

Para la interpretación de los resultados por espectroscopia se recurrió a una técnica analítica referenciada, basada en la “*verificación analítica para las determinaciones de cromo hexavalente en aguas por espectrofotometría*” [10].

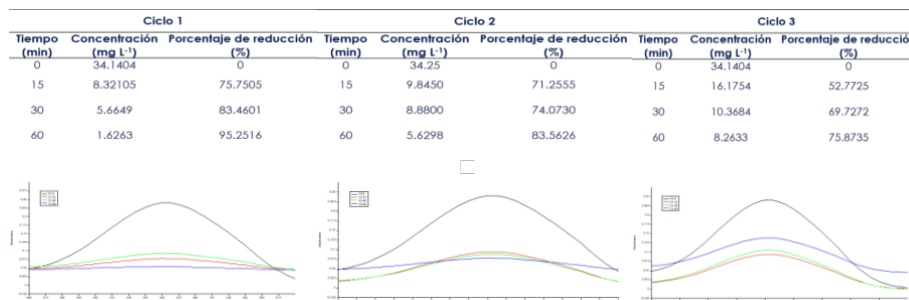
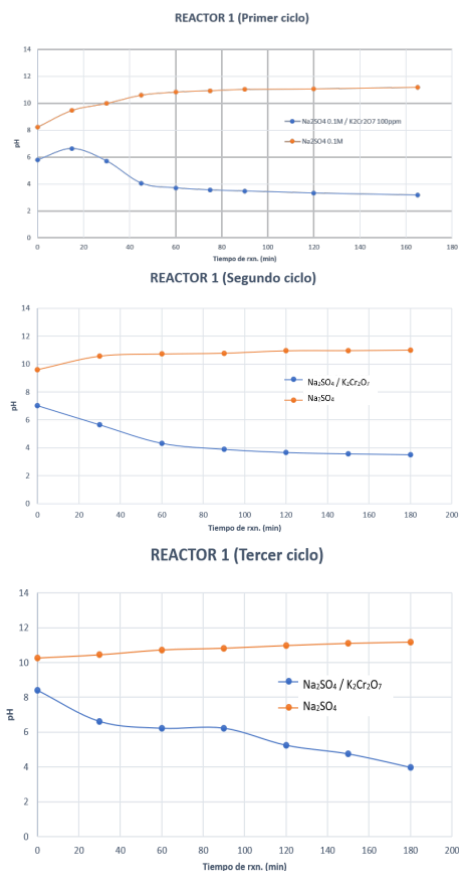


Figura 2. Porcentaje de conversión de Cr(VI) en tres ciclos consecutivos y espectros de absorción de las pruebas espectrofotométricas (Espectrofotómetro Ultravioleta Visible Perkin Elmer Lambda 25).

Conclusiones

Se logró de manera exitosa la implementación de un reactor tipo filtro prensa en un sistema integral electroquímico para la reducción del cromo hexavalente a cromo trivalente, alcanzando un porcentaje máximo de conversión equivalente al 95.25 % utilizando Na_2SO_4 como único reactivo sólido, y la respectiva recuperación de una solución de ésta misma especie tras el proceso de precipitación del cromo trivalente; si bien los porcentajes de conversión en dos procesos consecutivos a la primera prueba demuestran la efectividad del proceso y su aplicación potencial en el tratamiento de efluentes industriales contaminados por cromo hexavalente, productos de desecho en el proceso de electro cromado y curtido de pieles.

Bibliografía

- [1] Almaguer Busso G. (2008) “*Estudio comparativo de la reducción química y electroquímica de cromo hexavalente*”, Tesis de Maestría, Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Guanajuato, Gto., México.
- [2] Housecroft Catherine E., Sharpe Alan G. “*Química Inorgánica*”, Segunda Edición, Prentice Hall, 594 y 595.
- [3] Scerri Eric. “*50 Elementos Químicos qué son y qué representan*”, Primera Edición, Blume, Barcelona, 72.
- [4] Cruz González Víctor H. (2009) “*Contaminación de agua potable por cromo hexavalente. Caso de estudio: colonia Lechería, Municipio de Tultitlán, Estado de México*”, Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México.
- [5] María Pía Di Nanno, Gabriela Cordon, Leonardo Di Paolo, Leonardo Murrini y Gustavo Curutchet. 13 Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente. Septiembre 2003. <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/argentina13/Cong2.pdf>
- [6] Irgolic Kurt J., Marteil Artur E. “*Environmental Inorganic Chemistry*”. VCH Publishers Inc. Florida 1985. Pp 475 y 476.
- [7] Netzahuatl Muñoz Alma Rosa, Pineda Camacho Gabriela, Barragán Huerta Blanca Estela, Cristiani Urbina Eliseo. “*Remoción de cromo hexavalente y cromo total por la corteza de pyrus communis*”, Revista CENIC. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. La Habana, Cuba. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181620500026>
- [8] León, M. I. Aguilar, Z. G., and Nava J. L (2014). “*Electrochemical combustion of indigo at ternary oxide coated titanium anodes*”, J. Electrochem. Sci. Eng. 4(4) 247-258.
- [9] O. Solorza Feria, J. Fonseca Ortuño, R. González Hernández, J.P. Zúñiga Moreno. “Diseño y construcción de un electrocatalizador y una pila de combustible para producir energía eléctrica libre de contaminantes”.
- [10] Sierra, C. A. S., & García, H. G. (2013). “Verificación analítica para las determinaciones de cromo hexavalente en aguas por espectrofotometría”. Ingenierías USBMed, 4(1), 22-26.

REMOCIÓN DE CROMO VL MEDIANTE EL USO DEL *Eichhornia crassipes* PARA SU POSIBLE APLICACIÓN EN TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

María Fernanda Rodríguez Bravo^{1*}, Guillermo Manuel González Guerra¹, Martín Alejandro Alatorre Ordaz¹, Miguel Ángel Pérez Landeros².

Departamento de Química. Universidad de Guanajuato. Cerro de la Venada SN, Pueblito de Rocha, 36040
Guanajuato, Gto. MÉXICO.
mf.rodriguezbravo@ugto.mx

Resumen

La fitorremediación es una técnica que aprovecha la capacidad de plantas específicas para absorber, acumular, metabolizar, volatilizar o estabilizar contaminantes a través de procesos biológicos, químicos o físicos que ocurren naturalmente en las plantas. En el presente trabajo se analizó la eficiencia de la remoción del Cromo (VI) basado en la fitorremediación empleando lirio acuático común (*Eichhornia crassipes*), proveniente de la laguna del municipio de Yuriria, Guanajuato, México, lugar en donde se considera como una especie plaga, afectado considerablemente al ecosistema además de afectar la economía del lugar. La especie fue recolectada y posteriormente se colocó en soluciones de dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ de concentraciones conocidas (100, 50 y 25 mg L^{-1}), tomando muestras periódicamente cada 1, 4, 8 y 24 horas. Se efectuó un análisis por medio de espectrofotometría ultravioleta visible por el método de la 1,5-difenilcarbazida para Cr (VI), con el fin de calcular y comparar la disminución de dichas concentraciones. Se lograron porcentajes de remoción finales de 72.2, 60.11 y 56.62 %,.. Se propone aplicar esta metodología para reducir la contaminación por cromo causada por la empresa Química Central en el municipio de León, Gto. La cual fue clausurada hace 4 años debido al manejo indebido de los residuos que contenían cromo hexavalente.

Palabras clave: *Fitorremediación, Cromo IV, eichhornia crassipes.*

Introducción

Los metales pesados se encuentran entre los principales contaminantes ambientales y representan una grave amenaza para la salud por su persistencia a largo plazo en el medio ambiente, sin embargo, las tecnologías de remediación para sitios contaminados con metales pesados suelen estar limitadas a áreas pequeñas o bien, son costosas; como lo son el lavado de suelo, la reducción química, la electroforesis, vitrificación, entre otros. En los últimos años, la fitorremediación se ha considerado una alternativa económica y ecológica para este tipo de contaminación, la técnica involucra a plantas que pueden absorber, acumular y desintoxicar contaminantes de sus sustratos (suelo, agua y aire) a través de procesos físicos, químicos o biológicos [5].

El cromo existe en dos estados estables: cromo hexavalente (Cr VI) y cromo trivalente (Cr III); de los cuales el Cr (VI) es la forma más tóxica. El cromo (III) es esencial para procesos biológicos como descomponer el azúcar, las grasas y las proteínas dentro de un cuerpo del animal. Por otro lado, el cromo hexavalente es perjudicial para la salud derivado de la exposición durante largos períodos de tiempo, inhalar o ingerir cromo hexavalente causa hemorragias nasales, úlceras, convulsiones, daño renal y hepático, varios tipos de cáncer, y / o muerte. [7]

Éste se encuentra entre los principales contaminantes ambientales producto de los desechos de diversas actividades industriales, principalmente la curtiduría.

Se han identificado en el estado de Guanajuato dos problemáticas ambientales que pueden ser complementariamente combatidas.

La primera problemática tiene lugar en La Laguna de Yuriria, Guanajuato. (Fig. I), en donde podemos encontrar en forma de plaga la planta conocida como lirio acuático (*Eichhornia crassipes*).

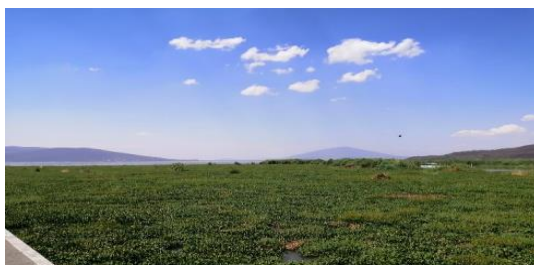


Figura 1: Invasión de lirio acuático sobre La Laguna. La planta ha cubierto gran parte de la superficie.

La Laguna de Yuriria fue construida en 1548 por Fray Diego de Chávez. La Laguna es, de acuerdo con el Instituto de Ecología de Guanajuato, santuario de 165 diferentes especies de aves, entre las que destacan los patos, las garzas, los pelícanos y algunas especies de gallinas acuáticas que forman parte del patrimonio ecológico de la región y del país. Sin embargo, en los últimos años la invasión del lirio acuático vuelve imposible la navegación (Figura 1), provocando la muerte de cientos de peces, carpas y charales, que son las más comunes en la Laguna. [1]. Esto afecta directamente la economía del municipio, debido a la escasa pesca, además amenaza la reserva ecológica que forma parte del patrimonio ecológico de la región y del país, además de tratarse de un área natural protegida [1].

Una segunda problemática, no menos importante, está relacionada a que en el estado de Guanajuato se cuenta con sitios en donde las actividades agropecuarias, la salud pública y también las áreas naturales se ven afectadas por la presencia de metales pesados, contaminantes que son producto de la influencia y proximidad a actividades industriales [2]. Un ejemplo de ello es la problemática causada por la empresa Química Central de México. Química Central de México, era una empresa que producía químicos para la curtiduría, sin embargo, sigue vigente en el Registro Público de Comercio de San Francisco del Rincón y no ha sido disuelta. En 2015, la empresa fue clausurada debido al incumplimiento con el retiro de más de 144 mil toneladas de cromo hexavalente que fueron abandonados en la parte trasera de la empresa que operó por 46 años. [3-4]

El uso del lirio acuático, una especie considerada como plaga, en la implementación de una técnica de fitorremediación puede absorber y remover eficientemente un metal altamente tóxico y contaminante, como lo es el cromo. Es posible combatir los problemas antes

mencionados, usando el lirio como absorbente de Cr (VI) reduciendo dicha plaga y reduciendo la contaminación por este metal.

Metodología

Las muestras de *Lirio Acuático* empleadas fueron recolectadas de la laguna de Yuriria, Guanajuato, México.

Obtención de *Eichhornia crassipes*

El lirio acuático se seleccionó y recupero de laguna de Yuriria, Guanajuato. Para eliminar cualquier residuo de agua sucia, se hizo un lavado a las raíces con agua destilada.

Proceso de fitorremediación y toma de muestras.

Se colocaron tres plantas en diferentes recipientes, de aproximadamente 6L, soluciones de $K_2Cr_2O_7$ (KEM, 99%), con concentraciones de 100, 50 y 25 mg L^{-1} . Posteriormente se tomaron muestras en intervalos de 1, 4, 8 y 24 horas.

Caracterización UV-VIS:

La caracterización para las muestras se llevó a cabo por medio del método de la 1,5-difenilcarbazida para determinación de Cr (VI) a 540 nm. Se utilizó el equipo “Varian 50 PROBE UV-VISIBLE spectrophotometer”.



Figura 2. Muestras de lirio en solución $K_2Cr_2O_7$

Se prepararon estándares de $K_2Cr_2O_7$ a diferentes concentraciones y pH 1.5, agua desionizada y H_2SO_4 (0.1 N) (KEM, 99%). Se añadieron 2 mL de disolución de 1,5-difenilcarbazida al 5% (P/V), se mezcló y dejó reposar 10 min para desarrollar el color que permitiera ver las ondas de una forma más completa. Se ajustó el espectrofotómetro con el blanco y se midió a 540 nm. Con los datos resultantes se construyó una curva de calibración.

Para el tratamiento de las muestras, estas fueron diluidas en agua desionizada, se ajustó el pH a 1.5 con H_2SO_4 y se añadieron 2 mL de disolución de difenilcarbazida. Se mezcló y dejó reposar por 10 minutos. Se realizó la lectura a 540 nm y finalmente con los valores de absorbancia se calculó la concentración en cada muestra con ayuda de la curva de calibración [8]

Resultados

En las figuras 3, 4 y 5, se muestran los espectros obtenidos por espectrofotometría UV-VIS, preparadas previamente con difenilcarbazida.

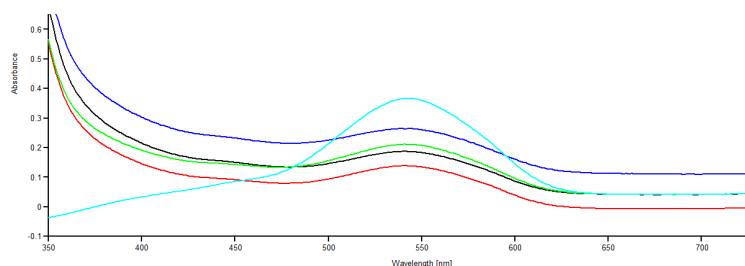


Figura 3: Espectro UV-VIS. Comparación utilizando *Eichhornia crassipes*. Solución 25ppm (Azul), transcurrido 1hr, (Morado) 4hrs (Verde), 8hrs (Negro) y 1día (Rojo).

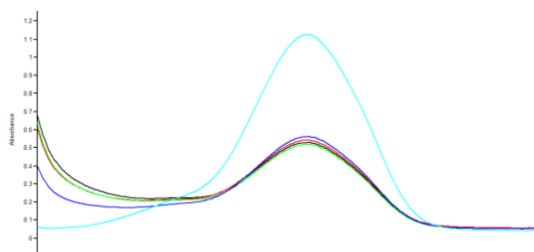


Figura 4: Espectro UV-VIS. Comparación utilizando *Eichhornia crassipes*. Solución 50ppm (Morado), transcurrido 1hr, (Verde) 4hrs (Negro), 8hrs (Azul) y 1día (Rojo).

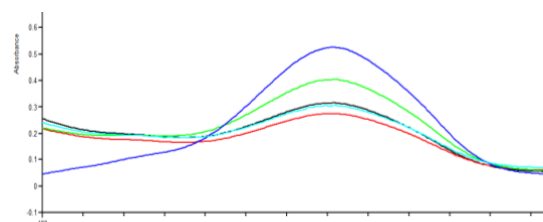


Figura 5: Espectro UV-VIS. Comparación utilizando *Eichhornia crassipes*. Solución 100ppm (Azul), transcurrido 1hr, (Morado) 4hrs (Verde), 8hrs (Negro) y 1día (Rojo).

Se observa en los espectros que la concentración inicial disminuyó con la presencia de *Eichhornia crassipes* ya que la absorbancia también lo hace a la longitud de onda de 540 nm. Esto se comprueba con el cálculo de las concentraciones presentadas en la tabla 1, tomando el valor de la absorbancia a 540 nm.

Tabla 1. Concentraciones de Cr (VI) empleando *Eichhornia crassipes*.

TIEMPO (horas)	CONCENTRACIÓN (mg L ⁻¹)		
0	25	50	100
1	19.0249	32.3183	47.4682
4	13.8957	23.8190	45.6301
8	11.5886	22.7994	44.3623
24	6.9524	19.9456	43.3738
Porcentaje final de remoción	72.1904 %	60.1088 %	56.6262 %

Como se muestra en la tabla anterior, el lapso en el que la especie es capaz de remover mayor cantidad de Cr es durante la primera hora, haciéndolo aproximadamente del 50% en las tres concentraciones iniciales. Al finalizar las 24 horas el porcentaje de remoción va de 72.2, 60.11 y 56.62%, respectivamente para las concentraciones trabajadas. El mayor porcentaje de remoción se logró al usar una menor concentración, lo cual es un posible indicativo del límite de remoción característico de la especie.

Cabe mencionar que en este periodo de tiempo el lirio acuático aun presentaba vida y con una buena apariencia, considerando las condiciones en cuando a la gran concentración de cromo en la que se encontraba.

Conclusiones

Con el presente trabajo se demostró la eficiencia de la especie fitorremediadora: *Eichhornia crassipes*, para la absorción de Cromo VI. Como se mencionó, esta especie aun presentaba vida después de las 24 horas a las que se evaluó, por lo que se pretende realizar posteriores experimentaciones en tiempos más largos, con la finalidad aprovechar al máximo la vida útil de la planta en la remoción de contaminantes. Específicamente se pretende realizar esta la especie *Eichhornia crassipes* adquiere una importancia muy significativa ya que, al tratarse de una de las peores plagas acuáticas, ésta sería una excelente alternativa para su uso, ya que cubre extensas superficies en presas, lagunas y canales, impidiendo el libre paso del agua o la navegación, afectando la supervivencia de las plantas y los animales. Sumado a esto, es posible aplicar esta metodología para la remoción de cromo en la zona afectada por el desecho del metal por la empresa Química Central, combatiendo dos grandes problemáticas ambientales por las que atraviesa el estado de Guanajuato.

Bibliografía

- [1] Newsweek México. (2019). *Yuriria: entre el olvido y el lirio* | Newsweek México. [online] Available at: <https://newsweekespanol.com/2018/01/yuriria-entre-el-olvido-y-el-lirio/#.XYb-OnUD7m>. [Accessed 22 Sep. 2019].
- [2] Silva, G. H. (2005). Monitoreo de Contaminantes en Las Cuencas de Los Ríos Guanajuato, San Juan de Otates Y Turbio Y Su Impacto en El Río Lerma, Estado de Guanajuato, Mexico. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geología. 1-3,10.
- [3] Anon, (2019). [online] Available at: https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/6032/1/mx.wap/clausura_profepa__instalaciones_de_quimica_ce

- ntal_de_mexico_en_guanajuato.html [Accessed 22 Sep. 2019].
- [4] Periódico AM | Noticias de Guanajuato, México. (2019). *Cumplen 4 años Química Central sin retirar tóxicos* | Periódico AM | Noticias de Guanajuato, México. [online] Available at: <https://www.am.com.mx/guanajuato/Cumplen-4-anos-Quimica-Central-sin-retirar-toxicos-l201902250001.html> [Accessed 22 Sep. 2019].
- [5] Ahmad, A., Iqbal, M., & Jabeen, R. (2009) Phytoremediation of Heavy Metals: Physiological and Molecular Mechanisms. *Bot. Rev.* 75. 340-343
- [1] Ahmad, A., Iqbal, M., & Jabeen, R. (2009) Phytoremediation of Heavy Metals: Physiological and Molecular Mechanisms. *Bot. Rev.* 75. 340-343.
- [6] Sumiahadi, A. & Acar, R. (2018). A review of phytoremediation technology: heavy metals uptake by plants. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 142, (012023), 5.
- [7] Saha, P., Shinde, O., & Sarkar, S. (2017). Phytoremediation of industrial mines wastewater using water hyacinth. *International journal of phytoremediation*, 19(1), 87-96.
- [8] Sarkar, M., Rahman, A. K. M. L., & Bhounmik, N. C. (2017). Remediation of chromium and copper on water hyacinth (*E. crassipes*) shoot powder. *Water resources and industry*, 17, 1-6.
- [9] Yapoga, S., Ossey, Y. B., & Kouame, V. (2013). PHYTOREMEDIATION OF ZINC, CADMIUM, COPPER AND CHROME FROM INDUSTRIAL WASTEWATER BY EICHHORNIA CRASSIPES. *International Journal of Conservation Science*, 4(1)

SEXTING, DIFERENCIAS POR EDAD, GÉNERO E IDENTIDAD SEXUAL

Nancy Angélica Blanco Arroyo ^a, Lucía Caudillo Ortega ^a, Erick Axel Rosas Díaz ^a, Javier Rivera Anguiano ^a,
Ma. Elvira Moreno Pulido ^a, Alfredo Lara Morales ^a

^a Departamento de Enfermería y Obstetricia, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato,
Guanajuato, CP. 36050, MÉXICO. Correo electrónico del autor de contacto: lucia.caudillo@ugto.mx

Resumen

El sexting, o el intercambio de material sexualmente explícito a través del sitio de internet, de redes sociales o teléfono móvil, es un comportamiento cada vez más frecuente, que puede influir en las personas en involucrarse en conductas sexuales de riesgo incrementando la probabilidad de adquirir una infección de transmisión sexual. Existe evidencia que el sexting presenta variaciones de acuerdo con las características sociodemográficas como el estado civil o la edad. El objetivo del estudio fue conocer las diferencias por edad, género e identidad sexual del sexting. La muestra consistió en 150 participantes hombres y mujeres de 15 a 54 años, que aceptaron participar voluntariamente en el estudio. Se administraron a través de una plataforma digital (Survey Monkey) de manera anónima una cédula de datos personales y el instrumento para medir la conducta de sexting en un tiempo aproximado de 25 minutos. Los resultados mostraron diferencias significativas en las personas del género masculino, edades entre 35 a 44 años y las personas que se identificaron como homosexuales. Se concluye que los hombres tienen mayor permisividad en temas relacionados a la sexualidad en comparación a las mujeres, las personas de mayor edad pueden tener mayor acceso a los medios digitales, por lo tanto, realizar más conductas de sexting. Las personas que se identifican como homosexuales realizan más conducta de sexting que los heterosexuales. Son necesarias las estrategias de prevención para disminuir los riesgos del sexting.

Palabras clave: *Salud sexual, redes sociales, contenido sexual explícito, tecnología.*

Introducción

Las tecnologías de información y comunicación han permitido el desarrollo de nuevas formas de comunicación e interacción social [1] [2] [3]. Una de las “nuevas formas de comunicación” que se ha incrementado considerablemente en los medios digitales y en las personas es la creación voluntaria y el envío de mensajes de texto, fotos o videos con contenido sexual personal vía internet o aparatos móviles como teléfonos celulares, tablets, ipads, iphones, entre otros; este fenómeno es llamado sexting [4] [5] [6].

La práctica de sexting conlleva una serie de riesgos variados, dichos riesgos hace que los jóvenes sean los más vulnerables. Uno de los riesgos es la pérdida de privacidad, ya que los contenidos de temática sexual que una persona genera y envía a otra y otras, pueden acabar en manos no deseadas, perdiendo el control sobre su difusión. Otros riesgos son los que incluyen sanciones en la escuela, problemas en casa con los padres e incluso procedimientos judiciales [7]. Finalmente los riesgos de mayor severidad es la correlación con conductas de riesgo sexual, como no usar anticonceptivos, tener relaciones sexuales sin protección y participar en relaciones sexuales actividad con múltiples parejas [8] [9] [10]. Sexting también se correlaciona con otros tipos de conductas de riesgo como el uso de drogas, el ciber acoso,

la agresión física (por ejemplo, ser golpeado por una pareja) y problemas de salud emocional [11].

Las prácticas de sexting pueden diferir por género, estado civil y la identidad sexual, dado que existe evidencia que refiere que hombres y mujeres tienen diferentes expectativas sociales con respecto a los comportamientos relacionados con la sexualidad, al respecto las mujeres pueden ser más presionadas para el sexting por los hombres, también es preciso conocer las diferencias por estado civil o identidades sexuales [2] [11] [12] [13]. Se necesita entender más sobre las razones para sexting, con la finalidad de generar acciones específicas de prevención.

Objetivos

1. Conocer las diferencias del sexting por edad, género e identidad sexual.
2. Determinar las características de la población de estudio.

Metodología

El estudio fue de tipo cuantitativo, descriptivo, comparativo, transversal que constituye al propósito es conocer las diferencias entre las variables de estudio, la obtención de los datos fue en un solo momento en un tiempo determinado [14]. La población estuvo conformada por personas (hombres y mujeres) de 15 a 54 años que reportado haber enviado una foto o un mensaje de texto de tipo sexual al menos una vez en su vida. El muestreo fue por conveniencia, las personas participaron voluntariamente en el estudio. El llenado de los instrumentos fue auto-aplicado en línea, dado que las personas tienden a guardar su identidad a través del internet para la práctica del sexting, de esta forma se aseguró su anonimato y confidencialidad de los datos. La muestra fue de 150 participantes.

Se aplicó una cédula de datos personales, donde se recolectaron datos sociodemográficos como la edad, el sexo, entre otros.

La Escala de Conducta de Sexting [6], con 37 reactivos. Las respuestas son de tipo Likert de 5 puntos donde los ítems del 1 al 29 tiene como respuesta; 1(nunca); 2 (raramente o algunas veces); 3 (ocasionalmente o 2-3 veces al mes); 4 (seguido o 2-3 veces a la semana); 5 (frecuentemente o diario). Dado la naturaleza de las preguntas las respuestas varían tales como del ítem 30 su respuestas son; (1. Nadie, 2. Solo una persona, 3. Personas, 4. 3/5 personas, 5. Más de 5 personas), la 31 y 32 son (1. Nadie, 2. Pareja o ex pareja, 3. Amigos, 4. Un extraño, 5. Alguien que te gusta o alguien con quien le fuiste infiel a tu pareja), y de la 33 a la 37 son (1. Nunca, 2. Casi nunca, 3. A veces, 4. Casi siempre, 5. Siempre). Se ha empleado en México, en estados al norte del país, reportando una confiabilidad de 0.8.

Se seleccionó el programa Survey Monkey para realizar las encuestas de forma virtual. Posteriormente se Para el reclutamiento de los participantes se repartieron cupones entre la población se les invitó a participar en el estudio, se explicó de forma simple y clara el objetivo de la investigación, aquellos que decidieron participar utilizaron su cupón, entrando en el link proporcionado y contestando la encuesta. Para el reclutamiento de los participantes se mantuvo el sistema virtual abierto por seis semanas.

El cuestionario en línea tenía instrucciones claras para su correcto llenado, en caso de alguna duda durante el llenado del cuestionario se les invito a que mandar un mensaje por vía whatsapp a un número designado para el estudio, con la finalidad de aclarar dudas, además se hizo énfasis en la confidencialidad y seguridad de los datos proporcionados por los participantes, al no identificarlos de ninguna forma en los cuestionarios. Es necesario destacar, que una vez que los participantes ingresaron a la plataforma virtual y aceptaron participar en el estudio firmaron vía electrónica el consentimiento informado y solo después de esto se procedió a contestar el cuestionario. El tiempo estimado de llenado fue de aproximadamente 25 minutos.

Resultados

Los participantes fueron en su mayoría mujeres, entre 15 a 54 años, la media de edad fue de 24.7 años ($DE=7.621$). En la Tabla 1 se describen las características sociodemográficas y la identidad sexual de los participantes.

Tabla 1. Características sociodemográficas

Variable	<i>f</i>	%
Género		
Mujeres	102	68
Hombres	48	32
Edad		
15-24	107	71.3
25-34	27	18
35-44	8	8
45-54	8	8
Ocupación		
Estudiante	97	64.7
Trabajo remunerado	50	33.7
Desempleado	3.0	2.0
Estado civil		
Soltero	120	80
Casado	17	11.3
Unión libre	11	7.3
Divorciado	2	1.3
Identidad Sexual		
...Heterosexual	113	75.3
Homosexual	26	17.3
Bisexual	11	7.3

(1)

En la historia sexual, la edad de la primera relación sexual presentó una media de 15.3 años ($DE=5.76$).

En el tipo de sexo en la primera relación se encontró que fue el vaginal (64%), anal (13.3%), oral (12%) y el 10.7% refirieron no haber tenido relaciones sexuales.

El 6.7% de los participantes refieren haber sido diagnosticados con una ITS en el último años.

Las ITS más frecuentes fueron la sífilis, gonorrea, virus de papiloma humano (VPH) y virus de inmunodeficiencia humana/ Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (VIH/Sida).

Las personas de 35 a 44 años, los hombres y quienes se identifican como homosexuales son quienes realizan mayor conducta de sexting. Tabla 2.

Tabla 2. Prueba de Kruskal Wallis, diferencias entre grupos por edad, género y sexting.

Variables	<i>n</i>	Mediana	<i>X</i> ²	<i>p</i>
<i>Edad</i>				
15 a 24 años	107	69.71	7.52	.05
25 a 34 años	27	90.57		
35 a 44 años	8	98.94		
45 a 54 años	8	78.56		
<i>Género</i>				
. Hombre	48	97.57	18.25	.001
.Mujer	102	65.11		
<i>Identidad sexual</i>				
. Heterosexual	113	68.04	15.99	.001
Homosexual	26	105.56		
Bisexual	11	81.14		

Conclusiones

De acuerdo con los resultados de los estudios se puede concluir que el sexting se presenta con mayor frecuencia en los hombres, sin embargo, las mujeres también participan en el sexting.

En la edad cabe señalar que las personas de mayor edad practican más la conducta del sexting. Con respecto a la identidad sexual, el sexting se es más aceptado en las relaciones entre personas del mismo sexo como forma de juego o coqueteo.

Por lo anterior, se recomienda seguir realizando investigaciones enfocadas al uso de las tecnologías como lo es el sexting y sus factores de riesgo para poder diseñar de intervenciones enfocadas a ese fenómeno y así disminuir las conductas de riesgo.

Bibliografía

- [1] Cooper, K., Quayle, E., Jonsson, L., & Svedin, C. G. (2016). Adolescents and self-taken sexual images: A review of the literature. *Computers in Human Behavior*, 55, 706-716.
- [2] Drouin, M., & Landgraff, C. (2012). Texting, sexting, and attachment in college students' romantic relationships. *Computers in Human Behavior*, 28, 444-449.
- [3] Gámez-Guadix, M., Borrajo, E., & Almendros, C. (2016). Risky online behaviors among adolescents: Longitudinal relations among problematic Internet use, cyberbullying perpetration, and meeting strangers online. *Journal of Behavioral Addictions*, 5, 100-107.
- [4] Agustina, J. R., & Gómez-Durán, E. L. (2012). Sexting: Research criteria of a globalized social phenomenon. *Archives of Sexual Behavior*, 41, 1325-1328.
- [5] Mitchell, K. J., Finkelhor, D., Jones, L. M., & Wolak, J. (2012). Prevalence and characteristics of youth sexting: A national study. *Pediatrics*, 129, 13-20.
- [6] Morelli, M., Bianchi, D., Baiocco, R., Pezzuti, L., & Chirumbolo, A. (2016). Sexting, psychological distress and dating violence among adolescents and young adults, *Psicothema*, 28 (2),137-142.

- [7] Lippman, J.R. & Campbell, S.W. (2012). Teenagers and sexting: perceived norms and sexual double standard. ICA Conference, 24–28 May 2012, Phoenix, AZ.
- [8] Ferguson, C., 2011. Sexting behaviors among young Hispanic women: incidence and association with other high-risk sexual behaviors. *Psychiatric Quarterly*, 82 (3), 239–243.
- [9] Rice, E., Rhoades, H., Winetrobe, H., Sanchez, M., Montoya, J., Plant, A., et al. (2012). Sexually explicit cell phone messaging associated with sexual risk among adolescents. *Pediatrics*, 130, 667-673.
- [10] Temple, J., R., Van Den Berg, P., Vi Donna Le, McElhany, A., & Brian, W., (2012). Teen sexting and its association with sexual behaviors. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 166 (9), 828–833.
- [11] Dake, J.A., Price, J., H., Maziarz, L., & Ward, B. (2012). Prevalence and correlates of sexting behavior in adolescents. *American Journal of Sexuality Education*, 7 (1), 1-15.
- [12] Fielder, R., L., & Carey, M.,P. (2009). Predictors and consequences of sexual ‘hookups’ among college students: A short-term prospective study. *Archives of Sexual Behavior*, 29, 1105–1119.
- [13] Weisskirch, R. S., & Delevi, R. (2011). “Sexting” and adult romantic attachment. *Computers in Human Behavior*, 27, 1697-1701.
- [14] Polit, D.F. and Hungler, B.P. (2004) *Nursing research-principle and methods*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

**USO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lippia graveolens kuth* (VERMABENACEAE)
COMO INHIBIDOR FÚNGICO, EN MIEMBROS DE LA FAMILIA ROSACEAE.**

Sergio Josafat Mora Soto^a, Rafael Ortiz Alvarado^b, Lucia Nava Barrios^c

^a Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Químico Farmacobiología Tzintzuntzan 173, Matamoros, Morelia, Michoacán ,C.P. 58240, MÉXICO. moragiosafatte@gmail.com

^b Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Químico Farmacobiología Tzintzuntzan 173, Matamoros, Morelia, Michoacán ,C.P. 58240, MÉXICO. ortizalvarado@gmail.com

^c Laboratorio de Neurobiología, Facultad de Químico Farmacobiología Tzintzuntzan 173, Matamoros, Morelia, Michoacán ,C.P. 58240, MÉXICO lnavabarrios@gmail.com.

Resumen

La alimentación es el ingreso o aporte de los alimentos en el organismo humano mediante el cual tomamos una serie de sustancias contenidas en los alimentos que componen la dieta, proceso que implica no solamente ingerir niveles apropiados de cada uno de los nutrientes, sino también permite obtener un balance adecuado y brindando una inocuidad alimentaria, que asegura la calidad en la producción y elaboración de los productos alimentarios donde el sector agropecuario y la globalización se ha reflejado un incremento a nivel internacional, además que el intercambio de información y de tecnologías que cuentan con una amplia gama, tanto de origen geográfico en todos los productos agroalimentarios y pesqueros que se comercializan, que a su vez generan un mayor riesgo en la propagación y existencia de enfermedades alimentarias y plagas afectando a todos los sistemas productivos agropecuarios en los países importadores y poniendo a la salud pública en riesgo. Cabe señalar que los rechazos de productos agropecuarios son debidos a problemas sanitarios o de inocuidad los cuales tienen un fuerte impacto económico y social que puede extenderse a toda una región, impactando la imagen y credibilidad del país exportador, lo que a su vez afecta la aceptación de otros productos agropecuarios que se comercializan. Por lo que se han empleado conservadores que son los aditivos más utilizados y los de uso frecuente y justificado, ya que impiden que los alimentos se deterioren y se prolongue la vida útil del producto y por ende mejora la conservación y preservación de sus propiedades iniciales, evitando así microorganismos o los procesos de oxidación que lleguen a alterar los alimentos. Por lo tanto, se han estudiado sobre el uso de los aceites esenciales que son sustancias naturales extraídas de diferentes partes de las plantas con diferentes propiedades tanto de carácter antibacteriano y antifúngico, que presentan propiedades de volatilidad y baja solubilidad en agua que a su vez dificultan su incorporación a los alimentos, por lo que es necesario el uso de vehículos para una óptima adición, asimismo el empleo de emulsiones permitiría la protección de los aceites esenciales, ejerciendo su acción antifúngica en las partes acuosas de los alimentos, de esta manera se determina el siguiente estudio que el aceite esencial de *Lippia graveolens* funciona como inhibidor de fitopatógenos aislados en *Rubus fruticosus* (zarzamora), *in vitro*.

Palabras clave: orégano, antracnosis, *Lippia graveolens*, método Soxhlet, zarzamora, *rubus fruticosus*.

Introducción

La preservación de alimentos inocuos implica la adopción de metodologías que permiten identificar y evaluar los potenciales peligros de contaminación de los alimentos en el lugar

que se producen o se consumen, así como la posibilidad de medir el impacto que una enfermedad transmitida por un alimento contaminado puede causar a la salud humana [1]

Patógenos, hongos fitopatógenos, virus y residuos de pesticidas son las prioridades en materia de inocuidad alimentaria de los productos frescos como son los agroalimentos. Los conservantes son los aditivos más utilizados y quizás los de uso más frecuentes justificado, impiden que los alimentos se deterioren, prolongue su vida útil, mejoren su conservación y preserven sus propiedades iniciales, evitando así microorganismos o los procesos de oxidación, los alteren [2]

Es por ello al utilizar los aceites esenciales como conservantes naturales teniendo una importancia en la industria alimenticia ya que estos compuestos reconocidos como seguros para ser usados en forma intencionada en alimentos. Los aceites esenciales de orégano constituyen una alternativa como potenciales agentes antioxidantes y antimicrobianos prolongando la vida útil de los alimentos, especialmente aquellos ricos en grasas insaturadas [3].

Cada vez, con mayor frecuencia los procesos productivos rebasan las fronteras nacionales, aumentando la distribución en distintas áreas geográficas. El reto que se presenta la globalización no solo se relaciona con la competitividad e los mercados internacionales, sino también con el riesgo que representan los flujos, cada vez mayores, de productos agropecuarios. Cuanto más amplia es la gama del origen geográfico de los productos agroalimentarios que se comercian, mayor es el riesgo de extensión de enfermedades y plagas, las cuales pueden representar, por un lado, riesgos a los sistemas productivos agropecuarios en los países importadores y, por otro, riesgos a la salud pública por enfermedades de origen alimentario. Todo ello impone, por parte de los países importadores, exigencias sanitarias y de inocuidad cada vez más estrictas a fin de reducir los riesgos mencionados. Cabe señalar que los rechazos de productos agropecuarios, debidos a problemas sanitarios o de inocuidad, tienen un fuerte impacto económico y social que puede extenderse a toda una región; impactando además la imagen y credibilidad del país exportador, lo que a su vez afecta la aceptación de otros productos agropecuarios que se comercian [4]. Los Acuerdos autorizan a los países a establecer sus propias normas. Pero de igual forma es precisar que las reglamentaciones estén sostenidas en principios científicos, para aplicar las medidas necesarias para preservar los agroalimentos y de igual forma la salud y la vida de las personas. [5].

Metodología

Extracciones de aceites esenciales por solventes orgánicos

Es importante identificar los efectos de diversos métodos de extracción sobre las propiedades y composición de los aceites esenciales y otros extractos. Los aceites esenciales son sustancias aromáticas de base lipídica encontradas en todas las plantas; están ampliamente distribuidas en las distintas partes de la planta: raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Los aceites esenciales son componentes heterogéneos de terpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles, lactonas entre otras [6].

En esta metodología, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura, [7].

Extracción de aceite esencial de orégano

Obtención de hojas del Orégano

Se obtuvieron 1 kg de orégano del género *Lippia graveolens* Kunth.

Tratamiento de las hojas del Orégano

Se realizó la separación de hojas, de los tallos del orégano para someterse a un molido en mortero, para la extracción por solventes en equipo Soxhlet.

Extracción Soxhlet

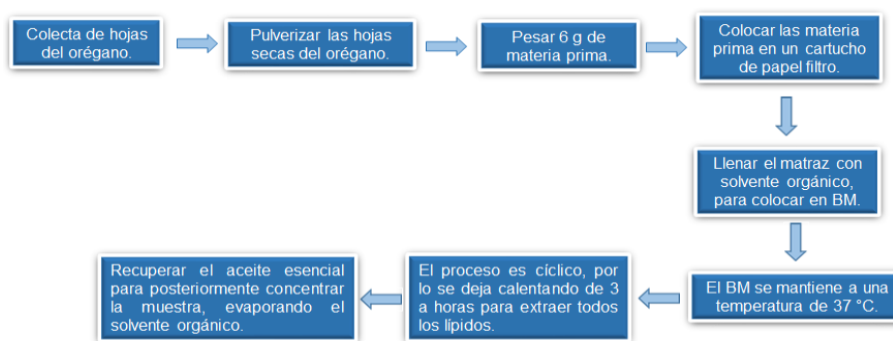
Las hojas del orégano pulverizadas, en peso seco, se sometieron por solvente no polar, en equipo Soxhlet, realizando cinco extracciones con éter etílico (Meyer), utilizando 6 gramos de materia prima en cada extracción.

Obtención del Aceite esencial del Orégano *Lippia graveolens* Kunth.

Para recuperar el aceite esencial de orégano del solvente orgánico, se realizó un baño María a una temperatura de 37 °C, después de hacer la separación del solvente orgánico (éter etílico) junto con el aceite esencial, se traspasó el aceite a tubos de polipropileno de 1.5 mL (Eppendorf) y luego se trasladaron a la estufa de secado para la evaporación por completo del solvente orgánico.

Resultados

Como parte de los resultados, se estableció primero la extracción del aceite esencial de *Lippia graveolens* provenientes de las hojas de orégano.



Ortiz, Mora, Todos los derechos reservados 2019.

Figura 1. Propuesta de procedimiento de *Lippia graveolens* Kuth, realizada en el presente proyecto.

Para determinar la carga bacteriana en la frutilla *Rubus fruticosus* (zarzamora), se elaboraron matraces de 50 ml del medio líquido con tres diferentes tiempos de 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs, teniendo controles por cada tiempo, inoculando con 300 µl de muestra y agregando 100 µl de aceite esencial de *Lippia graveolens* Kuth colocándolos en BM a temperatura de 27 °C,

pasando los tiempos obtenidos se recuperan las muestras en papel filtro y se pasan a una estufa de secado donde se obtiene el peso seco de cada muestra.



Figuras 2 y 3. Colocación de los matraces en BM y muestras en papel filtro en la estufa de secado.
Dado los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 1. Control de 24 hrs/muestra 300 μ l/100 μ l de aceite esencial

Peso seco (Papel Filtro)	Peso con Muestra	Peso Restante Total
0.7366 g	0.8052 g	0.0686 g
0.7369 g	0.8061 g	0.0692 g
0.6805 g (Control)	0.7467 g	0.0662 g
0.6703 g (Control)	0.7291 g	0.0588 g

Tabla 2. Control de 48 hrs/muestra 300 μ l/100 μ l de aceite esencial.

Peso seco (Peso Filtro)	Peso con Muestra	Peso Restante Total
0.7524 g	0.8052 g	0.0515 g
0-7576 g	0.8131 g	0.0555 g
0.7506 g (Control)	0.9062 g	0.2026 g
0.7644 g (Control)	1.0598 g	0.2954 g

Tabla 3. Control de 72 hrs/muestra 300 μ l/100 μ l de aceite esencial

Peso seco (Peso Filtro)	Peso con Muestra	Peso Restante Total
0.6726 g	0.7308 g	0.0582 g
0.6643 g	0.7433 g	0.0790 g
0.6698 g (Control)	0.9652 g	0.2954 g
0.7686 g (Control)	1.1918 g	0.4232 g

Dado a los resultados obtenidos, de acuerdo a los tiempos correspondientes se observa que el aceite esencial *Lippia graveolens* Kunth, tiene una eficiencia inhibición. Cabe señalar que en la **Figura 4**.

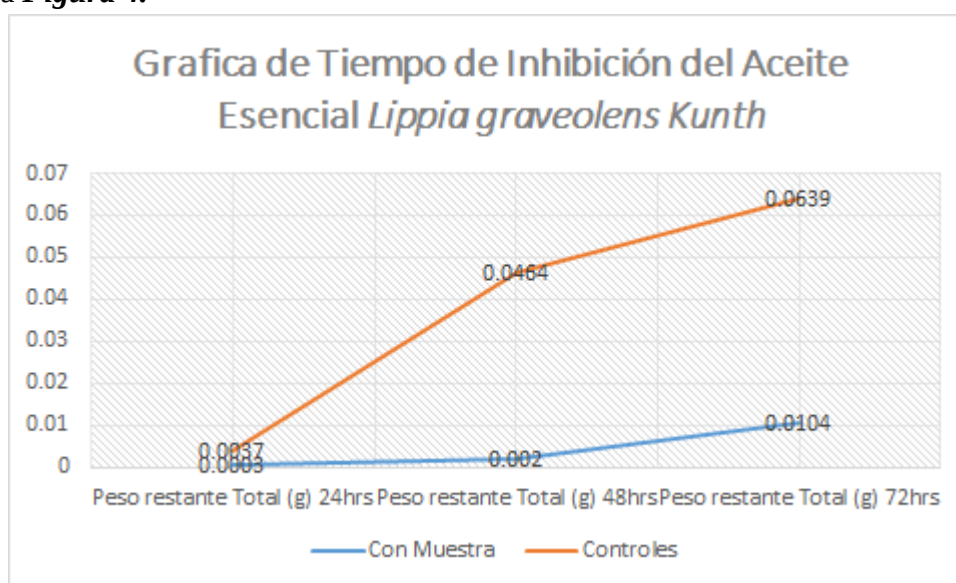


Figura 4. Tiempo de Inhibición del Aceite Esencial *Lippia graveolens* Kunth.

Conclusiones

Para tener un amplio conocimiento en el uso de utilización del aceite esencial de *Lippia graveolens* o en la utilización de ciertos aceites esenciales para hacer la preservación de ciertos alimentos, es necesario determinar su principio activo para saber grado de inhibición para ciertos fitopatógenos que afectan a los alimentos. Para poder completar el estudio más sobre el uso del aceite de esencial es necesario agregar un vehículo para la aplicación en los frutillos rojos como es, la zarzamora y así mismo, generar planes de conservación y manejo.

Bibliografía

- [1] Comité Nacional para la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias. (2010). Inocuidad Agroalimentaria. Febrero 28, 2018, de Comité Nacional para la aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias
 Sitio web:
<http://www.cnmsf.gob.do/Generalidades/InocuidadAlimentaria/tabid/164/Default.aspx>.

- [2] Astudillo Segovia Rodrigo Servio. (2014). Utilización de aceites esenciales naturales como conservantes en la elaboración de salchichas de pollo. marzo 18, 2018, de Universidad Politécnica Salesiana Ecuador, Sitio web: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/7009/1/UPS-CT003676.pdf>
- [3] Asensio M. Claudia. (2013). UTILIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE VARIEDADES DE ORÉGANO COMO CONSERVANTE ANTIMICROBIANO, ANTIOXIDANTE Y DE LAS PROPIEDADES SENSORIALES DE ALIMENTOS: QUESOS COTTAGE, RICOTA Y ACEITE DE OLIVA. marzo 28, 2018, de Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Sitio web: <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/1692/Asensio%20-%20Utilizaci%F3n%20de%20aceites%20esenciales%20de%20variedades%20de%20or%20E9gano%20como%20conservante....pdf?sequence=1>
- [4] González C. Alfredo. (2006). Análisis Prospectivo de Política de Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria. diciembre 08, 2016, de SAGARPA Sitio web: <http://www.sagarpa.gob.mx/programas2/evaluacionesExternas/Lits/Otros%20Estudios/Attachments/13/Prospectivo%20Agroalimentaria.pdf>
- [5] World Trade Organization. (2003-2005). MEDIDAS SANITARIAS Y FITOSANITARIAS. febrero 27, 2018, de Organización Mundial del Comercio Sitio web: https://www.wto.org/spanish/res_s/booksp_s/agrmntseries4_sps_08_s.
- [6] H. A. Peredo-Luna. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. 30 de Abril de 2019, de Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos Sitio web: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
- [7] Albarracin M. Gloria. (2003). COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL UTILIZANDO PIPER ADUNCUM (CORDONCILLO) PROCEDENTE DE LA ZONA CAFETERA. 30 dfe abrikl de 2019, de TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS Sitio web: <http://www.bdigital.unal.edu.co/989/1/gloriacristinaalbarracinmontoya>.

VARIACIÓN TEMPORAL EN LA DEPREDAÇÃO DE NIDOS ARTIFICIALES DE AVES EN LAS INMEDIACIONES DEL CERRO DE LA BUFA, GUANAJUATO.

Carlos Manuel Martínez Sainz*, Suria Gisela Vásquez Morales, Juan Pablo Huchin Mian
Departamento de Biología. División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta
S/N, Guanajuato, Guanajuato, 36050, MÉXICO.
*Correo electrónico: msainz_carl@hotmail.com

Resumen

La depredación de nidos de aves puede influir en la dinámica de las poblaciones de aves. El objetivo de este estudio fue analizar la variabilidad temporal en la tasa de depredación de nidos artificiales de aves durante un ciclo anual, su asociación con la cobertura vegetal y la altura de colocación de cada nido. Los experimentos de campo se realizaron durante un ciclo anual. La duración de los experimentos fue de tres semanas, esto para simular el periodo natural de incubación de huevos de aves. En total se realizaron ocho experimentos de campo y se emplearon 588 nidos artificiales. En cada nido fueron colocados dos huevos, uno de codorniz como cebo e incentivo alimenticio para los depredadores, y otro de plastilina, para obtener marcas de mordidas para identificar al depredador. El experimento fue monitoreado una vez a la semana. Los factores que tuvieron una influencia significativa ($p < 0.05$) sobre la depredación de los nidos fueron: la altura del nido y la estación del año. La cobertura vegetal no representó un factor determinante sobre la tasa de depredación de los nidos. Se encontraron dos principales depredadores de nidos: el zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*) y las aves que depredaron especialmente los nidos altos en la primavera y el verano. Conocer la variabilidad temporal de la depredación de nidos artificiales y los posibles depredadores de esos nidos, nos permite entender la dinámica y el potencial éxito reproductivo de nidos naturales de aves en la zona de estudio.

Palabras clave: *Depredación de aves, Nidos artificiales, Cobertura vegetal.*

Introducción

La distribución y composición de poblaciones de aves en una región está mediada por múltiples factores. Algunos de ellos son la disponibilidad de alimento y la disposición de sitios donde poder anidar, lo que puede influir en competencia inter e intraespecíficas por la adquisición de éstos [1, 2]. Respecto a la composición vegetal de una región, esta tiene un valor intrínseco para el desarrollo de comunidades de aves, pues una alta densidad foliar es un indicativo de presencia de alimento, como semillas o artrópodos de los que las aves se alimentan. Además, una estructura vegetal compleja brinda un mayor número de posibles sitios de anidamiento en adición a la abundancia de materiales que emplean para la fabricación de nidos, lo que hace que en un aumento de densidad de población las aves puedan distribuirse a distintas alturas en la vegetación o en extensiones muy amplias [3]. Finalmente se ha especulado del efecto que tienen la densidad vegetal sobre la depredación en nidos de aves, un tema que ha sido estudiado por muchos y han arrojado resultados mixtos; se ha pensado en la cobertura vegetal como una barrera física que impide el acceso o fácil localización de los nidos por los depredadores, además de que la búsqueda de nidos se vuelve

exhaustiva ante numerosos sitios de posible anidación. También cabe destacar que la cobertura vegetal, como barrera física y visual, de ser demasiado alta también impediría a las aves alertar de la proximidad de los depredadores [4, 5].

La depredación es un evento que no ocurre en la misma magnitud a lo largo del año, los cambios de estaciones repercuten en la abundancia de recursos y en el estatus de los factores ambientales, lo que afecta el fitness de los animales. En temporada frías, la escasez de alimentos hace posible que animales que no suelen comer huevos, como roedores o mustélidos, cambien sus estrategias alimenticias para mitigar la poca abundancia de los alimentos principales, afectando a las comunidades de aves. Respecto a temporadas cálidas, donde la mayoría de las aves efectúan sus actividades de cortejo y crianza, se ha señalado que es el momento donde la depredación puede afectar en mayor medida, esto, ante la intensa actividad parental de búsqueda de alimento y las frecuentes vocalizaciones de cortejo, lo cual alerta a los depredadores de la presencia de nidos susceptibles a ser atacados [6].

Considerando el estudio de nidos naturales, estos pueden ofrecer resultados más cercanos al fenómeno natural, pero tener un tamaño de muestra adecuado para hacer fiables análisis estadísticos es sumamente arduo y es una técnica altamente invasiva, pues se ha observado que la constante presencia de los investigadores o sus instrumentos de monitoreo, como cámaras de video o de registros térmicos alteraban el comportamiento de las aves, llegando a abandonar el nido para buscar un sitio de mejor calidad, lo que sin intención merma el desempeño reproductivo, además de que estas mismas razones pueden también alertar a depredadores próximos de los nidos que se estudian [7]. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue utilizar nidos artificiales para analizar el riesgo de depredación de nidos en las inmediaciones del cerro de la Bufa, Guanajuato.

Materiales y métodos

Los nidos artificiales utilizados en este experimento de campo se construyeron de fibra de ixtle. Los nidos artificiales se colocaron a lo largo de un transecto de 800 m en las inmediaciones del Cerro de la Bufa, Guanajuato. Se coloran tres tipos de nidos de acuerdo con su altura de colocación: bajo= 0 m, medio= 1 m, y alto > 1.5 m de altura. En total, se emplearon 308 nidos artificiales y se realizó un experimento, con duración de tres semanas, en cada temporada del año. En cada nido fueron colocados dos huevos: uno de codorniz como cebo para los depredadores, y otro de plastilina, para obtener marcas de mordidas para identificar al depredador. Se aplicaron modelos lineales generalizados (GLM) para conocer los factores con mayor influencia sobre los niveles de depredación.

Se utilizó estadística descriptiva para describir la cobertura vegetal por tipo de nido y temporada del año; así como para indicar el número de depredadores. Para establecer diferencias significativas en la media de la cobertura vegetal por tipos de nidos y temporada se aplicaron análisis de varianza de una vía (ANOVA-1 vía). La depredación de los nidos fue

analizada con curvas de supervivencia Kaplan-Meier tanto para los experimentos de tres semanas como de siete días de duración. Las diferencias significativas en los niveles de depredación por tipo de nido fueron establecidas con pruebas “Log-Rank”.

Resultados

La media de cobertura vegetal entre los tipos de nidos por cada temporada del año no mostró diferencias significativas. Sin embargo, la media de la cobertura vegetal exhibió variación por cada temporada del año con una media mayor a 50% en el otoño y verano, mientras que durante el invierno y primavera fue menor a 25% (Fig. 1). Esta variabilidad en la abundancia de la vegetación por temporada está asociada al ciclo anual y patrón de lluvias en el sitio de estudio

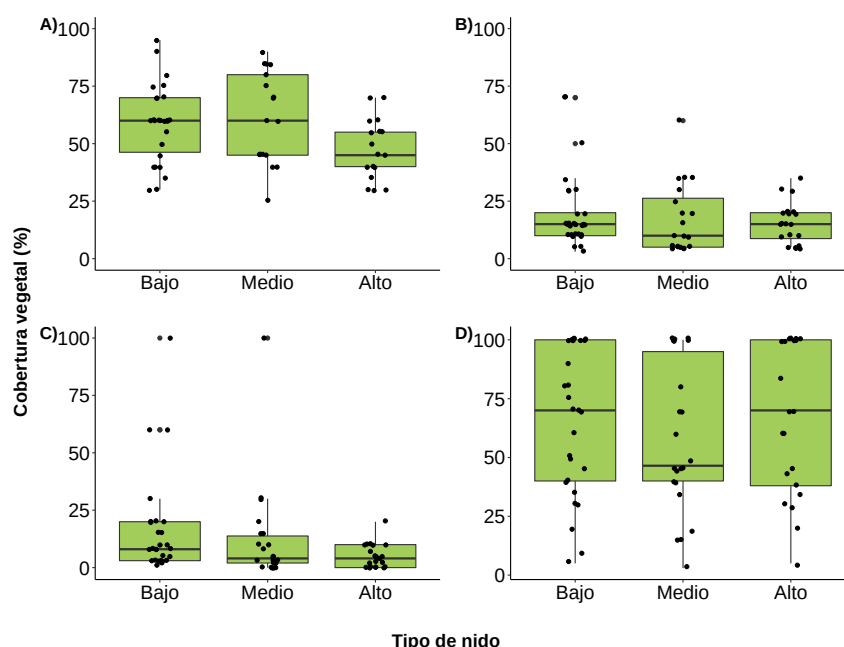


Figura 1. Cobertura vegetal (CV) sobre nidos artificiales colocados a tres diferentes alturas: nido bajo (0 m), nido medio (1 m), nido alto (> 1 m) en cuatro temporadas del año en las inmediaciones del cerro de la Bufo. **A)** CV otoño 2018, **B)** CV invierno 2019, **C)** CV primavera 2019, **D)** CV verano 2019. Las gráficas describen los cuartiles, mediana, valores mínimos y máximos de los datos

En el experimento de tres semanas de duración se observó una alta depredación en la primera semana (Fig. 2). El nivel de depredación durante el invierno y la primavera fueron particularmente altos exhibiendo similares niveles de depredación para los tres tipos de nidos (Fig. 2 B y C). Durante el invierno la depredación de nidos bajos y medios fue muy alta, la totalidad de los nidos habían sido depredados al finalizar las tres semanas de experimento. De forma similar, en la primavera todos los nidos bajos fueron depredados en la primera semana, mientras que la depredación de nidos altos y medios fueron del 82% y 90%, respectivamente. En contraste, el experimento de verano exhibió la menor tasa de depredación, siendo el único donde más de la mitad de los nidos de todos los tratamientos sobrevivió a la depredación, los nidos bajos siguen siendo los más vulnerables, pues el 45%

de ellos sufrió depredación, similar a los nidos medios con el 41%, pero los altos tuvieron una mayor supervivencia, debido a que únicamente el 29% de éstos fueron depredados (Fig. 2D).

El mejor modelo de regresión logística mostró que los factores que tuvieron una mayor influencia significativa ($p < 0.05$) sobre la depredación de los nidos fueron la altura del nido y la estación del año. La cobertura vegetal no representó un factor determinante sobre la tasa de depredación de los nidos (Tabla 1).

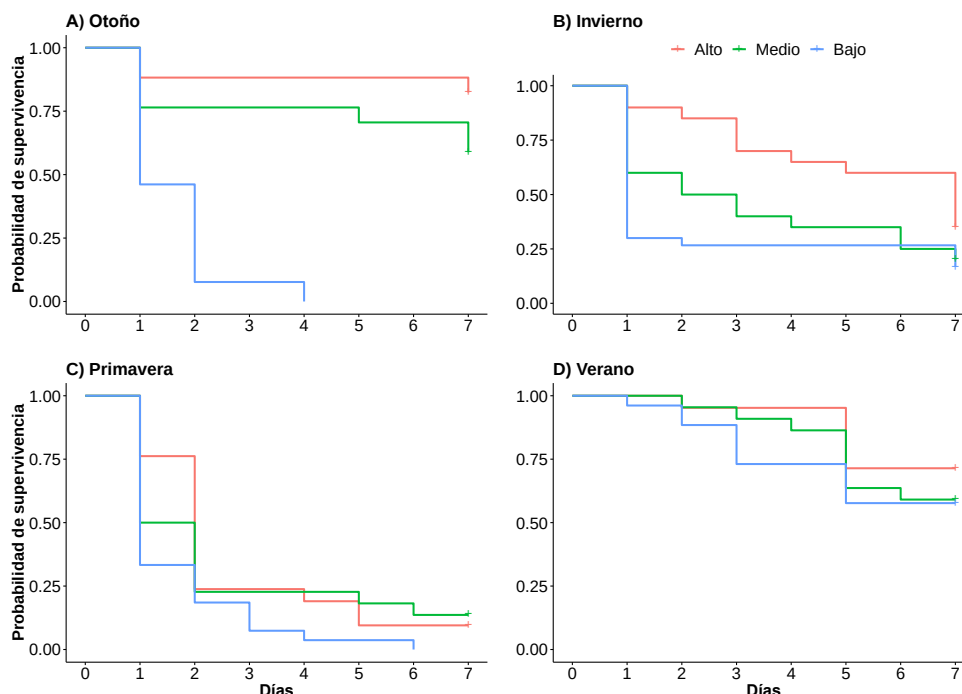


Figura 2. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para nidos artificiales bajos (0 m), medios (1m), altos (>1m) durante tres semanas de exposición en cuatro temporadas de un ciclo anual.

Este modelo evidenció que la probabilidad de encontrar nidos bajos depredados fue 8.63 veces mayor comparado con los nidos altos ($p < 0.001$). Las temporadas de otoño y verano mostraron un riesgo de depredación de 0.11 y 0.06 veces menor que en invierno (referencia). La depredación de primavera fue similar a la depredación de invierno ($p = 0.282$) (Tabla 1).

Tabla 1. Nidos artificiales. Experimento de tres semanas de duración. Regresión logística múltiple para evaluar la probabilidad de encontrar nidos depredados. Los factores fueron cobertura (covariable continua), tipo de nido (bajo y medio), temporada del año (otoño, primavera, verano). Los niveles de referencia o comparación fueron para el tipo de nido: “nido alto” y para la temporada: “invierno”.

Efecto	Estimado	SE	Estadístico de Wald	df	p	Odds ratio (95% IC)
Modelo						
Nido bajo	2.155	0.589	3.657	1	< 0.001	8.63 (2.97-31.64)
Nido medio	0.538	0.421	1.279	1	0.201	1.71 (0.75-3.98)

Otoño	-2.152	0.785	-2.740	1	0.006	0.11 (0.01-0.44)
Primavera	-0.955	0.888	-1.075	1	0.282	0.38 (0.05-2.06)
Verano	-2.721	0.783	-3.475	1	< 0.001	0.06 (0.00-0.25)

Los principales grupos de depredadores estuvo conformado por zorros y aves. La depredación por zorros fue especialmente alta durante el otoño que presentó el 54.6% (35/64) de depredación comparado con el resto de las temporadas. En cuanto a las aves, se encontró que presentaron una mayor depredación de nidos durante el verano con el 46.8% (15/32) comparado con las otras temporadas (Fig. 3).

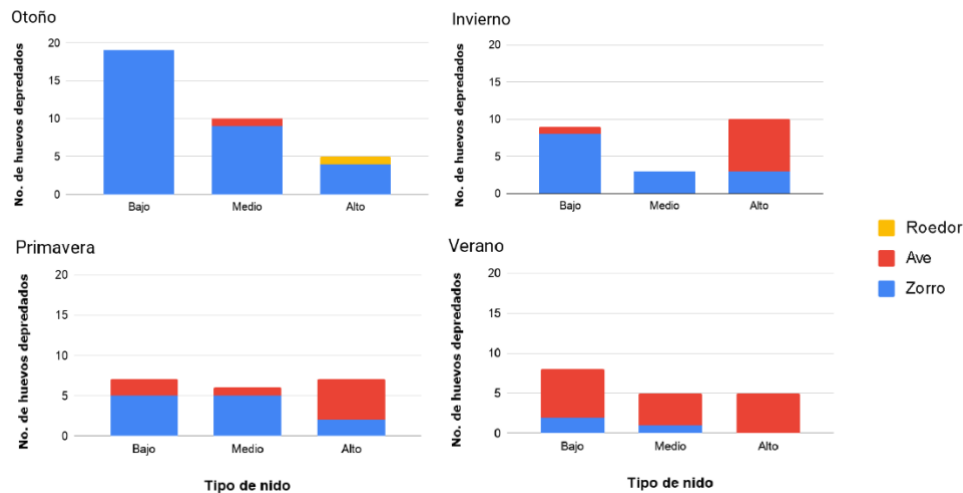


Figura 3. Grupos de depredadores por tipo de nidos y temporada en experimentos de tres semanas de duración.

Conclusiones

Existe una variabilidad temporal en los niveles de depredación de nidos entre las estaciones del año, con alta depredación en invierno y primavera; mientras que durante el verano y otoño tienen pocas probabilidades de ser depredados. Los nidos a nivel de suelo fueron considerablemente los más vulnerables a la depredación. La cobertura vegetal, a pesar de que cambia considerablemente a través de las estaciones, no representó un predictor relevante para describir la probabilidad de depredación sobre nidos artificiales, posiblemente debido a que la complejidad de la estructura vegetal de la zona no es lo suficiente para ofrecer un ocultamiento eficiente para los depredadores.

Bibliografía

[1]Mönkkönen, M., Husby, M., Tornberg, R., Helle, P., Thomson, R. L., 2007. Predation as a landscape effect: the trading off by prey species between predation risk and protection benefits. J. Anim Ecol 76, 619-629.

- [2]Seibold, S., Hempel, A., Piehl, S., Bäessler, C., Brandl, R., Rösner, S., Müller, J., 2013. Forest Vegetation Structure Has More Influence on Predation Risk of Artificial Ground Nests Than Human Activities. *Basic and Applied Ecology* 14, 687-693.
- [3]Agüero, M. L., García-Borboroglu, J. P., Esler, D., 2010. Nesting habitat of chubut steamer ducks in Patagonia, Argentina. *Emu* 110, 302-306.
- [4]Martin, T. E., 1993. Nest Predation and Nest Sites. *JSTOR* 43, 523-532.
- [5]Buehler, R., Bosco, L., Arlettaz, R., Jacot, A., 2017. Nest site preferences of the Woodlark (*Lullula arborea*) and its association with Artificial Nest Predation. *Acta Oecológica* 78, 41-46.
- [6]Husby, M., Hoset, K. S., 2018. Seasonal Variation in Nest Predation Rates in Boreal Forest. *J. of Ornith* 159, 975-984.
- [7]Tarjuelo, R., Barja, I., Morales, M. B.; Traba, J., Benítez-López, A., Casas, F., Arroyo, B., Delgado, M. P., Mougeot, F., 2015. Effects of Human Activity on Physiological and Behavioral Responses of an Endangered Steppe Bird. *Behavioral Ecology* 26, 828-838.

MAESTRÍA

DESEMPEÑO DINÁMICO DE ESQUEMAS DE PURIFICACIÓN INTENSIFICADOS INVOLUCRADOS EN LA PURIFICACIÓN DE 2,3- BUTANODIOL

David Vallejo-Blancas, Eduardo Sánchez-Ramírez^a, Juan Gabriel Segovia-Hernández^a,
Juan José Quiroz-Ramírez^b

^a Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato,
Gto., 36050, MÉXICO.

^asanchez.ramirez.eduardo@gmail.com

^aag_segovia@hotmail.com

^b CONACyT-CIATEC A.C Centro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas, Omega 201, Col.
Industrial Delta, 37545 León, Gto, MÉXICO.

Resumen

A causa del agotamiento de las fuentes de energía no renovable y la contaminación del medio ambiente, se ha comenzado la búsqueda de fuentes de energía renovable con un bajo impacto ambiental. Actualmente se ha incentivado en gran medida la conversión de biomasa en productos de alto valor agregado, como lo es la producción de ácido láctico, ácido levulínico, biodiesel, bioetanol, biobutanol, 2,3-butanodiol (2,3-BD), entre otros. Recientemente se ha encontrado que el uso de la Metil-Etil-Cetona (MEK) como combustible ha mostrado buenos resultados en los motores de encendido por chispa. El 2,3-butanodiol (2,3-BD) funge como un precursor en la síntesis de MEK, lo cual realza el interés en la obtención de este, el cual puede ser obtenido a partir de rutas sintéticas de base biológica. No obstante, la implementación industrial de estos procesos llega a generar desconfianza debido a la falta de estudios de control realizados en materia de bioprocesos. Por tal motivo, en este trabajo se evaluó el desempeño dinámico de diversos esquemas de destilación involucrados en la separación y purificación del 2,3-BD contenido en el efluente proveniente de un proceso de fermentación.

Palabras clave: 2,3-BD, MEK, Lazo abierto, Lazo cerrado

Introducción

En años recientes se ha buscado la obtención de diversos productos químicos de plataforma mediante rutas sustentables con la finalidad de suplir la demanda de petróleo y reducir el deterioro del medio ambiente a nivel mundial propiciado por el aprovechamiento del petróleo, sus derivados y otras fuentes de energía fósil. Ejemplo de ello es la producción de base biológica de 2,3-BD, el cual es compuesto químico de gran demanda en el sector industrial que puede ser producido en biorrefinerías mediante la transformación de biomasa [1, 2]. En materia energética, una de las rutas para la producción de MEK se lleva a cabo por medio de la deshidratación ácida del 2,3-BD con conversiones superiores al 95% en mol [3]. La importancia de esta reacción se atribuye a que, en investigaciones recientes se ha

encontrado que la MEK puede ser empleada como un prometedor combustible en motores de encendido por chispa, alcanzando inclusive la misma eficiencia que el etanol [4].

La producción de 2,3-BD de base biológica tiene más de 100 años de historia, en 1906 Harden y Wolpe estudiaron su producción empleando a la bacteria *Klebsiella pneumoniae* y para 1926 se detectó la acumulación de 2,3-BD en cultivos de *Paenibacillus polymyxa*. [5-7]. No obstante, un punto crítico en la producción biológica del 2,3-BD es la separación y purificación de este, quizá esta etapa sea aún más crítica que la propia síntesis debido a que de ello depende que el proceso entero represente una alternativa de producción económicamente atractiva [8].

Con respecto a la separación y purificación del 2,3-BD contenido en el efluente de fermentación, debido a su alto punto de ebullición y a la ausencia de azeótropos en dicho efluente, la destilación se perfila como una de las alternativas más prometedoras para realizar esta tarea [9]. Recientemente, Sánchez-Ramírez et al. [10] han propuesto una serie de esquemas de destilación involucrados en la purificación del 2,3-BD, estos esquemas se pueden apreciar en la Fig. 1, mientras que en la Tabla 1 se presenta el punto de ebullición de los principales componentes del efluente. No obstante, hasta ahora no ha sido ampliamente estudiado el desempeño dinámico que pudiesen presentar estos esquemas de destilación u otras alternativas para la recuperación del 2,3-BD de base biológica e inclusive, los estudios de control en bioprocesos reportados en la bibliografía resultan escasos. Con respecto al control en esquemas de destilación, se ha encontrado que el acoplamiento térmico llega a exhibir mejores propiedades de control que las secuencias convencionales en aquellos casos donde el componente de interés se encuentra en alguno de los extremos de volatilidad dentro de la mezcla [11].

Tabla 1. Punto de ebullición de los componentes presentes en el efluente

Componente	T _{eb} [°C]
Agua	100
Acetoína	147.8
2,3-BD	177.182

(1)

(2)

(3)

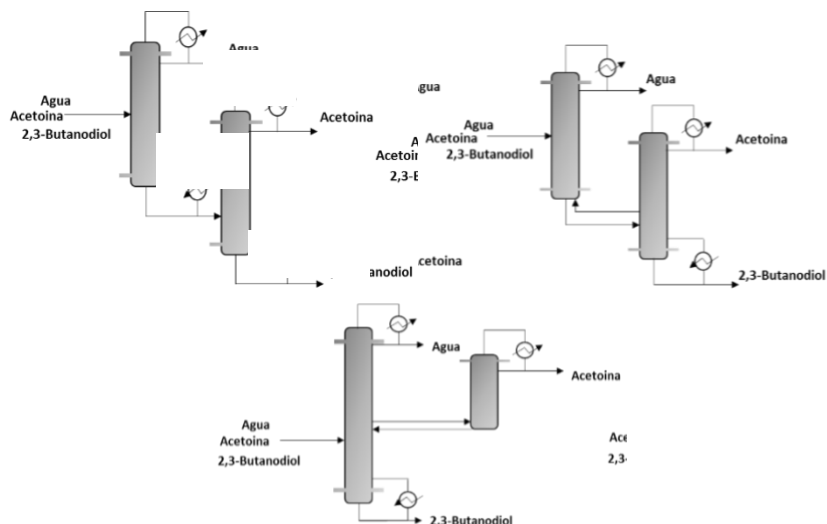


Figura 3. Esquemas de purificación para la obtención de 2,3-BD. (1) Secuencia directa (SD), (2) Secuencia térmicamente acoplada (STAC), (3) Secuencia termodinámicamente equivalente (STEQ). Tomada de Sánchez-Ramírez et al., (2019).

En materia de biocombustibles, han sido realizados estudios de control en varias secuencias de destilación involucradas en la separación y purificación del bio-butanol contenido en la mezcla acetona-butanol-etanol (ABE). Como resultado del estudio se encontró que el acoplamiento térmico en las secuencias de destilación perjudica la controlabilidad de estas, mientras que el movimiento de secciones o la eliminación de alguna sección de la columna mejora la controlabilidad sobre las secuencias de destilación convencional [12].

Por tal motivo, en este trabajo se analizaron las propiedades de control y el desempeño dinámico exhibido ante diversas perturbaciones sobre las corrientes de producto para un conjunto de trenes de destilación con diversas topologías con el fin de encontrar la mejor alternativa, desde el punto de vista de control, para su posible implementación a nivel industrial.

Metodología

Para el estudio de control fue seleccionado un diseño de cada uno de los trenes de destilación presentados en la Fig. 1, estos diseños fueron obtenidos previamente de un proceso de optimización realizado por Sánchez-Ramírez et al. [10]. Los diseños en estado estacionario de Aspen PlusTM fueron exportados a Aspen DynamicsTM para el estudio de control, el cual consistió en un análisis de control tanto a lazo abierto como a lazo cerrado, por medio del análisis de la respuesta de cada secuencia ante una perturbación realizada en las corrientes de producto sobre las zonas de la columna asociadas a la recuperación de estos, principalmente la relación de reflujo interna para corrientes de domo y la carga térmica de caldera para corrientes de fondo.

El estudio de control a lazo abierto en un sistema permite conocer su función de transferencia por medio de una entrada que lo desvíe de su estado estacionario. Ante esta situación el sistema presentará una respuesta específica para sobrellevar estos cambios que le sean inducidos y el seguimiento gráfico de esta respuesta permite conocer el comportamiento de la función de transferencia, lo cual es importante debido a que esta función caracteriza la relación que existe entre la salida y la entrada de un sistema. Para el análisis a lazo abierto se llevó a cabo una perturbación del estado estacionario para cada una de las secuencias analizadas. Fueron modificadas particular y no simultáneamente las variables manipulables asociadas a cada corriente de producto, las cuales fueron la carga térmica y la relación de reflujo con un decremento del 5% para cada corrida en cada análisis. La respuesta obtenida fue aproximada a tres tipos de respuesta, las cuales corresponden a respuestas de primer orden, primer orden en competencia y segundo orden.

Con las funciones de transferencia obtenidas se procedió a generar la matriz de transferencia, la cual se caracteriza por relacionar todos los cambios de composición en las corrientes de producto con los cambios realizados en las variables manipuladas. La importancia de esta matriz radica en que a través de ella fue posible realizar una descomposición de valores singulares (SVD) en MATLAB™, lo cual tiene la finalidad de obtener ciertos valores numéricos que generan información cualitativa sobre la controlabilidad de un proceso; dichos valores son el valor singular mínimo (σ^*) y el número de condición (γ^*).

El estudio de control a lazo cerrado tuvo como finalidad analizar el desempeño dinámico de cada esquema de destilación por medio de simulaciones dinámicas en Aspen Dynamics™. Para este análisis se empleó un controlador proporcional-integral (PI), debido a que tiene una mayor exactitud que el controlador proporcional (P), mientras que su exactitud es sumamente similar a la del controlador proporcional-integral-derivativo (PID) con la ventaja de que su implementación industrial resulta más sencilla que la de este último.

La sintonización del controlador PI se llevó a cabo montando este controlador en las corrientes de producto para posteriormente ser inducida una variación en la composición del producto principal en cada corriente de producto con un decremento del 1% con respecto a la especificación de diseño. Para lograr restablecer la operación de la columna en el nuevo valor de set-point indicado, se llevó a cabo una asociación del reflujo en corrientes de domo y la carga térmica en corrientes de fondo a la composición del producto principal en cada una de estas corrientes. La sintonización del controlador PI se llevó a cabo mediante la generación de una superficie de respuesta para los diferentes valores de K_c y τ_i asociados al controlador PI, para cada una de las respuestas obtenidas a causa de las perturbaciones realizadas sobre la composición de los productos principales. Para tener un indicativo cuantitativo de cada respuesta obtenida, el comportamiento de estas fue medido mediante el criterio de la integral absoluta del error (IAE).

$$IAE = \int_0^{\infty} |\varepsilon(t)| dt \quad (1)$$

Resultados

Como resultado del análisis de control a lazo abierto, las propiedades de control de un proceso pueden verse reflejados en el valor de σ_* y γ^* , los cuales para estos esquemas de destilación se muestran en la Fig. 2 y Fig. 3, respectivamente. Del análisis a lazo abierto se obtuvo que la secuencia STEQ presentó las mejores propiedades de control, puesto que ello se traduce en aquella secuencia que presente el mayor valor de σ_* y el menor valor de γ^* .

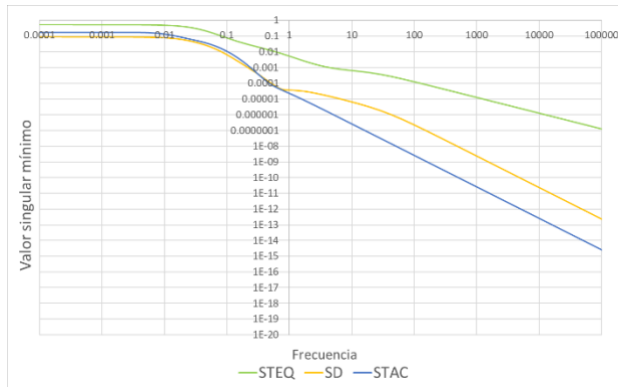


Figura 4. Valor singular mínimo (σ_*)

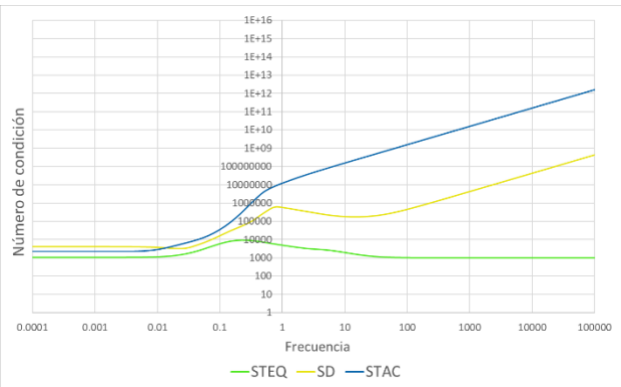


Figura 5. Número de condición (γ^*)

El valor de σ_* representa una medida de la flexibilidad que tiene el sistema ante transiciones operacionales, cuanto mayor sea el valor de σ_* más controlable será el proceso. Por otro lado, γ^* cuantifica la susceptibilidad del sistema frente a errores del modelo, no idealidades y perturbaciones, un elevado valor de γ^* significa que el sistema es menos controlable debido a que tiende a la amplificación este tipo de errores.

Como resultado del análisis de control a lazo cerrado, en la Tabla 2 se presentan los valores de K_c y τ_i con los cuales fue sintonizado cada controlador PI empleado en el análisis, mientras que en la Tabla 3 se muestran los valores del IAE obtenido para cada una de las respuestas empleando los parámetros de sintonización para el controlador antes mencionados. A continuación, se presentan las respuestas obtenidas para los lazos de acetoína y 2,3-BD (Fig. 4 y Fig. 5, respectivamente) ante el cambio de set-point realizado en estos, una vez que fue montado el controlador PI.

Tabla 2. Parámetros de sintonización del controlador PI

Secuencia	Lazo de control					
	Agua		Acetoína		2,3-BD	
	K_c	τ_i	K_c	τ_i	K_c	τ_i
SD	250	1	200	11	4	67
STAC	250	8	55	25	5	5
STEQ	50	150	50	45	250	1

Tabla 3. IAE obtenido en cada lazo de control

Secuencia	Producto		
	Agua	Acetoína	2,3-BD
SD	0.00039663	0.00183092	0.01838870
STAC	0.00322336	0.00457941	0.00507370
STEQ	0.08145409	0.00743200	0.00017062

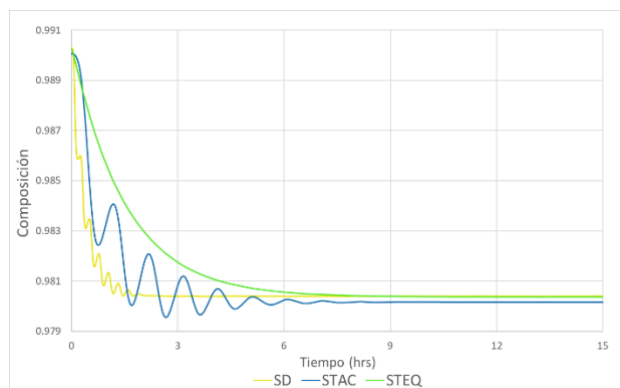


Figura 4. Cambio de set-point en el lazo de acetoína

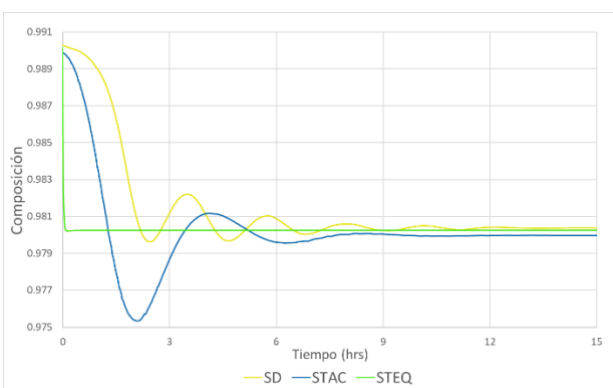


Figura 5. Cambio de set-point en el lazo del 2,3-BD

Derivado del análisis de control a lazo cerrado puede apreciarse que las secuencias que presentan un desempeño dinámico más sobresaliente son la secuencia STAC y la secuencia STEQ, cuyos parámetros de diseño se muestran en la Tabla 4 y Tabla 5, respectivamente.

Tabla 4. Variables de diseño para la secuencia STAC. Adaptada de Sánchez-Ramírez et al. (2019)

Secuencia Acoplada Térmicamente	C1	C2
Número de etapas teóricas	49	50
Relación de reflujo	0.3	68.5
Etapas de alimentación	42	12
Diámetro de la columna (m)	0.675	0.502
Altura de la columna (m)	28.7	29.3
Eficiencia general	0.6941	0.7601
Presión de operación (kPa)	101.353	101.353
Flujo de destilado (kmol/h)	3417.5	7.62
Flujo de interconexión de vapor (kmol/h)	-	3859.5
Flujo de interconexión de líquido (kmol/h)	3986.76	-
Calor del condensador (kW)	49676	6352
Calor de la caldera (kW)	-	65861

Tabla 5. Variables de diseño para la secuencia STEQ. Adaptada de Sánchez-Ramírez et al. (2019)

Secuencia Termodinámicamente Equivalente	C1	C2
Número de etapas teóricas	87	12
Relación de reflujo	0.3	25.023
Etapas de alimentación	42	12
Diámetro de la columna (m)	0.675	0.502
Altura de la columna (m)	51.8	6.1
Eficiencia general	0.7258	0.7466
Presión de operación (kPa)	101.353	101.35
Flujo de destilado (kmol/h)	3416.28	7.14
Flujo de interconexión de vapor (kmol/h)	-	24.85
Flujo de interconexión de líquido (kmol/h)	32	-
Calor del condensador (kW)	50201	384
Calor de la caldera (kW)	64439	-

Conclusiones

Derivado del estudio realizado se puede inferir que la composición de la mezcla, el corte de separación y las variables de diseño de cada columna influyen drásticamente en la controlabilidad de cada secuencia de destilación. Con respecto a los resultados del análisis de control a lazo abierto, en el caso específico de la secuencia SD y la secuencia STAC, a menores frecuencias las propiedades de control de la secuencia STAC son superiores a las de la secuencia SD, esto se debe a que para perturbaciones menores se espera que la secuencia STAC muestre un mejor desempeño dinámico que la secuencia SD. Del estudio a lazo cerrado se concluye que el acoplamiento térmico y movimiento entre secciones mejora

considerablemente la controlabilidad, mientras que para el caso específico de la separación y purificación del 2,3-BD de la mezcla en la que está contenido, las alternativas más viables son la secuencia STAC y STEQ por el desempeño dinámico mostrado. Puede decirse que el movimiento entre secciones mejora considerablemente las propiedades de control y el desempeño dinámico de las secuencias de destilación convencional de las que provienen.

Bibliografía

- [1] Celińska, E., & Grajek, W. (2009). Biotechnological production of 2,3-butanediol—Current state and prospects. *Biotechnology Advances*, 715-725.
- [2] Wu, K.-J., Saratale, G. D., Lo, Y.-C., Chen, W.-M., Tseng, Z.-J., Chang, M.-C., . . . Chang, J.-S. (2008). Simultaneous production of 2,3-butanediol, ethanol and hydrogen with a *Klebsiella* sp. strain isolated from sewage sludge. *Bioresource Technology*, 7966-7970.
- [3] Emerson, R. R., Flickinger, M. C., & Tsao, G. T. (1982). Kinetics of dehydration of aqueous 2,3-butanediol to methyl ethyl ketone. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, 473-477.
- [4] Hoppe, F., Burke, U., Thewes, M., Heufer, A., Kremer, F., & Pischinger, S. (2016). Tailor-Made Fuels from Biomass: Potentials of 2-butanone and 2-methylfuran in direct injection spark ignition engines. *Fuel*, 106-117.
- [5] Ji, X.-J., Huang, H., & Ouyang, P.-K. (2011). Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, 351-364.
- [6] Kosaric, N., & Magee, R. J. (1987). The Microbial Production of 2,3-Butanediol. *Advances in Applied Microbiology*, 89-161.
- [7] Garg, S. K., & Jain, A. (1995). Fermentative production of 2,3-butanediol: A review. *Bioresource Technology*, 103-109.
- [8] Penner, D., Redepenning, C., Mitsos, A., & Viell, J. (2017). Conceptual Design of Methyl Ethyl Ketone Production via 2,3-Butanediol for Fuels and Chemicals. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 3947-3957.
- [9] Harvianto, G. R., Haider, J., Hong, J., Van Duc Long, N., Shim, J.-J., Cho, M. H., . . . Lee, M. (2018). Purification of 2,3-butanediol from fermentation broth: process development and techno-economic analysis. *Biotechnology for Biofuels*, 11-18.
- [10] Sánchez-Ramírez, E., Quiroz-Ramírez, J. J., Hernández, S., Segovia-Hernández, J. G., Contreras-Zarazúa, G., & Ramírez-Márquez, C. (2019). Synthesis, design and optimization of alternatives to purify 2, 3-Butanediol considering economic, environmental and safety issues. *Sustainable Production and Consumption*, 282-295.
- [11] Segovia-Hernández, J. G., Hernández, S., Rico-Ramírez, V., & Jiménez, A. (2003). Dynamic study of thermally coupled distillation sequences using proportional - integral controllers. *European Symposium on Computer Aided Process Engineering*, 521-526.
- [12] Errico, M., Sanchez-Ramirez, E., Quiroz-Ramirez, J. J., Segovia-Hernández, J. G., & Rong, B. G. (2016). Synthesis and design of new hybrid configurations for biobutanol purification. *Computers & Chemical Engineering*, 84, 482-492.

DETERMINACIÓN DE LOS VALORES NUMÉRICOS DE LOS PARÁMETROS PARA UN MODELO DE CRECIMIENTO DE MICROALGAS

Mario Alfonso Ferreira Rivera^a, Fernando López Caamal^{a*}, Glenda Cea Barcia^b, Ixbalank Torres Zúñiga^c

^a Departamento de Ingeniería Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Guanajuato, 36050, MÉXICO. fernando.lopez@ugto.mx

^b Departamento de Ciencias Ambientales, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Carretera Salamanca-Valle de Santiago, Irapuato, Guanajuato, 36500, MÉXICO. glendacea@ugto.mx

^c Departamento de Ingeniería Electrónica, C. A. Telemática, División de Ingenierías, Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, Salamanca, 36885, MÉXICO. ixbalank@ugto.mx

Resumen

El presente trabajo se enfoca en la estimación de los valores numéricos de los parámetros que conforma un modelo matemático dinámico que describe el crecimiento de la biomasa y el consumo de sustrato en un cultivo en continuo de microalgas a partir de datos experimentales adquiridos de la literatura. Este ajuste se realiza con la ayuda de la herramienta computacional *Matlab* y sus funciones *fminsearch* y *fmincon*, basándose éstas en encontrar el mínimo local de una función objetivo calculada por medio del error de la norma cuadrada entre los datos experimentales y los datos generados por la solución de las ecuaciones diferenciales que conforman el modelo. Obteniendo como resultado la siguiente estimación: $\rho_{max}=0.16018$, $K_s = 0.0015361$, $\mu_{max} = 1.5138$, $Q_m = 0.035938$, correspondientes a iniciar la simulación con +10% de diferencia de los valores de los parámetros de referencia.

Palabras claves: *Estimación de parámetros, microalgas, modelo dinámico.*

Introducción

Los cultivos de microalgas han recibido una atención cada vez mayor en relación con la gran variedad de aplicaciones importantes que van desde, biocombustibles, pigmentos, cosméticos, tratamiento de aguas residuales, etc. [1]. Las microalgas son organismos fotosintéticos unicelulares con estructura simple permitiéndole rapidez de crecimiento. Son además organismos fotoautótrofos conformados principalmente por carbono, oxígeno, hidrogeno, nitrógeno, azufre y fosforo [2]. Contienen pigmentos fotosintéticos, clorofila α , son autótrofas o heterótrofas con la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica produciendo oxígeno (O_2), sintetizar compuestos de carbono (C) mediante la fijación del CO_2 y de convertir la energía solar [3]. Su hábitat es típicamente flotar o sedimentarse en un medio acuático siendo la luz su principal fuente de energía y el CO_2 su principal fuente de carbono, fijando más del 40% del carbono de la Tierra [2], también pueden crecer bajo fuentes externas de carbono utilizada en la generación de la energía requerida para su metabolismo y también obtener energía por medio del proceso de fotosíntesis. La biomasa algal está compuesta bioquímicamente por lípidos, carbohidratos y proteínas conformando estos hasta el 90% del peso seco total y las proteínas pueden ser el 50% del peso total, el restante 10% lo conforman minerales, ácidos nucleicos, pigmentos. Las microalgas contienen vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes [4].

Los modelos matemáticos que describen el comportamiento de estos microorganismos son típicamente ecuaciones diferenciales ordinarias, cuya solución nos muestra patrones importantes del cultivo.

Finalmente se calcularán los valores numéricos de los parámetros de un modelo de microalgas ajustados a partir de datos recolectados de la literatura para así comprender, analizar y predecir la conducta de las variables involucradas (X, S, Q) y posteriormente determinar qué realizar para obtener el mejor comportamiento del cultivo.

Metodología

Para realizar la estimación de los valores numéricos de los parámetros del siguiente modelo de microalgas compuesto por ecuaciones diferenciales (1) implementado por [5], el cual expresa los balances de masa en un biorreactor en continuo, caracterizándose este modelo por describir las dinámicas de las microalgas en condiciones heterotróficas, utilizando las siguientes variables de estado: concentración de biomasa X [gDW/L], concentración de nitrógeno extremo o concentración de sustrato S [gN/L] y la cuota celular o intracelular Q [gN/gDW].

$$\dot{X} = \mu * X - D * X$$

$$\dot{S} = D * S_{in} - \rho * X - D * S \quad (1)$$

$$\dot{Q} = \rho - \mu * Q$$

Donde D [$1/d$] representa la tasa de dilución definida matemáticamente como $D = \frac{Q_{in}}{V}$, el cual proporciona la rapidez con la que el volumen del cultivo es reemplazado con medio de cultivo nuevo, siendo Q_{in} el flujo de entrada del medio nuevo y V es el volumen del cultivo. Suponiendo un funcionamiento continuo con volumen constante, y la tasa de adsorción de carbono definida por la ley de Monod representada por ρ [$gN/gDW * d$].

$$\rho = \rho_{max} \frac{S}{S + K_s} \quad (2)$$

Siendo K_s y ρ_{max} las constantes de: saturación sustrato media y la tasa máxima de adsorción de nitrógeno inorgánico del sustrato limitante (nitrógeno extracelular) respectivamente.

Droop [6] propuso que la tasa de crecimiento de microalgas representada por μ [$1/d$] depende de la cuota intracelular mínima Q_m en lugar de la concentración de sustrato externo identificada empíricamente, por tanto, las microalgas incluso pueden crecer cuando se termina el sustrato externo y μ_{max} es la tasa máxima de crecimiento.

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{Q_m}{Q} \right) \quad (3)$$

En la Tabla 1 se presentan los parámetros de referencia [5] utilizados para la simulación y solución del modelo.

Tabla 2. Parámetros constantes y condiciones iniciales del modelo.

Parámetro	Descripción	Valor	Unidades
ρ_{max}	Tasa máxima de absorción de nitrógeno	0.0916	$\frac{gN}{gDW * d}$
K_s	Constante de saturación media	0.0017499	gN/L
μ_{max}	Tasa máxima de crecimiento específico	1.8102	$1/d$

Q_m	Cuota mínima de nitrógeno	0.0369	gN/gDW
V	Volumen	13	L
Q_{in}	Flujo de entrada	6	L/d
S_{in}	Concentración de sustrato de entrada	0.070	$gN * L$
$X(0)$	Condición inicial de X	0.140	gDW/L
$S(0)$	Condición inicial de S	0.0165	gN/L
$Q(0)$	Condición inicial de Q	0.045	gN/gDW

En la Tabla 2 y 3 encontramos los parámetros iniciales a utilizar en los algoritmos de estimación suponiendo diferencias del -5%, -10%, 5%, 10% con respecto a los valores de los parámetros de referencia de la Tabla 1, utilizándose como condiciones iniciales para implementar el algoritmo de optimización.

Tabla 3. Parámetros con $\pm 5\%$ de diferencia de los valores de referencia.

Parámetro	Valor Inferior	Valor de Referencia	Valor Superior
ρ_{max}	0.08702	0.0916	0.09618
K_s	0.001662405	0.0017499	0.001837395
μ_{max}	1.71969	1.8102	1.90071
Q_m	0.035055	0.0369	0.038745

Tabla 4. Parámetros con $\pm 10\%$ de diferencia de los valores de referencia.

Parámetro	Valor Inferior	Valor de Referencia	Valor Superior
ρ_{max}	0.08244	0.0916	0.10076
K_s	0.00157491	0.0017499	0.00192489
μ_{max}	1.62918	1.8102	1.99122
Q_m	0.03321	0.0369	0.04059

Estimar parámetros en ecuaciones algebraicas y ecuaciones diferenciales ordinarias, es fundamental para conocer el comportamiento del sistema, realizándose de la siguiente manera.

Este problema particular de estimación de parámetros es esencialmente ajustar un conjunto de datos experimentales (mediciones, observaciones) a una serie de ecuaciones algebraicas o diferenciales que juntas conforman un modelo específico de estudio en cierta área del conocimiento.

Una restricción básica de este problema es que si se quieren determinar m parámetros de un modelo se necesitan al menos m medidas experimentales y estas medidas deben ser lo suficientemente representativas para los procesos que se quieren estudiar con un error experimental razonable [7].

Consiste básicamente la estimación de parámetros en:

Teniendo una tabla datos experimentales Ψ donde las observaciones dependen de las condiciones en las que se encuentre el sistema en estudio.

$$\Psi = \{(t_i, y_i^T)^T \in [t_0, T] \times \mathbb{R}^n; i = 1, 2, \dots, m\},$$

y_i representa los datos experimentales medidos en un tiempo determinado t_i y minimizar el error correspondiente entre los datos experimentales y los datos de la solución que proporciona el conjunto de ecuaciones diferenciales implementado en la ecuación (4).

$$g(p) = \frac{1}{2} \|Y - F(p)\|_2^2 \quad (4),$$

donde Y son las mediciones experimentales y $F(p)$ son los valores de la solución del modelo con parámetros adquiridos de la literatura, siendo $g(p)$ la función objetivo del problema.

Por medio de la utilización del programa *Matlab* e implementación de la función *fminsearch* que utiliza el método no lineal (Nelder-Mead) y la función *fmincon* que se reserva el método implementado y aplicando el error relativo absoluto (ε), se concluirá que función arroja los mejores resultados de los parámetros estimados, en el cual la función objetivo (4) se tratará como un problema de programación no lineal.

$$\varepsilon = \frac{\text{error absoluto (e)}}{\text{valor exacto}} \quad (5)$$

$$\text{error absoluto (e)} = |\text{valor real} - \text{valor calculado}|$$

Resultados

A continuación, se presentan una serie de tablas en el cual encontraremos los resultados de las simulaciones realizadas con el modelo en estudio, los datos experimentales y el valor de la respectiva función objetivo para cada caso.

En la Tabla 4 se representan los valores numéricos de los parámetros encontrados por la función *fminsearch* con diferencia de -5% y -10% del valor de referencia.

Tabla 5. Valores de los parámetros obtenidos con *fminsearch* -5% y -10% del valor de referencia.

Parámetro	Parámetros obtenidos con - 5% del valor de referencia	Parámetros obtenidos con - 10% del valor de referencia	Función objetivo para caso de -5% del valor de referencia	Función objetivo para caso de -10% del valor de referencia
ρ_{max}	346129.14	17143335.7828	0.0021	0.0021
K_s	31583.48457	1568368.1186		
μ_{max}	1.598522004	1.59824794044		
Q_m	0.03614747334	0.03614314878		

En la Tabla 5 se representan los valores numéricos de los parámetros encontrados por la función *fmincon* con diferencia de -5% y -10% del valor de referencia.

Tabla 6. Valores de los parámetros obtenidos con *fmincon* -5% y -10% del valor de referencia.

Parámetro	Parámetros obtenidos con - 5% del valor de referencia	Parámetros obtenidos con - 10% del valor de referencia	Función objetivo para caso de -5% del valor de referencia	Función objetivo para caso de -10% del valor de referencia
ρ_{max}	1.1361	1.4217	0.0465	0.0022

K_s	0.75967	0.10842	
μ_{max}	1.3472	1.5645	
Q_m	0.025291	0.036085	

En la Tabla 6 se representan los valores numéricos de los parámetros encontrados por la función *fminsearch* con diferencia de 5% y 10% del valor de referencia.

Tabla 7. Valores de los parámetros obtenidos con *fminsearch* 5% y 10% del valor de referencia.

Parámetro	Parámetros obtenidos con 5% del valor de referencia	Parámetros obtenidos con 10% del valor de referencia	Función objetivo para caso de 5% del valor de referencia	Función objetivo para caso de 10% del valor de referencia
ρ_{max}	4.8252	0.16018		
K_s	0.35304	0.0015361	0.0021	0.0026
μ_{max}	1.5329	1.5138		
Q_m	0.036009	0.035938		

En la Tabla 7 se representan los valores numéricos de los parámetros encontrados por la función *fmincon* con diferencia de 5% y 10% del valor de referencia.

Tabla 8. Valores de los parámetros obtenidos con *fmincon* 5% y 10% del valor de referencia.

Parámetro	Parámetros obtenidos con 5% del valor de referencia	Parámetros obtenidos con 10% del valor de referencia	Función objetivo para caso de 5% del valor de referencia	Función objetivo para caso de 10% del valor de referencia
ρ_{max}	1.5195	1.913		
K_s	0.11629	0.14895	0.0022	0.0022
μ_{max}	1.5636	1.5635		
Q_m	0.036082	0.036081		

En la Tabla 8 se encuentran calculados los promedios de los errores relativos absolutos para cada caso implementado en los algoritmos, evidenciando que la mejor función que ajusta los parámetros es *fminsearch* con 10% de diferencia de los valores de referencia, obteniendo un error relativo absoluto promedio de 0.26516941.

Tabla 8. Promedio de los errores relativos absolutos para cada caso.

Caso	<i>fminsearch</i>	<i>fmincon</i>
-5%	5456859.34	111.273792
-10%	270853972	18.9090965
5%	63.1507153	20.3005125
10%	0.26516941	26.0404769

Conclusiones

Las dos funciones implementadas tienen buen funcionamiento para cumplir el objetivo del presente trabajo, donde la función *fminsearch* destaca por obtener el mejor ajuste de los

parámetros con los siguientes resultado: $\rho_{max}=0.16018, K_s = 0.0015361, \mu_{max} = 1.5138, Q_m = 0.035938$, obtenidos con 10% de diferencia de los valores de referencia, obteniendo un error relativo absoluto de 0.26516941, pero teniendo como limitante empezar muy cerca de los parámetros de referencia para así evitar un mayor tiempo de cómputo y mayor error en los parámetros encontrados.

Bibliografía

- [1] Benavides, M., Coutinho, D., Hantson, A. L., Van Impe, J., & Vande Wouwer, A. (2015). "Robust Luenberger observers for microalgal cultures". *J Process Control*, 36, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.jprocont.2015.09.005>
- [2] Benavente, Montañez, Aguilar, Méndez, & Valdivia. (2012). "Tecnología De Cultivo De Microalgas En Fotobiorreactores". *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(7), 12.
- [3] Mataran Perez, L., Gonzalez Dominguez, J., Rodriguez Perez, M., Rodrigo, D., Abellan Perez, M., & Salvatierra Rios, D. (1989). "Cinc Plasmático E Intraeritrocitario En La Artritis Reumatoide Y Espondilitis Anquilosante". *Anales de Medicina Interna*, 6(12), 629–632.
- [4] Agrotendencia. (2020). El cultivo de microalgas. Copyright. Recuperado de <https://agrotendencia.tv/agropedia/el-cultivo-de-microalgas/>.
- [5] Mendoza Pedro O., (2018) "*Optimización y Monitoreo en Línea de un Fotobiorreactor de Producción de Microalgas*", Tesis de Maestría, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México, 58-59.
- [6] Droop, M. R. (1968). "Vitamin B12 and Marine Ecology. IV. The Kinetics of Uptake, Growth and Inhibition in *Monochrysis Lutheri*". *J. Mar. Biolog. Assoc. U. K.*, 48(3), 689–733. <https://doi.org/10.1017/S0025315400019238>
- [7] Sánchez De Oleo, C. M. (2015). "*Estimación de Parámetros en Modelos de Transporte de Agua y Nitrógeno en el Suelo*". 152 pp.

DETERMINACIÓN DEL DISEÑO ÓPTIMO PARA UN INTERCAMBIADOR DE TUBOS Y CORAZA: UN ENFOQUE METAHEURÍSTICO.

Jaime David Ponce-Rocha ^{a*}, Rosa Ivon Pantoja-Canova ^b

^a Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Gto., 36050, MÉXICO.

jd.poncerocha@ugto.mx

^b Departamento de Química, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Gto., 36050, MÉXICO.

Resumen

El presente trabajo tiene como objetivo la determinación del diseño óptimo de un intercambiador de tubo y coraza del tipo TEMA-E mediante una aproximación metaheurística. Se empleó el método ϵ -NTU y la metodología Bell-Delaware, para el modelado termo-hidráulico. La maximización de la eficiencia en la transferencia de calor y la minimización de costos asociados al equipo, fueron seleccionadas como las funciones objetivo. El trabajo fue desarrollado en la herramienta computacional Matlab V. R2019a, donde se eligieron tres algoritmos evolutivos incluidos en dicha herramienta: algoritmos genéticos (mono y multiobjetivo), recocido simulado y enjambre de partículas. Finalmente, la implementación de técnicas de optimización permitió una reducción económica del 63%, un aumento en la efectividad de 0.3192 unidades, así como un rango de operación más amplio en comparación con el caso base.

Palabras clave: *Intercambiador de tubos y coraza; Algoritmos metaheurísticos; Optimización multiobjetivo.*

Introducción

Los intercambiadores de calor son equipos usados en una gran cantidad de procesos industriales, su objetivo principal consiste la recuperación de calor residual mediante la transferencia de calor entre varios fluidos y tomando en cuenta aspectos como la eficiencia y factibilidad económica del proceso [1]. El uso de intercambiadores de calor de tubo y coraza (STHE) prevalece como el equipo de intercambio térmico más común a nivel industrial debido a su flexibilidad de operación, lo que ha impulsado al desarrollo de diversas metodologías enfocadas en la descripción termo-hidráulica de estos equipos, las cuales están fundamentadas en ecuaciones analíticas, correlaciones gráficas y reglas heurísticas [2]. En este sentido, la metodología Bell-Delaware permite obtener una descripción adecuada referente al desempeño hidráulico de intercambiadores de calor, mientras que el uso del modelo ϵ -NTU (Efectividad-Número de Unidades de Transferencia) muestra resultados superiores respecto a la predicción del desempeño térmico del equipo [3-4].

El diseño termo hidráulico para STHE incluye la determinación del área de transferencia, número de tubos, pitch de tubos, arreglo geométrico de tubos, número de pasos lado tubos y lado coraza, entre otros. En este nexo, la combinación de la maximización en la eficiencia de transferencia de calor y minimización de costos, se han establecido como objetivos de optimización en función de variables de diseño del equipo [5]. Entre los algoritmos de optimización, las técnicas metaheurísticas han ganado popularidad, lo que ha llevado a una

nueva rama, conocida como optimización metaheurística. Particularmente los algoritmos de optimización metaheurística están inspirados en la naturaleza, (por ejemplo, recocido simulado, algoritmos genéticos, enjambre de partículas, etcétera) y han mostrado resultados favorables para la solución de problemas de optimización mono y multiobjetivo [6].

Cuando los algoritmos de optimización no poseen la característica propia de un enfoque de optimización multiobjetivo, el uso de técnicas de agregación-transformación, como el método de suma ponderada, combina todas las funciones asociadas a la optimización multiobjetivo en un escalar mediante la implementación de pesos, facilitando su solución. Aun cuando existe la problemática de la determinación de los coeficientes de peso, este método ofrece una implementación simple con resultados satisfactorios en el espacio de búsqueda[7].

El objetivo de este trabajo consiste en la determinación del diseño óptimo de un intercambiador de tubos y coraza tipo TEMA-E, empleando distintos algoritmos de optimización metaheurística, estableciendo como funciones objetivo la minimización del costo total y la maximización de la efectividad, a través de la manipulación de variables de decisión.

Metodología

La figura 1, muestra la metodología empleada para el desarrollo de este trabajo.



Figura 6. Metodología propuesta.

Se seleccionó un intercambiador de calor tipo TEMA-E, el cual es empleado para la recuperación de calor residual generado en el proceso de producción de plata [8]. La

transferencia de calor considera dos fluidos, agua y aceite industrial. Las propiedades termo-físicas de los fluidos están dadas en la tabla 1.

Tabla 9. Datos termo-físicos de las corrientes de entrada al intercambiador de calor TEMA-E [8].

Datos termo-físicos	Lado coraza (Aceite Industrial)	Lado tubos (Agua)
Densidad [kg/m ³]	849	993
Calor específico [J/kg K]	2,094	4,178
Viscosidad [Pa S]	0.0646	0.000723
Conductividad térmica [W/m K]	0.14	0.634
Factor de ensuciamiento [m ² W/K]	0.000176	0.000088
Datos de operación		
Flujo másico [kg/s]	36.30	18.10
Temperatura de entrada [°C]	65.60	32.20

El modelo termo-hidráulico integra la metodología Bell-Delaware y el modelo ϵ -NTU, los cuales fueron implementados en un entorno de programación: Matlab V R2019a.

Las funciones objetivo contemplan la minimización del costo total (1) y la maximización de la efectividad (2).

$$\text{Costo total} = CT = C_{\text{Inversión}} + C_{\text{Operación}} \quad (1)$$

$$C_{\text{Inversión}} = 8,500 + 409A_t^{0.85} \quad (1.a)$$

$$C_{\text{Operación}} = \sum_{k=1}^{ny} \frac{C_o}{(1+i)^k} \quad (1.b)$$

$$C_o = P k_{el} \tau \quad (1.c)$$

$$P = \frac{1}{\eta} \left(\frac{m_t}{\rho_t} \Delta P_t + \frac{m_s}{\rho_s} \Delta P_s \right) \quad (1.d)$$

$$\epsilon = f(NTU, A, \text{Tipo de intercambiador de calor: TEMA - E}) \quad (2)$$

$$\epsilon = \frac{2}{(1 - Cr) + (1 - Cr^2)^{0.5} \coth \left(\frac{NTU}{2} (1 - Cr^2)^{0.5} \right)} \quad (2.a)$$

$$NTU = \frac{U_0 A_t}{C_{min}} \quad (2.b)$$

$$Cr = \frac{C_{min}}{C_{max}} = \frac{\min [\dot{m}_f c_{p,f}, \dot{m}_c c_{p,c}]}{\max [\dot{m}_f c_{p,f}, \dot{m}_c c_{p,c}]} \quad (2.c)$$

Donde A_t representa el área de transferencia de calor del intercambiador de calor, ny es el tiempo de vida del equipo en años (10), k es la tasa anual de descuento (10%), k_{el} , τ y η representan el costo de energía eléctrica (\$0.15 kWh), tiempo de operación anual en años (7500 horas) y la eficiencia de bombeo (0.6). Asimismo $\dot{m}$ representa el flujo másico de la

corriente, c_p implica la capacidad térmica y los subíndices f y c, hacen referencia al fluido frío y caliente respectivamente.

El problema de optimización fue formulado de la siguiente manera:

Enfoque multiobjetivo

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Min}(CT) \\ \text{Max}(\varepsilon) \end{array} \right\} = f \left(AT, D_o \& D_i, \frac{P_t}{D_o}, L_t, N_t, \frac{bc}{D_s}, \frac{bs}{D_s}, \frac{L_t}{D_s} \right) \quad (3a)$$

Enfoque mono-objetivo

$$\begin{aligned} f_1(x) &= TC \\ f_2(x) &= \varepsilon \\ \text{Min } F(x) &= w_1 f_1(x) - w_2 f_2(x) \end{aligned} \quad (3b)$$

$$\min F(x) = f \left(\text{Tube arrangements}, D_o \& D_i, \frac{P_t}{D_o}, L_t, N_t, \frac{bc}{D_s}, \frac{bs}{D_s}, \frac{L_t}{D_s} \right)$$

Las variables de decisión y su definición se muestran en la tabla 2.

Tabla 10. Variables de decisión.

Variables de decisión	Rango de valores
Arreglo de tubos	$AT = [30^\circ, 45^\circ, 60^\circ, 90^\circ]$
Diámetro externo de tubos [m]	$0.0127 \leq D_o \leq 0.0222$
Diámetro interno de tubos [m]	$0.0089 \leq D_i \leq 0.0190$
Longitud de tubos [m]	$3.00 \leq L_t \leq 8.00$
Número de tubos	$100.00 \leq N_t \leq 600.00$
Relación de corte en deflector	$0.19 \leq \frac{bc}{D_s} \leq 0.32$
Relación de espaciamiento de deflector	$0.20 \leq \frac{bs}{D_s} \leq 1.40$
Relación de longitud de tubo y diámetro de coraza	$3.00 \leq \frac{L_t}{D_s} \leq 13.00$

Se evaluaron tres algoritmos de optimización metaheurística integrados en la suite de optimización de Matlab V2019a ®:

- I. Algoritmos genéticos
 - a. Enfoque mono-objetivo: GA. Número de individuos: 200, Generaciones: 700, fracción de cruce: 0.8.
 - b. Enfoque multiobjetivo: Gamultiobj. Número de individuos: 200, Generaciones: 700, fracción de cruce: 0.8.

- II. Recocido simulado (SA). Número máximo de iteraciones: 21,000. Temperatura inicial: 100.
- III. Enjambre de partículas (PSO). Número de partículas: 200, número máximo de iteraciones: 200.

Resultados

La figura 2, muestra el frente de Pareto con los resultados óptimos de cada uno de los algoritmos de optimización metaheurística evaluados.

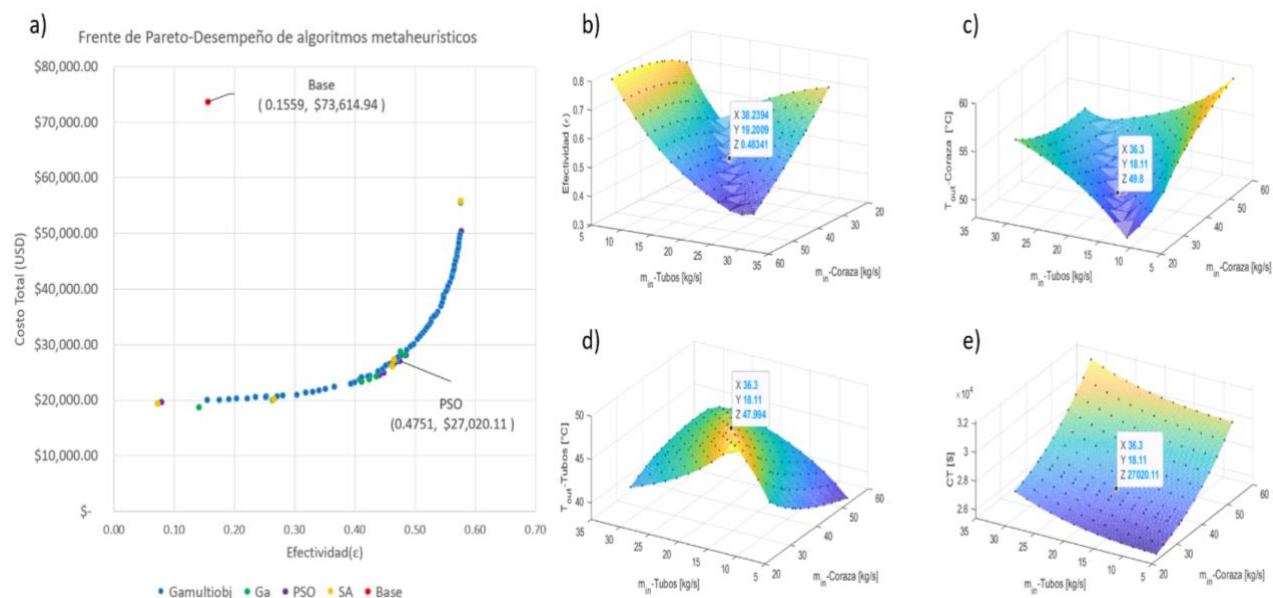


Figura 7. a) Distribución de puntos óptimos usando diversos algoritmos metaheurísticos; Efecto de variación en flujos de entrada sobre: b) efectividad, c) Temperatura de salida-Coraza, d) Temperatura de salida-Tubos, e) Costo total.

De acuerdo con los resultados mostrados en la figura 2a, se seleccionó un punto en el frente de Pareto perteneciente al algoritmo de enjambre de partículas (0.4751, \$27,020.11). Posteriormente, se realizó un análisis de sensibilidad para el determinar el efecto de variaciones en los flujos de entrada en lado tubos y lado coraza (figura 2), respecto a variables como la efectividad (2b), temperatura de salida-lado coraza (2c), temperatura de salida-lado tubos (2d) y costo total (2e).

La tabla 3, despliega los indicadores más relevantes referentes al diseño, condiciones de operación y costos.

Tabla 11. Comparativo de indicadores para el caso base y caso óptimo.

Indicador	Base	Óptimo
Costo total	\$ 73,614.94	\$27,020.11
Efectividad	0.1559	0.4751
Área de transferencia de calor [m²]	26.18	76.36
Flujo de entrada-lado coraza [kg/s]	36.30	36.30

Temperatura de entrada-lado coraza[°C]	65.60	65.60
Temperatura de salida-lado coraza [°C]	60.42	49.80
Flujo de entrada-lado tubos [kg/s]	18.11	18.11
Temperatura de entrada-lado tubos [°C]	32.20	32.20
Temperatura de salida-lado tubos [°C]	37.38	47.99
Coefficiente global de transferencia de calor (U) [W/m²K]	536.61	1,058.07
Caída de presión-lado coraza (ΔP_s) [Pa]	111,357.43	3,616.58
Caída de presión-lado tubos (ΔP_t) [Pa]	17,605.36	2,095.41

La tabla 4, muestra la comparativa de las variables de diseño para el caso base y el escenario óptimo seleccionado.

Tabla 12. Comparativo de especificaciones de diseño.

	T_{Layout}	D_o & D_i	$\frac{P_t}{D_o}$	L_t	N_t	$\frac{bs}{D_s}$	$\frac{bc}{D_s}$	D_s	TC	ϵ	
Base	45°	0.0190 0.0166	1.32	4.30	102	0.83	0.26	0.34	\$	73,614.94	0.1559
Óptimo	45°	0.0127 0.0113	2.00	3.58	600	0.32	0.47	0.73	\$	27,020.11	0.4751

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos, es posible determinar que el uso de algoritmos de optimización metaheurísticos permite obtener una mejora notable en las funciones objetivo-establecidas. Si bien el uso del método de suma ponderada ofrece resultados satisfactorios, su implementación requiere una búsqueda rigurosa para la determinación de los coeficientes de peso, y, por lo tanto, la necesidad de un mayor tiempo de cálculo. En el caso del algoritmo genético con enfoque multiobjetivo, existe una mejora sustancial en la generación de resultados, respecto al tiempo computacional requerido y el rango de resultados obtenidos. El punto óptimo seleccionado permitió mejorar la efectividad en más de tres veces el valor original. Asimismo, considerando los aspectos económicos, se obtuvo una reducción del 63.30%. Con respecto a la temperatura de salida en ambos fluidos, fue posible mejorar la capacidad de eliminación de calor residual del aceite con temperaturas de salida aceptables en ambos lados. Respecto al apartado de análisis de sensibilidad, es posible validar la obtención de un diseño flexible de intercambiador de calor de tubos y coraza. Finalmente, entre las modificaciones futuras, es recomendable considerar los efectos de las variaciones de temperatura frente a las propiedades de ambos fluidos.

Bibliografía

- [1] Fares, M., AL-Mayyahi, M. and AL-Saad, M. (2020) “Heat transfer analysis of a shell and tube heat exchanger operated with graphene nanofluids,” *Case Studies in Thermal Engineering*. Elsevier BV, 18, p. 100584.
- [2] Kern, D. Q. (1983) *PROCESS HEAT TRANSFER*. 1st ed.
- [3] Ribeiro, M. C. C. (1984) Comparison of thermo-hydraulic calculation methods for shell and tube heat exchangers, sem phase change. Universidade Estadual de Campinas.
- [4] Bergman, T. L., Lavine, A. and Incropera, F. P. (2007) *Fundamentals of heat and mass transfer*.
- [5] Rao, R. V. and Patel, V. (2013) “Multi-objective optimization of heat exchangers using a modified teaching-learning-based optimization algorithm,” *Applied Mathematical Modelling*. Elsevier, 37(3), pp. 1147–1162.
- [6] Yang, X.-S. (2011) “Metaheuristic Optimization: Algorithm Analysis and Open Problems BT - Experimental Algorithms,” in Pardalos, P. M. and Rebennack, S. (eds.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 21–32.
- [7] Yang, X.-S. (2014) “Multi-Objective Optimization,” in *Nature-Inspired Optimization Algorithms*. Elsevier, pp. 197–211.
- [8] Sanaye, S. and Hajabdollahi, H. (2010) “Multi-objective optimization of shell and tube heat exchangers,” *Applied Thermal Engineering*. Pergamon, 30(14–15), pp. 1937–1945.

DISEÑO DE UN PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL A PARTIR DE ACEITES DE REÚSO

Osiris Martínez- Sánchez ^a, Fernando Israel Gómez-Castro ^a, Nelly Ramírez-Corona ^b.

^a Departamento de Ingeniería Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Gto. 36050, MÉXICO. fgomez@ugto.mx

^b Departamento de alimentos, Ingeniería Química y Ambiental, Universidad de las Américas de Puebla, Sta. Catarina Mártir, Puebla, Puebla, 72810, MÉXICO.

Resumen

El biodiésel es uno de los combustibles más estudiados en la actualidad y está destinado a remplazar parcialmente el diésel fósil en las distintas aplicaciones industriales. Puede ser obtenido de una gran variedad de fuentes que contienen triglicéridos, donde la calidad y el precio del biodiésel depende en gran medida del tipo de materia prima usada para su producción. En este trabajo analizaremos diferentes aspectos que involucran la producción de biodiésel y su utilidad, incluyendo el potencial de la materia prima para producir este biocombustible, las diferentes tecnologías que son usados en el proceso de producción, información técnico-económico sobre la producción de la producción de biodiésel. Se presenta información de la ventaja que representa utilizar el biodiesel en motores y una comparación con el uso de diésel fósil.

Palabras clave: *Biodiésel, Biocombustible, Aceite de reúso, Esterificación, Transesterificación.*

Introducción

El biodiésel se define como ésteres monoalquílicos de cadena larga de aceites vegetales y grasas animales. Es producido a partir de aceites vegetales, y ha ganado importancia a lo largo de los años como una buena alternativa renovable para sustituir el diésel fósil [1]. Generalmente es producido mediante el proceso de transesterificación de triglicéridos, los cuales representan el constituyente mayoritario en aceites vegetales con un alcohol, generalmente etanol o metanol en presencia de catalizadores alcalinos (figura 1). La transesterificación puede ser catalizada por catalizadores ácidos o encimas [2]. El biodiésel puede ser producido también mediante el proceso de esterificación de ácidos grasos libres con alcohol y catalizadores ácidos (figura 2).

El uso de materia prima de baja calidad ayuda a disminuir el costo asociado a materia prima. Un ejemplo de este tipo de materia prima es el aceite de reúso, el cual presenta un alto contenido de ácidos grasos libres (>6%) y agua. Se ha determinado que para obtener buenos rendimientos en la reacción de transesterificación es necesario que la materia prima cuente con un porcentaje menor de 1% de ácidos grasos libres [3]. Una de las principales dificultades al trabajar con este tipo de materias primas es que al sintetizar el biodiésel a través de la

transesterificación, los catalizadores alcalinos experimentan fácilmente una reacción de saponificación que conducen a la formación de jabones, lo cual afecta directamente al rendimiento del biodiésel.

El biodiesel tiene ventajas considerables respecto al diésel fósil, por ejemplo, es biodegradable, no tóxico, originado de recursos renovables, al no contener sulfuros o aromáticos, disminuye las emisiones de contaminantes [4]. Las propiedades del biodiesel son muy parecidas al diésel fósil [5], por lo tanto, no se requiere de alguna modificación en las máquinas o motores que funcionen con diésel si están contruidos mediante la regularización estándar.

El objetivo del siguiente trabajo es proponer un diseño para la producción de biodiésel a partir de aceites de reúso, procurando obtener altos rendimientos del biodiésel. El diseño propuesto debe ser factible económicamente, es decir, el costo del proceso para producir biodiésel debe ser lo suficientemente bajo para obtener un precio de biodiésel competente respecto al diésel fósil.

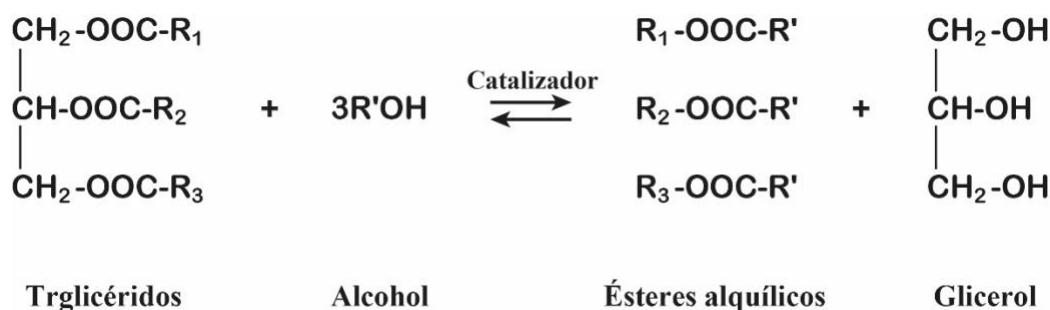


Figura 8. Reacción de transesterificación.



Figura 9. Reacción de esterificación.

Metodología

En la figura 3 se muestra el diagrama del proceso propuesto en este trabajo. Se utilizó el software comercial Aspen Plus v8.8 para la simulación del diseño y para el análisis de los costos. Se emplea el uso del modelo termodinámico NRTL para la mayoría de las etapas del proceso, utilizando UNIFAC solo para las etapas de separación de fases [9].

En las etapas reactivas se determinó la temperatura de reacción y el tiempo de residencia, las cuales son variables importantes para la conversión de los ácidos grasos libres y triglicéridos hacia biodiésel en la esterificación y transesterificación respectivamente.

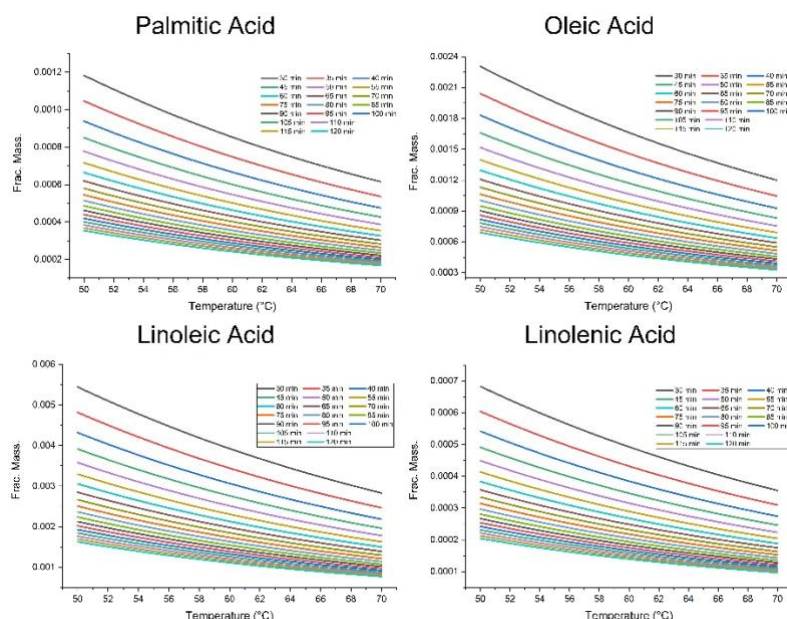


Figura 11. Concentración de ácidos grasos libres en relación de la temperatura y tiempo de residencia.

En el caso del reactor de transesterificación, se determinó que la temperatura de reacción favorece la conversión de los triglicéridos a biodiésel. En la figura 5 se observa que mientras la temperatura de reacción se incrementa la concentración de los etil ésteres se ve favorecida de manera proporcional. De igual manera, a mayor tiempo de residencia en el reactor, mayor es la concentración de los etil ésteres, sin embargo, a partir de 70 minutos de operación, el incremento en la concentración de los etil ésteres va disminuyendo. Por lo tanto, se consideraron 70 minutos de operación del reactor de transesterificación para obtener la mayor cantidad de conversión posible sin incrementar tanto los costos de operación, coincidiendo en cierta medida con lo reportado en la literatura [6,7].

Considerando el mismo criterio de que el alcohol se evapora cuando se opera a temperaturas superiores a su punto de ebullición, la temperatura de reacción seleccionada para este reactor de igual manera fue de 70 °C con el fin de tener el control de la temperatura en el reactor.

Con base en lo anterior, se ha determinado que operar el reactor de esterificación a presión atmosférica y a una temperatura de 70 °C durante un tiempo de 60 minutos, nos garantiza una conversión de ácidos grasos libres a biodiésel del 95%. Esta conversión también nos garantiza la disminución de los ácidos grasos al 0.35% en la mezcla. Así mismo, para el reactor de transesterificación se determinó que, para las mismas condiciones operacionales incluyendo el tiempo de operación del reactor, se obtiene una conversión global del 99.7% de los triglicéridos alimentados al proceso. La conversión obtenida con estas condiciones de operación es ligeramente mayor a lo que reportan algunos autores [7,8].

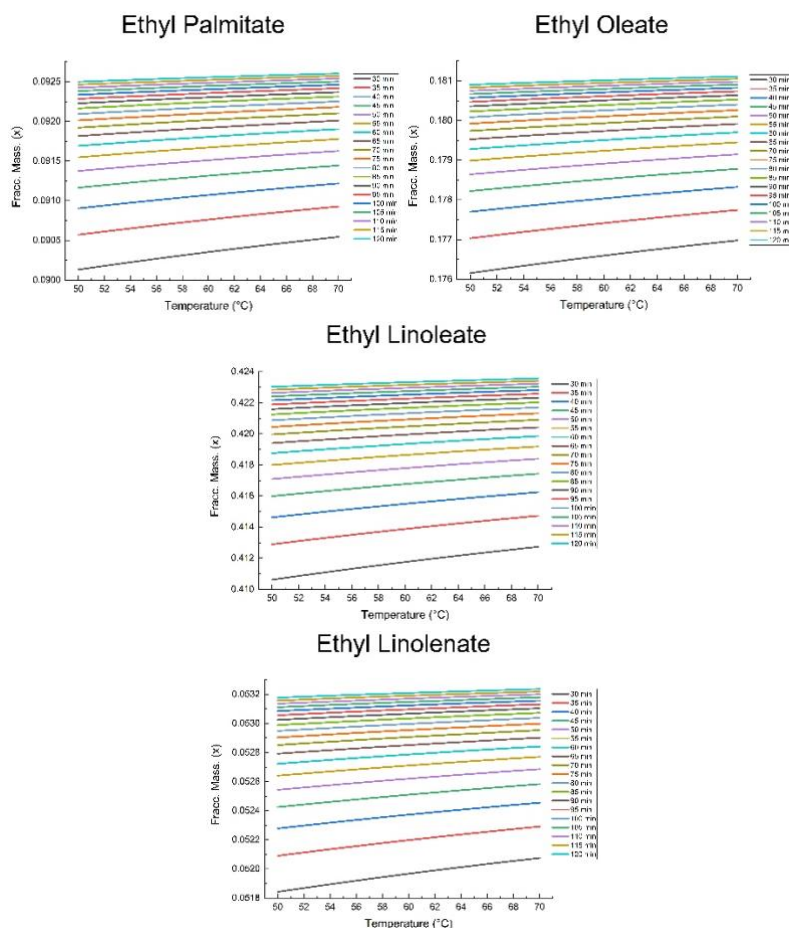


Figura 12. Concentración de etil ésteres en relación de la temperatura y tiempo de residencia.

Se consideran en este trabajo 340 días de operación al año en la planta de producción de biodiésel; es decir, 3140 horas de operación [9,10]. El costo de los equipos del proceso es de \$721,200 USD, sin embargo, considerando los factores que recomiendan autores como Turton y col. [11] para incluir otros costos asociados al proceso, se estimó el costo de los equipos como \$1,940,028 USD.

El costo anualizado de los equipos es de 194,002.8 USD/año.

En el proceso propuesto por Lisboa y colaboradores [10] producen 8,000 toneladas de biodiésel a partir de aceite de reúso, y el costo de los equipos es equivalente a \$6,667,691.68 USD, el cual es un costo mucho mayor a pesar de tener una producción de biodiésel menor. Por otra parte, Avinash y col [8] reportan el costo de los equipos para su proceso de \$21,920,165.14 para una producción de casi 40,000 toneladas anuales a partir de aceite de reúso, igualmente el costo del proceso propuesto en este trabajo es mucho menor ya considerando la producción menor de biodiésel con la que se cuenta.

El costo de operación del proceso propuesto es de \$643,462.22 USD/año. A partir de esta información se estima que el proceso tiene un costo de \$837,553.83 USD/año. Considerando los costos de las materias primas y el precio de los productos y subproductos que involucra

el proceso se tiene una ganancia que asciende los \$30,000,000 USD/año. Lo anterior considerando el precio de biodiésel de \$0.75 UDS/L propuesto por la Secretaría de Energía mexicana al año del 2017 y los costos de materia prima y productos a fecha de agosto del 2020.

Conclusiones

Se ha demostrado que es posible convertir materia prima de baja calidad, considerada como desecho y contaminante, tal es el aceite de reúso, en una fuente de energía renovable como lo es el biodiésel. Para trabajar con una materia prima con esta calidad se demostró que es necesario una etapa de pretratamiento para obtener altas cantidades de conversión de biodiésel. Quedó demostrado que el etanol resulta ser buena alternativa en las etapas reactivas, sustituyendo al metanol, logrando obtener alta conversión de biodiésel en tiempos de reacción similares. El biodiésel obtenido cumple en gran medida con las especificaciones necesarias para ser considerado como buen sustituto del diésel. El proceso cuenta con un rendimiento económico favorable y proporciona cierto margen a convertir al biodiésel como un producto competitivo económicamente contra el diésel fósil.

Bibliografía

- [1] Apita, Aldo. (2011). Transesterification Reaction Kinetics of Jatropha Oil for Biodiesel Production, 221-227.
- [2] Alenezi, R., Leeke, G. A., Winterbottom, J. M., Santos, R. C. D., & Khan, A. R. (2010). Esterification kinetics of free fatty acids with supercritical methanol for biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 51(5), 1055–1059.
- [3] Rani, K. N. P., Kumar, T. P., Neeharika, T. S. V. R., Satyavathi, B., & Prasad, R. B. N. (2013). Kinetic studies on the esterification of free fatty acids in jatropha oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(6), 691–697.
- [4] Abd Rabu, R., Janajreh, I., & Honnery, D. (2013). Transesterification of waste cooking oil: Process optimization and conversion rate evaluation. *Energy Conversion and Management*, 65, 764–769.
- [5] Gomez-Castro, F. I., Rico-Ramirez, V., Segovia-Hernandez, J. G., Hernandez-Castro, S., & El-Halwagi, M. M. (2013). Simulation study on biodiesel production by reactive distillation with methanol at high pressure and temperature: Impact on costs and pollutant emissions. *Computers and Chemical Engineering*, 52, 204–215.
- [6] Lu, H., Liu, Y., Zhou, H., Yang, Y., Chen, M., & Liang, B. (2009). Production of biodiesel from Jatropha curcas L. oil. *Computers and Chemical Engineering*, 33(5), 1091–1096.
- [7] Lozada, Ricardo & Jiménez, Jorge. (2009). Transesterificación alcalí-catalizada del aceite de higuera. *Investigaciones Aplicadas*, ISSN 2011-0413, Vol. 3, pags. 1-10.
- [8] Avinash, A., & Murugesan, A. (2017). Economic analysis of biodiesel production from waste cooking oil. *Energy Sources, Part B: Economics, Planning and Policy*, 12(10), 890–894.
- [9] El-Galad, M. I., El-Khatib, K. M., & Zaher, F. A. (2015). Economic feasibility study of biodiesel production by direct esterification of fatty acids from the oil and soap industrial sector. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24(4), 455–460.
- [10] Lisboa, P., Rodrigues, A. R., Martín, J. L., Simões, P., Barreiros, S., & Paiva, A. (2014). Economic analysis of a plant for biodiesel production from waste cooking oil via enzymatic transesterification using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 85, 31–40.

[11] Turton, R., C. Bailie, R., B. Whiting, W., & A. Shaeiwitz, J. (2009). Analysis, Synthesis and Design of Chemical Processes (Third Edit). Prentice Hall.

EL c-di-AMP EN LA REPARACIÓN DEL ADN Y LA MUTAGÉNESIS DE *Bacillus subtilis*

Karen Abundiz Yáñez^a, Hilda Cecilia Leyva Sánchez^a, Mario Pedraza Reyes^a

^a Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Noria Alta, Guanajuato, Guanajuato, 36050, MÉXICO.

Resumen

Todas las células vivas deben monitorear su medio ambiente y contar con las vías apropiadas para ejecutar una respuesta, esta interacción célula-medio ambiente permite la adaptación en ecosistemas altamente competitivos y constituye uno de los pilares de la vida. Los nucleótidos de señalización son una de las estrategias que los microorganismos han desarrollado para interactuar y responder a los estímulos del medio ambiente, uno de ellos es el c-di-AMP, que en algunas bacterias como *Bacillus subtilis*, impacta en la supervivencia. El genoma de *B. subtilis* posee los genes *disA*, *cdaA* y *cdaS* que codifican para sintetasas de c-di-AMP (DACs), las cuales se expresan en distintas etapas de su ciclo de vida. Estudios previos han reportado una relación entre los niveles de c-di-AMP y la viabilidad celular ante agentes que dañan al ADN. Para investigar un posible papel del c-di-AMP en los eventos de mutagénesis, en este estudio se utilizaron enfoques moleculares para la obtención de cepas de *B. subtilis* YB955 deficientes en los genes *disA* y/o *cdaA*. Utilizando estas mutantes se encontró que DisA y CdaA participan en la modulación de la mutagénesis espontánea e inducida por agentes genotóxicos durante el crecimiento de *B. subtilis*.

Palabras clave: *B. subtilis*; YB955; Diadenilato Ciclasa; c-di-AMP, Mutagénesis

Introducción

La capacidad de interactuar con su medio ambiente y responder a sus estímulos es una característica de todas las células vivas. [1]. Al detectar condiciones inapropiadas para su crecimiento, *B. subtilis* activa una diversidad de respuestas como la esporulación, la respuesta general al estrés, la competencia celular y la mutagénesis asociada al estrés [2].

Los nucleótidos de señalización son moléculas que contribuyen a la regulación de las vías celulares tanto en procariotas como en células eucariotas [3]. Muchas bacterias sintetizan dinucleótidos cíclicos como el c-di-GMP y el c-di-AMP, involucrados en procesos celulares complejos [4]. El c-di-AMP ha sido asociado al crecimiento celular, la supervivencia y la regulación de la virulencia en los microorganismos [5], es producido por las Diadenilato Ciclasas (DAC), una función descrita por primera vez en la proteína DisA de *B. subtilis* [6]. DisA produce c-di-AMP en respuesta a la integridad del ADN, puede interactuar con diversas proteínas de reparación del ADN y de recombinación y es requerida para garantizar que las esporas estén libres de daño al material genético antes de su germinación-eclosión en el regreso a la vida vegetativa [7].

Además de DisA, el genoma de *B. subtilis* codifica para otra DAC de la fase vegetativa denominada CdaA, implicada en el metabolismo de la pared celular y la división celular, así

como en el control del metabolismo central y la homeostasis del potasio [1]. CdaA es la única DAC con la que cuentan algunos patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Una tercera DAC, CdaS, específica de esporulación y requerida para una germinación eficiente de la espora, ha sido descrita en *B. subtilis* [1].

Se ha reportado que DisA y los niveles de c-di-AMP influyen en la supervivencia celular ante diversos factores que dañan al ADN durante la fase de crecimiento de *B. subtilis* [8]. Además, se reportó que, en cepas sometidas a estrés nutricional, las proteínas relacionadas con la síntesis, degradación e interacción con el c-di-AMP se encontraron desreguladas [2]. Con el propósito de investigar una posible participación del c-di-AMP y las DAC en la modulación de los procesos mutagénicos, tanto espontáneos como en presencia de agentes que dañan al ADN, en el presente estudio se generó una colección de cepas mutantes en los genes *disA*, *cdaA*, y *disA cdaA* y se usaron para realizar ensayos de mutagénesis espontánea e inducida por los agentes de daño Peróxido de Hidrógeno y Mitomicina-C (M-C). Se utilizó el fondo genético *B. subtilis* YB955 con la finalidad de realizar posteriormente ensayos de mutagénesis asociada al estrés (SAM) [9].

Metodología

Tabla 1. Cepas empleadas en este estudio

Cepa	Genotipo o descripción	Referencia
<i>Bacillus subtilis</i>		
YB955	<i>B. subtilis</i> <i>hisC952 metB5 leuC427 xin-1 sp_SENS</i> .	Sung y Yasbin (2002) [9]
PERM1647	YB955 Δ <i>disA</i> . Em ^R .	Este estudio
PERM1665	YB955 Δ <i>cdaA</i> / Δ <i>disA</i> . Em ^R Cm ^R .	Este estudio
PERM1687	YB955 Δ <i>cdaA</i> . Cm ^R .	Este estudio
PERM1729	YB955 Δ <i>disA::Phs-disA</i> . Em ^R Spc ^R .	Este estudio
PERM1730	YB955 Δ <i>cdaA</i> / Δ <i>disA::Phs-disA</i> . Em ^R Cm ^R Spc ^R .	Este estudio

Obtención de cepas

El ADN genómico aislado de la cepa YB955 de *B. subtilis* se usó como molde para la amplificación *in vitro* de fragmentos internos del marco de lectura abierto de los genes *cdaA* y *disA* mediante PCR, los cuales se insertaron en el vector integrativo pMutin4-cat para la obtención de las mutantes sencillas Δ *disA* y Δ *cdaA*, en el fondo genético *B. subtilis* YB955. Se seleccionaron las transformantes por resistencia a Eritromicina o Cloranfenicol, respectivamente.

Para la obtención de la doble mutante Δ *disA cdaA*, se prepararon células competentes de la cepa *B. subtilis* Δ *disA*, previamente obtenida y se transformaron con el plásmido que contenía el fragmento de *cdaA*. Las colonias transformantes se seleccionaron en placas suplementadas con Eritromicina y Cloranfenicol.

Para la obtención de las reintegrantes, se amplificó el marco de lectura abierto del gen *disA* y se insertó en el locus *amyE* de las mutantes Δ *disA* y Δ *cdaA* Δ *disA* usando el vector pDR111. Todas las mutantes y reintegrantes fueron corroboradas a nivel molecular por PCR.

Ensayos de frecuencia de mutación espontánea e inducida por H₂O₂ y M-C por resistencia a Rifampicina

Las cepas de interés se inocularon en medio A3 y se incubaron a 37 °C en agitación constante durante el tiempo necesario para llegar a una D.O._{600nm} de 0.5; en este punto, para los ensayos de mutagénesis inducida, el cultivo se dividió en dos subcultivos. Uno de los subcultivos fue usado como control y el otro fue suplementado con la concentración de H₂O₂ o Mitomicina-C (M-C) necesaria para obtener una DL₂₅. Los cultivos fueron incubados a 37 °C con agitación constante durante 12 h adicionales. Posteriormente, las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron con Sales Spizzen 1X y se resuspendieron en un volumen final de 1 mL de dicha solución. Se sembraron alícuotas de 100 µL en seis placas de medio LB suplementadas con Rif (10 µg/mL) las cuales fueron incubadas a 37°C y las colonias resistentes al antibiótico se contaron después de 24 h. La cantidad de células en el cultivo bacteriano se determinó mediante dilución seriada y cuenta viable en placas de medio LB. La frecuencia de mutación se reportó, para cada experimento, como el promedio de colonias Rif^r por 10⁹ células viables. Estos experimentos se repitieron al menos tres veces para cada cepa y dos veces para las reintegrantes.

Análisis Estadísticos

Se realizó un análisis estadístico usando el software Minitab19. Los datos siguieron una distribución paramétrica, por lo cual se realizó un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 95% (p<0.05).

Resultados

Con el fin de investigar un posible papel de CdaA y DisA en la mutagénesis asociada al crecimiento de *B. subtilis*, se realizaron ensayos de frecuencia de mutación espontánea mediante la selección de colonias resistentes a rifampicina en las mutantes $\Delta disA$, $\Delta cdaA$ y $\Delta cdaA\Delta disA$, en las reintegrantes $\Delta disA::Phs-disA$ y $\Delta cdaA\Delta disA::Phs-disA$ y en la cepa parental YB955. Como se muestra en la **Fig. 1** con respecto a la cepa parental, la pérdida de DisA no incrementó de manera significativa la frecuencia de mutación espontánea de *B. subtilis*; sin embargo, la ausencia de CdaA, o de ambas DACs incrementaron significativamente la mutagénesis espontánea en esta bacteria. La complementación con DisA en los fondos genéticos $\Delta cdaA$ y $\Delta cdaA\Delta disA$ reestableció la frecuencia de mutagénesis a los niveles de la cepa parental y la mutante deficiente en CdaA, respectivamente. Estos resultados sugieren un papel de las DACs estudiadas aquí, particularmente de CdaA, en prevenir eventos mutagénicos durante el crecimiento de *B. subtilis*.

Para investigar el tipo de lesiones genéticas que activan la función de DisA y/o CdaA en células crecimiento de *B. subtilis*, las cepas YB955 (parental), así como las mutantes $\Delta disA$, $\Delta cdaA$ y $\Delta cdaA\Delta disA$ y las reintegrantes $\Delta disA::Phs-disA$ y $\Delta cdaA\Delta disA::Phs-disA$ fueron tratadas con una DL₂₅ de H₂O₂ durante 12 h. Como se muestra en la **Fig. 2**, el agente oxidante

incrementó la mutagénesis de la cepa deficiente en DisA, respecto a la cepa parental YB955. Interesantemente, en referencia a la cepa YB955, la presencia de H₂O₂ indujo una disminución significativa en la frecuencia de mutación Rif^r de la cepa $\Delta cdaA$; adicionalmente, no se observó un incremento significativo en la mutagénesis inducida por H₂O₂ en la doble mutante $\Delta cdaA\Delta disA$, respecto a la mutante sencilla en *disA*. La reintegración de *disA* restableció, al nivel de la cepa parental YB955, los valores de frecuencia de mutación inducida por H₂O₂ tanto en la cepa $\Delta disA$ como en la mutante $\Delta disA\Delta cdaA$. Estos resultados sugieren la participación de DisA en prevenir y de CdaA en promover efectos mutagénicos en presencia del agente oxidante H₂O₂, durante el crecimiento de *B. subtilis*.

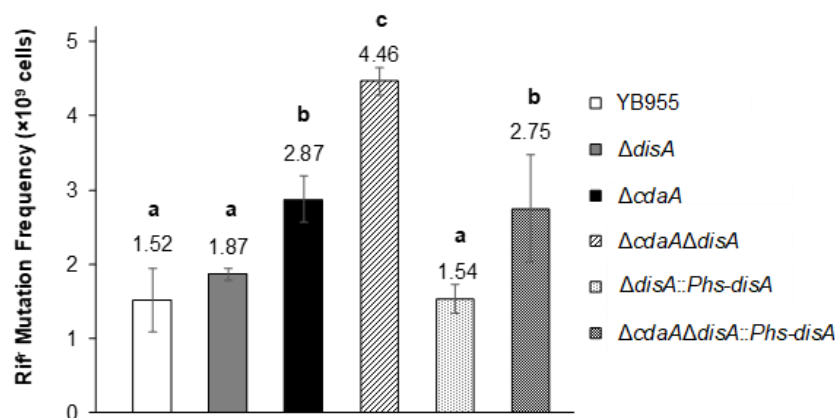


Fig 1. Frecuencia de mutación espontánea a rifampicina de diferentes cepas de *B. subtilis*. Cada barra representa el promedio de los datos obtenidos de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado para cada cepa. Las barras de error representan el error estándar de la media. Las letras a, b y c indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas, las cuales se determinaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 95% ($P < 0.05$).

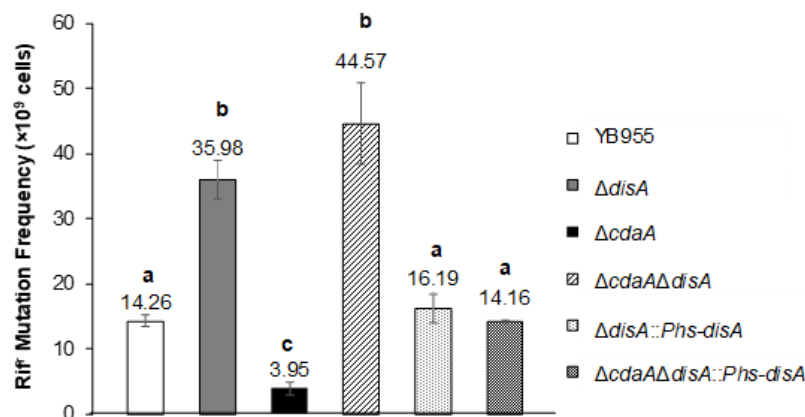


Fig. 2. Frecuencia de mutación a rifampicina inducida por H₂O₂ de diferentes cepas de *B. subtilis*. Cada barra representa el promedio de los datos obtenidos de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado para cada cepa. Las barras de error representan el error estándar de la media. Las letras a, b y c indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas, las cuales se determinaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 95% ($P < 0.05$).

c indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas, las cuales se determinaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 95% ($P < 0.05$).

A continuación, se investigó si la M-C, un agente alquilante capaz de interferir con la replicación y activar la respuesta SOS en *B. subtilis*, afecta la mutagénesis en las cepas construidas en este estudio. Como se observa en la **Fig. 3**, el tratamiento con M-C indujo un marginal, pero significativo incremento en los niveles de mutagénesis de la mutante sencilla en *cdaA*, respecto a la cepa YB955, mientras que el agente alquilante no afectó los niveles de mutagénesis de la mutante sencilla *disA*. Sin embargo, en referencia a la cepa parental YB955, la inactivación de ambos genes condujo a un incremento mayor en la mutagénesis inducida por M-C. La inducción de *disA* desde el promotor *Phs* fue capaz de restaurar los niveles de mutagénesis inducida por M-C de las cepas deficientes en *disA* o ambos genes a los valores calculados para la cepa parental YB955. En conjunto estos resultados sugieren el requerimiento de al menos una DAC para contrarrestar la mutagénesis inducida por agentes activadores de la respuesta SOS como la M-C, durante el crecimiento de *B. subtilis*.

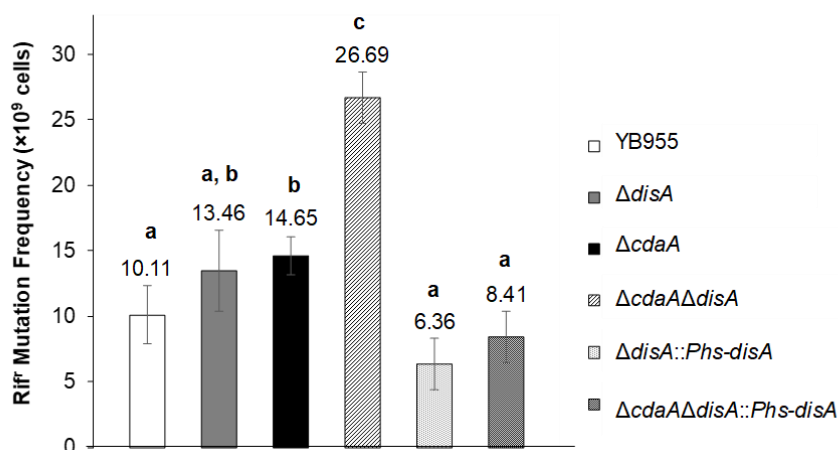


Fig. 3. Frecuencia de mutación a rifampicina inducida por M-C de diferentes cepas de *B. subtilis*. Cada barra representa el promedio de los datos obtenidos de tres experimentos independientes realizados por sextuplicado para cada cepa. Las barras de error representan el error estándar de la media. Las letras a, b y c indican diferencias estadísticamente significativas entre las cepas, las cuales se determinaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey, con un nivel de significancia de 95% ($P < 0.05$).

Conclusiones

CdaA y DisA, a través de los niveles de c-di-AMP, tienen un papel en contrarrestar las mutaciones espontáneas en células en crecimiento de *B. subtilis* y las mutaciones voluminosas inducidas por el agente de daño Mitomicina-C. Interesantemente, ante la presencia del agente oxidante H_2O_2 , su ausencia tuvo efectos contrapuestos, donde CdaA favorece las mutaciones inducidas por el peróxido, mientras que DisA previene su aparición.

Agradecimientos

Trabajo financiado por CONACyT (Subsidio A1-S-27116) y la UG (Subsidio CIIC 228/2019 y 178/2020). KAY, agradece la beca otorgada por CONACyT para la realización de este trabajo.

Bibliografía

- [1] Gundlach, J., Dickmanns, A., Schröder-Tittmann, K., Neumann, P., Kaesler, J., Kampf, J., Herzberg, C., Schwede, F., Kaever, V., Tittmann, K., Stülke, J. & Ficner, R. (2015). Identification, Characterization, and Structure Analysis of the Cyclic di-AMP-binding PII-like Signal Transduction Protein DarA. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(5), pp. 3069-3080. doi: 10.1074/jbc.M114.619619
- [2] Castro-Cerritos, K. V., López-Torrez, A., Obregón-Herrera, A., Wrobel, K., Wrobel, K. & Pedraza-Reyes, M. (2017). LC-MS/MS proteomic analysis of starved *Bacillus subtilis* cells overexpressing ribonucleotide reductase (*nrdEF*): implications in stress-associated mutagenesis. *Current Genetics*, 64(1), pp.215-222. doi: 10.1007/s00294-017-0722-7
- [3] Corrigan, R. M. & Gründling, A. (2013). Cyclic-di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nature reviews. Microbiology*, 11(8), pp. 513-524. doi: 10.1038/nrmicro3069
- [4] Mehne, F. M. P., Gunka, K., Eilers, H., Herzberg, C., Kaever, V. & Stülke, J. (2012). Cyclic Di-AMP Homeostasis in *Bacillus subtilis*: Both lack and high-level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(3), pp. 2004-2017. doi: 10.1074/jbc.M112.395491
- [5] Fahmi, T., Port, G. C. & Cho, K. H. (2017). c-di-AMP: An Essential Molecule in the Signaling Pathways that Regulate the Viability and Virulence of Gram-Positive Bacteria. *Genes*, 8(8), pp. E197. doi: 10.3390/genes8080197
- [6] Witte, G., Hartung, S., Büttner, K. & Hopfner, K.P. (2008). Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Molecular cell*, 30(2), pp. 167-178. doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.020
- [7] Campos, S. S., Ibarra-Rodríguez, J. R., Barajas-Ornelas, R. C., Ramírez-Guardiana, F. H., Obregón-Herrera, A., Setlow, P. & Pedraza-Reyes, M. (2014). Interaction of Apurinic/Apyrimidinic Endonucleases Nfo and ExoA with the DNA Integrity Scanning Protein DisA in the Processing of Oxidative DNA Damage during *Bacillus subtilis* Spore Outgrowth. *Journal of Bacteriology*, 196(3), pp. 568. doi: 10.1128/JB.01259-13
- [8] Gándara C. y Alonso J.C. (2015). DisA and c-di-AMP act at the intersection between DNA-damage response and stress homeostasis in exponentially growing *Bacillus subtilis* cells. *DNA Repair*. 27:1-8.
- [9] Sung, H. M. & Yasbin, R. E. (2002). Adaptive, or Stationary-Phase, Mutagenesis, a Component of Bacterial Differentiation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184(20), pp. 5641-5653. doi: 10.1128/JB.184.20.5641-5653.2002
- [10] Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (3rd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

ELUCIDACIÓN DE LAS PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LA OXIDORREDUCTASA YhdA de *Bacillus subtilis*

Luz I. Valenzuela-García¹, Blanca L. Zapata¹, Norma Ramírez-Ramírez¹, Juan P. Huchín-Mian¹, Victor M. Ayala-García², Mario Pedraza-Reyes¹

Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, N. Alta S/N. Guanajuato, Gto, CP. 36050, MÉXICO.

Resumen

El gen *yhdA* de *Bacillus subtilis* codifica para una proteína que pertenece a un grupo de enzimas denominado “Flavin Mononucleótido Oxido Reductasas dependientes de NADPH” (FMN: NADPH), estas reducen el Cr(VI) a Cr(III), sin generar subproductos parcialmente reducidos que son citotóxicos y genotóxicos. En un estudio previo se observó que la sobreexpresión de *yhdA* aumentó la resistencia de *B. subtilis* a los efectos nocivos del cromato y mejoró su capacidad para reducir este ion. En el presente estudio se obtuvo y purificó a homogeneidad una proteína recombinante His₁₀-YhdA, la cual logró reducir el Cr (VI) al 80%, además, se encontró que las condiciones óptimas para la reducción de este ion ocurrieron a una temperatura de 35°C y un pH de 7.0.

Palabras clave: Cromato, Oxidorreductasa, Cromato reductasa, *Bacillus*

Introducción

La actividad antropogénica ha convertido al cromo (Cr), un elemento presente de manera natural en rocas, suelos, plantas y animales, en un contaminante ambiental [1]. El Cr(VI) existe en forma de oxianiones solubles en agua (CrO_4^{2-}) o en forma de dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). El cromato es altamente tóxico, mutagénico y cancerígeno para los organismos debido a su capacidad de atravesar las membranas celulares a través de transportadores de sulfato como consecuencia de su analogía estructural molecular con el ion sulfato (SO_4^{2-}) [2] de lo contrario, el Cr(III) forma compuestos menos solubles a pH fisiológico, como hidróxido u óxido hidratado [3]. Como consecuencia de su amplio uso, el cromo está presente en los efluentes originados de las diferentes industrias y representa un contaminante grave del suelo, el agua y el aire; constituyendo un riesgo toxicológico para los seres humanos, los animales y plantas [4]. Para contender con los efectos tóxicos de Cr, los microorganismos cuentan con diversos mecanismos, incluida la reducción de Cr(VI) por enzimas específicas o inespecíficas, reparación de daños en el ADN, actividades de desintoxicación y expulsión de iones cromato desde el citoplasma de la célula [1]. Resultados de estudios *in vitro* han demostrado que Cr(VI) promueve una amplia variedad de lesiones de ADN, 7,8-dihidro-8-oxodeoxiguanosina (8-oxo-G), roturas de filamentos, sitios apurínicos/apirimidínicos (AP), y aductos de cromo-ADN, entre otras modificaciones [5]. Las especies reactivas de oxígeno

atacan al ADN ocasionando distintas lesiones en esta biomolécula, incluyendo un amplio rango de bases oxidadas entre las que destaca la altamente mutagénica guanina oxidada (8-oxo-G) [6,7,8]. Para contrarrestar los efectos mutagénicos de esta lesión, los microorganismos cuentan con un sistema de prevención y reparación-eliminación denominado sistema de la guanina oxidada GO [9,10,11]. Un estudio reciente mostró que el sistema GO protege a *B. subtilis* de los efectos citotóxicos y genotóxicos promovidos por el cromato [13]. *B. subtilis* presenta una respuesta adaptativa al ion cromato [13]. Un análisis bioinformático mostró que YhdA, una NADPH (FMN) oxidoreductasa con actividad azoreductasa, posee un 60% de homología con las proteínas YieF y ChrR de *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*, respectivamente capaces de reducir el cromato. En el presente estudio se investigaron las propiedades bioquímicas de la proteína recombinante His₁₀-YhdA purificada a homogeneidad, durante la reducción de cromato.

Metodología

Para la purificación de la proteína His₁₀-YhdA se inoculó un cultivo de 250 mL de medio LB suplementado con Amp y Cm con la cepa *E. coli* PERM1562, el cual se propagó hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5. En este punto se agregó IPTG (0.5 mM) y se continuó la incubación por 2 h bajo las condiciones descritas. El cultivo se centrifugó a 4000 x *g* y posteriormente las células se resuspendieron en buffer Tris-HCl 100 mM conteniendo NaCl 300 mM, a un pH 7.5 (Buffer A). A continuación, las células se rompieron por sonicación. El lisado celular se centrifugó a 4000 x *g*, 4°C, durante 15 min y el sobrenadante se pasó a través de una columna de Ni-NTA (QIAGEN, Valencia, CA) previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 100 mM. La columna se lavó con tres volúmenes de buffer Tris-HCl 100 mM conteniendo 20 mM de imidazol. Finalmente, la proteína His₁₀-YhdA se eluyó con buffer Tris-HCl 100 mM conteniendo 150 mM de imidazol. Durante el último paso se colectaron fracciones de 1 mL, las cuales se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

La actividad de Cromato-reductasa se llevó a cabo a una temperatura de 30°C por 30 min en una mezcla de reacción de 100 µl que contenía regulador Tris-HCl 100 mM, 30 µg de proteína total, Cr(VI) 200 ppm. La concentración de Cr(VI) fue determinada por el método de S-difenilcarbazida [13].

Resultados

Purificación de la proteína recombinante His₁₀-YhdA

La proteína His₁₀-YhdA presente en la fracción soluble de la cepa *E. coli* PERM1562 se sujetó a purificación por cromatografía de afinidad metálica en una columna de Ni-NTA agarosa, siguiendo la estrategia descrita en la Metodología. De esta manera, se recuperó una proteína altamente purificada de ~19 kDa, tal y como lo muestra el análisis electroforético efectuado en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes el cual se observa en la Figura 1.

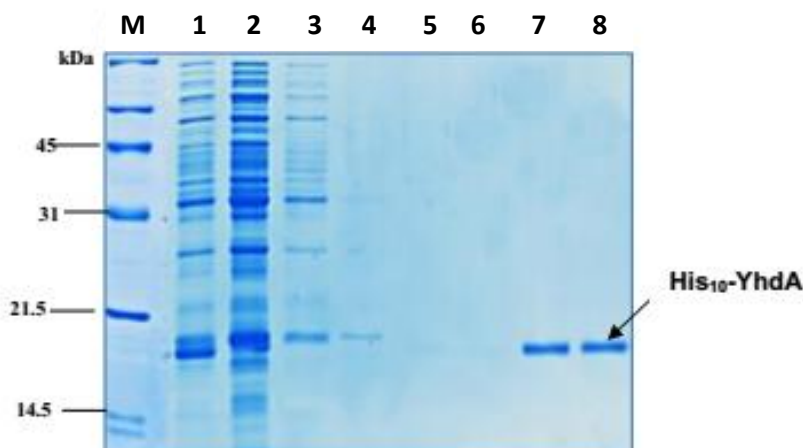


Figura 1. Análisis mediante SDS-PAGE de la purificación de la proteína His₁₀-YhdA por cromatografía de afinidad metálica en una columna de Ni-NTA-Agarosa. Los extractos libres de células de un cultivo inducido con IPTG de la cepa *E. coli* PERM1562 se purificaron en una columna de Ni-NTA agarosa. M, marcadores de peso molecular; Carril 1, extracto celular soluble; Carril 2, fracción de proteínas no unidas a la columna; Carriles 3-5, fracciones de lavado con 20 mM de imidazol; Carriles 6-8, proteína His₁₀-YhdA eluída con 150 mM de imidazol.

Determinación de propiedades bioquímicas de His₁₀-YhdA durante la reducción de Cr(VI)

Utilizando la proteína His₁₀-YhdA purificada, se determinó su capacidad de catalizar la reducción de 50 ppm de cromato, en presencia de 10 mM de NADPH a 30°C. Bajo estas condiciones, His₁₀-YhdA mostró una actividad específica de 371 ± 2.91 mg de Cr(VI) reducido/min/mg de proteína. Adicionalmente, se determinaron las condiciones óptimas de pH y temperatura en las que YhdA cataliza la reducción de cromato. Para tal fin, se realizaron reacciones independientes de reducción en las que se utilizó el cromato a una concentración final de 250 ppm con 10 mM de NADPH a diferentes temperaturas y pH. Se encontró que His₁₀-YhdA fue más eficiente en la reducción de cromo hexavalente a 30°C y a un pH de 7.5.

Conclusiones

Se generó mediante enfoques moleculares una cepa de *E. coli* capaz de reproducir a la enzima His₁₀-YhdA. La enzima purificada a homogeneidad mostró capacidad de reducción de cromato y propiedades bioquímicas apropiadas para su aplicación en la bioremediación de efluentes contaminados con altas concentraciones de cromato.

Agradecimientos

Trabajo financiado por CONACyT (Subsidio A1-S-27116) y la UG (Subsidio CIIC 228/2019 y 178/2020). BLZM, agradece la beca otorgada por CONACyT para la realización de este trabajo.

Bibliografía

- [1] Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol Rev* 25: 335-347.
- [2] Pardee AB, Prestidge LS, Whipple MB, Dreyfuss J. (1966). A binding site for sulfate and its relation to sulfate transport into *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem.* 241: 3962-3969.
- [3] Ehrlich, HL. (2002). How microbes mobilize metals in ores: A review of current understandings and proposals for further research. *Miner Metallurg Process* 19: 220-224.
- [4] Barceloux, DG., Barceloux, D. (1999). Cobalt. *Journal of Toxicology: Clin Toxicol.* 37: 201-216.
- [5] Oi W, Reiter R, Tan D, Garcia J, Manchester L, Karbownik M, Calvo J. 2000. Chromium (III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. *Environ Health Perspect* 108: 399-402
- [6] Wood ML, Dizdaroglu M, Gajewski E, Essigmann JM. (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochem.* 29: 702-703.
- [7] Shibutani S., Takeshita M, Grollman AP. (1991). Insertion of specific bases during ADN synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349: 431-434.
- [8] Croteau DL., Bhor VA. (1997). Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial ADN in mammalian cells. *J Biol Chem* 272: 25409-12.
- [9] Lu AL, Li X, Gu Y, Wright PM & Chang DY. (2001). Repair of Oxidative ADN Damage: Mechanisms and Functions. *Cell Biochem Biophys.* 35: 141-170.
- [10] Oliver A, Sánchez J.M, Blázquez J. (2002). Characterization of the GO system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 217: 31-35.
- [11] Tsuzuki T, Nakatsu Y. Nakabeppu Y. (2007). Significance of error-avoiding mechanisms for oxidative ADN damage in carcinogenesis. *Cancer Sci.* 98: 465-470.
- [12] Michaels ML, Miller J.H. (1992). The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-Hydroxyguanine (7, 8-Dihydro-8-Oxoguanine). *J Bacteriol* 174: 621-6325.
- [13] Santos-Escobar F, Gutiérrez-Corona F and Pedraza-Reyes M. (2014). Role of *Bacillus subtilis* Error Prevention Oxidized Guanine System (GO) in Counteracting Hexavalent Chromium-Promoted-Oxidative DNA Damage. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 59435502.

ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN DE RH(III) POR MEDIO DE SISTEMAS ACUOSOS BIFÁSICOS

Diana Laura Navarro Segura^a, Mario Ávila Rodríguez^a

^a Departamento de Química, Universidad de Guanajuato, Cerro de la Venada S/N, Guanajuato, Guanajuato, 36040, MÉXICO.

Resumen

La recuperación de Rh(III) a partir de desechos se ha estudiado utilizando diferentes métodos de separación, como precipitación, extracción líquido-líquido, extracción líquido-sólido (intercambio iónico). Muchos de esos sistemas no son realmente muy eficientes y la cinética de la extracción de Rh(III) es muy lenta. En este trabajo, proponemos el uso de dos fases no miscibles ricas en agua (una de ellas compuesta por una alta concentración de sulfato de sodio y la otra fase compuesta por polietilenglicol (PEG)) para realizar la recuperación de Rh(III). Con el objetivo de encontrar las mejores condiciones de extracción, se evaluaron varias concentraciones de sulfato de sodio y PEG, en función del tiempo y a diferentes temperaturas. Los resultados obtenidos muestran que es posible realizar la extracción de Rh(III) cercanas al 60% a pH ácido en un sistema acuoso bifásico (ATPS, por sus siglas en inglés) compuesto por un 25% p/p de sulfato de sodio y un 35% p/p de PEG-1000. Es importante destacar que la velocidad de transferencia de masa de Rh(III) al PEG es muy rápida porque, es posible transferir entre 40 y 45% de Rh (III), en solo 2 minutos de contacto de las fases.

Palabras clave: *Sistemas acuosos bifásicos, Rodio, Extracción Líquido-Líquido, Polietilenglicol*

Introducción

Los metales preciosos como el oro (Au), la plata (Ag), el platino (Pt), el paladio (Pd) y el rodio (Rh) son ampliamente utilizados en distintos campos como catalizadores en procesos químicos y electroquímicos, en la industria, la medicina y la joyería. Como consecuencia existe una creciente demanda de metales preciosos, por lo que es de gran interés económico su recuperación de solución acuosa, ya sea en soluciones de desecho en sus procesos de producción o bien provenientes de fuentes secundarias [1].

Existen distintos métodos para la recuperación de estos metales, como la extracción líquido-líquido que es una técnica de separación que ha sido muy utilizada tanto a nivel industrial como a nivel analítico para la recuperación o separación de iones metálicos. Sin embargo, en este tipo de técnica, se utilizan disolventes orgánicos que pueden generar contaminación al medio ambiente. Por lo anterior, se busca proponer metodologías de separación alternativas, que sean menos contaminantes del medio ambiente, como lo son los sistemas bifásicos acuosos (ATPS de sus iniciales en inglés). Los ATPS son sistemas de agua y disolventes de base acuosa, que pueden usarse como una alternativa potencial a la extracción líquido-líquido tradicional [2].

Los ATPS se pueden formar mezclando una variedad de componentes en agua, como dos polímeros, un polímero y una sal inorgánica u orgánica, otros incluyen los líquidos iónicos y alcoholes de cadena corta [3].

El polietilenglicol (PEG), de diferentes pesos moleculares ha sido ampliamente utilizado en ATPS, debido a su biodegradabilidad, baja toxicidad, bajo costo, puntos de fusión relativamente bajos y baja naturaleza volátil. Una de las características más interesantes del PEG es la posibilidad de ajustar las propiedades por la variación de la longitud de la cadena del polímero, además de la alta capacidad de diseño para lograr rendimientos de extracción mejorados, en función de la especie a extraer. A menudo se le consideran en el marco de las tecnologías verdes [4].

Como en el proceso de extracción líquido-líquido convencional, en un sistema ATPS se involucra la transferencia de masa de una especie de una fase líquida a otra fase líquida (ambas fases no miscibles entre sí). La formación de dos fases ‘acuosas’ en un ATPS se puede explicar, ya que en un sistema polímero - polímero se forman grandes agregados y debido a la exclusión estérica, los polímeros comienzan a separarse entre dos fases diferentes. Por otro lado, en el caso de una ATPS de polímero - sal, la sal absorbe grandes cantidades de agua, generando un fenómeno salino (salting-out) que provoca un cambio en la solubilidad del polímero, haciéndolo más insoluble y como consecuencia la formación de las dos fases [5]. Este proceso depende de las condiciones de ambas fases, del extractante y del diluyente, de los efectos del medio en ambas fases, así como de la naturaleza de las especies a extraer. En este trabajo, se plantea y analiza una metodología en sistemas bifásicos acuosos para la extracción de Rh(III) de soluciones acuosas. En dicho sistema, de manera general, la fase orgánica está compuesta por un polímero de alto peso molecular, en este caso Polietilenglicol de peso molecular 1000 g/mol (PEG-1000) y la fase acuosa compuesta por soluciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y Na_2SO_4 a diferentes concentraciones. Se evaluó la eficiencia de extracción bajo diversas condiciones, en función del tiempo y de la temperatura.

Metodología

La primera parte para realizar la extracción de Rh(III) es la formación de ATPS sin el metal. Las fases se prepararon por separado, la fase orgánica compuesta por una solución de %p/p de PEG-1000 en agua y la fase acuosa compuesta por una solución de % p/p de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ o % p/p de $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$.

Las condiciones generales de las ATPS, para el estudio de la extracción de Rh(III) fueron: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30% p/p y 30% p/p de PEG-1000 y en el caso del Na_2SO_4 al 35% p/p y 25% p/p de PEG-1000. Las fases acuosas estaban compuestas de 100 ppm de Rh(III) en disoluciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o de Na_2SO_4 . La solución inicial de Rh(III) se encuentra en 0.1M HCl. Después, la fase acuosa y la fase orgánica se pusieron en contacto en una relación 1:1 en volumen. El tiempo de separación de fases después de la agitación fue de 2 minutos. La influencia de las variables en el rendimiento de extracción de Rh(III), fue el tiempo de contacto entre las fases y la temperatura, también se hicieron mediciones de pH para las fases acuosas y orgánicas antes y después de la extracción.

La cuantificación de Rh(III) se realizó en fases acuosas por medio de espectrofotometría de Ultravioleta-Visible utilizando el método de Claus Blue y por Espectroscopia de Absorción Atómica de Flama.

La concentración de Rh(III) en fase orgánica se obtuvo por balance de masa. La eficiencia de extracción se determina de la siguiente manera:

$$\%E = \frac{\text{masa de Rh(III) en Peg}}{\text{masa}_i \text{ de Rh(III) en Na}_2\text{SO}_4} \times 100 \quad (1)$$

De donde;

$$\text{masa de Rh(III) en Peg} = \text{masa}_i \text{ de Rh(III) en Na}_2\text{SO}_4 - \text{masa}_f \text{ de Rh(III) en Na}_2\text{SO}_4 \quad (2)$$

$$\text{masa}_i \text{ de Rh(III) en Na}_2\text{SO}_4 = V_i \times [\text{Rh(III)}]_i \quad (3)$$

$$\text{masa}_f \text{ de Rh(III) en Na}_2\text{SO}_4 = V_f \times [\text{Rh(III)}]_f \quad (4)$$

Donde $[\text{Rh(III)}]_i$ representa la concentración inicial de Rodio en fase acuosa y $[\text{Rh(III)}]_f$ es la concentración final de Rodio en fase acuosa después de la extracción en ppm (mg/L). V_i es el volumen inicial de la fase acuosa y V_f es el volumen final de la fase acuosa después de la extracción.

Resultados

El estudio cinético de la extracción de Rh(III) (Figura 1) muestra que el porcentaje de extracción usando ambas técnicas de análisis de Rh(III) (UV-Visible y AAF) se comporta de manera muy similar. Sin embargo, la gráfica muestra una enorme inestabilidad en los primeros 10 minutos de contacto de las fases y después de este tiempo se vuelve más estable. Es interesante notar que tan solo en 2 minutos podemos llegar a tener extracciones desde el 50 hasta el 60%.

Con los resultados obtenidos sobre cinética, y corroborando que la extracción de Rh(III) después de 20 minutos es estable, se optó por escoger un tiempo de contacto de 30 minutos para los experimentos siguientes.

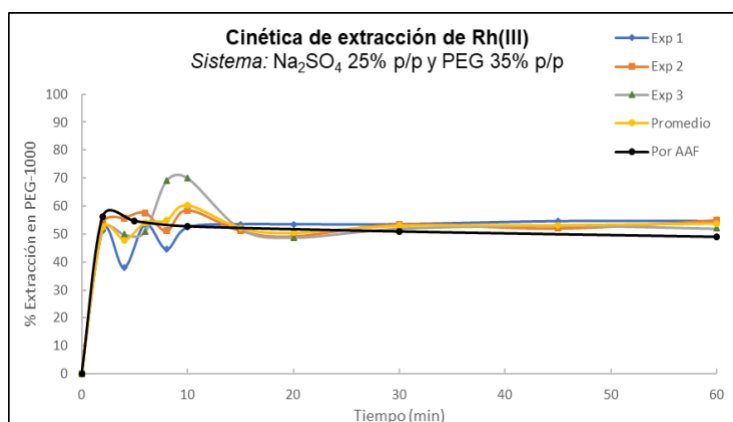


Figura 1. Comportamiento cinético de la extracción de Rh(III) en un sistema Na_2SO_4 25% p/p y PEG-1000 35% p/p.

Otro factor importante en el estudio de ATPS para extracción de iones metálicos es la temperatura. De esta manera se evaluó el comportamiento de la ATPS con respecto a la extracción de Rh(III) a diferentes temperaturas (20°C, 25°C, 40°C y 50°C), en el sistema Na₂SO₄ 25% p/p y PEG-1000 35% p/p.

Es necesario señalar que los volúmenes de las fases tienen variaciones no despreciables en el proceso de extracción de Rh(III), observándose que a mayor temperatura mayor es el volumen de fase acuosa y menor el de la fase orgánica.

En la tabla 1, se muestra la comparación de resultados obtenidos usando las dos técnicas de cuantificación de Rh(III), para un tiempo de 30 minutos de contacto entre las fases y a 4 temperaturas distintas.

Tabla 1. Comparativo de la extracción de Rh(III) con dos diferentes técnicas de análisis.

TIEMPO (MINUTOS)	TEMPERATURA °C	% EXTRACCIÓN DE Rh(III)	
		AAF	UV-VISIBLE
30	20	43.48	44.39
	25	50.93	52.94
	40	41.87	55.10
	50	45.18	52.57

El análisis de resultados muestra que la extracción de Rh(III) en fase orgánica es relativamente parecida a una temperatura de 20°C y 25°C, con ambas técnicas de análisis. Las diferencias más importantes se presentan a las temperaturas de 40°C y 50°C. En ambos casos, hay un incremento en la extracción de Rh(III) y después una ligera disminución, lo cual podría indicar un posible cambio en el mecanismo de extracción del ion metálico.

Los resultados mostrados nos permiten ver, que es posible realizar la extracción del Rh(III) por medio de ATPS, con un rendimiento del orden de 55%, con una de cinética de extracción rápida.

También se hicieron mediciones de pH antes y después de la extracción y los valores de pH observados previo a la extracción de Rh(III), así como después de la extracción en el equilibrio, por un ATPS de Na₂SO₄ al 25 % p/p y PEG-1000 al 35 % p/p. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Valores de pH previo y posterior a la extracción en una ATPS.

PREVIO A LA EXTRACCIÓN		POSTERIOR A LA EXTRACCIÓN	
<i>Fase acuosa</i>	<i>pH</i>	<i>Fase acuosa</i>	<i>pH</i>
Rh(III) 100 ppm en Na₂SO₄ al 25 % p/p	1.74 - 1.80		2.15 – 2.35
<i>Fase orgánica</i>	<i>pH</i>	<i>Fase orgánica</i>	<i>pH</i>
PEG-1000 al 35 % p/p	3.37 – 3.40		2.29 – 2.33

Cabe mencionar que el Na₂SO₄ al 25 % p/p sin Rh(III) tiene un pH de 8.1. Con los resultados de pH mostrados, se puede decir que la influencia del estándar de Rh(III) en HCl 0.1 mol/L

hace que proceso de extracción se lleve en un medio ácido. Lo anterior es un resultado interesante, ya que en las condiciones de un pH relativamente ácido se logra la extracción de Rh(III) por el ATPS.

El mecanismo de extracción de iones metálicos por ATPS, no ha sido aún bien establecido, debido a la complejidad del sistema. Se tienen dos fases ricas en agua, lo cual es ya una primera complicación. Aunado a esto existen efectos importantes del medio (fenómeno de salting-out), lo cual es el fundamento de la formación de las dos fases no miscibles, pero que también tienen una influencia en cada una de las especies presentes en el sistema. Para tratar de proponer un posible mecanismo, se debe considerar la forma en que se encuentra el Rh(III) en fase acuosa previa a la extracción.

Considerando las condiciones de la solución inicial de Rh(III), el cual se encuentra en un medio de HCl 0.1 mol/L, la especie que predomina es $RhCl_5(H_2O)^{2-}$, lo cual se corroboró con su espectro obtenido entre 200 a 800 nm por UV-Visible. Por otra parte, en un medio salino de alta concentración de electrolitos, como la fase acuosa utilizada en este trabajo (Na₂SO₄ al 25% p/p), la actividad de agua (a_w)₂ del medio disminuye con respecto a la actividad del agua en ausencia de éste (a_w)₁:

$$(a_w)_2 > (a_w)_1$$

Debido a que el agua solvata las moléculas Na₂SO₄, por lo que se tiene menos agua disponible.

Considerando que el pH del medio (Na₂SO₄ + RhCl₅(H₂O)²⁻ + H₂O) es ácido, y que la actividad del agua es menor, se puede provocar una mejor asociación entre aniones y cationes, lo cual puede inducir a la formación del par de ion $[RhCl_5(H_2O)]^{2-} \cdot 2H^+$.

El polietilenglicol es un surfactante no iónico, su cadena tiene forma de zigzag al estar en ausencia de agua, pero cuando está en presencia de ella su forma cambia aleatoriamente. Su característica hidrofílica es causa de los puentes de hidrógeno formados entre los oxígenos del grupo éter y los hidrógenos del agua. Cuando la cadena es flexible, el oxígeno hidrofílico estará fuera de la cadena, mientras que el -CH₂- estará dentro de la cadena, lo que facilita que la cadena se una al agua.

La extracción de complejo de Rh(III) por el PEG-1000, se puede explicar debido a que en la fase acuosa se tiene un medio sumamente salino, por lo que es factible la formación del par de ion $[RhCl_5(H_2O)]^{2-} \cdot 2H^+$, que será la especie extraída en fase PEG. A pesar de que el PEG es rico en agua su polaridad es menor que la de la solución salina, lo cual tiene como consecuencia la transferencia de pares de iones de la fase acuosa a la fase orgánica. Aunado a esto, el PEG tiene una estructura desordenada en solución acuosa, por lo que su estructura permitirá que los oxígenos formen puentes de hidrógeno con el agua, así como con los protones de la especie $[RhCl_5(H_2O)]^{2-} \cdot 2H^+$, extraída en fase orgánica, lo cual favorece la transferencia de masa del Rh(III) de la fase acuosa (fase salina) a la fase orgánica (PEG-1000).

Conclusión

En este estudio se ha demostrado que el uso de ATPS formada por Na_2SO_4 al 25% p/p y PEG-1000 al 35% p/p, es una buena alternativa para extraer Rh(III) ya que con tiempos de extracción muy cortos, se puede extraer cantidades del orden del 60%. A partir de los resultados obtenidos, también se demostró que no es necesario aumentar la temperatura para mantener el rendimiento de extracción. El mecanismo de extracción es complejo, pero es posible que la especie extraída en fase orgánica sea $[\text{RhCl}_5(\text{H}_2\text{O})]^{2-} \cdot 2\text{H}$.

Bibliografía

- [1] Ramesh, A., Hasegawa, H., Sugimoto, W., Maki, T., Ueda, K. (2008). “*Adsorption of gold (III), platinum (IV) and Palladium (II) onto glycine modified crosslinked chitosan resin*”. Bioresour Technol, 99, 3801–3809.
- [2] Hongzhe Tian, Chunqi Xu, Jianing Cai, Jing Xu. (2018). “*The aqueous biphasic system based on cholinium ionic liquids and nonionic surfactant and its application for triazine-based herbicides extraction*”. Journal of Chemical Thermodynamics, 125, 41-49.
- [3] Mujahid Iqbal, Yanfei Tao, Yufei Zhu, Dongmei Chen, Xu Wang, Lingli Huang, Dapeng Peng, Adeel Sattar, Muhammand Abu Bakr Shabbir, Hafiz Iftikhar Hussain, Saeed Ahmed and Zonghui Yuan. (2016). “*Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications*”. Biological Procedures Online, 18, 1-18.
- [4] Zafarani-Moattar MT, Hamzehzadeh S, Nasiri S. (2012). “*A New Aqueous Biphasic System Containing Polypropylene Glycol and a Water-Miscible Ionic Liquid*”. Biotechnol Progr, 28, 146-56.
- [5] Ja. Asenjo, Ba Andrews. (2011). “*Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective.*” J Chromatography A, 1218, 8826-8835.

EVALUACION DE CATODOS DE CARBÓN ACTIVADO (CA) PARA SU APLICACIÓN EN SUPERCAPACITORES DE CA-PEDOT

Josué Armando Lara Gamez^a, Juan Emanuel Ruiz Rocha^a, Angelica Arlet Villegas Barrón^a, Silvia Gutierrez Granados^a, Jesús Salvador Jaime Ferrer^b.

^aDivisión de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Guanajuato, 36000, MÉXICO.

^bCentro de Innovación Aplicada en Tecnologías Competitivas, CONACYT, Omega no.201 Col. Industrial Delta, León, Guanajuato, 37545, MÉXICO.

Resumen

En este trabajo se aborda la preparación de electrodos de carbón activado (electrodo negativo) con el objetivo de mejorar las características de conducción del material, permitiendo al supercapacitor un desempeño más eficiente y con una mayor capacidad de almacenamiento de energía. El carbón activado presenta extensas áreas de superficie, tiene una gran conductividad eléctrica, es de bajo costo y tiene una elevada estabilidad química, por lo que es un material ampliamente utilizado en la fabricación de supercapacitores. Los electrodos se preparan sobre un colector de corriente de Al mediante la técnica de casting, electrodos al 5% en peso de PVDF como binder respecto al carbón activado. Se realizaron caracterizaciones electroquímicas por voltametría cíclica, carga y descarga a corriente constante, en una celda de prueba tipo Swagelok a tres electrodos, usando acetonitrilo (ACN) como solvente y tetrabutilamonio tetrafluoroborato (TBABF) como electrolito 0.3M a 10 mV/s, observando el comportamiento de la capacitancia a distintos porcentajes de agente conductor, así como la influencia del tratamiento termico atmosferico. Se obtuvieron buenos resultados y se espera que al mejorar la técnica de casting sobre el aluminio, mejore la capacitancia del electrodo.

Palabras clave: *supercapacitor, capacitor hibrido, EDCL, pseudocapacitor*

Introducción

En los últimos años, los supercapacitores han surgido como una alternativa o complemento importante de las baterías. Los supercapacitores son dispositivos de almacenamiento de energía eléctrica en forma de cargas electroestáticas confinadas en pares de placas conductoras separadas por un medio dieléctrico. La principal característica de estos dispositivos frente a las baterías es la mayor potencia que es capaz de inyectar, aunque poseen una menor densidad de energía. Otra característica de los supercapacitores es la rapidez de carga y descarga, pueden proporcionar corrientes de carga altas, no necesitan mantenimiento, trabajan en condiciones de temperatura muy adversas. Esto permite que sean dispositivos de mayor durabilidad, lo que mejora considerablemente el costo beneficio al no tener que reemplazar esta parte del automóvil frecuentemente. Y, por último, no presentan en su composición elementos tóxicos, algo muy común en baterías. Otra ventaja notable es la

cantidad de ciclos de carga y descarga que puede tener un supercapacitor, siendo éste mil veces más que las baterías actuales [1].

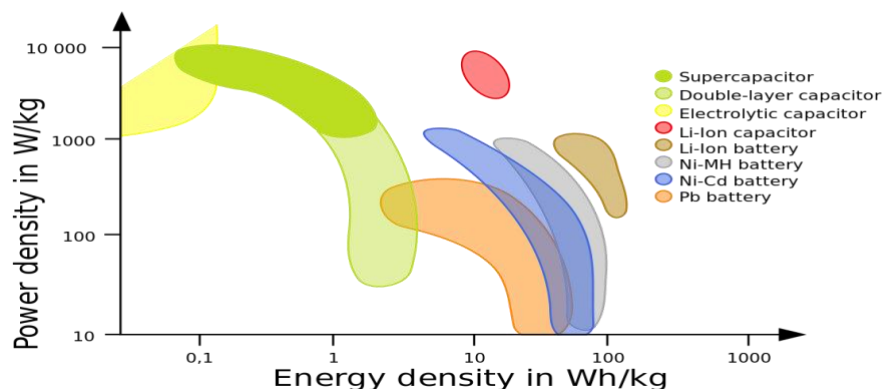


Figura 1. Diagrama de Ragone de los sistemas de almacenamiento de energía.

La principal desventaja de los supercapacitores es la limitada capacidad de almacenar energía, por lo que los trabajos de investigación actuales están enfocados en aumentar la densidad energética de estos dispositivos. Estas diferencias se reflejan en el diagrama de Ragone (Figura 1), que muestra la densidad de energía en función de la densidad eléctrica para varios dispositivos de almacenamiento energético. Por último, los esfuerzos en el desarrollo de los supercapacitores deben estar enfocados a la capacidad de almacenamiento de carga para hacerlos una propuesta real como reemplazo de las baterías actuales de ion Litio [2]. Los supercapacitores, debido a su diseño, son capaces de almacenar rápidamente energía. Su funcionamiento es parecido al de un capacitor, en el cual se aprovecha la migración de cargas hasta los electrodos del sistema, por lo que su capacidad de almacenamiento depende directamente del área, donde se depositen las cargas en cada electrodo. En el caso de los supercapacitores existen de dos tipos, capacitores de doble capa electroquímica (EDLC) y pseudocapacitores.

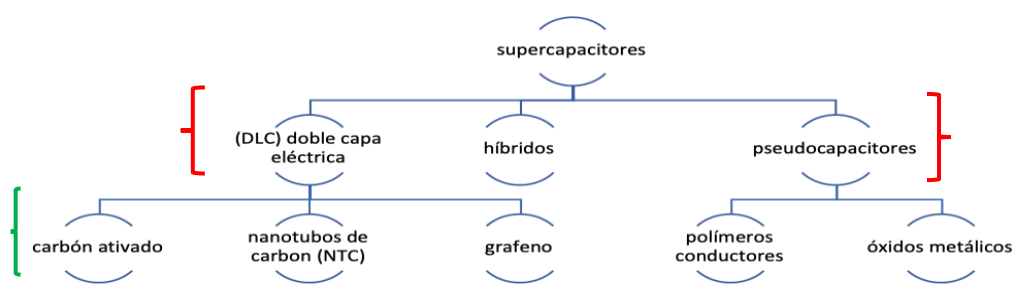


Figura 2. Esquema de los distintos tipos de supercapacitores.

La principal diferencia entre estos dos tipos radica en la forma en la que se almacenan las cargas, ya que en los EDLC solamente se aprovechan las cargas que se acumulan en la doble capa, de ahí su nombre [3]. Mientras que en los pseudocapacitores se aprovechan las reacciones redox “rápidas” que suceden en el cuerpo del electrodo, de tal manera que el electrodo en sí también participa en la acumulación de energía [4]. Un esquema general de las diferencias de los capacitores se observa en la Figura 2, donde se muestran sus componentes principales, y los mecanismos que intervienen en la acumulación de energía en cada uno.

Metodología experimental

Elaboración de cátodo de Carbono.

Todos los experimentos se realizaron en una celda electroquímica adaptada con un vaso de precipitado de 10 ml para tres electrodos. Las soluciones de trabajo fueron preparadas utilizando productos químicos grado reactivo analítico y agua desionizada. Todos los experimentos fueron realizados a presión atmosférica.

Preparar solución de Carbón Activado + Carbón Vulcan + PVDF al 5% de CA como aglutinante; 0.1g, (0.005, 0.01, 0.015g) y 0.005g respectivamente en 10 ml de acetona.

Para la preparación de un electrodo de carbono se tienen presentes los siguientes pasos:

- a) En un matraz Erlenmeyer de 25 ml agregar una cantidad de 10 ml de acetona, y colocar en agitación sin calentamiento agregando los 0.005g de binder (fluoruro de polivinilideno).
- b) Al cabo de 5 minutos de agitación agregar los 0.1g de Carbón Activado y 0.01g de Carbón Vulcan.
- c) Dejar en agitación por 30 minutos, posteriormente llevar al sonicador por una 1 hora aproximadamente, esto permite que haya una mezcla homogénea entre el material activo, el aglutinante y el agente conductor.
- d) Después se vuelve a llevar la solución a la parrilla con agitación y una temperatura superior de 95°C para permitir que la acetona se evapore de manera lenta.
- e) El proceso finaliza cuando se tiene una pasta lo suficientemente espesa para poder colocarla sobre aluminio (cuidar la viscosidad es el paso mas importante, ya que de esto depende la adherencia sobre el aluminio)

Resultados

Caracterización electroquímica (respuesta electroquímica del carbón activado y carbón vulcan).

Para caracterizar los electrodos de carbón activado y carbón vulcan se hicieron pruebas por medio de un voltamperograma a potencial negativo. Las pruebas de impedancia resaltaron la poca capacitancia debida al material activo, por lo tanto, cuando se añade el agente conductor a la mezcla, dicha capacitancia aumenta considerablemente.

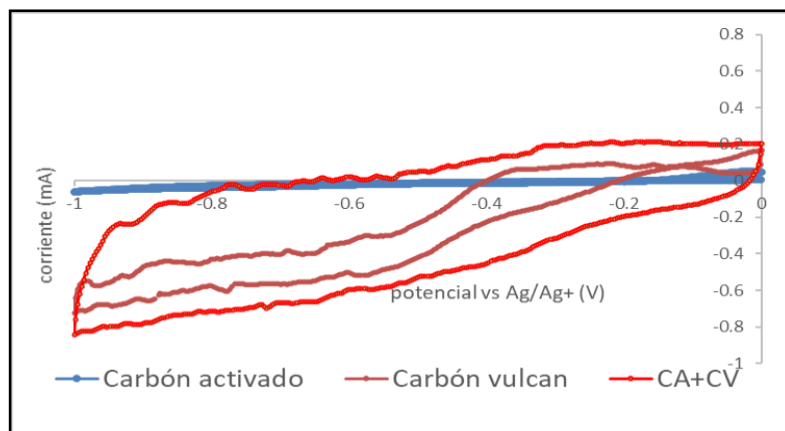


Figura 3. Voltamperometría cíclica para la caracterización del electrodo de a) carbón activado b) carbón vulcan y c) mezcla 0.1g CA y 0.1g CV, con una ventana de potencial de 0 a -1 V y una velocidad de barrido de 10 mv/s.

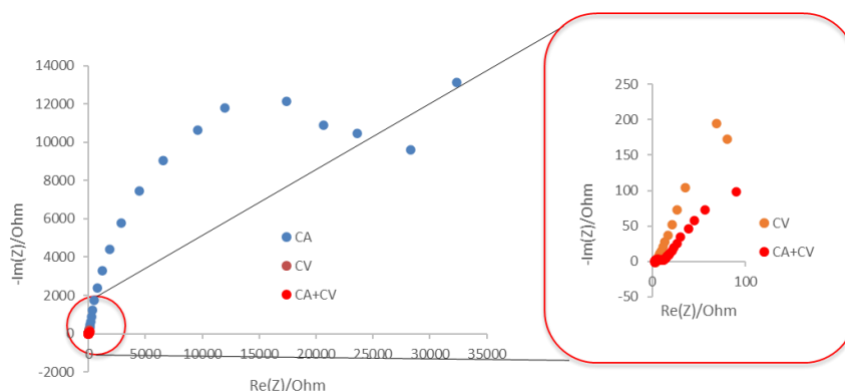


Figura 4. Diagrama de Nyquis para la contribucion de carbón activado, carbón vulcan y una mezcla 1:1 CA-CV.

Efectos del tratamiento termico.

Se realizaron pruebas de voltamperometría cíclica las cuales muestran una tendencia en el aumento de la capacitancia conforme aumenta la temperatura, llegando a un punto máximo de capacitancia en 200°C.

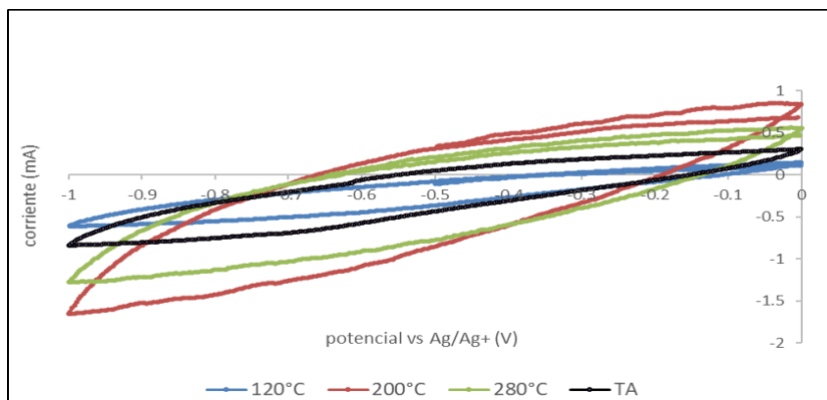


Figura 5. Voltamperometría cíclica para una mezcla 0.1g CA, 0.005g CV y 0.005g de PVDF con una ventana de potencial de 0 a -1 V y una velocidad de barrido de 10 mv/s.

Influencia del agente conductor.

Se observa un aumento de la capacitancia al aumentar la cantidad de carbón vulcan contenida en la mezcla manteniendo la temperatura constante, sin embargo, el aumento excesivo de agente conductor puede provocar un desprendimiento del material de electrodo del sustrato, generando resistencias muy altas al paso de corriente.

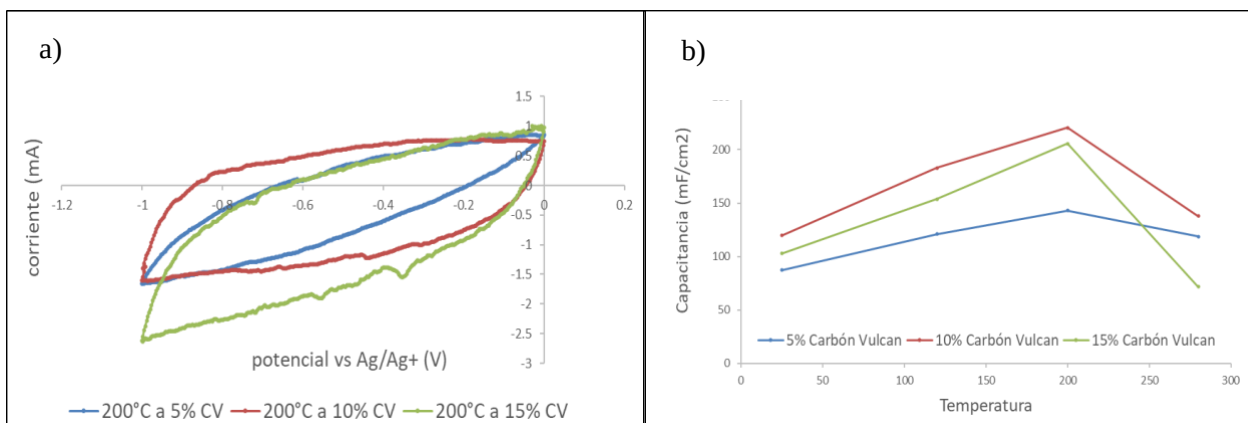


Figura 6. a) Voltamperometria ciclica para 5% CV, 10% CV y 15% CV todas a 200°C, y b) grafica de Capacitancia vs Temperatura.

Conclusiones

Un 10% de Carbón Vulcan permitió la máxima capacitancia de 220.36 mF/cm². El tratamiento termico atmosferico a 200°C logra obtener capacitancias de 142.95, 220.36 y 205.67 mF/cm² para 5, 10 y 15 % de Carbón Vulcan como agente conductor. Por lo tanto se

logro aumentar la transferencia electrónica es decir la cantidad de iones que pueden ser atraídos por el sistema, esto debido a la presencia del agente conductor.

Referencias

- [1] A. González, E. Goikolea, J. A. Barrena, and R. Mysyk, “Review on supercapacitors: Technologies and materials,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 58, pp. 1189–1206, 2016.
- [2] Z. Lin *et al.*, “Materials for supercapacitors: When Li-ion battery power is not enough,” *Mater. Today*, vol. 21, no. 4, pp. 419–436, 2018.
- [3] H.-Q. Wang, J. Yin, Q. Li, and P. Yin, “Current Progress on the Preparation of Binders for Electrochemical Supercapacitors,” *Postdoc J.*, vol. 2, no. 1, 2014.
- [4] B. Dyatkin, V. Presser, M. Heon, M. R. Lukatskaya, M. Beidaghi, and Y. Gogotsi, “Development of a green supercapacitor composed entirely of environmentally friendly materials,” *ChemSusChem*, vol. 6, no. 12, pp. 2269–2280, 2013.

GLICOSIDASAS EN *Acanthamoeba*: ESTUDIOS DURANTE LA FASE VEGETATIVA Y DE DIFERENCIACIÓN

Amezola Rivera Jesús Antonio ^a, Flores Villavicencio Lérica Liss ^b Flores Martínez Alberto ^c y Villagómez Castro Julio César ^d

^a Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Norial Alta s/n, Guanajuato, Guanajuato, C.P 36050, MÉXICO. ^a ja.amezolarivera@ugto.mx; ^b lflores@ugto.mx; ^c floralb@ugto.mx; ^d castroj@ugto.mx.

Resumen

Introducción. *Acanthamoeba castellanii* es una ameba de vida libre patógena y agente etiológico de la encefalitis amebiana granulomatosa, queratitis amebiana e infecciones diseminadas o dérmicas. Presenta dos estadios de vida: vegetativo (trofozoíto) y de resistencia (quiste). El quiste tiene una doble pared, cuyo componente mayoritario es la celulosa, lo cual le confiere resistencia al medio ambiente y agentes terapéuticos. Se han descrito varias enzimas involucradas en la síntesis de celulosa durante su enquistamiento y, se ha sugerido, la participación de hidrolasas, por la presencia de genes codificantes para endoglucanasas y glicosidasas. Sin embargo, no se han caracterizado aún estas glicosilhidrolasas en trofozoítos, ni durante su diferenciación celular.

Objetivo. Evaluar la actividad enzimática de las glicosidasas durante las fases vegetativa y de diferenciación en *A. castellanii*.

Metodología y resultados parciales. Los trofozoítos se cultivaron en el medio PYG (pH 6.5; 30°C) hasta su fase exponencial de crecimiento; se cosecharon para inducir el enquistamiento en el medio ME (pH 9.0; a 30 ó 37°C) utilizando dos inóculos diferentes y cada 24 h se recuperaron las células para los ensayos. Se obtuvo el mayor rendimiento de quistes ($\geq 80\%$) y viabilidad ($\geq 90\%$) en el medio ME a 37°C, sin importar el inóculo inicial. La actividad enzimática se evaluará utilizando sustratos fluorescentes (sustrato: 4-MU-glicósido) y mediante zimogramas tanto para los trofozoítos, como durante el enquistamiento o el desenquistamiento (en el medio PYG).

Conclusión. El enquistamiento de *A. castellanii* es óptimo y reproducible en el medio ME (pH 9.0; 37°C).

Palabras clave: Diferenciación, *Acanthamoeba castellanii*, glicosidasas. ME.

Introducción

Los organismos del género *Acanthamoeba* son amebas de vida libre (AVL) que comúnmente habitan en suelo, aire y ambientes acuáticos naturales o artificiales: piscinas, sistemas de tratamiento o enfriamiento de agua, equipos de diálisis, dentaduras postizas, lentes de contacto, entre otros [1,2,3]. Sin embargo, algunas especies de AVL son patógenas, dando lugar a enfermedades como encefalitis amebiana granulomatosa (GAE), queratitis (AK) e infecciones diseminadas o dérmicas [2,4]. Adicionalmente, pueden albergar bacterias de

importancia médica [1]. Su ciclo de vida involucra dos morfologías: la vegetativa o trofozoíto, con movilidad y metabolismo activo y; la de resistencia o quiste, con metabolismo reducido y que le brinda resistencia al medio ambiente y fármacos, debido a su doble pared, compuesta principalmente por celulosa (pared interna o endoquiste) y, por proteínas, lípidos y carbohidrato (pared externa o ectoquiste) [5,6,7]. Para la síntesis de celulosa, durante su enquistamiento, se ha descrito la participación de 3 enzimas: glucógeno-fosforilasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y celulosa sintasa [7,8]. Adicionalmente, se ha sugerido la participación de enzimas celulolíticas (endoglucanasa y glucosidasas) [9,10] presentes en los trofozoítos, las cuales no han sido caracterizadas en estas amebas. Durante el desenquistamiento no se ha descrito la participación de enzimas hidrolíticas, solamente la liberación del trofozoíto a través del ostiolo [11]. Si bien, en el genoma de *Acanthamoeba*, se han anotado varios genes de glicosidasas (endoglucanasa, glucosidasas), se han observado variaciones en su expresión durante su ciclo de vida [12,13,14,15].

En el género *Entamoeba*, donde la pared del quiste está formada principalmente por quitina y quitosana, se ha descrito la diferenciación como un proceso concertado en el que participan enzimas sintéticas e hidrolíticas (quitina sintasa, quitinasa, glicosidasas, etc.) [16,17,18]. En este trabajo se estudió el efecto de dos condiciones de temperatura (30 °C y 37°C) y de dos densidades celulares distintas (2.5×10^5 y 5×10^5 trofozoítos/mL), sobre el enquistamiento de *Acanthamoeba castellanii*.

Metodología

Como material biológico se utilizó *Acanthamoeba castellanii* genotipo T4.

Medios de cultivo, enquistamiento y desenquistamiento (PYG, CHANG, EM, PY, YG y PBS + Glc)

- a) **Medio PYG.** Fue preparado de acuerdo con el protocolo previamente descrito por Visvesvara, G. S., *et al.*, 1975 [19].
- b) **Medio CHANG.** Fue preparado de acuerdo con el protocolo previamente descrito por...[20].
- c) **Medio de enquistamiento (EM).** Fue preparado de acuerdo con el protocolo previamente descrito por Sohn, H. J., *et al.*, 2017 [20].
- d) **Medio PY.** El medio PY fue preparado utilizando las mismas condiciones que para el medio PYG, sin la adición de glucosa.
- e) **Medio YG.** El medio YG fue preparado utilizando las mismas condiciones que para el medio PYG, sin la adición de peptona.
- f) **Medio PBS + Glc.** El medio PBS + Glc fue preparado utilizando la misma concentración de glucosa que en el medio PYG, disuelta en buffer PBS.

Crecimiento amebiano

Botellas de plástico (Corning) de 40 mL para cultivo celular, conteniendo cada una de ellas 4 mL de medio de cultivo CHANG o PYG, se inocularon con 10,000-20,000 trofozoítos y se incubaron a 30° C, sin agitación, en un incubador marca CRAFT. El crecimiento celular fue observado cada 24 horas utilizando el microscopio invertido (Leica DMI) hasta que se obtuvo la confluencia celular, evaluada por la formación de una monocapa amebiana en la pared inferior de la botella. Estas botellas se utilizaron para el mantenimiento y propagación de los cultivos durante el desarrollo experimental.

Enquistamiento y desenquistamiento amebianos

Los experimentos de enquistamiento se realizaron tres veces por triplicado a menos que se indique lo contrario. Trofozoítos cultivados en medio PYG (pH 6.5, 30 °C), hasta la fase exponencial de crecimiento, fueron cosechados por exposición a frío durante 10 minutos e inoculados, a una densidad celular de 2.5×10^5 y 5×10^5 trofozoítos/mL, en placas de 12 pozos conteniendo medio ME (medio de enquistamiento pH 9.0 a temperaturas de 30 °C ó 37 °C). Para ello, los trofozoítos se lavaron previamente 3x en PBS a 280 x g durante 5 minutos a 4° C, decantando el medio sobrenadante, y resuspendiendo las pastillas celulares en medio ME, se contaron los trofozoítos utilizando una cámara de Neubauer. Se adicionó, en cada pozo, 1 mL de la suspensión celular correspondiente. Cada 24 horas, a lo largo de 3 días, se recuperó el contenido de un pozo, de cada condición de cultivo, cosechando las células por espátulado y, se evaluó el porcentaje de enquistamiento (relación entre el número de quistes recuperados con respecto a las células totales recuperadas) utilizando microscopía de luz transmitida (Leica DM500).

La viabilidad celular se determinó utilizando el colorante azul tripano al 0.2 % (p/v, concentración final) utilizando el criterio de exclusión del colorante por las células vivas. Los quistes se tiñeron con el colorante fluorescente Calcofluor W2R (0.2 % p/v) y se contaron utilizando un microscopio Leica DM500, donde, además, de utilizar como criterio de enquistamiento la tinción de la pared del quiste, se observó su integridad, con base al mantenimiento de la permeabilidad diferencial de la pared quística.

Los ensayos de desenquistamiento se realizarán utilizando los quistes recuperados del cultivo en medio EM durante 72 h, y cultivándolos a dos temperaturas diferentes (30 °C y 37 °C), en los cuatro diferentes medios de desenquistamiento (PYG, PY, YG y PBS + Glc). Antes de inocular los quistes se tratarán con TX-100 al 0.05 % (v/v) para lisar los trofozoítos remanentes y se lavaran con el amortiguador PBS. Se evaluará el porcentaje de desenquistamiento a las 24 h, en cada condición de desenquistamiento, contando los trofozoítos recuperados en una cámara de Neubauer, utilizando el microscopía de Leica DM500 con técnica de luz visible. Se determinará la viabilidad celular como se menciona anteriormente.

Actividad enzimática

La actividad enzimática de tres diferentes glicosidasas (β -glucosidasa, β -xilosidasa y glucanasa [celobiohidrolasa]) se evaluará utilizando sustratos fluorescentes (4-MU- β -D-glucopiranosido, 4-MU- β -D-xilopiranosido y 4-MU- β -D-celobiosido, respectivamente). Adicionalmente se realizarán los zimogramas correspondientes en células vegetativas (trofozoítos) y durante la diferenciación amebiana (trofozoítos y quistes), enquistamiento en medio EM y desenquistamiento en medio PYG. Todos los experimentos se realizarán al menos tres veces por triplicado.

Resultados parciales y discusión

A lo largo de todos los ensayos realizados, la viabilidad amebiana, determinada por el método de exclusión de azul tripano, fue superior al 90 % para trofozoítos y cerca del 80 % para los quistes (datos no mostrados). Para la evaluación del enquistamiento amebiano se contaron los quistes y trofozoítos recuperados cada 24 h a lo largo de 3 días desde su inóculo en medio EM. Se observó que el porcentaje de enquistamiento a 30 °C fue del 60% entre las 48 y 72 horas de cultivo(*Figura 1, panel a*) como había sido reportado por Sohn, H. J., *et al.*, 2017 [21]. En cambio, el enquistamiento a 37 °C brindó el mayor porcentaje de enquistamiento amebiano (80%) a las 72 horas de iniciado el proceso de diferenciación, independientemente de la densidad celular del inóculo inicial (*Figura 1, panel b*) y c)).

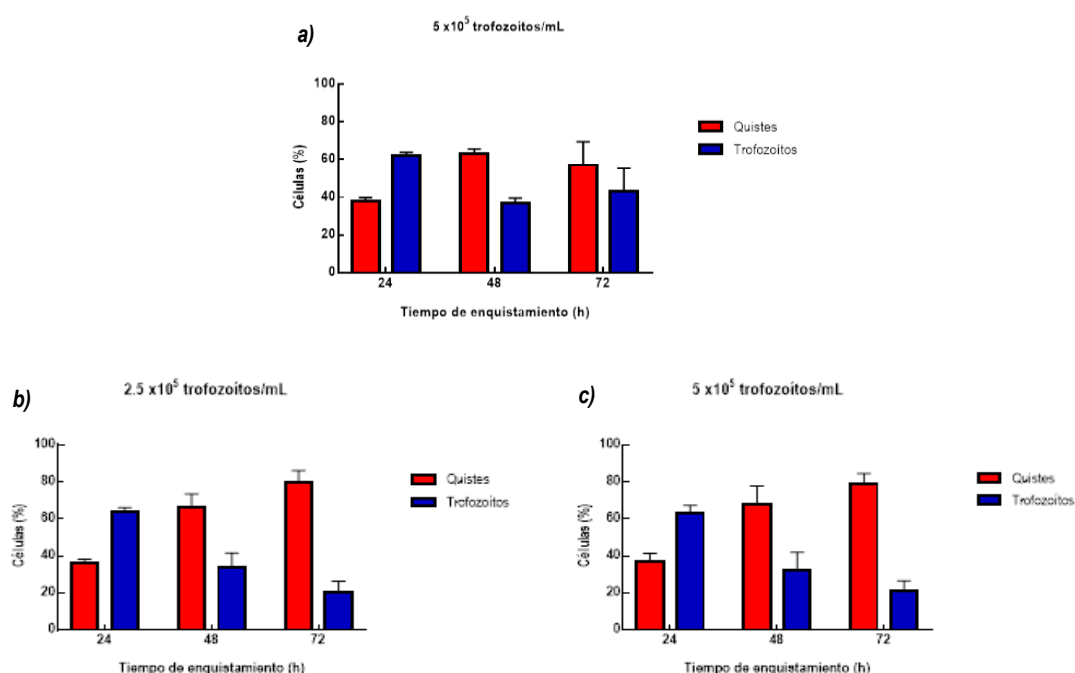


Figura 1. Enquistamiento de *A. castellanii* en medio ME. Se inocularon 2×10^5 o 5×10^5 células/mL en el medio de cultivo ME y se incubaron a 30 o 37 °C. Cada 24 h durante 3 días se contaron los trofozoítos y quistes recuperados y se determinó el % de enquistamiento. Panel a) $n=6$ a 30 °C, panel b) y c) enquistamiento $n=3$ a 37 °C.

La morfología celular durante el enquistamiento a 30 °C a lo largo de los 3 días de ensayo muestra que el fenómeno diferenciativo inicia por la agregación celular a las 24 horas (semejante a lo reportado para el género *Entamoeba* [21]), la posterior formación de la pared celular a partir de las 48 horas y la liberación de los quistes maduros observados a las 72 h en el medio ME (Figura 2).

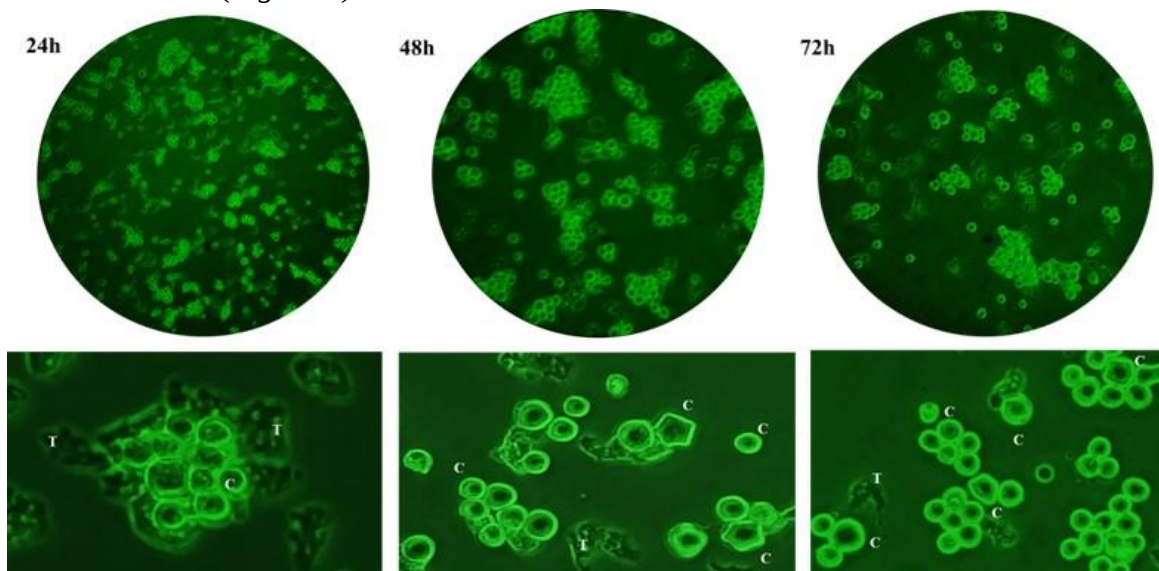


Figura 2. Quistes y trofozoítos de *A. castellanii* durante el enquistamiento a 30 °C. Se observa una disminución en la cantidad de trofozoítos (T) con respecto al tiempo y un aumento en la aparición de quistes (C).

Cuando se evaluó el enquistamiento con base a la integridad de la pared celular, utilizando la tinción con Calcofluor W2R, se demostró la formación de la pared de celulosa en los quistes como se había reportado [5, 6]. Si bien, no se observaron diferencias entre los quistes inducidos a 30 o 37 °C, se recuperaron células que no formaron completamente su pared celular (Figura 3).

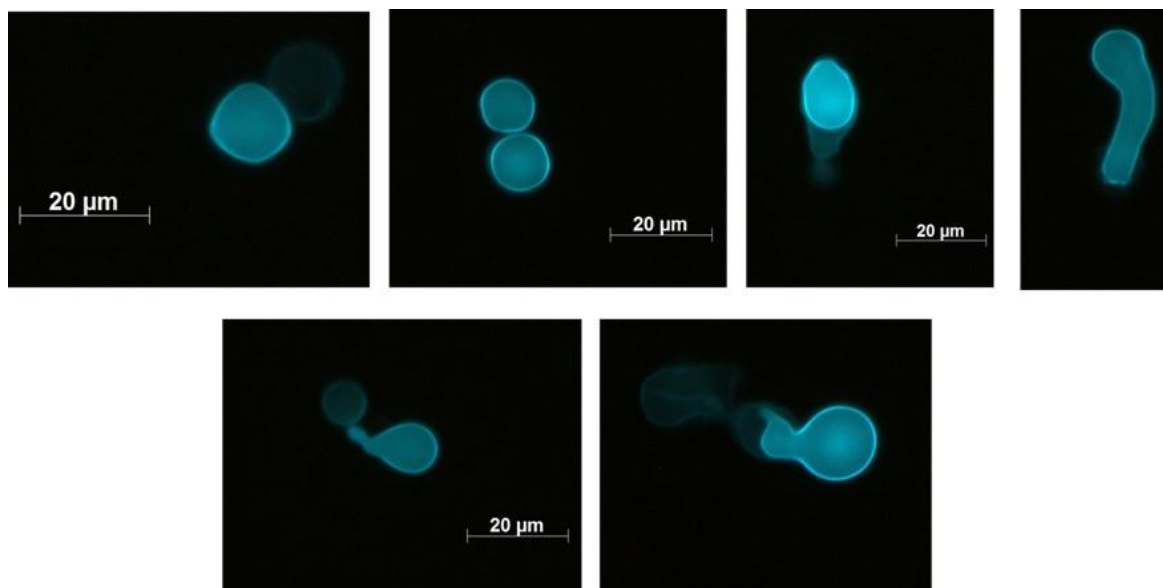


Figura 3. Formación de la pared celular a las 24h en medio EM (30 °C) de Quistes de *A. castellanii*. La aparición de la pared de celulosa es evidenciada por el halo intenso y fluorescente visto en la periferia en cada caso)

Conclusiones

Los resultados de este trabajo sugieren que la mejor temperatura para obtener un mayor rendimiento de quistes de *Acanthamoeba castellanii* inducidos en medio EM (pH 9.0) es de 37 °C a las 72 horas, sin importar el inóculo inicial (densidad celular) utilizado.

Bibliografía

- [1] Guimaraes, A. J., et al. (2016). "Acanthamoeba spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence." *Microbiological Research* 193: 30-38.
- [2] Kot, K., et al. (2018). "Amoebas from the genus Acanthamoeba and their pathogenic properties." *Ann Parasitol* 64(4): 299-308.
- [3] Lorenzo-Morales, J., et al. (2013). "Acanthamoeba keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide?" *Trends in parasitology* 29(4): 181-187.
- [4] Lakhundi, S., et al. (2015). "Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of Acanthamoeba infections." *Parasit Vectors* 8: 23.
- [5] Neff, R. J. y R. H. Neff (1969). "The biochemistry of amoebic encystment." *Symp Soc Exp Biol* 23: 51-81.
- [6] Blanton, W. y C. Villemez (2007). "Molecular Size and Chain Length Distribution in Acanthamoeba Cellulose*." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 25: 264-267.
- [7] Garajová, M., et al. (2019). "Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for Acanthamoeba cyst wall architecture." *Scientific Reports* 9(1): 4466.
- [8] Moon, E.-K. y H.-H. Kong (2012). "Short-cut pathway to synthesize cellulose of encysting Acanthamoeba." *The Korean journal of parasitology* 50(4): 361-364.
- [9] Lasman, M. (1975). "Glucosidase Activity in Acanthamoeba (Mayorella) palestinensis. The Effect of Glucose and Natural Glucosides on α - and β -Glucosidases." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 22: 435-437.
- [10] Deichmann, U. y H. Jantzen (1977). "Das Cellulassenzymssystem während Wachstum und Entwicklung von Acanthamoeba castellanii." *Archives of microbiology* 113(3): 309-313.

- [11] Weisman, R. A. (1976). "Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*." *Annu Rev Microbiol* **30**: 189-219.
- [12] Clarke M, Lohan AJ, Liu B, *et al.* (2013). "Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling". *Genome Biol.*14(2): R11.
- [13] Moon, EK., Xuan, YH., Chung, DL., Hong Y y Kong HH. (2011). "Microarray analysis of differentially expressed genes between cysts and trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*". *Korean J Parasitol.* 49(4):341-347
- [14] Moon, E. K., Chung, D. I., Hong, Y. C y Kong, H. H. (2007). "Differentially expressed genes of *Acanthamoeba castellanii* during encystation". *The Korean journal of parasitology*, 45(4), 283–285.
- [15] Anderson IJ, Watkins RF, Samuelson J, *et al.* (2005). "Gene discovery in the *Acanthamoeba castellanii* genome". *Protist.* 156(2):203-214.
- [16] Chatterjee, A., *et al.* (2009). "Evidence for a "Wattle and Daub" Model of the Cyst Wall of *Entamoeba*." *Plos Pathogens* 5(7): e1000498.
- [17] Das, S., & Gillin, F. D. (1991). "Chitin synthase in encysting *Entamoeba invadens*". *Biochemical Journal*, 280(Pt 3), 641-647.
- [18] Villagómez-Castro, J.-C y López-Romero, E. (1996). Identification and partial characterization of three chitinase forms in *Entamoeba invadens* with emphasis on their inhibition by allosamidin. *Antonie van Leeuwenhoek* 70(1), 45-48.
- [19] Visvesvara, G. S y Balamuth, W. (1975). "Comparative studies on related free-living and pathogenic amebae with special reference to *Acanthamoeba*". *The Journal of protozoology*, 22(2), 245–256.
- [20] Sohn, H. J., *et al.* (2017). "Efficient Liquid Media for Encystation of Pathogenic Free-Living Amoebae.". *The Korean journal of parasitology* 55(3): 233-238.
- [21] López-Romero, E y Villagómez-Castro, J.C. (1993) "Encystation in *Entamoeba invadens*". *Parasitol Today*, 9(6),225-227.

MODELO TERMO-HIDRÁULICO PARA EL DISEÑO Y EL ANÁLISIS DEL DESEMPEÑO DE INTERCAMBIADORES DE CALOR DEL TIPO TWISTED-TUBES

Jennifer Barraza-Colón ^a, Martín Picón-Núñez ^{a*}.

^a Departamento de Ingeniería Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Gto. 36050, MÉXICO. piconnunez@gmail.com

Resumen

En el presente trabajo se realizó un modelo termo-hidráulico basado en la caída de presión disponible con el fin de hallar el área de transferencia de calor de una variedad de intercambiadores de calor conocida twisted tube (tubos trenzados). Adicionalmente se realizó un análisis del desempeño de estos equipos al ser empleados en procesos industriales con fluidos altamente viscosos. En el desarrollo del trabajo se pueden diferenciar tres fases claves, en la primera fase se realizó una búsqueda bibliográfica para determinar las distintas correlaciones de coeficientes de transferencia de calor, caída de presión y relaciones geométricas propias de esta tecnología, contando con esta información se determinó una metodología para determinar el modelo. La segunda fase consistió en encontrar procesos industriales donde se necesitará equipos de intercambio de calor, como se mencionó anteriormente los procesos que se seleccionaron fueron aquellos que implicaran fluidos de alta viscosidad y finalmente se hizo el análisis comparando distintos aspectos como lo son la relación coeficientes de transferencia, área y costos de los intercambiadores twisted tube con la tecnología convencional tubo-coraza.

Palabras clave: *Modelado termo-hidráulico, Intercambiadores, Tecnología, Viscosidad.*

Introducción

La economía de la industria de procesos químicos está fuertemente relacionada con el tamaño, el costo de operación y mantenimiento de los equipos de intercambio de calor [1]. Éstos cumplen la función de transferir energía térmica entre fluidos de mayor a menor temperatura, con el fin de ejecutar aplicaciones típicas que implican calentamiento, enfriamiento, condensación y evaporación de corrientes fluidas. Para mejorar la efectividad de los intercambiadores de calor con el fin de incrementar el calor que se transfiere, una manera adecuada consiste en promover el aumento de coeficiente de transferencia de calor. Existen tres tipos de técnicas para lograr dicho objetivo, las activas, las pasivas y las compuestas [2]. Las técnicas activas requieren el consumo de energía externa mecánica para incrementar la velocidad del fluido o la vibración de superficies. Las pasivas no requieren aplicación directa de energía externa, incluyen superficies rugosas o modificación a la geometría de las superficies. Por último, la compuesta es básicamente un híbrido entre las dos técnicas anteriores [3]. La mayoría de los procesos industriales hace uso de intercambiadores de calor convencionales de tipo tubo y coraza. Esta tecnología es una solución rentable, conocida y probada para una amplia variedad de requisitos de transferencia

de calor. Sin embargo, tienen limitaciones operativas como: factores como el uso ineficiente del lado de la coraza, resistencia convectiva al flujo de calor en el interior y exterior del tubo, alta caída de presión y zonas muertas o de bajo flujo alrededor de los deflectores donde pueden producirse incrustaciones, corrosión, vibración, etc. Este tipo de problemas eventualmente provocan fallas en el equipo además de tasas bajas de transferencia de calor, lo que se traduce a una baja eficiencia de operación y consecuentemente, pérdidas económicas [4]. En el presente trabajo se estudia un tipo de intercambiador de calor que incorpora aspectos innovadores en su diseño que es conocido como tecnología Twisted Tube. Este tipo de equipo utiliza una técnica de transferencia de calor pasiva que ha sido capaz de superar las limitaciones de la tecnología convencional [5]. Actualmente la compañía Koch Heat Transfer Incorporated es la única encargada del diseño y la comercialización de estos equipos a nivel mundial.

Una aplicación destacada de esta tecnología se evidencia cuando se involucran fluidos altamente viscosos, los cuales tienden a generar coeficiente de transferencia de calor muy bajos, resultando en áreas de transferencia de calor grandes. La geometría de los intercambiadores de tipo twisted tube, al generar alta turbulencia local, mejoran la transferencia de calor sin incrementos importantes en la caída de presión [6]. La finalidad de este proyecto es desarrollar un modelo termo- hidráulico basado en la caída de presión disponible para hallar el área de transferencia de calor de este tipo de intercambiador aprovechando las ventajas que esta tecnología ofrece.

Metodología

La metodología que se llevó a cabo se puede resumir con los siguientes numerales:

1. Revisión bibliográfica, con el fin de revisar los antecedentes y estar al corriente con los trabajos previos que puedan fundamentar este trabajo.
2. Recopilación y corroboración de información que incluyen correlaciones del coeficiente de película, factores de fricción y relaciones geométricas
3. Selección de casos de estudio.
4. Desarrollo de metodología de diseño con el fin de estructurar un modelo termo- hidráulico base.
5. Aplicación del modelo a los casos de estudios seleccionados previamente.

Resultados

A continuación, se presentan los resultados de la aplicación del modelo termo- hidráulico para el diseño de intercambiadores tipo twisted tube. Los diseños se comparan con los que se obtienen empleando tecnología convencional de tipo tubo y coraza. Los procesos industriales seleccionados fueron la purificación de la glicerina y la producción de goma a partir de melaza.

Para el proceso de purificación de glicerina se requieren una serie de etapas. La primera consiste en el calentamiento de la glicerina bruta desde una temperatura inicial de 333 K hasta 353 K, con el objetivo de reducir su viscosidad. En esta etapa es donde se sustituye el

intercambiador convencional con uno de tipo twisted tube. En la Tabla 1 se pueden apreciar las condiciones de diseño base, así como las propiedades de los fluidos implicados que son glicerina técnica como fluido de calentamiento este pasa por el lado de la coraza y glicerina cruda que es el fluido frío y pasa dentro de los tubos.

Tabla 1. Propiedades físicas y de operación en el proceso de purificación de glicerina.

PROPIEDADES FÍSICAS Y DE OPERACIÓN				
Carga térmica			4911.051 KJ/h	
Temperatura de Entrada del fluido frío (glicerina cruda)			333 K	
Temperatura de salida del fluido frío (glicerina cruda)			342.26 K	
Temperatura de Entrada del fluido caliente (glicerina técnica)			393.28 K	
Temperatura de salida del fluido caliente (glicerina técnica)			379.02 K	
Flujo masico dentro de los tubos (glicerina cruda)			240.884 kg/h	
Flujo masico en la coraza (glicerina técnica)			181.881 kg/h	
Velocidad dentro de los tubos			1.5 m/s	
velocidad en la coraza			1.5 m/s	
DISEÑO				
U			408.835 KJ/h m ² K	
Área			0.26 m ²	
Número de tubos			66	
Diámetro de tubos			0.00635 m	
Diámetro carcasa			0.07937 m	
Largo			0.20 m	
Pasos			1-2	
Material			Acero inoxidable SS-316	
PROPIEDADES DE LOS FLUIDOS				
Densidad glicerina cruda (333k)			1467 kg/m ³	
Densidad glicerina técnica (380k)			1238 kg/m ³	
capacidad calorífica glicerina cruda			2.202 KJ/Kg K	
capacidad calorífica glicerina técnica			1.894 KJ/kg K	
conductividad térmica glicerina cruda			0.29 w/m°C	
conductividad térmica glicerina técnica			0.28 w/m°C	
viscosidad glicerina cruda (338K)			7.93 Cp	

Los resultados para este primer caso se encuentran resumidos en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados comparativos de un intercambiador convencional con el twisted tube en el proceso de purificación de glicerina.

	TUBOS-CORAZA	TWISTED TUBE
Área [m^2]	0.26	0.13
velocidad tubos [m/s]	1.5	0.023
velocidad coraza [m/s]	1.5	0.016
diámetro de los tubos [m]	0.00635	0.0049
diámetro de la coraza [m]	0.07937	0.15
Largo de los tubos [m]	0.13	0.46
numero de tubos	66	18
caída de presión [KPa]	300	140.5
U [kW/m^2C]	113.56	1061.09

En el segundo caso de estudio se requiere realizar un precalentamiento de melaza, de 293 K a 313 K. De manera similar se comparan el diseño entre la tecnología convencional y la de twisted tube. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3. Propiedades físicas y de operación en el proceso de producción de aoma a partir de melaza

PROPIEDADES FÍSICAS Y DE OPERACIÓN			
Carga térmica			134049.6 KJ/h
Temperatura de Entrada del fluido frio (Melaza 1)			293 K
Temperatura de salida del fluido frio (Melaza 1)			313 K
Temperatura de Entrada del fluido caliente (Melaza 2)			413 K
Temperatura de salida del fluido caliente (Melaza 2)			343.4 K
Flujo masico dentro de los tubos (Melaza 1)			1604.2 kg/h
Flujo masico en la coraza (Melaza 2)			1604,2 kg/h
Velocidad dentro de los tubos			0.03 m/s
velocidad en la coraza			0.024 m/s
Caída de presión			12227.89 Pa
DISEÑO			
U			1126.51 KJ/h m^2 K
Área			8 m^2
Número de tubos			16
Diámetro de tubos			0.0267 m
Diámetro carcasa			0.203 m
Largo			6.10 m
Pasos			1-2
Material			Acero inoxidable SS-316
PROPIEDADES DE LOS FLUIDOS			
Densidad Melaza (333k)			1450 kg/m3
Densidad Melaza (380k)			1450 kg/m3
capacidad calorífica Melaza 1			2.14 KJ/Kg K
capacidad calorífica Melaza 2			2.14 KJ/kg K
conductividad térmica Melaza 1			0.3 w/m°C
conductividad térmica Melaza 2			0.3 w/m°C

Tabla 4. Resultados comparativos de un intercambiador convencional con el twisted tube en el proceso de producción de goma a partir de melaza.

	TUBOS-CORAZA	TWISTED TUBE
Área [m^2]	8	4.4
velocidad tubos [m/s]	0.03	0.023
velocidad coraza [m/s]	0.03	0.016
diámetro de los tubos [m]	0.0267	0.0049
diámetro de la coraza [m]	0.203	0.15
Largo de los tubos [m]	6.10	26.9
numero de tubos	16	11
caída de presión [KPa]	122.67	138.3
U [kW/m^2C]	340.69	3113

En las tablas anteriores se evidencia que es una reducción de aproximadamente el 50% en el área de transferencia de calor cuando se hace uso de la tecnología twisted tube con respecto al uso de intercambiadores de tubo y coraza. Esto se traduce a una disminución en costos, algo favorable para cualquier proceso industrial.

Conclusiones

El aumento del desempeño de un intercambiador de calor puede lograrse de dos maneras; la primera es promoviendo el coeficiente de transferencia de calor para disminuir el área de transferencia de calor y la segunda es disminuyendo la caída de presión para reducir los costos de operación. La tecnología del twisted tube como se evidencia en los resultados, permite lograr ambos objetivos para una misma carga térmica. Los intercambiadores de tipo twisted tube son idóneos para aplicaciones con fluidos de alta viscosidad, donde el incremento que logra en los coeficientes de transferencia de calor es mayor comparado con fluidos menos viscosos. La metodología de diseño que se desarrolló en este trabajo permite a un diseñador encontrar el área de transferencia de calor necesaria para análisis de factibilidad económica en proyectos de readecuación de procesos en operación.

Referencias

- [1] Danielsen, S. O. (2009). Investigation of a twisted-tube type shell-and-tube heat exchanger (Master's thesis, Institutt for energi-og prosessteknikk).
- [2] Thawkar, V. P., & Farkade, H. S. (2015) Experimental analysis and CFD of the twisted tube heat exchanger under forced convection. International Journal of Science and Research (IJSR), ISSN (Online), 2319-7064.
- [3] Zachár, A. (2010). Analysis of coiled-tube heat exchangers to improve heat transfer rate with spirally corrugated wall. International Journal of Heat and Mass Transfer, 53(19-20), 3928-3939.
- [4] Babu, P. E. R. (2015). Heat Transfer Analysis on Twisted Tube Heat Exchanger Technology. vol. 5, IJCET.
- [5] Thawkar, V. P., & Farkade, H. S. (2015) Experimental analysis and CFD of the twisted tube heat exchanger under forced convection. International Journal of Science and Research (IJSR), ISSN (Online), 2319-7064.
- [6] Yan, W., Gao, X., Xu, W., Ding, C., Luo, Z., & Zhang, Z. (2017). Heat transfer performance of epoxy resin Flows in a horizontal twisted tube. Applied Thermal Engineering, 127, 28-34.

OPTIMIZACIÓN DE LA CADENA DE SUMINISTRO PARA LA PRODUCCIÓN DE COMBUSTIBLES A BASE DE BIOMASA Y PRODUCTOS DE ALTO VALOR AGREGADO EN MÉXICO

Yulissa M. Espinoza Vázquez, Fernando Israel Góñez-Castro ^a, JoséMaría Ponce-Ortega ^b.

^a Departamento de Ingeniería Química, División
de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato,
Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Gto, 36050, México.

fgomez@ugto.mx

^b División

Estudios de Posgrado, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás
Hidalgo, Francisco J. Múgica S/N, Morelia, Mich. 58060, México.

Resumen

México es un país con una alta producción agrícola. Estos residuos pueden ser utilizados para producir biocombustibles y otros productos. Dado que existen muchas posibilidades para hacer uso de los biocombustibles, la pregunta que surge es: ¿cuál es la mejor estrategia para el aprovechamiento de la biomasa lignocelulósica disponible en el país? Por ello, en el presente trabajo se presenta un modelo matemático que representa la cadena de suministro para la conversión de la biomasa lignocelulósica de México en biocombustibles y productos de alto valor agregado. El modelo se enfoca en maximizar las ganancias mientras satisface la demanda de estos mismos. Además, se analiza el efecto de las variaciones sobre la disponibilidad de materias primas y la demanda de productos. De acuerdo con los resultados, se puede obtener la mejor rentabilidad si la biomasa se utiliza para producir toda la demanda.

Palabras clave: *cadena de suministro, biomasa lignocelulósica, análisis de incertidumbre.*

Introducción

La mayoría de los requerimientos energéticos se satisfacen a través de combustibles fósiles, sin embargo, es bien sabido que la disponibilidad del crudo es incierta y las tendencias indican que las reservas decaen. Por otro lado, el uso de gasolina y Diesel para el transporte son la principal fuente de emisiones de CO₂ en ese sector. Para combatir estas problemáticas, se ha propuesto el uso de biocombustibles. Estos se obtienen a partir de biomasa renovable y se espera que muestren menores emisiones de gases de efecto invernadero que los combustibles fósiles. Ejemplo de ello es el bioetanol, que se recomienda usar en motores mezclado con gasolina, con un contenido máximo de 10 % vol de bioetanol [1]. Otro bioalcohol es el biobutanol, se recomienda el uso de biobutanol en mezclas con gasolina con contenido alcohólico de hasta 16 % [2]. Desafortunadamente, la producción industrial de bioetanol o biobutanol no es económicamente competitiva [3]. Por lo tanto, además de la producción de biocombustibles, la generación de productos de alto valor agregado en un esquema de biorrefinería es obligatoria para mejorar el potencial económico de la industria basada en la biomasa. Entre los muchos productos potenciales de alto valor agregado, el ácido levulínico es una opción interesante ya que es una molécula plataforma

para una diversidad de productos como ésteres de levulínico, ácido succínico, γ -valerolactona y sus derivados, entre otros [4]. Otro producto de alto valor agregado es el furfural, que es una plataforma para otros productos de importancia industrial, como el alcohol furfurílico, tetrahydrofurano, anhídrido maleico, etc. [5].

En México, existe un potencial para el uso energético de biocombustibles, al 2006, la producción de residuos agrícolas se ha reportado en 75.73 millones de toneladas [6], con un alto aporte de residuos de los cultivos de maíz. Así, en este trabajo se desarrolla un modelo matemático para determinar la cadena de suministro óptima para el aprovechamiento de los residuos agrícolas en México. El modelo de programación disyuntiva generalizada puede definir que combinación de productos sería más rentable. Adicionalmente, se analiza el efecto de la variación en la disponibilidad de residuos, ya que la producción agrícola cambia de temporada a temporada y de año a año. Finalmente, se analiza el efecto de los cambios en la demanda de los productos.

Metodología

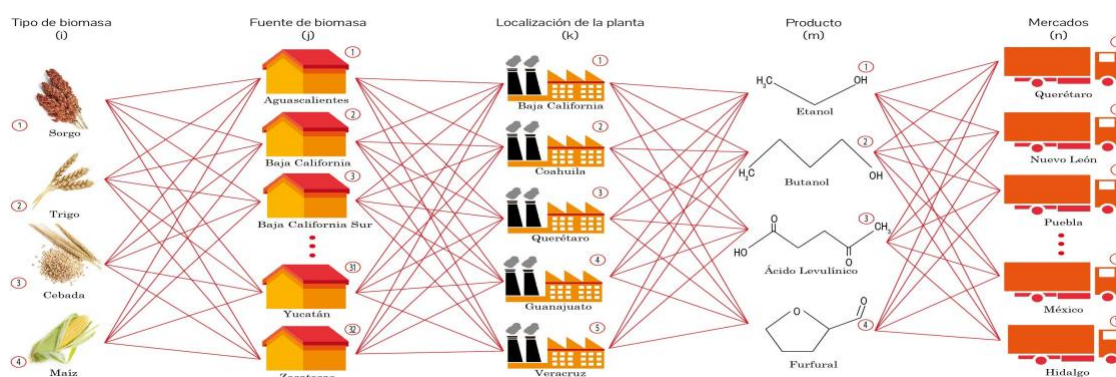


Figura 1: Superestructura de la cadena de suministro.

Se analizó la distribución de residuos agrícolas de maíz, sorgo, trigo y cebada; para los 32 estados de México [7] para ambas temporadas (primavera-verano y otoño-invierno), a lo largo de los años 2015, 2016, 2017 y 2018. En el caso de los bioalcoholes, se espera que satisfagan una fracción de la demanda de gasolina. Para los productos de alto valor agregado, la demanda de ácido levulínico se determina en función de disolvente, mientras que la demanda de furfural se estima asumiendo su uso como lubricante [8, 9]. La superestructura propuesta para la cadena de suministro se muestra en la Figura 1. Para el modelo matemático, cada instalación k puede existir o no, así mismo puede producir un producto o no, esto se representa sigue:

$$\left[\begin{array}{c} Y(k) \\ TCP(k) = \sum_m \sum_n FP(m, k, n) \cdot CP(m) \\ TCRM(k) = \sum_m \sum_n \frac{FP(m, k, n)}{Yld(i, m)} \cdot RMUC(i) \\ TCL(k) = \sum_m \sum_n \frac{FP(m, k, n)}{p(m)} \cdot LS(m, k) \cdot LC \\ \left[\begin{array}{c} S(m, k) \\ \sum_n FP(m, k, n) = A \end{array} \right] \vee \left[\begin{array}{c} \neg S(m, k) \\ \sum_n FP(m, k, n) = 0 \end{array} \right], \forall m \end{array} \right] \vee \left[\begin{array}{c} \neg Y(k) \\ TCP(k) = 0 \\ TCRM(k) = 0 \\ TCL(k) = 0 \end{array} \right], \forall k \quad (1)$$

donde:

$$A = \sum_i \sum_j RMASF(i, j, k, m) \cdot Yld(i, m)$$

TCP(k) es el costo de producción total de la biorrefinería k, CP(m) es el costo de producción unitario para el producto m, TCRM(k) es el costo debido a la materia prima que ingresa a la instalación k, Yld(i, m) es el rendimiento del producto m obtenido de la materia prima i, RMUC(i) es el costo unitario de la materia prima i [10], TCL(k) es el costo de adquisición de la tierra para la instalación k, LS(m, k) es la superficie de tierra requerida por litro de producto, LC es el costo de la tierra por metro cuadrado [11]. Los valores de CP(m) y Yld(i, m) se estiman a partir de los datos reportados [12, 13, 14, 15]. La función objetivo es la ganancia, que viene dada por:

$$GN = \sum_m \sum_k \sum_n FP(m, k, n) \cdot SP(m) - \sum_k TCRM(k) - \sum_k TCP(k) - \sum_k TCL(k) - \sum_i \sum_j \sum_k TSP(i, j, k) - \sum_m \sum_k \sum_n CTP(m, k, n) \quad (2)$$

donde SP (m) es el precio de venta del producto m [16, 17, 18, 19]. TSP y CTP son los costos de transporte de la biomasa a la planta y de la planta al mercado, respectivamente [20]. Las disyunciones representadas por la ecuación 1 se relajan utilizando el enfoque Big-M [21]. Las disyunciones relajadas se incorporan al resto del modelo, siendo codificadas en el software GAMS para maximizar la ganancia dada por la ecuación 2. El problema MILP resultante consta de 6665 igualdades y 355 desigualdades. El problema de optimización se soluciona con BARON, en un equipo HP con CPU Inter Core i5-8300H, 12.00 GB de RAM.

Resultados

De acuerdo con los resultados obtenidos, para maximizar la ganancia solo se debe producir ácido levulínico. Se determinó que solo se debe tener una planta ubicada en Guanajuato, se considera que esto debido a la ubicación estratégica de este estado. La Figura 2 muestra la demanda anual satisfecha por estado, se observa que se satisface la demanda total de cada estado.

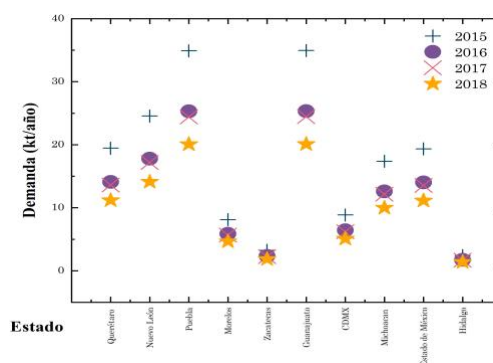


Figura 2: Demanda satisfecha de ácido levulínico.

Las Figuras 3 y 4 muestran los porcentajes de uso de cada tipo de materia prima de las diferentes fuentes en primavera-verano y otoño-invierno, respectivamente. Las cantidades de materia prima totales son iguales en cada temporada, sin embargo, a lo largo de los años se pueden observar algunas variaciones, pero en todos los casos el mayor contribuyente de materia prima para la temporada primavera-verano es el estado de Querétaro, con los residuos de maíz como principal materia prima. Para la temporada otoño-invierno, el estado de Tamaulipas es el estado con mayor aporte, con una alta proporción de residuos de sorgo. Se observa que las cantidades varían respecto al año, esto debido a la variación de la demanda del ácido levulínico.

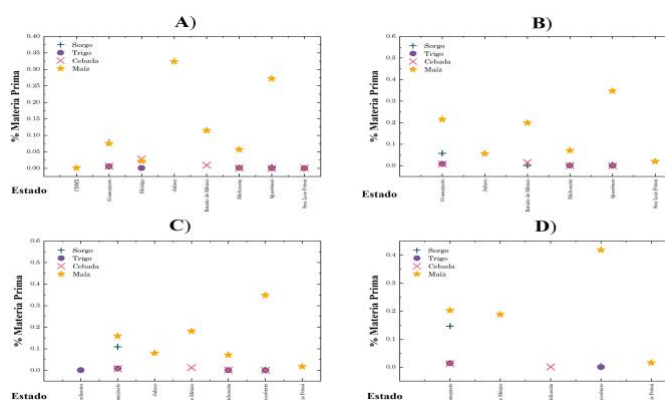


Figura 3: Contribución para cada materia prima de las diferentes fuentes: A) 2015, B) 2016, C) 2017, D) 2018, primavera-verano.

La Figura 5 muestra la máxima ganancia obtenida a lo largo de los años. Se observa que el cambio en la temporada no afecta considerablemente la ganancia, ya que la cantidad total de materia prima es la misma para las dos estaciones y las toneladas de ácido levulínico.

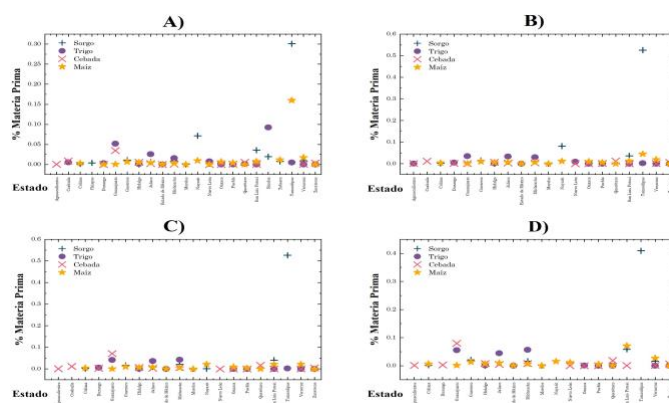


Figura 4: Contribución para cada materia prima de las diferentes fuentes: A) 2015, B) 2016, C) 2017, D) 2018, otoño-invierno.

producidas permanecen constantes a lo largo del año. Por otro lado, a medida que pasan los años se reduce la ganancia, que es causado por la reducción de la demanda de ácido levulínico

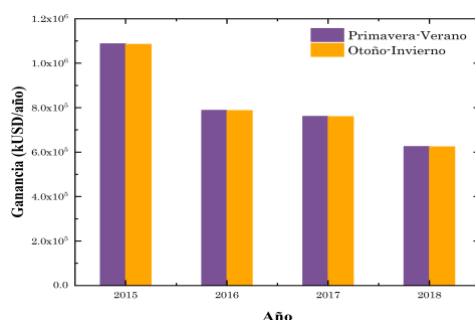


Figura 5: Variación en la ganancia máxima

Conclusiones

Se ha determinado que, para obtener la mayor ganancia, la biomasa debe utilizarse para producir productos de alto valor agregado, como el ácido levulínico. La ganancia depende en gran medida de la demanda de ácido levulínico, por lo que se deben considerar más productos de alto valor agregado para mejorar o mantener la ganancia. El desarrollo de tecnologías más eficientes es obligatorio para un mejor desempeño económico, aumentando el rendimiento y reduciendo los costos de producción. Además, se deben considerar materias primas adicionales, particularmente para la temporada otoño-invierno, donde la disponibilidad de residuos lignocelulósicos tiende a reducirse.

Bibliografía

- [1] Constagliola M. A., Prati M.V., Florio S., Scorletti P., Terna D., Iodice P., Buono D. y Senatore A. (2016) "Performances and emissions of a 4-stroke motorcycle fuelled with ethanol/gasoline blends", *Fuel*, 183, 470-477.
- [2] Zhang Q., Dong J., Liu Y., Wang Y. y Cao Y. (2016) "Towards a green bulk-scale biobutanol

- from bioethanol upgrading”, 2016, *J. Energy Chem.*,25,(6),907-910.
- [3] Carrillo-Nieves D., Rostro-Alanís M., De la Cruz-Quiroz R., Ruíz H. A., Iqbal H.M.N y Parra-Saldívar. (2019) “Current status and future trends of bioethanol production from agro-industrial wastes in Mexico”, *JRSE*,102,63-74.
 - [4] Pileidis F.D. y Titirici M.M. (2016) “Levulinic acid biorefineries: new challenges for efficient utilization of biomass”, *CHEMSUSCHEM*,9,562-582.
 - [5] Dalvand K., Rubin J., Gunukula S., Clayton-Wheeler M. y Hunt G.(2018) “Economics of biofuels: Market potential of furfural and its derivatives”, *Biomass Bioenergy*,115,56-63.
 - [6] Saval S. (2012) “Aprovechamiento de Residuos Agroindustria: Pasado, Presente y Futuro”, *Biotechnol*,16,(2),14-46.
 - [7] Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2020) “Anuario Estadístico de Producción Agrícola”. Recuperado de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
 - [8] Sistema de Información Energética (SIE). (2019) “Volumen de ventas internas de petrolíferos por entidad federativa”. Recuperado de: <http://sie.energia.gob.mx/movil.do?action=cuadro&cvecua=PMXE2C03>
 - [9] Petróleos Mexicanos (PEMEX). (2018) “Anuario Estadístico”. Recuperado de: [https://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Anuario%20Estadistico%20Archivos/anuario-estadistico 2018.pdf](https://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Anuario%20Estadistico%20Archivos/anuario-estadistico%202018.pdf)
 - [10] Mercado Libre. (2020) “3000 pacas de rastrojo de sorgo y de maíz”. Recuperado de: [https://articulo.mercadolibre.com.mx/MLM-776767869-3000-pacas-de-rastrojo-de-sorgo-y-de-maiz JM#position=1&type=item&tracking_id=373cabcd-850e-4e4d-97e3-e39d2a33c3f1](https://articulo.mercadolibre.com.mx/MLM-776767869-3000-pacas-de-rastrojo-de-sorgo-y-de-maiz-JM#position=1&type=item&tracking_id=373cabcd-850e-4e4d-97e3-e39d2a33c3f1)
 - [11] El Informador. (2019) “Serán siete las refinerías de México en 2022”. Recuperado de: <https://www.informador.mx/Seran-siete-las-refinerias-de-Mexico-en-2022-t201905090003.html>
 - [12] Sassner P., Galbe M. y Zacchi G. (2008) “Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials”, *Biomass Bioenergy*,32,422-430.
 - [13] Baral N.R. y Shah A. (2016) “Techno-Economic Analysis of Cellulosic Butanol Production from Corn Stover through Acetone–Butanol–Ethanol Fermentation”, *Energy Fuels*,30,5779–5790.
 - [14] Gozan M., Ryan B. y Krisnandi Y. (2018) “Techno-economic assessment of Levulinic Acid Plant from Sorghum Bicolor in Indonesia”, *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*,345,012012.
 - [15] Cai C.M., Zhang T., Kumar R. y Wyman C.E. (2013) “Integrated furfural production as a renewable fuel and chemical platform from lignocellulosic biomass”, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*,89,2-10.
 - [16] Arena República. (2019) “Etanol, a 17 pesos el litro, una alternativa ante el desabasto de gasolinas”. Recuperado de: <https://www.arenapublica.com/negocios/etanol-17-pesos-el-litro-una-alternativa-ante-el-desabasto-de-gasolinas>
 - [17] Appropedia. (2012) “Biobutanol as fuel”. Recuperado de: [https://www.appropedia.org/Biobutanol as fuel](https://www.appropedia.org/Biobutanol_as_fuel)
 - [18] Marketwatch. (2019) “Mercado de ácido levulínico 2019”. Recuperado de: <https://www.marketwatch.com/pressrelease/levulinic-acid-market-2019-global-industry-company-profile-brief-analysis-byregions-\growth-prospects-future-scope-and-trends-by-forecast-2024-2019-04-10>
 - [19] DalinYebo. (2014) “Furfural market prices”. Recuperado de: <https://dalinyebo.com/furfural-market-prices-2014/>
 - [20] MERCOSUR. (1999) “Estudio de integración regional en el transporte de carga”. Recuperado de: <http://www.oas.org/usde/publications/Unit/oea75s/begin.htm#Contents>
 - [21] Trespalacios F. y Grossman I.E. (2015) “Improved Big-M reformulation for generalized disjunctive programs”, *Comput. Chem. Eng.*,8,(76),98-103.

PAPEL DE LA REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE BASES EN LA ESPORULACIÓN DE *Bacillus subtilis*

Lissett E. Martínez Magaña^a, Valeria P. Suarez Castro^a, Norma Ramírez-Ramírez^a, Mario Pedraza Reyes^a

^aDepartamento de Biología. Universidad de Guanajuato. N. Alta S/N. Guanajuato, Gto. 36050, México.

Lissett_mm@outlook.com; pedrama@ugto.mx

Resumen

A pesar de que los mecanismos de reparación del ADN han sido extensamente estudiados en células en crecimiento de *B. subtilis*, en la actualidad se conoce poco respecto a la manera en la que las células esporulantes protegen su material genético para asegurar un eficiente proceso de esporulación. Un reporte reciente mostró que lesiones distorsionantes en el ADN de células esporulantes de *B. subtilis* emplean un mecanismo dependiente de Mfd que acopla la transcripción con la reparación por escisión de nucleótidos (NER). Interesantemente, en ausencia de factores externos que dañan al ADN, la sola ausencia de Mfd afectó el proceso de esporulación. Estos resultados apoyan la idea de que el procesamiento de lesiones espontáneas, incluidas la oxidación y desaminación de bases requiere de Mfd para una eficiente morfogénesis de la espora.

En este trabajo, se investigó la posible relación de Mfd con componentes del sistema de reparación por escisión de bases (BER) durante el proceso de esporulación en *B. subtilis*. Para abordar este aspecto, en células esporulantes de *B. subtilis* deficientes en las AP-endonucleasas Nfo, ExoA, Nth, se evaluó el impacto de la interrupción de *mfd* en la eficiencia de esporulación de *B. subtilis*.

Palabras clave: *B. subtilis*, esporulación, Mfd, AP-endonucleasas, REB.

Introducción:

B. subtilis posee la capacidad de formar endoesporas cuando se encuentra en ayuno nutricional [1,2]. Durante el proceso de esporulación, la copia cromosomal presente en los dos compartimentos de las células esporulantes no son replicados *de novo*. [3] Sin embargo, durante este proceso, se postula que los esporangios deben de mantener intacto sus cromosomas para asegurar la consecución del programa de expresión espacio-temporal de genes que conduce a la formación de la endoespora. [4,5]

Durante la esporulación el material genético de las células esporulantes puede ser amenazado por factores ambientales e intracelulares que atentan contra la eficiencia de este proceso de diferenciación celular. Debido a esto, ambos compartimentos del esporangio necesitan ser capaces de prevenir, eliminar e incluso tolerar daños genéticos que surjan durante la esporogénesis. [6,5] Pese a que durante este proceso no hay síntesis de ADN, reportes previos sugirieron que la reparación del ADN podría ser dirigida hacia los genes transcritos activamente. [6]

La inactivación de Mfd en *B. subtilis* afectó significativamente la eficiencia de esporulación aun cuando no hubo exposición a agentes genotóxicos externos, por lo que se postuló que las lesiones que surgen espontáneamente generadas por el metabolismo celular sean capaces de activar una vía de reparación dependiente de Mfd. [4]. Debido a que lesiones que surgen de manera espontánea no son sustrato del sistema NER, se propone que estas involucren al sistema BER mediado a través de Mfd.

Se ha reportado que durante la esporulación, *B. subtilis* es capaz de expresar genes involucrados en reparación y protección del ADN, incluyendo los que codifican a componentes del sistema NER, a la UV-endonucleasa YwjD, la liasa del fotoproducto de esporas, Spl, a RecA, las Y-DNA polimerasas YqjH y YqjW, así como al factor que acopla la reparación con la transcripción Mfd. Análisis genéticos y fisiológicos mostraron la participación de estos en proteger las células esporulantes de distintos agentes genotóxicos y citotóxicos [5, 6, 7]

Para contender con las lesiones 8-OxoG promovida por el estrés oxidativo, se conoce que los esporangios de *B. subtilis* cuentan con proteínas del sistema GO [8] así como con las AP-endonucleasas Nfo y ExoA [9], componentes importantes del sistema de reparación por escisión de bases (REB). En un estudio reciente se encontró que el gen *nth*, que codifica para una tercera AP-endonucleasa se expresa durante la germinación/eclosión de las esporas de *B. subtilis*. [10]

En el presente estudio se estudio la interacción genética de Mfd y las AP-endonucleasas Nfo, ExoA y Nth durante la esporulación de *B. subtilis*. [11]

Metodología:

Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Genotipo	Referencia
PERM311	168 (WT) trpC2	Stock del laboratorio del Dr. M. Pedraza-Reyes
PERM1309	$\Delta mfd::spc$ (Spc ^R)	Stock del laboratorio del Dr. M. Pedraza-Reyes
PERM1307	$\Delta nfo::neo \Delta exoA::tet \Delta nth::eri$ (Neo ^R Tet ^R Eri ^R)	Stock del laboratorio del Dr. M. Pedraza-Reyes
PERM1310	$\Delta nfo::neo \Delta exoA::tet \Delta nth::eri \Delta mfd::spc$ (Neo ^R Tet ^R Eri ^R Spc ^R)	Stock del laboratorio del Dr. M. Pedraza-Reyes

Determinación de la frecuencia de esporulación.

Se preparó un pre-inóculo de la cepa de interés crecido en un tubo de ensaye conteniendo 3 mL de medio LB suplementado o no con antibióticos, según se requirió. De este tubo se tomaron 150 μ L para inocular 15 mL de medio NSM suplementado con las sales correspondientes en un matraz estéril sin antibióticos. Este matraz se incubó en agitación (250 rpm) a 37 °C durante 24 h y posteriormente se recuperó el paquete celular centrifugando a 5000 $\times g$ a una temperatura de 25 °C durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó una vez más utilizando PBS. Finalmente, la pastilla fue resuspendida en 10 mL de PBS; a continuación, se prepararon diluciones decimales seriadas hasta el factor de dilución 10^{-7} . De dicha dilución se tomaron 100 μ L los cuales fueron sembrados en placas de medio sólido sin antibióticos. Posteriormente, este mismo tubo se colocó en un baño María a 80 °C durante 20 min y nuevamente se tomaron 100 μ L para sembrar en otra placa de medio sólido sin antibióticos. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C sin agitación; posteriormente, se realizó la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC) para posteriormente determinar el porcentaje de esporulación mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Esporulación} = (\text{UFC de células tratadas con calor} / \text{UFC de células no tratadas}) \times 100.$$

Resultados

Análisis de la frecuencia de esporulación de las cepas deficientes en Mfd y las AP-endonucleasas en células esporulantes de *Bacillus subtilis*.

Reportes anteriores mostraron que los esporangios de *B. subtilis* poseen proteínas de reparación, incluyendo a las DNA polimerasas de baja fidelidad YqjH/YqjW, Mfd, RecA y el sistema NER, necesarias para un eficiente proceso de esporulación, así como la presencia de Mfd. [6, 4, 7].

Para evaluar el papel de Mfd y las AP-endonucleasas durante el proceso de esporulación, se determinó la eficiencia de esporulación para cada una de las cepas mutantes *mfd*, *nfo* *exoA* *nth* y *mfd* *nfo* *exoA* *nth*, así como de la cepa parental.

Los resultados mostraron que, con respecto a la cepa silvestre la ausencia de Mfd disminuyó ligera pero significativamente la eficiencia de esporulación, cerca de un 20%, lo cual concuerda con lo reportado por Ramírez-Guadiana en 2013 [4]. Los resultados obtenidos de estos ensayos en la cepa, que carecía de las AP-endonucleasas Nfo ExoA y Nth mostró también una pequeña disminución en el porcentaje de esporulación (~50%) respecto a la cepa WT. Sin embargo, el efecto más notorio se presentó en la cuádruple mutante *mfd* *nfo* *exoA* *nth* ya que la frecuencia de esporulación disminuyó cerca de 50% en comparación con la cepa WT y cerca de 30%, respecto a las mutante *mfd* y *nfo* *exoA* *nth*. (**Figura 1**).

Estos resultados nos sugieren que lesiones generadas de manera espontánea como los sitios AP y roturas de cadena, principales sustratos de las proteínas Nfo, ExoA y Nth, del sistema

REB, afectan el proceso de esporulación y que la presencia de Mfd es necesaria para que estos sean procesados correctamente.

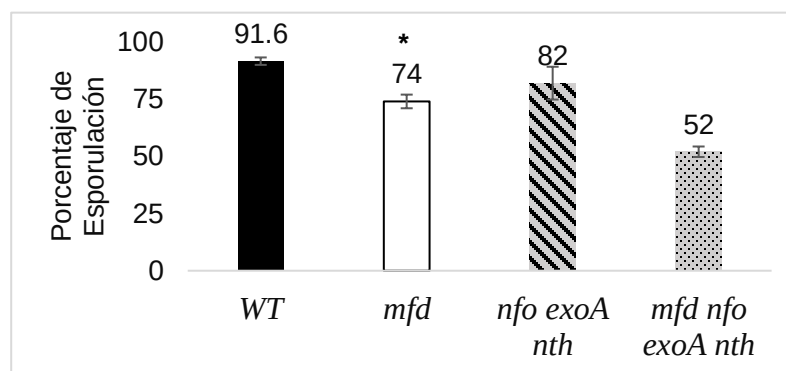


Figura 1. Porcentaje de esporulación de las cepas de *B. subtilis* carentes de Mfd y/o las AP-endonucleasas Nfo, ExoA y Nth comparadas con la cepa parental silvestre (WT). Cada barra representa el promedio de datos colectados a partir de tres experimentos independientes realizados por triplicado $\pm$ EE. [*] Indica diferencia significativa entre cepas determinado por ANOVA de una vía seguido por un test de Tukey $P < 0.05$

Conclusiones

La interrupción de *mfd* en el fondo genético *nfo exoA nth* afectó significativamente la esporulación de *B. subtilis*. Estos resultados apoyan la noción de que la acumulación de lesiones de ADN espontáneas que son sustratos del sistema REB son procesadas a través de Mfd con un impacto positivo en la esporogénesis de *B. subtilis*.

Agradecimientos

Trabajo financiado por CONACyT (Subsidio A1-S-27116) y la UG (Subsidio CIIC 228/2019 y 178/2020). LEMM, agradece la beca otorgada por CONACyT para la realización de este trabajo.

Bibliografía:

- [1] Piggot J. y Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis* *Microbiology* 7:579–586
- [2] Setlow, P. (2006). I will survive DNA protection in bacterial spores. 15, 14–16 (2006).
- [3] Veening JW, Murray H y Errington J (2009) A mechanism for cell cycle regulation of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 23:1959–1970.
- [4] Ramírez-Guadiana, F. H., Ayala-García V. M., Yasbin R. E., Robleto E. y Pedraza-Reyes M. (2013). Transcriptional coupling of DNA repair in sporulating *Bacillus subtilis* cells. *Molecular Microbiology* 90:1088–1099
- [5] Ramírez-Guadiana, F. H., Barajas-Ornelas, R. C., Corona- Bautista, S. U., Setlow P. y Pedraza-Reyes, M. (2016) The RecA-dependent SOS response is active and required for processing of DNA damage during *Bacillus subtilis* sporulation. *Plos One* 1–13
- [6] Rivas-Castillo AM, Yasbin RE, Robleto E, Nicholson WL y Pedraza-Reyes M (2010). Role of the Y-family DNA polymerases YqjH and YqjW in protecting sporulating *Bacillus subtilis* cells from DNA damage. *Curr Microbiol* 60:263–267.
- [7] Ramírez-Guadiana, F. H., Barraza-salas, M., Ramírez-Ramírez, N., Ortiz-cortés, M., Setlow, P. y Pedraza-Reyes, M. (2012). Alternative excision repair of ultraviolet B- and C-induced DNA damage in dormant and developing spores of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriology* 194:6096–6104.

- [8] Ramírez, M. I., Castellanos-jua, F. X., Yasbin, R. E. y Pedraza-Reyes, M. (2004). The *ytkD* (*mutTA*) Gene of *Bacillus subtilis* encodes a functional antimutator 8-Oxo- (dGTP/GTP) ase and is under dual control of sigma A and sigma F RNA polymerases. *J. Bacteriology* 186:1050–1059
- [9] Ibarra, J. R., Orozco, A. D., Rojas, J. A., López, K., Setlow, P., Yasbin, R. E., y Pedraza-Reyes, M. (2008). Role of the Nfo and ExoA apurinic/apyrimidinic endonucleases in repair of DNA damage during outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, 190(6), 2031-2038.
- [10] Ramírez Guadiana FH y Pedraza Reyes, M (2013). Analisis de la expresión del gen *nth* involucrado en la reparación del material genetico durante el ciclo de vida de *Bacillus subtilis*, Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato. Tesis de licenciatura.
- [11] Suarez-Castro, V.P y Pedraza Reyes, M. (2018). Acoplamiento transcripcional de la reparación por escisión de bases en células esporulantes de *Bacillus subtilis* (Tesis de Maestría) Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

PARTICIPACIÓN DEL GEN *EHaSM4* EN LA RESPUESTA AL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO O CHOQUE TÉRMICO EN *Entamoeba histolytica*

Lizbeth Karina Cervantes-Velázquez^a, Fátima Berenice Ramírez-Montiel, Bernardo Franco, Ángeles Rangel-Serrano, Itzel Páramo-Pérez, Luis Fernando Anaya-Velázquez, Luis Felipe Padilla-Vaca^b

^a Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, Lascuráin de Retana No. 5, Guanajuato, Guanajuato, 36100, MÉXICO. lk.cervantesvelazquez@ugto.mx.

^b Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, Lascuráin de Retana No. 5, Guanajuato, Guanajuato, 36100, MÉXICO. padillaf@ugto.mx.

Resumen

Entamoeba histolytica es un patógeno que durante el proceso infectivo está expuesto a ambientes altamente oxidantes y especies reactivas de oxígeno (ROS), en donde la membrana plasmática (MP) es el primer blanco expuesto y cuyo daño puede comprometer la integridad de las amibas. En respuesta, la amiba posee mecanismos enzimáticos para detoxificarse de las ROS y se ha sugerido que podría reparar el daño ocasionado en su MP. Se ha descrito en células de mamífero que las esfingomielinasas ácidas (aSMasas) participan en la reparación del daño a la MP ocasionado por una toxina formadora de poros y por peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En *E. histolytica* se ha descrito un mecanismo de reparación de MP mediado por aSMasas en respuesta al daño causado por moléculas formadoras de poros, donde se incrementó la expresión de 4 de los 6 genes que codifican para aSMasas. Al evaluar la participación de las aSMasas en la respuesta al estrés oxidativo, se incrementó la expresión de todos los genes de aSMasas, y en particular el gen *EhaSM4*, por lo que en el presente trabajo nos enfocamos a evaluar la participación de este gen en respuesta al estrés oxidativo generado por H₂O₂ o choque térmico. Los trofozoítos que sobreexpresan el gen *EhaSM4* (cepa HM1-SM4HA) secretan tres veces mayor actividad de aSMasa con respecto a la cepa control, y ambas cepas incrementan su actividad de aSMasa secretada cuando se exponen a diferentes concentraciones de H₂O₂ o cuando se incuban a 42°C a diferentes tiempos. Este aumento en la actividad secretada ya sea con H₂O₂ o con choque térmico se correlaciona con una mayor expresión de los seis genes de aSMasas, en particular del *EhaSM4* y del *EhaSM6*. Además, la sobreexpresión del gen *EhaSM4* favorece la supervivencia de los trofozoítos de *E. histolytica* cuando se exponen a H₂O₂ o a choque térmico. Por lo anterior, se propone que las aSMasas son selectivas para diferentes tipos de estrés celular, participando el gen *EhaSM4* en la respuesta a estrés oxidativo. Además, la mayor viabilidad de los trofozoítos expuestos al estrés oxidativo en la cepa que sobreexpresa el gen *EhaSM4* sugiere que las aSMasas podrían estar involucradas en el proceso patogénico de *E. histolytica*.

Palabras clave: *Entamoeba histolytica*, esfingomielinasas ácidas, estrés oxidativo.

Introducción

La amibiasis intestinal es una enfermedad ocasionada por el parásito *Entamoeba histolytica*. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, esta patología causa entre 40,000 y 100,000 muertes por año, lo que la sitúa como una de las principales causas de muerte por parasitosis alrededor del mundo [1]. La infección es un proceso multifactorial en el que la adaptación es la clave para la supervivencia del parásito, que está dictada por moléculas específicas y mecanismos para enfrentar el sistema inmunológico del huésped. Cuando los trofozoítos superan la barrera del moco intestinal, las células epiteliales secretan potentes mediadores proinflamatorios y quimiocinas que reclutan células inmunes, como los neutrófilos, que liberan ROS [2] y macrófagos activados que liberan NO [3], ambos dañando la MP por oxidación de lípidos [4]. Durante el desarrollo temprano de la infección, *E. histolytica* contrarresta el aumento de O₂ encontrado en el torrente sanguíneo y las ROS con una variedad de enzimas antioxidantes, como la NADPH: flavina oxidorreductasa [5], superóxido dismutasa de hierro [6], rubreritrina y peroxirredoxina [7], que convierten H₂O₂ en H₂O.

La esfingomielina (SM), un esfingolípido presente en las membranas plasmáticas es hidrolizada por las esfingomielinasas (SMasas), produciendo ceramida y fosforilcolina. Las SMasas se clasifican en función de su pH óptimo de actividad [8]. Se ha descrito en células de mamífero que las esfingomielinasas ácidas (aSMasas) participan en la reparación del daño a la MP ocasionado por una toxina formadora de poros [9] y por H₂O₂ [10]. El análisis del genoma de *E. histolytica* reveló la presencia de seis genes que codifican para aSMasas, las cuales se transcriben activamente en el parásito [11]. Los trofozoítos de *E. histolytica* tratados con moléculas formadoras de poros mostraron un aumento en la actividad secretada de aSMasa y los trofozoítos que sobreexpresan el gen de la aSMasa6 expuestos a éstas exhibieron un aumento significativo en la actividad secretada de aSMasa que correlacionó con una mayor viabilidad amibiana en un proceso dependiente de Ca²⁺. Las moléculas formadoras de poros permiten la entrada de Ca²⁺ extracelular, esto favorece la migración de los lisosomas a la periferia de la célula, se fusiona con la membrana plasmática y los lisosomas vierten su contenido de aSMasas produciendo ceramida y favoreciendo la internalización de la lesión para su degradación en fagolisosomas. Los poros generados por el daño a la MP se bloquean por estructuras en forma de parche de lisosomas y endosomas que evitan la lisis del trofozoíto [12]. De acuerdo con los datos preliminares del grupo de trabajo [12], el H₂O₂ indujo un aumento de la secreción de aSMasa en *E. histolytica* y se observó aumentó en la expresión de los seis genes que codifican para aSMasas, en particular el gen *Ehasm4* que no aumentó su expresión ante daño con moléculas formadoras de poro. Dado lo anterior se sugiere que la participación de aSMasas en *E. histolytica* podría ser selectiva a diferentes tipos de estrés celular. Por lo que en el presente trabajo se evaluó el gen *Ehasm4* en la respuesta al estrés oxidativo generado por H₂O₂ o choque térmico.

Metodología

Generación de trofozoítos E. histolytica transfectantes que sobreexpresan aSMasa4: La secuencia de codificación de la aSMasa4 amibiana se obtuvo por PCR a partir del DNA

genómico de *E. histolytica* de la cepa HM1:IMSS usando oligonucleótidos sentido y antisentido que contienen los sitios de restricción apropiados. El producto de PCR se clonó en pGEM-T (Promega) y posteriormente en el vector de expresión pEhEx y se añadió una etiqueta de hemaglutinina (HA) en el extremo C-terminal de la aSMasa [13]. Se transfectaron trofozoítos HM1:IMSS con la construcción paSM4HA mediante transfección mediada por liposomas [14]. Los transfectantes que sobreexpresan se seleccionaron con 60 μg / ml de G418 y se mantuvieron como líneas celulares estables HM1-SM4HA. La sobreexpresión del gen *EhaSM4* se determinó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Ensayo de la actividad aSMasa secretada en E. histolytica: Se recolectaron trofozoítos en la fase exponencial de crecimiento. Se colocaron 3×10^5 amebas por pocillo de una placa de cultivo celular de 24 pocillos y se incubaron a 37°C en TYI-S-33 durante 2 h. Los trofozoítos adheridos se incubaron adicionalmente en 500 μL de medio DMEM con Ca^{+2} (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) a 37°C durante el tiempo indicado. Después de cada tiempo de incubación, se colectó el sobrenadante libre de células y se determinó la actividad de aSMasa secretada usando el kit de ensayo Amplex Red Sphingomyelinase Assay.

Inducción de estrés oxidativo en trofozoítos de E. histolytica por la adición de H_2O_2 y por choque térmico: Las amibas adheridas en una placa de cultivo celular de 24 pocillos se incubaron en medio DMEM con Ca^{2+} y diferentes concentraciones de H_2O_2 (Se añadieron 0, 0.1, 0.2, 0.5 y 1 mM). Las amibas se incubaron durante 10 min para inducir estrés oxidativo en las células. Pasado este tiempo, se evaluó la actividad aSMasa presente en los sobrenadantes. Para el choque térmico se incubaron las amibas a 42°C durante 30, 60 y 90 min. Pasado este tiempo, se evaluó la actividad aSMasa presente en los sobrenadantes.

Ensayos de viabilidad celular: Una vez expuestos los trofozoítos al H_2O_2 o choque térmico, se determinó la viabilidad de las amibas por medio de ensayos de crecimiento en cultivo. Brevemente, los trofozoítos se cosecharon en condiciones en esterilidad, se colocaron en una placa multipozos con medio DMEM con Ca^{2+} y se le sometió a estrés. Se recuperaron los trofozoítos, se sembraron en 6 mL de medio TYI-S-33 y se incubaron a 37 °C durante 24 h. El número de trofozoítos se determinó por conteo directo.

Resultados

Se evaluó el efecto del H_2O_2 sobre la actividad de aSMasa secretada en trofozoítos de las cepas HM1-HA (cepa control con el plásmido vacío) y HM1-SM4HA (cepa sobreexpresante). Se probaron diferentes concentraciones de H_2O_2 (0, 0.2, 0.5 y 1 mM). En ambas cepas, la actividad de aSMasa se incrementó en todas las concentraciones probadas alcanzando un máximo de 19 veces en comparación con la condición control en la cepa HM1-HA y de 15 veces en la cepa HM1-SM4HA con respecto a su propio control. La actividad de aSMasa secretada en la cepa HM1-SM4HA después de la exposición a H_2O_2 , con la concentración de 0.2 y 0.5 mM, es de 35% más que en la cepa HM1-HA (Figura 1A).

Para determinar si la sobreexpresión del gen *EhaSM4* participa en el mantenimiento de la viabilidad de las amibas, ambas cepas se expusieron a distintas concentraciones de H_2O_2 (0.2, 0.5 y 1 mM) por 10 min y se cultivaron por 24 h. Se determinó su viabilidad por crecimiento en cultivo. Observando para todas las concentraciones una disminución en el porcentaje de viabilidad de trofozoítos expuestos a H_2O_2 con respecto a su control sin tratamiento. Sin embargo, para la cepa HM1-SM4HA fue menor el daño ocasionado por H_2O_2 mostrando una relación directa entre los niveles de la actividad secretada de aSMasa en la cepa HM1-SM4HA y el porcentaje de viabilidad de los trofozoítos (Figura 1B).

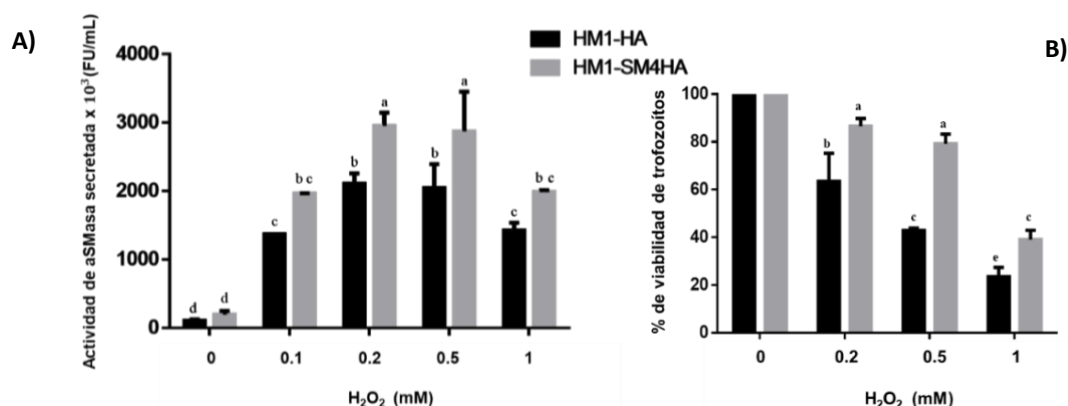


Figura 1 Efecto del H_2O_2 sobre la secreción de la actividad de aSMasa y viabilidad. A). Actividad secretada de aSMasa por trofozoítos expuestos a H_2O_2 . B). Viabilidad de los trofozoítos expuestos a H_2O_2 . El porcentaje (%) indica la viabilidad de los trofozoítos tomando como referencia a la cepa control no dañada.

Se evaluó el efecto del H_2O_2 en trofozoítos de las cepas HM1-HA y HM1-SM4HA sobre los niveles de transcripción de los genes aSMasas en trofozoítos expuestos a 0.5 mM H_2O_2 (Tabla 1).

Tabla 1. Los niveles de expresión de genes cuantitativos *EhaSM* de *E. histolytica* en respuesta a la exposición al peróxido de hidrógeno

Gen	Cepa	HM1-HA	HM1-HA+ H_2O_2	HM1-SM4HA	HM1-SM4HA+ H_2O_2
<i>EhaSM1</i>		1	2.95 ± 0.83	0.83 ± 0.10	3.08
<i>EhaSM2</i>		1	3.69 ± 0.73	0.76 ± 0.30	3.11
<i>EhaSM3</i>		1	3.23 ± 0.47	0.92 ± 0.19	3.04
<i>EhaSM4</i>		1	6.13 ± 0.30	4.56 ± 0.38	9.04
<i>EhaSM5</i>		1	5.72 ± 0.18	1.45 ± 0.27	5.62
<i>EhaSM6</i>		1	8.01 ± 0.91	1.46 ± 0.27	7.10

Los datos se normalizaron utilizando el método $\Delta\Delta CT$ contra el gen GADPH. La relación de expresión de la cepa HM1-HA de control se establece en 1.0 y los valores representan el pliegue de la sobreexpresión. * Trofozoitos tratados con 0.5 mM de peróxido de hidrógeno durante 10 minutos a 37 °C.

Se evaluó el efecto del choque térmico sobre la secreción de la actividad de aSMasa en trofozoítos de las cepas HM1-HA y HM1-SM4HA. Los trofozoítos fueron incubados a

diferentes tiempos (30 y 60 min) a una temperatura de choque térmico (42°C). En ambas cepas, la actividad de aSMasa se incrementó en todos los tiempos evaluados, siendo mayores en la cepa HM1-SM4HA mostrando un incremento de hasta 53% en los niveles de actividad de aSMasa secretada.

En la cepa HM1-HA se observó un incremento de 20 veces la actividad de aSMasa secretada tanto para los 30 como 60 min de incubación a 42°C en comparación con su control, mientras que la cepa HM1-SM4HA presentó un incremento de 13 veces con respecto a su control. (Figura 2A). Luego del tratamiento con choque térmico, las amibas se colocaron en medio de cultivo y después de 24 h se determinó su viabilidad por crecimiento del cultivo. Los trofozoítos de la cepa HM1-HA y HM1-SM4HA que se expusieron a 42°C (30, 60 y 90 min) mostraron una disminución gradual de la viabilidad en las condiciones probadas. Observando menor daño en la cepa HM1-SM4HA (Figura 2B).

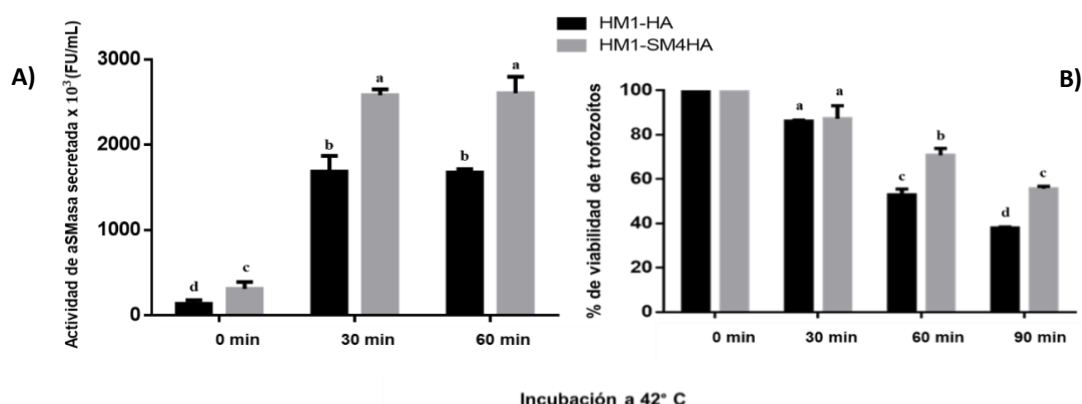


Figura 2. Efecto de choque térmico sobre la secreción de la actividad de aSMasa y viabilidad. A) Actividad secretada de aSMasa por trofozoítos expuestos a diferentes tiempos (30 y 60 min a 42°C). B) Viabilidad de los trofozoítos expuestos a choque térmico. El porcentaje (%) indica la viabilidad de los trofozoítos tomando como referencia a la cepa control no dañada.

Se evaluó el efecto del choque térmico en trofozoítos de las cepas HM1-HA y HM1-SM4HA sobre los niveles de transcripción de los genes aSMasas en trofozoítos expuestos a 30 min a 42°C (Tabla 2). Mostrando un incremento en los niveles de expresión de los genes aSMasas principalmente en el *EhaSM4* y *EhaSM6*.

Tabla 1. Los niveles de expresión de genes cuantitativos *EhaSM* de *E. histolytica* en respuesta a la exposición al choque térmico

Cepa	HM1-HA	HM1-HA+ 42°C	HM1-SM4HA	HM1-SM4HA+ 42°C

Los datos se normalizaron utilizando el método $\Delta\Delta CT$ contra el gen *GADPH*. La relación de expresión de la cepa HM1-HA de control se establece en 1,0 y los valores representan el pliegue de la sobreexpresión. * Trofozoítos incubados a 42°C por 30 min.

<i>Gen</i>				
<i>EhaSM1</i>	1	3.46 ± 0.40	0.83 ± 0.10	4.85
<i>EhaSM2</i>	1	3.58 ± 0.07	0.76 ± 0.30	3.31
<i>EhaSM3</i>	1	2.61 ± 0.53	0.92 ± 0.19	3.76
<i>EhaSM4</i>	1	3.99 ± 0.09	4.56 ± 0.38	8.76
<i>EhaSM5</i>	1	3.21 ± 0.31	1.45 ± 0.27	3.00
<i>EhaSM6</i>	1	4.28 ± 1.26	1.46 ± 0.27	3.06

Conclusiones

El peróxido de hidrógeno o el choque térmico aumentan la actividad secretada de aSMasa en trofozoítos de *E. histolytica*, lo que se correlaciona con una mayor expresión de los seis genes que codifican para aSMasas. La sobreexpresión del gen *EhaSM4* favorece la supervivencia de los trofozoítos de *E. histolytica* cuando se exponen al peróxido de hidrógeno o al choque térmico, lo que se correlaciona con un aumento de la actividad de la aSMasa secretada con respecto al control. El mayor porcentaje de trofozoitos viables expuestos al estrés oxidativo en la cepa que sobreexpresa el gen *EhaSM4* sugiere que la aSMasa4 podría estar participando como un determinante de virulencia de *E. histolytica*.

Bibliografía

- [1] Turkeltaub JA, McCarty TR III, Hotez PJ. The intestinal protozoa: emerging impact on global health and development. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015;31(1):38–44.
- [2] Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA, Mandell GL. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. *J Infect Dis*. 1981;143(1):83–93.
- [3] Lin J-Y, Seguin R, Keller K, Chadee K. Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene. *Infect Immun*. 1994;62(5):1534–41.
- [4] Olivos-García, A., Saavedra, E., Nequiz, M., Santos, F., Luis-García, E. R., Gudiño, M., & Pérez-Tamayo, R. 2016. The oxygen reduction pathway and heat shock stress response are both required for *Entamoeba histolytica* pathogenicity. *Current genetics*, 62(2), 295-300.
- [5] Bruchhaus, I., Richter, S., and Tannich, E. 1998. Recombinant expression and biochemical characterization of an NADPH:flavin oxidoreductase from *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* 330: 1217–1221.
- [6] Tannich, E., Bruchhaus, I., Walter, R.D., and Horstmann, R.D. 1991. Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. *Mol Biochem Parasitol* 49: 61–71.
- [7] Bruchhaus, I., Richter, S., and Tannich, E. 1997. Removal of hydrogen peroxide by the 29 kDa protein of *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* 326: 785–789.
- [8] Hannun, Y. A., y Obeid, L. M. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(2), 139.
- [9] Tam C, Idone V, Devlin C, Fernandes MC, Flannery A, He X, et al. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J Cell Biol*. 2010;189(6):1027–38.
- [10] Ferranti CS, Jin C, Thompson C, Zhang J, Rotolo J, Buddaseth S, Zvi F, Kolesnick R. 2020. Fusion of lysosomes to plasma membrane initiates radiation-induced apoptosis. *J Cell Biol* 219 (4): e201903176.
- [11] Mendoza-Macías, C. L., Barrios-Ceballos, M. P., Anaya-Velázquez, F., NakadaTsukui, K., Nozaki, T., y Padilla-Vaca, F. 2010. *Entamoeba histolytica*: molecular cloning and characterization of a novel neutral sphingomyelinase. *Exp. Parasitol.*, 125(3), 279-285.

- [12] Ramírez-Montiel, F., Mendoza-Macías, C., Andrade-Guillén, S., Rangel-Serrano, Á., Páramo-Pérez, I., Rivera-Cuéllar, P. E., ... & Padilla-Vaca, F. 2019. Plasma membrane damage repair is mediated by an acid sphingomyelinase in *Entamoeba histolytica*. PLoS pathogens, 15(8).
- [13] Saito-Nakano Y, Yasuda T, Nakada-Tsukui K, Leippe M, Nozaki T. Rab5-associated vacuoles play a unique role in phagocytosis of the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. J Biol Chem. 2004;279(47):49497–507.
- [14] Mendoza-Macías CL, Barrios-Ceballos MP, Anaya-Velázquez F, Nakada-Tsukui K, Nozaki T, Padilla-Vaca F. *Entamoeba histolytica*: Molecular cloning and characterization of a novel neutral sphingomyelinase. Exp Parasitol. 2010;125(3):279–85.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS: EFECTO DEL SOPORTE MESOPOROSO

Perla Judith Pérez-Díaz^a, Beatriz Ruiz-Camacho^a, Adriana Medina-Ramírez^a

^a Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Guanajuato, DCNE, Col. Noria Alta s/n, Guanajuato, Guanajuato, C.P. 36050, MÉXICO. pperezdiaz01@gmail.com

Resumen

Se realizó la síntesis de tres sustratos compuestos por zeolita X:carbón en proporciones de 3:1, 1:1 y 1:3 con el objetivo de ser empleados como soporte de nanopartículas metálicas de Pt para su aplicación en celdas de combustible. La caracterización física demostró que la adición de la zeolita X al carbón Vulcan aumenta el tamaño de poro cuando se aumenta la cantidad de zeolita, adquiriendo de este modo sustratos mesoporos. De manera análoga se encontró que los sustratos de zeolita:carbón 3:1 y 1:1 tienen la mejor distribución metálica concluyendo que la adición de la zeolita X mejora la dispersión de las nanopartículas de Pt.

Palabras clave: Zeolita X, carbón Vulcan, soporte, platino, electrocatalizadores.

Introducción

De entre los problemas que el mundo afronta en la actualidad, el cambio climático derivado como consecuencia de las emisiones de gases de efecto invernadero es uno de los de mayor impacto y de mayor necesidad a atender. Este problema ha guiado a la búsqueda de tecnologías que sean capaces de incrementar la eficiencia de la conversión de la energía y de eliminar las emisiones; un ejemplo de esto son las celdas de combustible. Existen diferentes tipos de celdas de combustible de acuerdo con la aplicación que se le desea dar, entre ellas se encuentran las celdas de combustible tipo PEM. En una celda de este tipo se llevan a cabo la reacción anódica de oxidación de hidrógeno (o del combustible líquido) y la reacción catódica de reducción de oxígeno, cada una en su respectiva capa de catalizador. Debido a que la eficiencia de estas reacciones depende del electrocatalizador, estos juegan un papel crítico en el desempeño de las celdas de combustible [1]. Se ha demostrado que el platino (Pt) es el catalizador más eficiente para estas reacciones. Usualmente el catalizador de Pt es dispersado en pequeñas partículas sobre la superficie de algún material con partículas más grandes que actúan como soporte, conocido como polvo de carbón. El más usado es carbón Vulcan XC72. De esa forma el Pt es altamente dividido y esparcido de tal manera que una gran proporción del área superficial estará en contacto con el reactante, dando como resultado una gran reducción de la carga de catalizador con un aumento de potencia [2]. Sin embargo, el uso del carbón bajo condiciones ácidas más las condiciones de operación, tiende a corroerse y degradarse dañando la eficiencia de la celda [3] orientando las reacciones a los subproductos. Este trabajo se centra en esta problemática, y para solucionar la inestabilidad del soporte se propuso el uso de un segundo material que le brindará estabilidad y una mejor

dispersión de partículas metálicas en el soporte de base carbón. El material propuesto son las zeolitas.

Las zeolitas son materiales inorgánicos nanoporosos cristalinos formados por tetraedros TO_4 donde T puede ser Si, Al, P, entre otros. [4], pero principalmente Si y Al. Consisten en una estructura cristalina construida de $[\text{AlO}_4]^{5-}$ y $[\text{SiO}_4]^{4-}$, enlazados juntos de tal manera que los cuatro átomos del oxígeno en las esquinas de cada tetraedro son compartidos con los cristales tetraedricos adyacentes. El ángulo de enlace β entre los enlaces Si-O-Al en la estructura cristalina de la zeolita juega un papel muy importante en contra de la corrosión de la superficie en medio ácido. Además de la resistencia a la corrosión, las zeolitas pueden mejorar la dispersión de las partículas metálicas del Pt debido a su alta selectividad y gran capacidad de adsorber y retener agua sin dañar la estructura ordenada de la zeolita [5]. En este trabajo se utiliza a la zeolita X, de la familia Faujasita, las cuales tiene las unidades cuboctaédricas de 24 tetraedros (cajas de sodalita) conectadas a través de prismas hexagonales (seis anillos dobles) formando una estructura de canal poroso tridimensional a lo largo. Estos se caracterizan por aberturas de ventana de 12 anillos de oxígeno con la apertura de 8 Å y super cajas de aproximadamente 12 Å. La combinación de un gran volumen de huecos y grandes aberturas de poros en un sistema de canales tridimensionales hace que la estructura molecular térmicamente estable de FAU sea ideal para muchas aplicaciones catalíticas, de intercambio iónico y de adsorción [6].

El objetivo de este trabajo es el estudio del efecto de la zeolita sobre carbón Vulcan XC72 en diferentes relaciones zeolita:carbón para ser usados como soporte de nanopartículas de Pt, buscando de esta forma mejorar el soporte de los electrocatalizadores de las celdas de combustible.

Metodología

Síntesis del soporte Zeolita X-C

El soporte de Zeolita X-C fue preparado en diferentes relaciones en peso: 3:1, 1:1 y 1:3, etiquetados como sustrato 1, sustrato 2, y sustrato 3. Primero la mezcla de zeolita y carbón se homogeneizó con 10 mL de agua agitando por 10 min. Después la mezcla se pasó a un baño ultrasónico por 10 min, posteriormente manteniéndose en agitación se le añadieron 2.1 mg de hidróxido de aluminio. La mezcla se mantuvo en agitación por 24 h. Posteriormente, se filtró y se secó a 60 °C por 24 h. El producto obtenido se sometió a un tratamiento térmico en mufla a 300°C por 3 h utilizando una rampa de calentamiento de 5 °C/min. Finalmente se recuperó el sólido, correspondiente al soporte zeolita X-carbón.

Preparación de los electrocatalizadores de Pt/zeolita X-C

La preparación de las nanopartículas de Pt se realizó mediante el método reportado en Ruiz-Camacho et al. [7]. De manera resumida se preparó una solución 0.5 mM de ácido hexacloroplatínico, se añadieron 85 mg de los sustratos/soportes previamente preparados y

60 ml de alcohol isopropílico. Esta solución se llevó a un baño ultrasónico a 42 kHz por 2 h. Por último, el solvente fue removido por evaporación.

Caracterización físicoquímica

Para identificar las fases cristalinas presentes l, las muestras se caracterizaron mediante DRX utilizando un difractómetro de rayos X modelo PANalytical con una fuente de radiación Cu K α ($\lambda=1.5406$ Å) en el rango de $10-80^\circ 2\theta$. Se realizó esta técnica de caracterización a los soportes con y sin partículas metálicas. Se realizaron pruebas de fisisorción de nitrógeno para conocer el tamaño y distribución de los poros del soporte. Por otro lado, la morfología y dispersión metálica de los electrocatalizadores fue estudiada mediante TEM usando un microscopio de campo de emisión TEM JEOL 1010, operado a 80 kV.

Resultados

Los patrones de DRX correspondientes a los soportes zeolita-carbón se muestran con fines comparativos en la Figura 1. Se puede observar que mientras más contenido de carbono en el soporte, la cristalinidad de la zeolita disminuye. Esto se observa en la intensidad de los picos, los cuales están identificados con círculo y corresponden a aquellos característicos de la zeolita X, de acuerdo a la base de datos de la carta JCPDS-39-0218. Por otro lado, la fase cristalina del carbono se detectó alrededor de 25° de 2θ con un pico no definido debido a que el carbono es un material amorfo. Esta señal es más pronunciada para el sustrato 3, debido a que es el material con más contenido de carbono. En el sustrato 1 este pico pasa casi desapercibido, al ser el material con menos contenido de carbono y el que tiene a la zeolita X más cristalina. Lo más destacado de estos resultados es saber que la estructura de la zeolita, si bien se afecta con la presencia del carbón, está presente proporcionando sus micro y mesoporos, más sus cajas y canales que ayudarán a la dispersión de las nanopartículas metálicas [8].

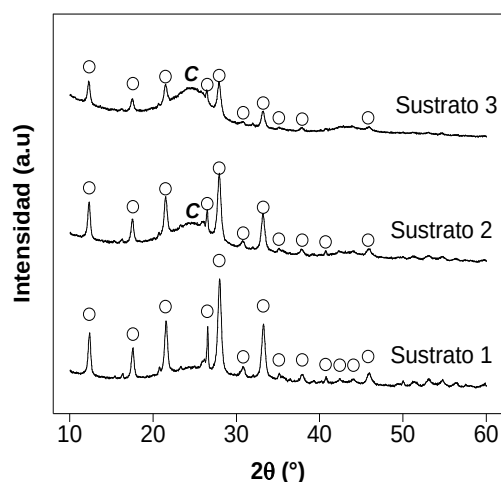


Figura 1. Patrones de difracción de rayos X (DRX)

La Figura 2 corresponde a las isoterma de fisisorción de nitrógeno. Para el caso de los sustratos, estos presentan una isoterma tipo III la cual parece ser convexa al eje p/p^0 sobre el rango completo y por tanto no hay un punto B (el comienzo de la sección casi lineal). Mientras menos perceptible sea este punto es una indicación de una cantidad significativa de superposición de cobertura de la monocapa y del inicio de adsorción multicapa. Los ciclos de histéresis aparecen en todo el rango de fisisorción y están generalmente asociadas con el llenado y vaciado de los mesoporos. Se encontró que el ciclo de histéresis bien definido solo lo presentó el sustrato 2, siendo este ciclo de histéresis un tipo H3. Los ciclos de este tipo están dados por agregados no rígidos de partículas en forma de placa, pero también si la red de poros consiste en macroporos que no están completamente llenos de condensado de poros [10, 11]. Con lo que respecta al área superficial específica se encontró que $\text{Sustrato 3} > \text{Sustrato 2} > \text{Sustrato 1}$, teniendo valores de 211.047, 173.255 y 105.627 m^2/g respectivamente, sin embargo, se sabe que el área superficial específica disminuye con la presencia de mesoporos, lo que significa que los sustratos 1 y 2 son más mesoporosos que el sustrato 3. Relacionando este dato con el contenido de carbón, se puede decir que mientras más carbón tiene el sustrato existe una mayor presencia de microporos, y que este incremento de mesoporosidad se debe a la zeolita. Esto también se comprueba con el tamaño promedio de poro encontrado de 6.318, 7.038 y 5.886 nm para Sustrato 1, Sustrato 2 y Sustrato 3, respectivamente.

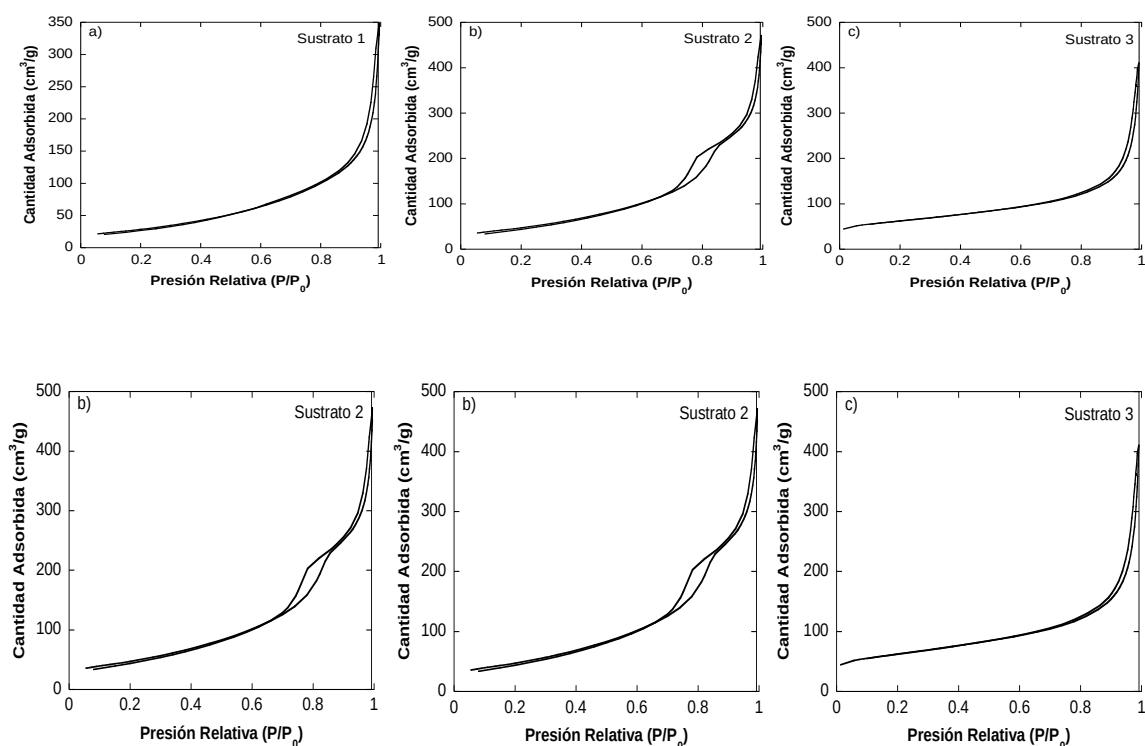


Figura 2. *Isotermas de fisisorción de nitrógeno*

Por otro lado, en la Figura 3 se muestran las micrografías obtenidas mediante TEM de los electrocatalizadores. Se observa una mejor dispersión de las nanopartículas metálicas en los materiales que poseen mayor contenido de zeolita X, es decir, en los electrocatalizadores cuyo soporte son el sustrato 1 y sustrato 2. Este comportamiento se le atribuye a la estructura de la zeolita X la cual ofrece sitios activos interconectados por el oxígeno para mejorar la dispersión y nucleación del Pt [5]. Además, provee de un gran número de mesoporos, a los que se les atribuye el aumento del tamaño de partícula y el mejoramiento de la dispersión del Pt, y por tanto un mejoramiento de la reacción electroquímica que se lleve a cabo, en este caso se trata de la reacción de oxidación del metanol. La formación de aglomerados de gran tamaño se le atribuye al carbón, ya que durante el proceso de síntesis los enlaces de Pt con los grupos funcionales del oxígeno

presentes en la superficie del carbono se ven afectados y esto conlleva a la aglomeración del Pt [11].

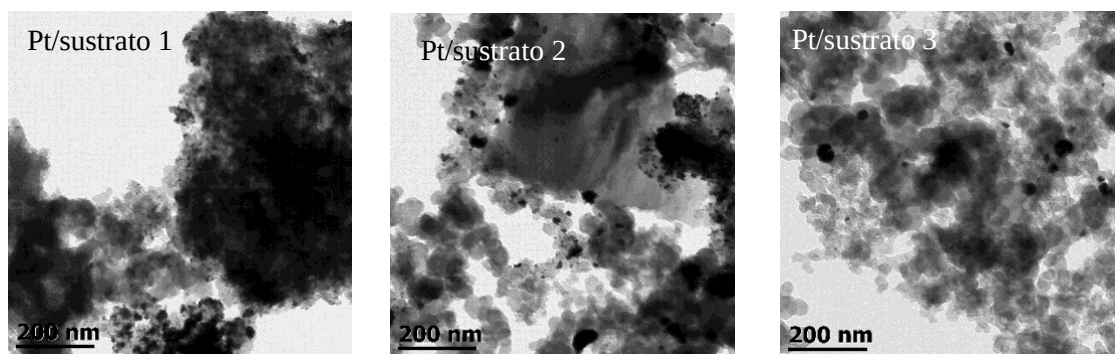


Figura 3. Micrografías de TEM

Después de la incorporación de las nanopartículas metálicas, estos materiales están destinados a usarse en la reacción de oxidación de metanol en el ánodo en una DMFC, como se mencionó anteriormente. Esta reacción se lleva a cabo en medio ácido y es importante mencionar que dentro de las razones de la elección de la zeolita X como segundo material en el soporte catalítico se debe a que el tratamiento ácido no afecta significativamente la estructura ni causa cambios morfológicos aparte de la formación de grupos hidroxilo (-OH) dentro de la red de silicio, al contrario, remueve las especies de aluminio externo que se encuentran en la superficie y se incrementa la cantidad de microporos significativamente cuando la acidez incrementa también. Las zeolitas dealuminadas son más estables en medio ácido sugiriendo un compromiso entre el contenido de aluminio y el rendimiento del catalizador para lograr una alta actividad y estabilidad a largo plazo [12].

Conclusiones

Se realizó la síntesis de tres soportes catalíticos de zeolita X-carbón en diferentes relaciones para probar el efecto de la zeolita. Se comprobó que la estructura cristalina de la zeolita se mantiene a lo largo de las tres relaciones, sin embargo, en una proporción 1:3 de zeolita:carbón, la cristalinidad de la zeolita se ve afectada. Por otro lado, los materiales con mayor contenido de zeolita presentan mayor mesoporosidad, la fisisorción de nitrógeno demostró que los sustratos 1 y 2 corresponden a los materiales más mesoporosos, con el mayor tamaño promedio de poro. Las micrografías de TEM demostraron que la dispersión de Pt sobre el soporte es mejor en aquellos con más cantidad de zeolita X debido a que este material le está proporcionando canales y cajas meosoporosas en donde pueden depositarse

las nanopartículas metálicas, además de la superficie carbonada. De este modo, se comprueba que la adición de la zeolita al soporte del catalizador mejora la dispersión de las nanopartículas de Pt, siendo favorecida a mayor contenido del material zeolítico. Por lo anterior, el Pt/sustrato 1 se perfila como una alternativa a evaluarse en reacciones de oxidación de alcoholes en estudios posteriores.

Bibliografía

- [1] Zhang J. (2008) “Preface” de PEM fuel cell electrocatalysts and catalyst layers: Fundamentals and applications, Springer, London, pp. v-vii.
- [2] Yuan X. y Wang H. (2008) “PEM Fuel Cell Fundamentals” de PEM fuel cell electrocatalyst and catalyst layers: Fundamentals and applications, Springer, , London, pp. 1-87.
- [3] Mu X., Xu Z., Ma Y., Xie Y., Mi H. y Ma J. (2017) “Graphene-carbon nanofiber hybrid supported Pt nanoparticles with enhanced catalytic performance for methanol oxidation and oxygen reduction” *Electrochimica Acta*, 253, 171-177.
- [4] Liu J. y Yu J. (2016) “Toward Greener and Designed Synthesis of Zeolite Materials” de Zeolites and Zeolite-like Materials, Elsevier, Amsterdam, pp. 1-32.
- [5] Yao J y Yao Y. “Investigation of zeolite supported platinum electrocatalyst for electrochemical oxidation of small organic species”, *International Journal of Hydrogen Energy* , 41, 14747-14757.
- [6] Julbe A. y Drobek M. “Faujasite” 767-768.
- [7] Ruiz-Camacho B., Martínez Álvarez O., Rodríguez-Santoyo H., López Pérez P. y Fuentes-Ramírez R. (2015) “Mono and bimetallic electrocatalyst of Pt and Ag for Oxygen reduction reaction synthesized by sonication” *Electrochemm Comm*, 61, 5-9.
- [8] Oliveira R., Vasic M, Santos D., Babic B., Hercigonja R, Sequeira C y Sljkic B. (2018) “Performance assessment of a direct borohydride-peroxide fuel cell with Pd-impregnated faujasite X zeolite as anode electrocatalyst” *Electrochimica Acta*, 269, 517-525.
- [9] Thommes M., Kaneko K., Neimark A., Olivier J., Rodriguez-Reinoso F., Rouquerol J. y Sing K. (2015) “Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report)” *Pure Appl. Chem*, 1-19.
- [10] Sing K. (2001) “The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials” *Colloids and Surfaces*, 3-9.
- [11] Lázaro M., Calvillo L., Celorio V., Pardo J., Perathoner S. y Moliner R. (2011) “Study an application of Carbon Black Vulcan XC-72 in Polymeric Electrolyte Fuel Cells” de Carbon Black: Production, properties and uses, New York, Nova, pp. 41-67.
- [12] Daas B. y Ghosh S. (2016) “Fuel cell applications of chemically synthesized zeolite modified electrode (ZME) as catalyst for alcohol electro-oxidation-A review” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 783, 308-315.

DOCTORADO

ANÁLISIS DE LA PEPTIDORAMNOMANA DE LA PARED CELULAR DURANTE LA INTERACCIÓN DE *Sporothrix schenckii* CON EL HOSPEDERO

Laura Cristina García Carnero^a, Nancy Edith Lozoya Pérez^a, Katarzyna Wrobel^b, Kazimierz Wrobel^b, Iván Martínez Duncker^c, Roberta Salinas Marín^c y Héctor Manuel Mora Montes^a

^a Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, Col. Noria Alta S/N, Guanajuato, Guanajuato, 36050, MÉXICO. laura_cgc@hotmail.com.

^b Departamento de Química, Universidad de Guanajuato, Cerro de La Venada S/N, Col. Pueblito de Rocha, Guanajuato, Guanajuato, 36080, MÉXICO.

^c Centro de Investigación en Dinámica Celular, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad No. 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62209, MÉXICO.

Resumen

La peptidoramnomana (PRM) es un componente importante de la pared celular de *Sporothrix*, y está compuesta por ramnosa, manosa, galactosa y proteínas. Este complejo corresponde a un antígeno altamente inmunogénico, reconocido por anticuerpos en el suero de pacientes con esporotricosis y receptores de las células del hospedero. Aunque se conoce la composición de los carbohidratos de la PRM, la identidad de las proteínas era desconocida. En este estudio se analizó la fracción de la PRM para la identificación de las proteínas que la componen, encontrándose 336, de las cuales se seleccionaron 3 para trabajar: una Chaperonina GroEL, una Hsp70 y una proteína no caracterizada. Se analizaron los niveles de expresión de los genes de estas proteínas, utilizando el transcriptoma disponible de *Sporothrix schenckii* y mediante RT-qPCR, en donde se vio, que todas se expresan en ambas morfologías del hongo; y que la Hsp70 se ve sobreexpresada cuando la levadura está en condiciones de infección. Así mismo, las proteínas seleccionadas se expresaron en un modelo procarionte, se purificaron, se generaron anticuerpos contra ellas, y se usaron para inocular larvas de *Galleria mellonera*. Por otro lado, se generaron plásmidos de silenciamiento que serán usados para transformar *S. schenckii* y evaluar su comportamiento, cuando no cuenta con los niveles normales de expresión de estos genes durante la infección. Todos estos ensayos ayudarán a determinar la contribución de estas proteínas durante la interacción patógeno-hospedero.

Palabras clave: *Sporothrix schenckii*, Pared celular, Peptidoramnomana, Hsp, *Galleria mellonera*.

Introducción

La esporotricosis es una micosis subcutánea distribuida mundialmente, pero con una incidencia mayor en zonas tropicales y subtropicales [1], es causada por las especies del complejo clínico de *Sporothrix*, principalmente *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis* y *Sporothrix globosa* [1]. La principal estructura del hongo que está en contacto con el hospedero es la pared celular, siendo esencial para la viabilidad del microorganismo y el establecimiento de la enfermedad. La pared celular de *S. schenckii* está compuesta por quitina y glucanas β -1,3 y β -1-6, cubiertas por una capa externa de un complejo conocido como peptidoramnomana (PRM) [1]. La PRM es un glicoconjugado compuesto por varias proteínas, con un amplio rango de pesos moleculares, que no han podido ser purificadas individualmente. Este complejo es reconocido por anticuerpos IgG,

presentes en suero de pacientes con esporotricosis y por receptores de las células del hospedero, así como por la lectina Concanavalina A (ConA) [2]. La PRM de la pared celular está compuesta por 33.5% de ramnosa, 57% de manosa, 1% de galactosa y 14.2% de proteínas, cuenta con epítomos que han sido encontrados únicamente en el género *Sporothrix*, y conformados por tetra- y pentasacáridos *O*-ligados, y tri- y disacáridos *N*-ligados [1,2].

Con base a lo mencionado anteriormente, la PRM es importante por ya que es altamente inmunogénica, siendo reconocida por el suero de pacientes con la micosis, sin mencionar que es específica del género, razones por las que es usada como antígeno en el único diagnóstico serológico confiable, para la detección de la esporotricosis [1]. Posee ramnosa, carbohidrato difícil de encontrar en hongos patógenos y estando únicamente reportado en *Sporothrix* y *Scedosporium* [1,2]. Aunque se conoce su composición de carbohidratos, la identidad de las proteínas que la componen es desconocida [1].

Metodología

Microorganismos

Las cepas de *S. schenckii* 1099-18, *Escherichia coli* DH5 α y BL21 fueron usadas en este estudio.

Aislamiento de la PRM

La PRM se aisló mediante extracción por buffer de citrato 0.02M y fraccionamiento con Cetavlon (*N*, *N* cetyl hexadecyltrimethyl-ammonium bromide), como se describió previamente [3]. La fracción ácida obtenida por este método se desechó, y la fracción cruda de la PRM se volvió a precipitar con Cetavlon pH 8.5. Esta fracción se pasó por una columna de ConA y lo adherido a la columna se eluyó, se desaló, se liofilizó y se almacenó.

Análisis de la PRM por espectrometría de masas

La fracción de la PRM se analizó mediante Maldi-TOF. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software proteómico MaxQuant. De las proteínas encontradas se seleccionaron 3 en base a sus valores de score, cobertura y posibles sitios de *O*- y *N*-glicosilación.

Expresión heteróloga de las proteínas seleccionadas

La sobreexpresión se llevó a cabo usando el vector pCold I, y las condiciones óptimas de inducción se establecieron en 15°C por 20 horas con 0.01mM de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido).

Purificación de las proteínas recombinantes

La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de Níquel, y se realizó bajo condiciones desnaturizantes con urea 8M. La purificación se verificó mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), teñida con Coomassie coloidal y plata.

Generación de anticuerpos en contra de las proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes purificadas, se utilizaron para inocular conejos machos Nueva Zelanda. La inmunización, se llevó a cabo mediante una inyección intramuscular con 150 μ g de proteína emulsificada en 500 μ L de adyuvante de Freund, con un volumen final de 1.5mL. La dosis inicial se preparó con el adyuvante completo y las 2 dosis de refuerzo se prepararon con adyuvante incompleto. Las 3 inmunizaciones se inyectaron con un intervalo de 15 días, para después sangrar los conejos (sangrado total). Antes de la inmunización, se le hizo un sangrado al conejo para la obtención del suero preinmune. Las γ -globulinas se precipitaron con sulfato de amonio sobresaturado y se titularon con la PRM como antígeno.

Inoculación de *Galleria mellonella* con las proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes purificadas, se utilizaron para la inoculación del modelo de infección *G. mellonella*. Se inocularon 10 larvas con diferentes concentraciones de las proteínas (10, 20, 40 y 80 μ g) y 10 larvas con PBS 1X como control, se vigilaron durante 15 días para la documentación de la presencia de melanización o lesiones y de la mortalidad.

Construcción de los plásmidos de silenciamiento de las proteínas seleccionadas

Se diseñaron oligonucleótidos, que amplificaran entre 200 y 250pb del ORF de los genes de las 3 proteínas seleccionadas, asegurando que la amplificación no se pareciera a ninguna otra región del genoma de *S. schenckii*. Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos, uno para amplificar el fragmento en sentido 5'-3' y el otro para amplificar en antisentido (3'-5'). Ambos fragmentos, se clonaron en el vector de silenciamiento pSilent-1, de aquí se amplificó desde el promotor al terminador (PtrpC-TtrpC) y se clonó en el vector binario pBGgHg.

Resultados

1. Identificación de las proteínas del complejo de la PRM

El análisis por espectrometría de masas de la PRM, reveló que la fracción está compuesta por un total de 336 proteínas. Basados en los valores del análisis y en algunos datos bioinformáticos, se seleccionaron 3 proteínas para trabajar: una Chaperonina GroEl (Hsp60), una Hsp70 y una proteína no caracterizada (Up). Los tres candidatos presentaron los scores y las coberturas más altos, así como varios posibles sitios de O- y N-glicosilación. Se realizó un análisis de las secuencias de las proteínas, para la búsqueda de un péptido señal; pero ninguna lo presenta, esto nos sugiere que las proteínas de choque térmico (Hsps), pueden estar funcionando como proteínas tipo moonlight, que se están secretando a la pared celular mediante vías no canónicas [4]. Las Hsps han demostrado ser inmunodominantes, en infecciones causada por diferentes hongos patógenos, y se han encontrado también, en la pared celular de estos, como es el caso de *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* [5].

Se aprovechó la disponibilidad del transcriptoma de *S. schenckii* (<http://sporothrixgenomedatabase.unime.it>), para evaluar la expresión de los genes de las 3

proteínas seleccionadas. Se encontró que las tres proteínas se expresan tanto en micelio como en levadura, pero la Hsp60 y la Up están sobrerreguladas en levadura, mientras que la Hsp70 en micelio. Se ha visto que varias Hsps, entre las que se incluyen la Hsp60 y Hsp70, están sobre reguladas cuando *C. albicans*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Coccidioides posadasii* son inyectados en el hospedero [6], por lo que se quiso analizar el nivel de expresión de la Hsp70 cuando la levadura está en condiciones de infección.

Levaduras que interaccionaron con monocitos humanos durante 24 horas, así como micelio y levadura sin interacción, fueron usados para la extracción de RNA, que se analizó mediante RT-PCR. El análisis mostró que el gen se expresa más en la morfología de micelio que en levadura, lo que concuerda con los datos obtenidos del transcriptoma. Sin embargo, se observó que cuando la levadura estuvo en interacción previa con las células inmunes, la expresión del gen aumenta todavía más (Figura 1), lo que puede sugerir alguna participación de esta proteína durante la infección.

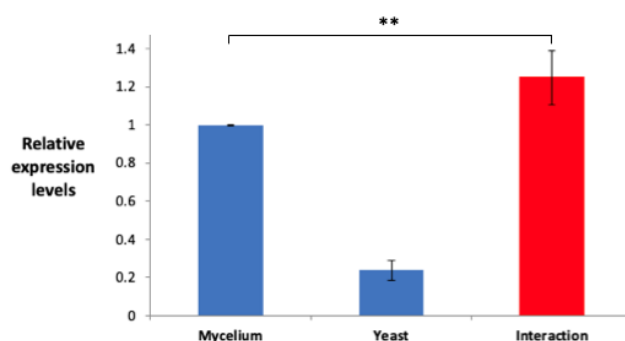


Figura 1. Niveles de expresión del gen de la Hsp70 en micelio, levadura y levadura que interaccionó con células mononucleadas. La expresión del gen es mayor en la morfología de micelio, pero se observa una expresión aun mayor, cuando las levaduras están en condiciones de infección. La gráfica representa el promedio de dos experimentos independientes, realizados por triplicado. Prueba de T $p < 0.05$.

2. Expresión heteróloga de las principales proteínas de la PRM

La inducción de la Hsp60 y Up muestra una banda diferencial de alrededor de 62kDa y 28kDa, respectivamente, pesos moleculares que coinciden con lo calculado bioinformáticamente. La purificación de estas proteínas mediante cromatografía de afinidad resultó en una única banda de los pesos moleculares correspondientes para cada una, cuando la electroforesis se tiñó tanto con Coomassie coloidal como con plata (Figura 2).

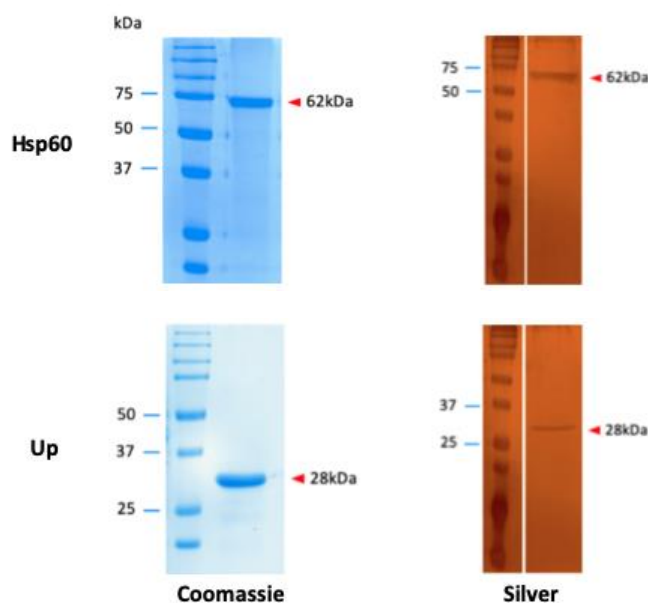


Figura 2. SDS-PAGE de la Hsp60 y Up purificadas. Se observa la banda esperada tanto para la Hsp60 como para la Up con tinción de coomassie y de plata.

Se llevó a cabo la generación de los anticuerpos contra la Hsp60 y Up recombinantes, obteniendo un título de 1:6400 para ambos, utilizando la PRM como antígeno. La inmunodetección de la Hsp60 y la Up nativas, en el complejo de la PRM usando los anticuerpos generados, mostró una señal de 62kDa, lo que corresponde con la Hsp60, y una señal de alrededor de 55kDa para la Up, mayor al peso molecular esperado, de 28kDa de la proteína recombinante (Figura 3). Este cambio en el peso molecular se debe probablemente a la glicosilación de la proteína, debido a que *E. coli* no lleva a cabo este proceso postraduccion, la proteína recombinante es más pequeña, mientras que la nativa, que si está glicosilada, es más grande. Esto confirma que la Up está glicosilada.

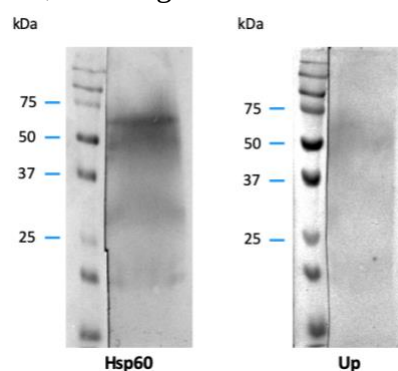


Figura 3. Inmunodetección de la Hsp60 y Up nativas en el complejo de la PRM por los anticuerpos generados contra las proteínas recombinantes. Se observa una banda de alrededor de 62kDa para la Hsp60 y una de alrededor de 55kDa para la Up.

Estudios recientes han demostrado que el uso de *G. mellonella* para la evaluación de la virulencia de *S. schenckii* y *S. brasiliensis* reproduce los datos que se obtienen al evaluar la virulencia de estos

hongos en ratón [7]. Por lo anterior, este modelo será utilizado para evaluar la capacidad de las proteínas recombinantes de alterar el curso de la infección por *S. schenckii*. Se evaluó la toxicidad de las proteínas en las larvas, inyectando diferentes concentraciones, pero no se obtuvo ninguna larva con melanización o lesiones visibles, aparte de que se logró una supervivencia del 100%, lo que indica, que las proteínas por sí solas no son tóxicas para el organismo.

3. Construcción de los plásmidos de silenciamiento para las proteínas seleccionadas

El silenciamiento de genes, mediante RNA de interferencia en *Sporothrix*, ya ha sido reportado previamente [8]. Por ello, se decidió seguir la misma metodología para la evaluación de la contribución de la Hsp60, Hsp70 y Up durante la infección. Se llevó a cabo la construcción de los plásmidos de silenciamiento, para la Hsp70 y la Up en el vector pSilent-1, que se confirmó mediante PCR y secuenciación. La confirmación por PCR, se llevó a cabo amplificando distintos fragmentos de la construcción: desde el PtrpC hasta el reverso del sentido (carril 1), desde el directo del antisentido hasta el TtrpC (carril 2) y desde el PtrpC hasta el TtrpC (carril 3) (Figura 4).

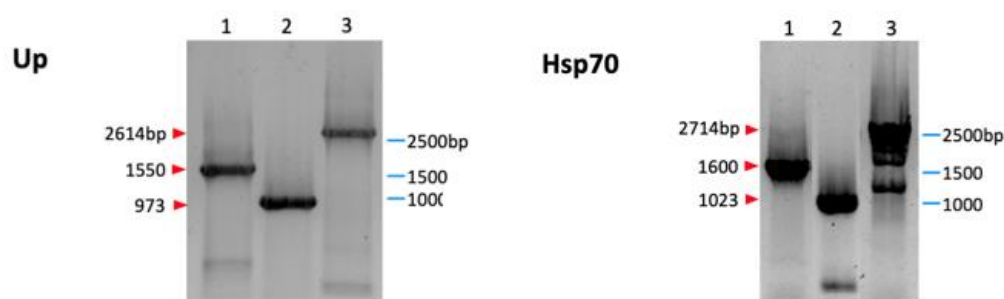


Figura 4. PCR para la comprobación de los plásmidos de silenciamiento del gen de la Hsp70 y de la Up. Se amplificaron distintos fragmentos de la construcción, carril 1: desde el PtrpC hasta el reverso del sentido, carril 2: desde el directo del antisentido hasta el TtrpC, carril 3: desde el PtrpC hasta el TtrpC.

Conclusiones

Con la información obtenida hasta el momento para las Hsps y la Up, se sugiere que las proteínas seleccionadas tienen una función durante la interacción patógeno-hospedero. Sin embargo, es muy prematuro para determinar si las proteínas recombinantes, o los anticuerpos anti éstas, son capaces de proteger al hospedero de la infección por *S. schenckii*, o si las mutantes silenciadas tienen una disminución en la virulencia.

Bibliografía

- [1] Lopes-Bezzera, L., Mora-Montes, H. M., Zhang, Y., Niño-Vega, G., Messias Rodrigues, A., Pires de Camargo, Z. and de Ho82og, S. (2018). "Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents", *Med. Myco.* 56, 126-143.
- [2] Lopes-Alves, L., Travassos, L., Previato, J. O. and Mendonca-Previato L. (1994) "Novel antigenic determinants from peptidorhamnomannans of *Sporothrix schenckii*", *Glycobio.* 4 (3), 281-288.

- [3] Lloyd K.O. and Bitoon M.A. (1971) "Isolation and purification of a peptido-rhamnomannan from the yeast form of *Sporothrix schenckii*" J Immunol, 107 (3), 663-671.
- [4] Jeffery, C. J. (2015) "Why study moonlighting proteins?", Fron in Gen, 6 (211).
- [5] Burnie, J. P., Carter, T. L., Hodgetts, S. J. and Matthews R. C. (2005) "Fungal heat-shock proteins in human disease", FEMS Microbiol Rev 30, 53-88.
- [6] Tiwari, S., Thakur, R. and Shankar, J. (2015) "Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi", Biotechnol Res Inter., 2015.
- [7] Clavijo-Giraldo, D. M., Matínez-Alvarez, J. A., Lopes-Bezerra, L. M., Ponce-Noyola, P., Franco, B., Almeida, R. S. and Mora-Montes H. M. (2016) "Analysis of *Sporothrix schenckii* sensu stricto and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*", J of Microbiol Meth.
- [8] Lozoya-Pérez, N. E., Casas-Flores, S., Fogaça de Almeida J. R., Martínez-Álvarez J. A., López-Ramírez L. U., Pereira Jannuzzi, G., Trujillo-Esquivel, E., Estrada-Mata, E., Almeida, S. R., Franco, B., Lopes-Bezerra, L. M. and Mora-Montes, H. M. (2019) "Silencing of OCH1 unveils the role of *Sporothrix schenckii* N-linked glycans during the host–fungus interaction", Infec and Drug Resis, 12, 67-85.

DESARROLLO DE UN ENTORNO VIRTUAL PARA EL DISEÑO RIGUROSO Y OPTIMIZACIÓN DE INTERCAMBIADORES DE CALOR DE TUBOS Y CORAZA

Fernando Israel Gómez Castro ^{a*}, Oscar Daniel Lara Montaña ^a, Claudia Gutiérrez Antonio ^b

^a Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato, Guanajuato, 36050, MÉXICO. fgomez@ugto.mx

^b Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Av. Cerro de las Campanas s/n, Col. Las Campanas, Querétaro, Querétaro, 76010, MÉXICO

Resumen

Los intercambiadores de calor son los equipos auxiliares más utilizados en cualquier industria de la transformación. Su función principal es aumentar o disminuir el contenido energético de alguna sustancia. Aunque existen diversas tecnologías de intercambiadores de calor, cada una con diferentes configuraciones geométricas, los intercambiadores de calor de tubos y coraza (ICTC) son los más utilizados. De la variedad de metodologías existentes para diseñar estos equipos destaca la de Kern y la Bell-Delaware. Con ambas metodologías es posible diseñar equipos capaces de cumplir con los requerimientos energéticos, sin embargo, lo deseable es obtener el diseño del equipo que satisfaga la transferencia de calor disminuyendo el costo total anual. Para lograrlo es necesario llevar a cabo un proceso de optimización. Los algoritmos metaheurísticos son capaces de obtener el diseño óptimo de estos equipos cuyos modelos de diseño son altamente no lineales, además dependen de variables de decisión continuas y discretas. En este trabajo se presenta un entorno de diseño y optimización de intercambiadores de calor que utiliza algoritmos de optimización metaheurística. Los algoritmos de optimización considerados son el optimizador por enjambre de partículas, el optimizador del lobo gris y el algoritmo Jaya. Como métodos de diseño es posible implementar el método de Kern y el Bell-Delaware.

Palabras clave: *Intercambiador de calor, optimización, algoritmos metaheurísticos.*

Introducción

Los intercambiadores de calor son dispositivos de ingeniería cuyo principal propósito es recuperar energía aprovechando el gradiente de temperatura de dos fluidos. Existen múltiples tecnologías disponibles, sin embargo, los intercambiadores de calor de tubos y coraza (ICTC) son los más utilizados en la industria. Se estima que más de un 60% de los intercambiadores de calor son ICTC. Presentan ventajas importantes, por ejemplo, una buena relación entre el área de transferencia de calor y el volumen del dispositivo, cuenta con métodos establecidos para su diseño y construcción, tienen una gran capacidad estructural para soportar altas presiones, entre otros.

Antes de construir un ICTC es necesario realizar el diseño, que tiene que satisfacer algunos requerimientos energéticos. Se pueden calcular múltiples diseños que sean capaces de cumplir exitosamente el propósito, cada diseño tendrá sus propias condiciones y parámetros de operación. Es tarea del diseñador no solo encontrar un diseño factible, sino el mejor diseño posible de acuerdo a algún criterio. Varios criterios pueden ser utilizados para decidir si un diseño es mejor a otro,

algunos ejemplos de criterios utilizados son los costos de bombeo, el costo total anual, la eficiencia, entre otros. Incluso es utilizar más de un criterio para hacer la selección. Al procedimiento de elegir el mejor diseño de acuerdo a un o varios criterios se le conoce como optimización.

El problema de optimizar un ICTC no es un procedimiento trivial. Dos de los modelos más utilizados para diseñar ICTC son el método de Kern y el método Bell-Delaware. El método Bell-Delaware es considerablemente más complejo que el de Kern y también más adecuados para realizar diseños rigurosos[1]. Ambos contienen ecuaciones no lineales, no continuas y no diferenciables que generan un espacio de búsqueda no convexo. Además, están sometidos a variables de decisión enteras y continuas.

Existen diferentes estrategias de optimización que pueden ser utilizadas. Se puede usar la programación matemática [2], [3] o bien pueden aplicarse algoritmos metaheurísticos. Los algoritmos metaheurísticos son de optimización iterativos que no se basan en el uso de derivadas. En cada iteración se evalúa una o varias soluciones en la función objetivo y en base a estas soluciones se generan nuevas soluciones que podrían ser mejores. En su estructura cada algoritmo metaheurístico emplea estrategias específicas que le permiten escapar de óptimos locales y probablemente alcanzar el óptimo global y converger en esa región. Estas estrategias pueden entrar en dos categorías: la exploración y la explotación. La exploración es la capacidad del algoritmo de encontrar soluciones en todo el espacio de búsqueda para identificar dónde es probable que se encuentre la mejor solución. La explotación es la capacidad que tiene el algoritmo de converger en la región con mayor probabilidad de estar localizado el óptimo global.

En este trabajo se aborda la optimización de intercambiadores de calor de tubos y coraza desde un enfoque metaheurístico. Se plantea un entorno de optimización que utiliza el método Bell-Delaware como modelo de diseño y como algoritmos de optimización se puede elegir el Optimizador por Enjambre de Partículas (PSO)[4], el Optimizador del Lobo Gris (GWO)[5], y el algoritmo Jaya (JA)[6]. Como función objetivo se considera el costo total anual.

Metodología

El entorno de optimización contiene el método Bell-Delaware como modelo para calcular diseños de un ICTC. En el modelo de Bell-Delaware se hace una corrección del coeficiente ideal de transferencia de calor en el lado tubos $h_{s,id}$ usando cinco factores de corrección de acuerdo a la ecuación 1.

$$h_s = h_{i,id} J_c J_l J_b J_s J_r \quad (1)$$

Donde h_s es el coeficiente corregido de transferencia de calor en la coraza, J_c es el factor de corrección debido a la configuración del deflector, J_l es el factor de corrección debido a las fugas entre los deflectores y los tubos y los deflectores y la coraza, J_b es un factor de corrección que se

debe a los efectos de *by-pass*, J_s corrige debido a la diferencia del espaciamiento del deflector inicial y final respecto al espaciamiento de los deflectores centrales y J_r es un factor de corrección por los gradientes adversos de temperatura en flujos laminares. El modelo completo puede ser encontrado en la literatura abierta [7]. El modelo utilizado no contempla cambios de fase.

Los métodos metaheurísticos utilizados son el PSO, GWO y JA. A continuación, se describe brevemente su funcionamiento. El método PSO se inspira en el movimiento que siguen las parvadas de aves o bancos de peces. Esta rutina de optimización se basa en encontrar la mejor posición (mejores valores de las variables de decisión) de cada individuo y del total de individuos. El método GWO se inspira en el patrón de caza utilizado por los lobos grises que consiste en: (i) aproximarse a la presa, (ii) rodear a la presa, y (iii) atacar a la presa. El método JA tiene la virtud de no contener parámetros propios que deban ser sintonizados. A medida que transcurren las iteraciones se guarda la mejor y peor posición, con esto se dirige la búsqueda hacia la mejor solución.

La codificación del modelo de Bell-Delaware y los métodos metaheurísticos se desarrolló en Python. La Figura 1 muestra como se interconectan las diferentes partes que componen el entorno de optimización de ICTC.

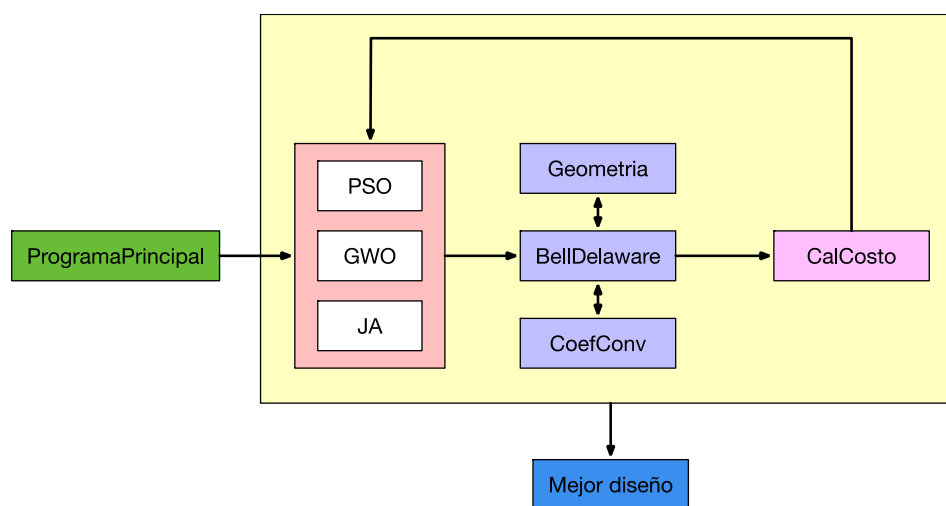


Figura 13. Estructura del entorno de optimización de ICTC.

El archivo con el que interactúa el usuario es *ProgramaPrincipal*, en él se dan las propiedades de los fluidos, y los parámetros del método de optimización como el número de individuos, el número de iteraciones, los límites de las variables de decisión y el número de experimentos (solo si se quiere obtener información estadística). *ProgramaPrincipal* transfiere la información a alguno de los métodos de optimización (que el usuario puede elegir). Se comienza con la rutina de optimización utilizando el modelo del intercambiador de calor que consta de tres códigos. *BellDelaware* calcula los aspectos termohidráulicos del intercambiador de calor, intercambia información con *Geometria*, que calcula la geometría del intercambiador de calor, y también con

$CoefConv$, donde se hace el cálculo del coeficiente convectivo de transferencia de calor en el lado de los tubos. Una vez que se calcula el diseño, el área se transfiere a $CalCosto$ que contiene la función objetivo con las restricciones penalizadas. Como función objetivo se usa el costo total anual, que es la suma del costo de operación y el costo anualizado. El diseño óptimo es mostrado una vez que se cumple con el criterio de paro.

El caso de estudio consiste en diseñar un intercambiador de calor al que entra agua de enfriamiento con un flujo de 18.8 kg/s, la temperatura de entrada es 33°C y la temperatura de salida es 37.2°C. El fluido caliente es nafta que entra a una temperatura de 114°C y sale a una temperatura de 40°C [8]. El agua se localiza en el lado tubos y la nafta en el lado coraza. Las propiedades de los fluidos se obtienen a la temperatura media. Como restricción la caída de presión en el lado tubos y coraza no debe sobrepasar de 70kPa, la velocidad de los tubos debe mantenerse entre 1m/s y 3m/s y la relación entre la longitud y el diámetro del intercambiador no debe ser inferior a 15. Para calcular el costo se considera una tasa de interés del 5%, un tiempo de vida del equipo de 20 años, 5000 horas de operación al año, una eficiencia de bombeo de 0.85 y un costo eléctrico de 1 USD/kWh. Se realizaron 30 experimentos y 50 iteraciones por experimento.

Como variables de decisión se consideran el diámetro de la coraza, el diámetro externo de los tubos, el pitch de los tubos, el arreglo de los tubos, el número de pasos en los tubos, el porcentaje de corte de los deflectores, el espacio entre los baffles centrales, el espacio del baffle inicial y final, el espacio entre los deflectores y la coraza, el espacio entre los tubos y los deflectores y el diámetro del haz de tubos.

Resultados

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos para el mejor diseño calculado con cada uno de los algoritmos de optimización. Puede observarse que el PSO y GWO tienen desempeños similares, alcanzan prácticamente el mismo costo total anual. También el costo fijo y el costo de operación pueden considerarse idénticos. El JA falla en alcanzar el diseño óptimo, aunque no se aleja mucho de los resultados dados por los otros, es posible que se caiga en un óptimo local. En todos los casos el costo fijo tiene un impacto muy superior al costo de operación.

Tabla 13. Resultados obtenidos para el mejor diseño calculado con cada optimizador.

Parámetro	Bell-Delaware		
	PSO	GWO	JA
Área (m^2)	32.56	32.56	32.79
Costo de operación (USD/año)	160.51	160.51	159.03
Costo fijo (USD/año)	3,865.99	3,806.01	3,824.16
Costo total anual (USD/año)	3,966.50	3,966.53	3,983.19

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos de los 30 experimentos realizados. Esta información es importante para identificar el algoritmo de optimización que es más probable que alcance el óptimo global. Respecto al valor mínimo en la función objetivo alcanzado por cada método, se observa

que el mejor está dado por el GWO. El promedio del PSO y JA son muy similares, siendo un poco mejor el del PSO. Si se analiza la rescisión estandar, también se puede identificar que el GWO tiene el valor más pequeño. Es importante notar que es muy pequeña comparada con la generada por los otros dos algoritmos. Esto indica que es menos probable que el GWO caiga en un óptimo local y es más probable que la solución obtenida esté en el vecindario del óptimo global. Aunque la desviación estandar del PSO y JA se encuenran en el mismo orden de magnitud, la del JA es conciderablemente más pequeña. Sin embargo, en ninguno de los 30 experimentos el JA logra alcanzar el diseño óptimo que se logra con el PSO y GWO.

Tabla 14. Resultados estadísticos realizando 30 experimentos.

Parámetro	Bell-Delaware		
	PSO	GWO	JA
Promedio (USD/año)	4,234.35	4,074.93	4,236.25
Mínimo (USD/año)	3,966.50	3,966.53	3,983.19
Desviación estándar (USD/año)	431.09	52.15	314.39

La Figura 2 muestra la gráfica de convergencia de los tres métodos a medida que transcurren las iteraciones. Se observa que el primero en converger es el JA, aunque como ya se mencionó solo alcanza un óptimo local. Para el experimento mostrado el GWO y PSO convergen aproximadamente en el mismo número de eteraciones.

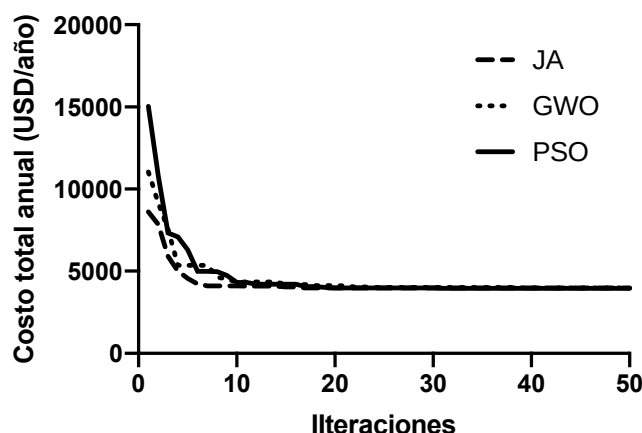


Figura 14. Curva de convergencia.

Conclusiones

En este trabajo se presenta un entorno virtual de optimización por medio del cual es posible obtener diseños óptimos para ICTC sin cambio de fase. Se le permite al usuario elegir entre tres optimizadores metaheurísticos que presentan un gran potencial para alcanzar la solución óptima. Sin embargo, en base a los resultados previamente reportados se recomienda que se utilice el GWO ya que para el problema planteado es el que tiene más probabilidades de alcanzar la región del óptimo. No se descarta que para otro problema alguno de los otros algoritmos pueda tener un mejor desempeño.

Bibliografía

- [1] R. K. Sinnott, *Coulson & Richardsons Chemical Engineering Design*. 2005.
- [2] F. T. Mizutani, F. L. P. Pessoa, E. M. Queiroz, S. Hauan, and I. E. Grossmann, “Mathematical programming model for heat-exchanger network synthesis including detailed heat-exchanger designs. 1. Shell-and-tube heat-exchanger design,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2003.
- [3] M. A. S. S. Ravagnani and J. A. Caballero, “A MINLP model for the rigorous design of shell and tube heat exchangers using the TEMA standards,” *Chem. Eng. Res. Des.*, 2007.
- [4] J. Kennedy and R. Eberhart, “Particle swarm optimization,” in *Proceedings of ICNN’95 - International Conference on Neural Networks*, 1995, vol. 4, pp. 1942–1948 vol.4.
- [5] S. Mirjalili, S. M. Mirjalili, and A. Lewis, “Grey Wolf Optimizer,” *Adv. Eng. Softw.*, 2014.
- [6] R. Venkata Rao, “Jaya: A simple and new optimization algorithm for solving constrained and unconstrained optimization problems,” *Int. J. Ind. Eng. Comput.*, 2016.
- [7] R. K. Shah and D. P. Sekulić, “Fundamentals of Heat Exchanger Design,” in *... to Thermo-Fluids Systems Design*, 2003.
- [8] P. Wildi-Tremblay and L. Gosselin, “Minimizing shell-and-tube heat exchanger cost with genetic algorithms and considering maintenance,” *Int. J. Energy Res.*, 2007.

ESTUDIO DE ELECTRODOS DE CARBONO TIPO DROPSSENS MODIFICADOS CON POLI(EUGENOL) PARA LA DETECCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

Cristina Corona Elizarrarás ^a, Silvia Gutiérrez Granados ^a, Sophie Griveau ^b, Fethi Bedioui ^b

^a Departamento de Química, Universidad de Guanajuato, Cerro de la Venada s/n Col. Pueblito de Rocha, Guanajuato, Guanajuato, 36040, MÉXICO. c.coronaelizarraras@ugto.mx

^b Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS), Chimie Paris Tech-PSL Recherche Université, 11 Rue Pierre et Marie Curie, Paris, Île-de-France, 75005, FRANCIA.

Resumen

Se modificó la superficie de un electrodo de carbono tipo dropSens con un polímero no conductor, el poli(eugenol) para llevar a cabo la detección del óxido nítrico. El óxido nítrico es un marcador intracelular y también agente citotóxico cuya concentración en condiciones fisiológicas se encuentra en el rango de nM. Es de vital importancia que el sensor propuesto sea selectivo para NO y se evite la detección de moléculas interferentes.

Palabras clave: *Poli(eugenol), óxido nítrico, electrodos modificados.*

Introducción

Los biosensores basados en electrodos serigrafados son sistemas en miniatura que permiten el análisis *in vivo* e *in vitro* de muestras reales mediante el uso de biodispositivos. Así pues, la técnica de serigrafía (película gruesa) se utiliza ampliamente para la fabricación a gran escala de biosensores desechables con varias ventajas, entre ellas el bajo costo, la versatilidad y la miniaturización [1].

El óxido nítrico es una de las diez moléculas más pequeñas que se encuentran en la naturaleza. Se puede mencionar su intervención como mediador de actividades antimicrobianas y antitumorales [2], así como neurotransmisor con un papel crucial en comunicación neuronal en el cerebro y el sistema nervioso periférico. Existen ciertas dificultades para lograr su detección y cuantificación debido a las numerosas propiedades del NO, que permite que lleve a cabo diversas funciones en los sistemas nervioso, cardiovascular e inmunológico. Es un radical libre, lo que podría explicar su existencia fugaz y concentraciones extremadamente bajas, así como inestabilidad en sistemas biológicos.

La modificación de la superficie del electrodo puede ser necesaria para hacer que el material del electrodo sea selectivo para la oxidación electroquímica del analito NO[•], que ocurre en electrodos de material convencional a altos potenciales en rangos de potencial entre 0.7 y 1 V vs electrodo de calomel saturado (SCE) en soluciones acuosas a pH 7.4 [3].

El poli(eugenol) (PE) se escogió como modelo de membrana para la modificación del electrodo ya que se ha reportado que es una de las mejores membranas poliméricas electrogeneradas teniendo un excelente desempeño para la detección amperométrica del NO[•] [4]. Las películas de PE son conocidas por ser porosas, esto porque el PE está compuesto por microporos que permiten que los gases lleguen al electrodo, mientras excluyen las moléculas más grandes. Las películas de PE proporcionan al electrodo una capa protectora que discrimina las moléculas según su tamaño,

evitando que las moléculas más grandes lleguen al electrodo [5]. A pesar de la presencia del poli(eugenol) como membrana permselectiva en la superficie del electrodo, el NO_2^- puede actuar como posible especie interferente durante la detección de $\text{NO}^\bullet$, debido a que es pequeño, una molécula que se oxida a bajos potenciales en comparación al NO. Por eso es importante desarrollar nuevas estrategias para la detección de $\text{NO}^\bullet$ y evitar la detección del interferente NO_2^- [6]. Debido a lo anteriormente mencionado, los requerimientos de especificidad y sensibilidad para la detección del óxido nítrico continúan siendo un reto [7].

Metodología

El sensor de NO fue preparado modificando la superficie del electrodo de carbono con una capa de poli(eugenol). La electropolimerización se hizo a un potencial constante de 400 mV/s vs Ag/AgCl, durante 15 minutos. Se utilizó una solución 10mM de eugenol en NaOH 0.1 M.

Caracterización electroquímica

Se utilizó una solución de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5mM, como electrolito soporte se usó buffer de fosfatos PBS 0.01M pH 7.4; velocidad de barrido 100 mV/s y variando v (50, 100, 200 y 400 mV/s).

Estudio de interferentes

Se realizó un estudio de interferentes, considerando el ion nitrito (1 mM y 100 μM en PBS). Primero se utilizó voltamperometría cíclica y después un estudio amperométrico.

Resultados

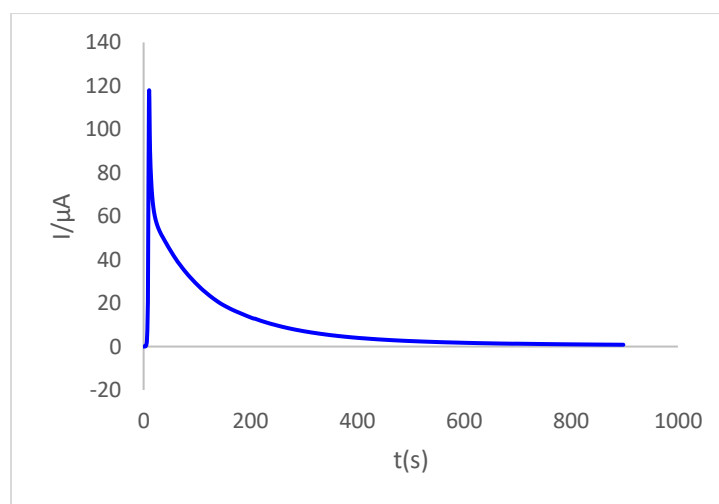


Figura 1. Preparación del poli(eugenol) en el electrodo de carbono por cronoamperometría, solución de eugenol 10 mM, potencial constante de 0.4 V, durante 900 s.

Se realizó un depósito de eugenol (figura 1) en el electrodo, utilizando un potencial constante de 0.4 V durante 900s, la concentración utilizada fue de 10 mM de eugenol en 0.1 M de NaOH. Bajo estas condiciones, se obtuvieron películas de poli(eugenol) en la superficie del electrodo de carbono reproducibles y adherentes.

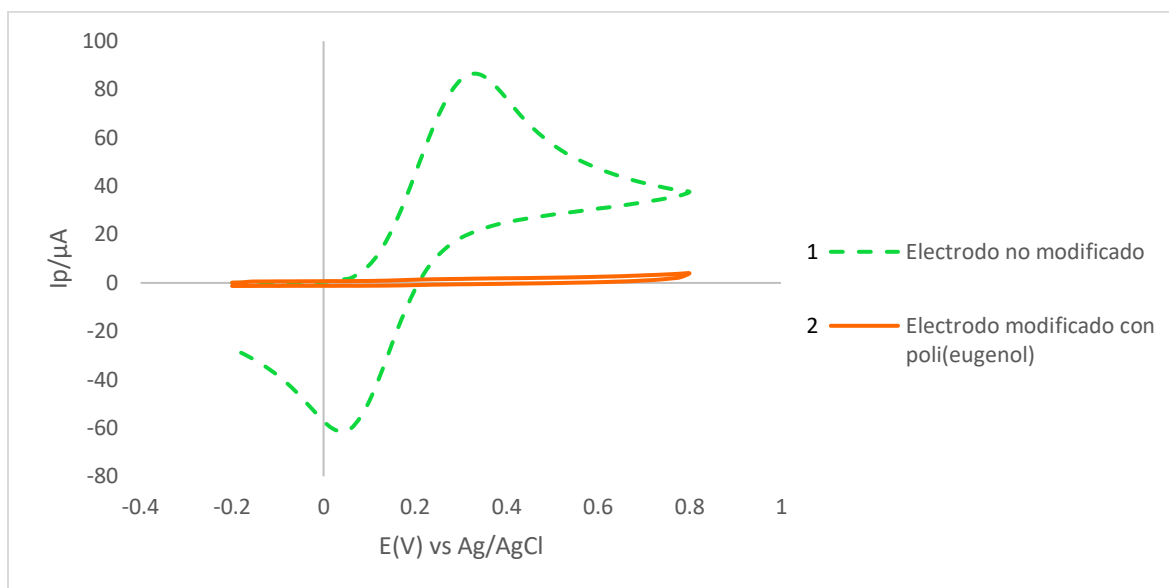


Figura 2. Voltamperograma de la respuesta del electrodo de carbono sin modificar (curva 1) y modificado (curva 2) con poli(eugenol) en solución de $K_4[Fe(CN)_6]$ 5mM. PBS utilizado como electrolito soporte. Velocidad de barrido: 100 mV/s.

Se caracterizó la película de PE analizando la señal redox del ferrocianuro de potasio. La figura 2 muestra la señal obtenida de $K_4[Fe(CN)_6]$ en un electrodo nuevo y limpio (curva 1) que sirve como referencia. Mientras que utilizando el electrodo con un recubrimiento de PE (curva 2), no se observa ninguna señal de $K_4[Fe(CN)_6]$. Lo que se esperaba, ya que, al estar recubierta la superficie, no ocurre la reacción de oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} .

Se realizó una cronoamperometría a un potencial constante 0.8V, para comprobar la respuesta del electrodo sin modificar y modificado con poli(eugenol) (figura 3). En una celda con 5mL de PBS, se adicionó una alícuota de NO_2^- para tener una concentración final de 100 μM .

Se hicieron ensayos para la detección amperométrica del NO^+ , potencial constante de 0.8 V vs Ag/AgCl, utilizando el electrodo modificado con eugenol, en PBS 0.01 M, pH 7.4 (figura 4). Adición de una alícuota para la obtención final de 100 μM .

Posteriormente se hicieron ensayos para la detección simultánea de NO y NO_2^- , con un electrodo modificado con eugenol a 0.8 V vs Ag/AgCl en PBS 0.01 M, pH 7.4 (figura 5) y adición de una alícuota de NO y NO_2^- , para una concentración final de 100 μM .

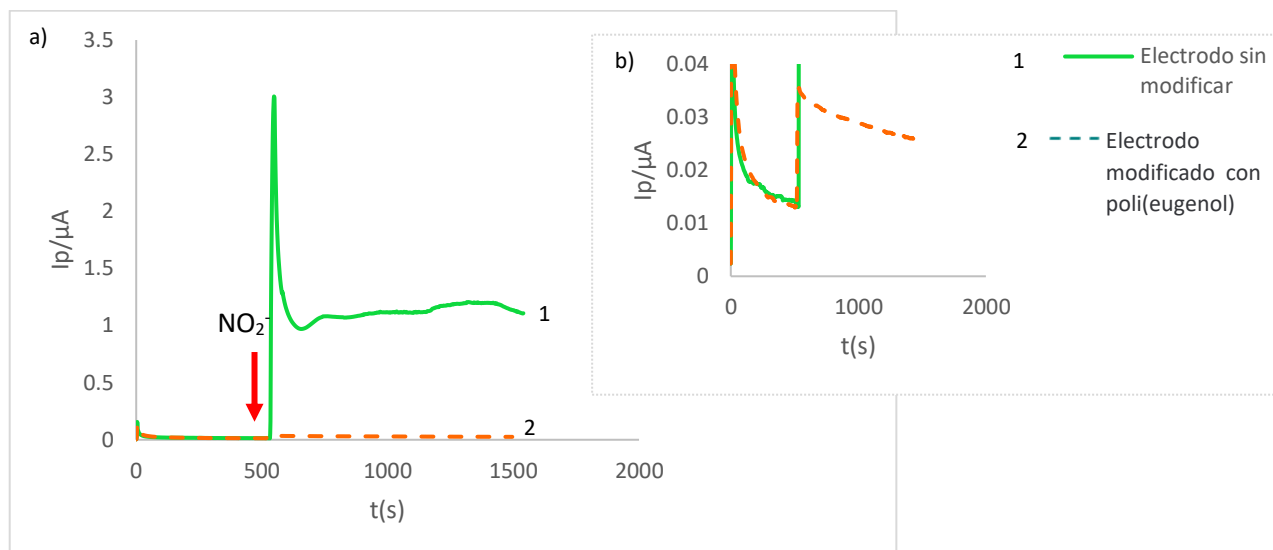


Figura 3. (a) Respuesta amperométrica del interferente NO_2^- , adición al mismo tiempo de la alícuota, electrodo sin modificar (curva 1), electrodo modificado con poli(eugenol) (curva 2). (b) acercamiento para observar la señal del NO_2^- en el electrodo modificado.

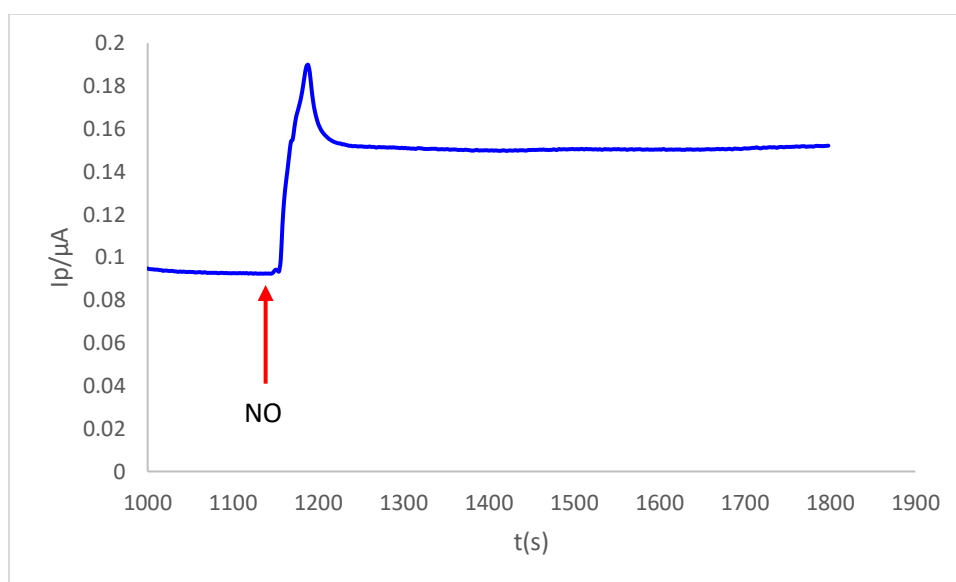


Figura 4. Detección amperométrica del NO .

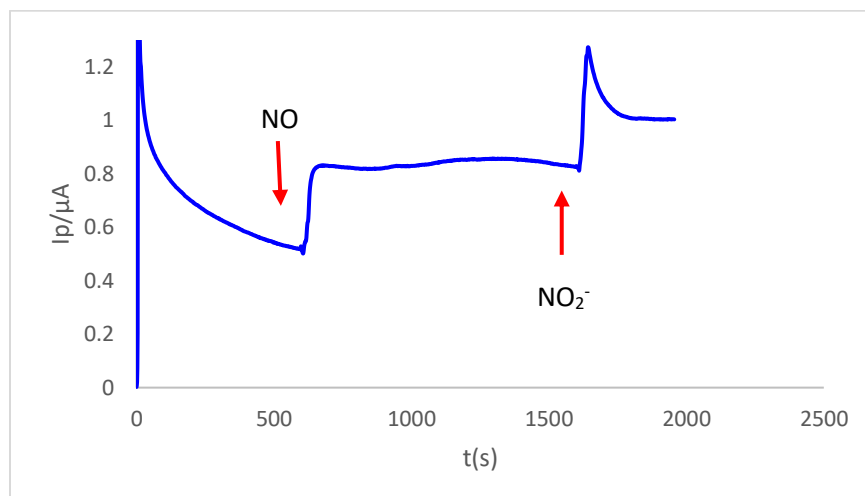


Figura 5. Respuesta amperométrica para la detección simultánea del NO y NO_2^- utilizando el electrodo modificado con poli(eugenol).

Conclusiones

Se modificaron electrodos serigrafados de carbono con poli(eugenol) mediante cronoamperometría. Las condiciones óptimas de polimerización fueron: concentración de monómero 10 mM de eugenol, en 0.1 M de NaOH durante 900 s, a un potencial de 0.4 V. Fueron caracterizados electroquímicamente utilizando de reacción modelo el Fe(II)/Fe(III), donde mostraron su estabilidad.

Los electrodos modificados con poli(eugenol) pueden ser utilizados para la detección del $\text{NO}^\bullet$. El depósito de poli(eugenol) actúa como barrera selectiva, permitiendo el paso del analito de interés ($\text{NO}^\bullet$) y evitando el del NO_2^- , no completamente, pero sí disminuyendo su señal. Esto se debe probablemente al efecto estérico o interacciones hidrófilas/hidrofóbicas.

Bibliografía

- [1] Tudorache, M., & Bala, C. (2007). Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, 565-578.
- [2] Bedioui, F., & Villeneuve, N. (2003). Electrochemical Nitric Oxide Sensors for Biological Samples- Principle, Selected Examples and Applications. *Electroanalysis*, 15, 1, 5-18.
- [3] Oliveira, R., Sella, C., Souprayan, C., Ait-Yahiatene, E., Slim, C., Griveau, S., . . . Bedioui, F. (2018). Development of a flow microsensor for selective detection of nitric oxide in the presence of hydrogen peroxide. *Electrochimica Acta*, 286, 365-373.
- [4] Ismail, A., Griveau, S., d'Orlyé, F., Varenne, A., & Bedioui, F. (2015). Quantitation of Cu^{+} -catalyzed Decomposition of S-Nitrosoglutathione Using Saville and Electrochemical Detection: a Pronounced Effect of Glutathione and Copper Concentrations. *Electroanalysis*, 27, 2857-2863.
- [5] Paul, D. W., Prajapati, I., & Reed, M. L. (2013). Electropolymerized eugenol: Evaluation as a protective film for oxygen sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 183, 129-135.
- [6] Griveau, S., Dumézy, C., Goldner, P., & Bedioui, F. (2007). Electrochemical analysis of the kinetics of nitric oxide release from two diazeniumdiolates in buffered aqueous solutions. *Electrochemistry Communications*, 9, 10, 2551-2556.
- [7] Corona Elizarrarás, C. (2020) “Electrodos modificados con PEDOT y poli(eugenol) para la detección del anión radical superóxido y óxido nítrico”, Tesis de Maestría, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México, 26-45.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOTOCATALÍTICA DEL BiOCl BAJO ILUMINACIÓN UV Y SOLAR PARA LA DEGRADACIÓN DE COLORANTES

**Lorena N. Méndez Alvarado^a, Juan Manuel Peralta-Hernández^b, Adriana Medina Ramírez^a,
Rosalba Fuentes Ramírez^a.*

^a Departamento de Ingeniería Química, DCNE, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato, Guanajuato, 36050, México. Correo electrónico: ln.mendezalvarado@ugto.mx.

^b Departamento de Química, DCNE, Universidad de Guanajuato, Cerro de la venada s/n, Pueblito de Rocha, Guanajuato, Guanajuato, 36040, México.

Resumen

En este trabajo se estudió la actividad fotocatalítica de oxiclورو de bismuto (BiOCl) comparando su fotoactividad con la del TiO₂ en la degradación del naranja de metilo (MO) bajo luz UV. Además, el BiOCl se probó en la degradación del naranja reactivo 84 (RO84) bajo luz UV y solar. El BiOCl fue sintetizado por el método solvotermal previamente reportado. El BiOCl se caracterizó por diferentes técnicas como: difracción de rayos X (RDX), microscopía electrónica de barrido (SEM) y se determinó la distribución de los poros y la superficie. Los resultados mostraron que la actividad fotocatalítica del BiOCl es mayor que el dióxido de titanio (TiO₂) bajo luz UV. Adicionalmente, los resultados mostraron que la degradación del RO84 (20 mg/L) fue mayor bajo irradiación solar, logrando la decoloración de alrededor del 97% a 60 min.

Palabras clave: *Oxicloruro de Bismuto, dióxido de titanio, fotodegradación, colorantes azo.*

Introducción

El agua es un recurso esencial para la vida terrestre, alrededor del 70% de la superficie del planeta está cubierta de agua, de la cual sólo el 2.5% de ésta se puede usar para la vida terrestre [1]. Hoy en día, el continuo incremento en el consumo de agua debido al acelerado crecimiento demográfico e industrial ha traído consigo la liberación de diversos contaminantes al medio ambiente, lo cual ha resultado en una seria disminución en la calidad y/o agotamiento del agua disponible para la vida terrestre. En el 2015, la organización mundial de la salud (OMS) informó que cerca de 1.7 millones de personas murieron debido a enfermedades relacionadas con la contaminación del agua [2].

El sector industrial concretamente el textil, se caracteriza por el alto consumo de agua por unidad de producción. Dasgupta et al., (2015), reportaron que el consumo de agua por unidad de producción en la industria textil es muy alto, alrededor de 0.2 m³ (200 L) de agua se consume por kg de tela procesada [3], generando por tonelada de producto terminado, entre 200 y 350 m³ de aguas residuales con diversos contaminantes, específicamente con altas concentraciones de sales inorgánicas y diferentes tipos de colorantes azoicos.

La presencia de colorantes azoicos en los efluentes residuales puede provocar efectos adversos en los ecosistemas, además, estos compuestos orgánicos son considerado tóxicos y cancerígenos. Con base a esto, es necesario desarrollar tecnologías capaces de eliminar este tipo de contaminantes altamente recalcitrantes[4]. La fotocatálisis es un proceso de oxidación avanzada, efectiva para la degradación de los colorantes azoicos, se basa en el uso de materiales semiconductores como

catalizador, fotoexcitados por fotones de contenido energético apropiado para la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2), responsables de la degradación de los colorantes alcanzando la mineralización del compuesto [5]. Diversas investigaciones se han enfocado en desarrollo de semiconductores, entre ellos, ha destacado el oxiclورو de bismuto (BiOCl) que ha demostrado tener propiedades potenciales como fotocatalizador en el tratamiento de efluentes residuales bajo iluminación de luz visible.

En este trabajo el oxiclورو de bismuto (BiOCl) fue sintetizado a través de un proceso solvotermal. El BiOCl se caracterizó mediante técnicas, como: microscopia electrónica de barrido (SEM), además se determinó la superficie mediante el método Brunauer-Emmett-Teller (BET). Se probó la actividad fotocatalítica del BiOCl para la degradación de colorantes azoicos, como el naranja de metilo (MO) bajo iluminación UV. Además, se evaluó la eficiencia de degradación del RO84 con el BiOCl bajo luz UV y solar, empleando diferentes dosificación del fotocatalizador.

Metodología

El procedimiento para la síntesis del BiOCl consistió en disolver 5 mmol de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 30 mL de metanol, después se añadieron cantidades equimolar de KCl y ácido cítrico. Se mantuvo en agitación constante durante 3 h. Después, la mezcla se transfirió a un autoclave manteniéndolo a 150°C durante 11 h. El producto se lavó y secó a 60°C durante 12 h.[6].

La caracterización de las fases cristalográficas del BiOCl se analizaron por difracción de rayos X (DRX), mediante un equipo Rigaku Miniflex®, los patrones de difracción se obtuvieron utilizando un difractómetro con radiación $\text{Cu K}\alpha$ de $1.54 \text{ \AA}$, a voltajes de 40 kV y corriente de 100mA. Cada muestra se escaneó en un rango de 2θ de 10 a 70° a una velocidad de $5^\circ/\text{min}$. El área de superficie específica (BET) del BiOCl se evaluó sobre la isoterma de adsorción de nitrógeno a 77K con el equipo Micromeritics TriStar II Plus surface area and porosity. La morfología y tamaño de partícula del BiOCl se analizaron mediante la microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM; ZEISS, Sigma HD VP) equipado con un detector de retrodispersión selectiva de ángulo (AsB). Las condiciones de análisis fueron: voltaje de 10 kV con un tamaño de apertura de 30 mm y un aumento de 10 kV.

En los primeros experimentos, se comparó la actividad fotocatalítica del BiOCl con la del dióxido de titanio ($\text{TiO}_2\text{-P25}$) bajo luz UV. En estos experimentos se dispersó 0.1 g de fotocatalizador por 100 mL de solución del MO, probando concentraciones de 20 y 50 mg/L del MO en solución. Se utilizó una bomba de aire para el suministro constante de oxígeno.

Los experimentos de degradación del colorante comercial RO84, inicialmente, se llevaron a cabo bajo luz UV, se probaron dos concentraciones del BiOCl desde 0.1 a 0.3g por 100 mL de solución del RO84 (20 mg/L). Por último, se evaluó la eficiencia de degradación del RO84 empleando 0.3g de BiOCl por 100 mL de solución de RO84 (20 mg/L) bajo luz solar. Este experimento se llevó a cabo verano de 2019 en la ciudad de Guanajuato, México ($20^\circ 49'$ - $21^\circ 14'$ latitud norte y $101^\circ 03'$ -

101° 27' longitud oeste); y a las 12:00 pm, con un incidente medio de radiación solar de 950 W/m², determinado por el Servicio Meteorológico Nacional de la Comisión Nacional del Agua de México.

Resultados

En la Figura 15 se muestra el patrón de difracción de Rayos X del BiOCl sintetizado donde se muestran señales que coinciden con la fase tetragonal del BiOCl (JCPDS 00-006-0249; con parámetros $a=b=3.8910$ Å y $c=7.369$ Å), además, se observa que el cristal presenta mayor exposición al plano (110). A partir de los difractogramas y mediante el uso del software X'pert Highscore Plus versión 2.2a, se calculó el tamaño de cristal, resultando un tamaño promedio del cristal de 19.1 nm.

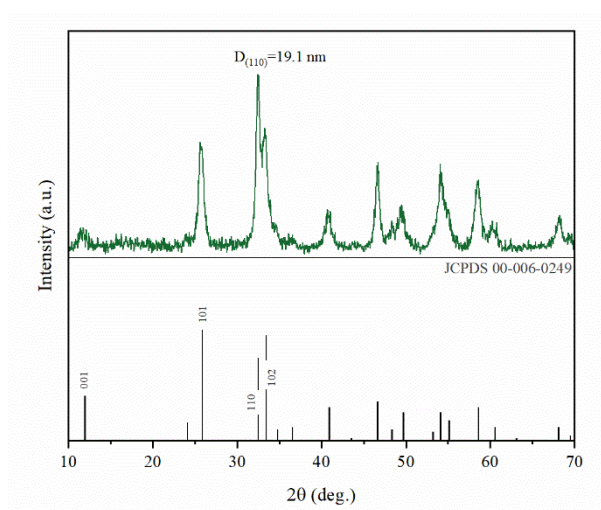


Figura 15. Difractograma de rayos-X del BiOCl sintetizado

La isoterma de adsorción-desorción de N₂ para el BiOCl sintetizado se muestra en la Figura 16 que corresponden a materiales mesoporosos (isoterma tipo IV), con un ciclo de histéresis en un rango de 0.4 a 1 (P/P₀) aproximadamente. Por lo general, según el tipo de ciclo o bucle de histéresis que presentes el material puede exhibir una amplia variedad de morfologías. En este caso se observa que el ciclo de histéresis del BiOCl sintetizado se relaciona con una morfología compuesta de partículas planas agregadas que dan lugar al poro en forma de hendidura. La distribución de tamaño de poro se muestra en la Figura 2 (inset) donde se exhibe la presencia de mesoporos en el BiOCl, con tamaños de poro que van desde los 2 a 20 nm. El área superficial del BiOCl es de 41.4 m²/g.

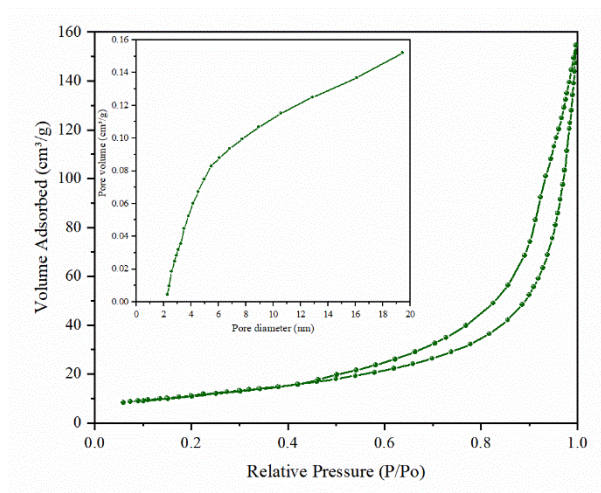


Figura 16. Isoterma de adsorción-desorción N_2 y curva de distribución de tamaño de poro en el BiOCl sintetizado (inset).

La morfología de superficie del BiOCl sintetizado se muestra en la Figura 17 donde se observan estructuras esféricas que están formadas por nanohojas irregulares, interconectadas entre sí, formando hendiduras lo cual proporciona mayor superficie para que se lleve a cabo las reacción fotocatalíticas. Las partículas esféricas presentaron un tamaño de diámetro del orden de 1 a 4 μm .

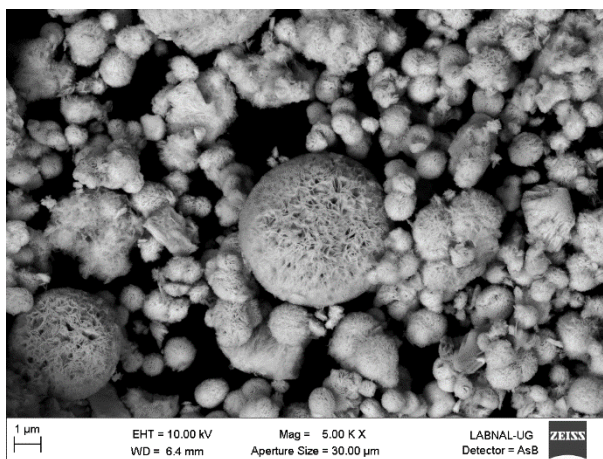


Figura 17. Micrografía electrónica de barrido de la muestra sintetizada de BiOCl

La degradación fotocatalítica de los colorantes orgánicos modelos han sido ampliamente usada para evaluar de la actividad de los fotocatalizadores, un ejemplo de ellos es el Naranja de metilo (MO) [7]. En este trabajo evaluó la actividad del BiOCl bajo luz UV para la degradación del MO probando soluciones sintéticas con concentraciones de 20 y 50 mg/L del colorante. Además, se comparó la eficiencia de degradación del BiOCl con el TiO_2 . En la Figura 18 se muestra los perfiles de degradación fotocatalítica del MO en solución, donde se observa que ésta se ve favorecida empleando el BiOCl sintetizado, alcanzando eficiencias de degradación entre el 85-90% del MO

en solución. En cambio, el TiO_2 logró degradar tan solo el 75% del MO en solución a la concentración más baja que se trabajó (20mg/L), además, se observa que al incrementar la concentración de MO (50mg/L) en solución, la eficiencia del TiO_2 disminuye en un 50%. Con base a los resultados se puede concluir que el BiOCl sintetizado mostró tener mayor fotoactividad bajo luz UV comparado al TiO_2 para la degradación del MO.

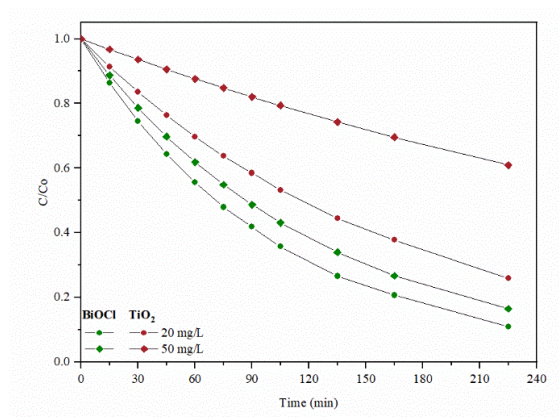


Figura 18. Degradación fotocatalítica empleando luz UV del MO a concentraciones de 20 mg/L (-♦-) y 50 mg/L, (-●-) con BiOCl (símbolos verdes) y TiO_2 (símbolos rojos).

Con base a estos resultados se propuso analizar la actividad fotocatalítica del BiOCl en la degradación de un colorante azoico reactivo, como lo es el naranja reactivo 84 (RO84). Se reporta que el uso de los colorantes reactivos dentro del proceso de tinción del algodón, presentan poca fijación, entre el 50 al 70%, debido a que el proceso de tinción con estos colorantes reactivos se ve disminuida, debido a una reacción competitiva, la hidrólisis del colorante. Siendo así que los efluentes generados en dicho proceso de tinción contienen una gran cantidad de colorantes.

La degradación fotocatalítica del RO84 se llevó a cabo a una concentración inicial de colorante de 20 mg/L. En la **Figura 15**Figura 19a se muestra que la mejor eficiencia de degradación se alcanzó empleando una concentración de BiOCl de 0.3g/100mL de solución. Además, se comparó la actividad del BiOCl bajo luz UV y solar, en la Figura 19b se muestra la eficiencia de degradación del RO84, en donde se puede observar que el BiOCl sintetizado presenta mayor fotoactividad bajo luz solar (-▲-) alcanzando a degradar cerca del 97% del colorante a los 60 min; mientras que, bajo luz UV (-▲-) tan solo se alcanzó a degradar aproximadamente el 76% del RO84 a 270 min.

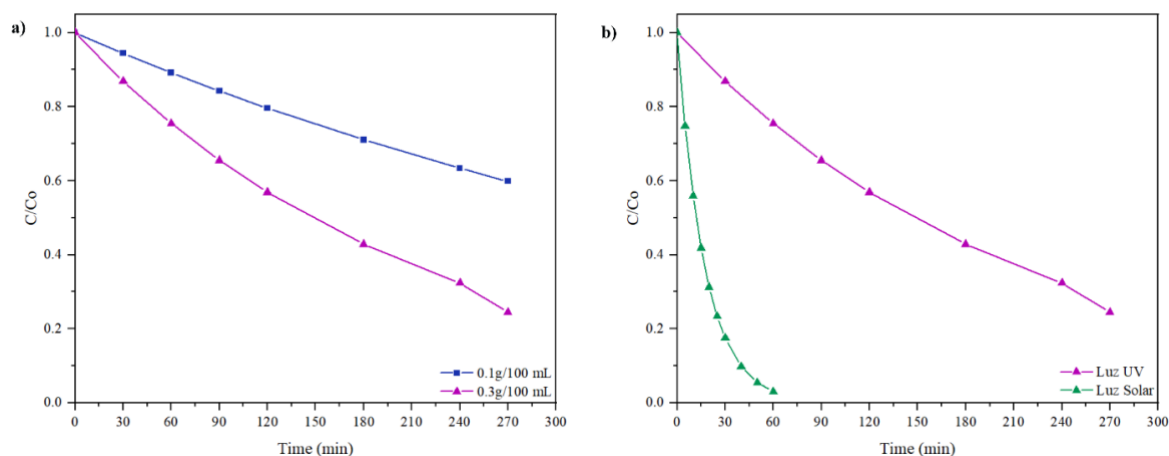


Figura 19.- Eficiencia de degradación de RO84 (a) probando concentraciones de 0.1g/100mL (-■-) y 0.3g/100mL (-▲-), (b) empleando luz UV (-▲-) y solar (-▲-), [BiOCl]=0.3g/100mL

Conclusiones

La síntesis del BiOCl mediante el método solvotermal generó una estructura jerárquica, obteniendo microesferas construidas a partir del auto ensamblaje de nanohojas interconectadas entre sí, proporcionando área superficial ($41.4 \text{ m}^2/\text{g}$) para que se lleve a cabo la adsorción del colorante, que es la etapa inicial para el proceso de fotodegradación. Los resultados obtenidos muestran que el BiOCl es capaz de activarse bajo iluminación UV para la degradación del MO y RO84, además, el BiOCl exhibió ser un fotocatalizador eficiente bajo la fotoactivación de luz solar, alcanzando a degradar cerca del 96% del RO84 (20 mg/L) a los 60 min.

Bibliografía

- [1] Cheng, M., Zeng, G., Huang, D., Lai, C., Xu, P., Zhang, C., & Liu, Y. (2016) "Hydroxyl radicals based advanced oxidation processes (AOPs) for remediation of soils contaminated with organic compounds: A review", *Chem. Eng. J.*, 284, 582–598.
- [2] Dasgupta, J., Sikder, J., Chakraborty, S., Curcio, S., & Drioli, E. (2015) "Remediation of textile effluents by membrane based treatment techniques: A state of the art review", *J. Environ. Manage.*, 147, 55–72.
- [3] Karpínska, J., & Kotowska, U. (2019). "Removal of organic pollution in the water environmental", *Water*, 11, (10), 1–7.
- [4] Nguyen, C. H., Fu, C. C., & Juang, R. S. (2018) "Degradation of methylene blue and methyl orange by palladium-doped TiO_2 photocatalysis for water reuse: Efficiency and degradation pathways". *J. Clean. Prod.*, 202, 413–427.
- [5] Sun, D., Wang, T., Xu, Y., Li, R., & Sato, T. (2015) "Hierarchical bismuth oxychlorides constructed by porous nanosheets: Preparation, growth mechanism, and application in photocatalysis", *Mater. Sci. Semicond. Process.*, 31, 666–677.
- [6] Wang, L., Li, Z., Chen, J., Huang, Y., Zhang, H., & Qiu, H. (2019) "Enhanced photocatalytic degradation of methyl orange by porous graphene/ZnO nanocomposite". *Environ. Pollut.*, 249, 801–811.
- [7] Yaqoob, A. A., Parveen, T., Umar, K., & Ibrahim, M. N. M. (2020). "Role of nanomaterials in the treatment of wastewater: A review". *Water*, 12, (495), 1–30.

GESTIÓN COORDINADA DE RESIDUOS AGRÍCOLAS PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE ALTO VALOR AGREGADO: EN EL ESTADO DE GUANAJUATO

Heriberto Alcocer-García^a, Juan G. Segovia-Hernández^a, Eduardo Sánchez-Ramírez^a, Ana G. Romero-García^a
Victor M. Zavala^b

^a Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Guanajuato, C.P.36050, MÉXICO.
eric_aog@hotmail.com

^b Department of Chemical and Biological Engineering, University of Wisconsin-Madison, 1415 Engineering Dr, Madison, Wisconsin, C.P. 53706, ESTADOS UNIDOS.

Resumen

En este trabajo se propuso un marco coordinado para gestionar la biomasa lignocelulósica de los residuos agrícolas en el estado de Guanajuato de manera escalable. El objetivo es la organización del intercambio, transporte y transformación de la biomasa en productos de alto valor agregado: ácido levulínico y furfural. Este marco coordinado involucra productores de biomasa, consumidores (biorrefinería), productos derivados, costo de transporte y costo de la tecnología. Este marco es operado por un sistema independiente, donde la función objetivo es maximizar la ganancia y lograr un equilibrio oferta-demanda. El modelo del marco permite manejar restricciones complejas e interdependencias que surgen del transporte y las transformaciones fisicoquímicas de la biomasa a productos. El marco es flexible en el sentido de que puede incluir a todos los proveedores y demandas, independientemente de su capacidad, ubicación geográfica o características demográficas. Como resultado el marco proporciona un enfoque sistemático que permite respuestas coordinadas en diferentes estaciones de producción de biomasa, logra visualizar objetivos sociales complejos como un impacto positivo en la agricultura local, establece proyecciones de un mercado viable, justifica la inversión en tecnología y evidencia la falta de esfuerzos en el uso de biomasa para la producción de productos químicos de alto valor agregado. Además, el marco puede facilitar la distribución coordinada de alimentos, transporte o algún otro producto.

Palabras clave: *Ácido Levulínico, Furfural, Biomasa, Marco Coordinado.*

Introducción

Actualmente en México, el mercado de residuos agrícolas contempla su uso para la generación de energía a través de la quema y como alimento para el ganado. Sin embargo, los precios bajos alientan a los agricultores a quemar desechos agrícolas para el desmonte de tierras y comenzar a preparar tierras para la próxima temporada. La agricultura "tumba, roza y quema" se ha utilizado tradicionalmente en México con el propósito de incorporar rápidamente ciertos nutrientes en el suelo, deshacerse de las hierbas y erradicar las plagas. Sin embargo, esta práctica es altamente contaminante y si no se toman las precauciones adecuadas, los fuegos pequeños y desatendidos se salen de control y se convierten en enormes incendios [1].

Por otro lado, en México, la transformación de la agricultura ha sido el objetivo de los últimos seis gobiernos federales, teniendo este último, la intención de asignar recursos no es suficientes, ya que

estos recursos escasos no garantizan una mayor autosuficiencia en los granos o el aumento de su producción, esto debido al desequilibrio entre el costo de producción y el precio final de los granos [2]. El Banco Mundial sostiene que el desarrollo agrícola es el medio más importante para poner fin a la pobreza extrema [3]. Por lo tanto, en busca de una fórmula que implique promover el crecimiento económico para los agricultores, así como promover factores que conduzcan a impactos económicos y ambientales positivos, se propone el uso de residuos agrícolas como fuente de biomasa, lo que generaría valor añadido a estos desechos y generaría una gama de productos que impactarían positivamente en la región.

La mala gestión y eliminación de los residuos agrícolas representa no sólo un peligro para el medio ambiente, sino también una oportunidad económica perdida. Específicamente, existen varias tecnologías de procesamiento de biomasa para generar productos de valor agregado a partir de desechos orgánicos, como productos químicos de bloques de construcción, combustibles y electricidad. Lamentablemente, la viabilidad económica de las rutas de procesamiento de residuos depende en gran medida de la escala, los costes de transporte y la composición de los residuos agrícolas (que varían en función de los residuos). Además, los responsables de la toma de decisiones a menudo desconocen los posibles usos de los flujos de residuos y, por lo tanto, de su valor inherente. Por lo tanto, no existe una red de gestión de residuos que garantice un mercado fuerte, un crecimiento sostenido para los sectores urbano y agrícola.

Los sistemas de gestión coordinados permiten un intercambio eficiente de productos en entornos complejos de toma de decisiones que involucran a un gran número de partes interesadas, que dependen de infraestructuras compartidas y restringidas, y que están impulsadas por complejos fenómenos físicos espaciotemporales y externalidades. Estos sistemas son implementados comúnmente en la industria. Los sistemas coordinados se han utilizado en la gestión de complejas estructuras de red eléctrica [4]. Los precios obtenidos en el marco propuesto proporcionarán un reflejo de los costos asociados y posibles ajustes a los precios de los residuos agrícolas y/o para identificar asignaciones óptimas para las operaciones. Además, este sistema puede proporcionar información para optimizar la inversión de fondos para incentivos asociados con la gestión de residuos agrícolas y para fomentar la intervención del sector privado o gubernamental. Por tanto, en este trabajo se propuso un marco coordinado, tomado como caso de estudio el estado de Guanajuato, se escogió este estado debido a que el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) muestra que Guanajuato es el segundo estado de México con mayor producción agrícola, aportando el 10.2% de la generación nacional [5], lo que lo convierte en una muestra importante para implementar el sistema coordinado.

Metodología

El problema de optimización se formuló utilizando datos de 10 años (2009-2018), cada año se propuso como un escenario, todos los escenarios se resolvieron simultáneamente. El objetivo de esto es obtener una solución que considera factores externos complejos como sequías, plagas, inundaciones, que de otra manera ser difícil de incorporar. Para obtener la cantidad de biomasa generada por cantidad de cultivo, utilizamos la radio reportada por McIlveen-Wright et al. 2013

[6] para diferentes materias primas. De las 3.830.305 toneladas por año de residuos agrícolas en el estado de Guanajuato el rastrojo de maíz representa 35%, paja de sorgo 41%, paja de trigo 17% y paja de cebada 7%. Para este caso de estudio se tomaron en cuenta solo las 3 biomásas más abundantes. También se obtuvieron costos y conversiones de tecnologías asociadas a la transformación a cada tipo de biomasa a productos de alto valor agregado. En este caso, los principales productos son Furfural y ácido levulínico, pero existen subproductos y productos intermediarios.

Consideramos un sistema que comprende un conjunto de ubicaciones geográficas (nodos) N , productos P , proveedores S , consumidores D , proveedores de transporte L , y proveedores de transformación (tecnología) T . Los productos comprenden diferentes tipos de flujos de residuos y productos derivados, los proveedores de transporte ofrecen alternativas para mover productos entre ubicaciones, y los proveedores de tecnología ofrecen alternativas para procesar productos para producir otros productos de mayor valor. Esta información es utilizada por un sistema independiente (ISO) para obtener precios y asignaciones que satisfagan el mercado. El mercado se satisface resolviendo un problema de optimización que encuentra vías óptimas de transporte y transformación que maximizan el beneficio y que equilibran la oferta y la demanda en una región determinada. En el marco del diseño propuesto, resolver el problema de compensación equivale a maximizar el beneficio colectivo de los actores del mercado, este modelo se basa en trabajos previos donde el marco coordinado fue utilizado para la gestión de residuos orgánicos [7].

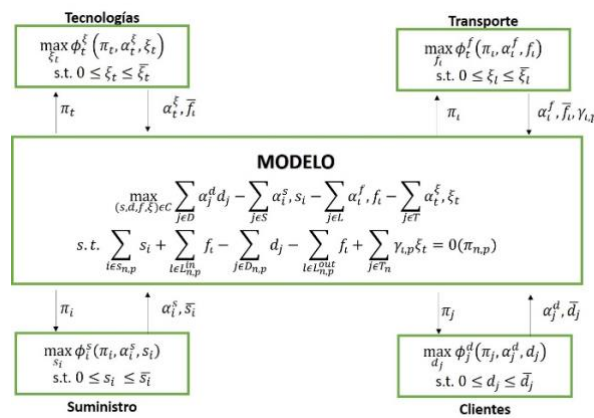


Figura 1. Sistema de coordinado.

La información requerida y/o generada por el sistema coordinado es recolectada en Microsoft® Excel®. Por otra parte, el sistema coordinado está programado en el lenguaje de Julia, ya que, proporciona facilidad y expresividad para la computación numérica de alto nivel, de la misma manera que los lenguajes como R, MATLAB y Python. Por último, se analizan los resultados obtenidos por el sistema coordinado y se utiliza QGIS para una mejor interpretación de los datos. QGIS es un sistema de información geográfica de software libre y de código abierto.

Resultados

Los datos de producción se obtuvieron a partir de datos abiertos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) [8]. Se seleccionó estratégicamente la ubicación de las biorrefinerías para el tratamiento de la biomasa y la producción de productos de valor añadido. Los criterios de selección fueron: su proximidad a las carreteras, la prestación de servicios para industrias de este tipo y su proximidad a la biomasa disponible, véase la Figura 2. Las ubicaciones (puntos) corresponden a parques industriales en las ciudades de: Abasolo, Celaya, Silao e Irapuato. Sector industrial en la ciudad de León es muy importante en el estado, sin embargo, este lugar no fue considerado, debido a los problemas de escasez de agua en la ciudad.

El problema de optimización comprende: 51 nodos, 1277 proveedores de biomasa y 11 productos diferentes (materias primas, intermediarios y derivados productos). Los 46 municipios del estado de Guanajuato y su producción de agricultura del periodo 2009-2018; cuatro ubicaciones de instalación para tecnologías de conversión y se consideró un único punto de demanda de los productos resultantes de la transformación.

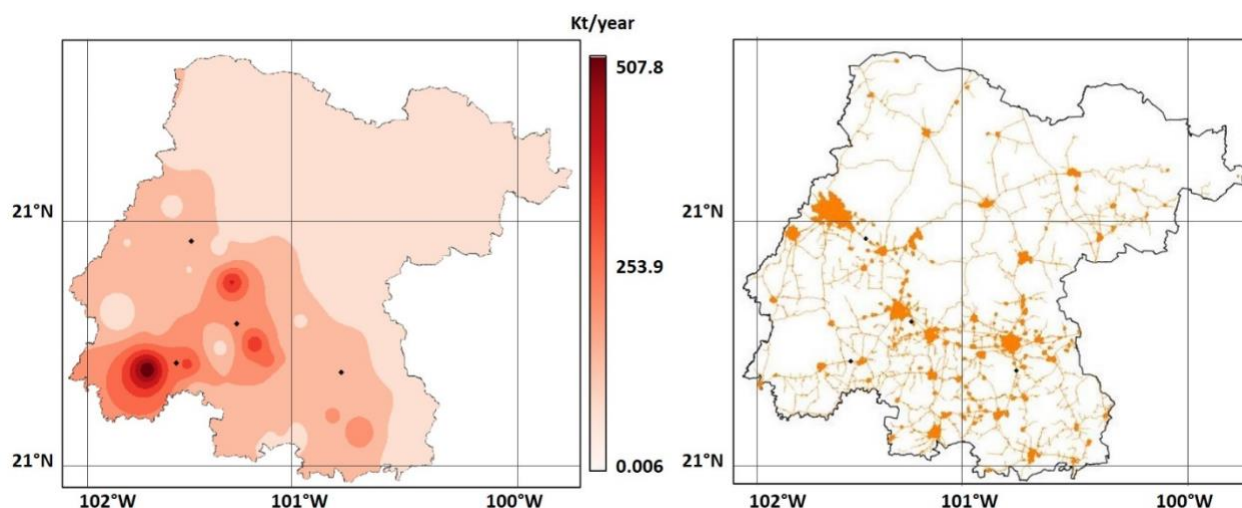


Figura 2. Ubicación de las biorrefinerías tomando como criterios: la cercanía a la biomasa y la disponibilidad de accesos carreteros.

Los productos derivados obtenidos son materias primas para aditivos de combustibles, por ello, la refinería Ing. Antonio M. Amor de Pemex es considerada el punto de demanda. Por simplicidad, asumimos que las rutas de transporte entre los nodos son lineales y asumimos que existen ofertas de transporte para mover producto entre todos los nodos del sistema. Esto da lugar a cientos de posibles caminos. Para dar una idea de la complejidad logística involucrada, el problema de optimización es un problema de programación lineal que contiene más de 32 mil variables de decisión y 7 mil restricciones. Este problema se puede resolver en 0.22 segundos utilizando herramientas de solución modernas como Gurobi 8.1.1.

En la Tabla 1 se muestra uno de los resultados arrojados por el marco coordinado, que son los precios a los cuales el mercado se equilibra (clearing prices), estos precios son calculados de forma independiente para cada nodo presente en el problema. Como resultado obtenemos un rango de

precios donde nuestro mercado aun existe y todos los miembros del sistema se ven beneficiados. En la Figura 3 se muestran los clearing prices para la materia prima del Rastrojo de maíz y como estos estarían distribuidos en todo el estado. En este documento sólo se muestra el ejemplo del maíz, pero esto es aplicable para todos los productos en la Tabla 1.

Tabla 1. Precios que equilibran el mercado.

Clearing prices			
Producto	Precio teórico	Precio mínimo	Precio máximo
Rastrojo de maíz	18.33	7.81	22.54
Paja de sorgo	14.96	3.35	17.83
Paja de trigo	16.66	4.43	19.31
Furfural	1700.00	1685.71	1700.00
Ácido levulínico	1102.31	1088.02	1102.31

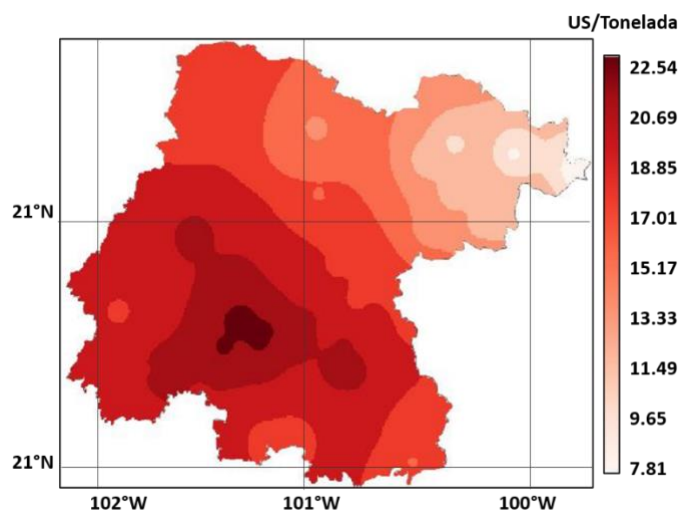


Figura 3. Clearing prices en el estado de Guanajuato para el rastrojo de maíz.

La Figura 4 presenta los resultados de los flujos de transporte (clearing flows) para los diferentes tipos de biomasa y productos derivados. En el caso de los clearing flows para el rastrojo de maíz, se observa que todos los proveedores están involucrados, Figura 3a. Para los otros dos tipos de biomasa, no todos los proveedores tienen participación, esto ocurre por dos razones: se produce una cantidad muy pequeña en este lugar y no puede competir contra el costo de transporte y producción; o esta biomasa no se produce en esta ubicación.

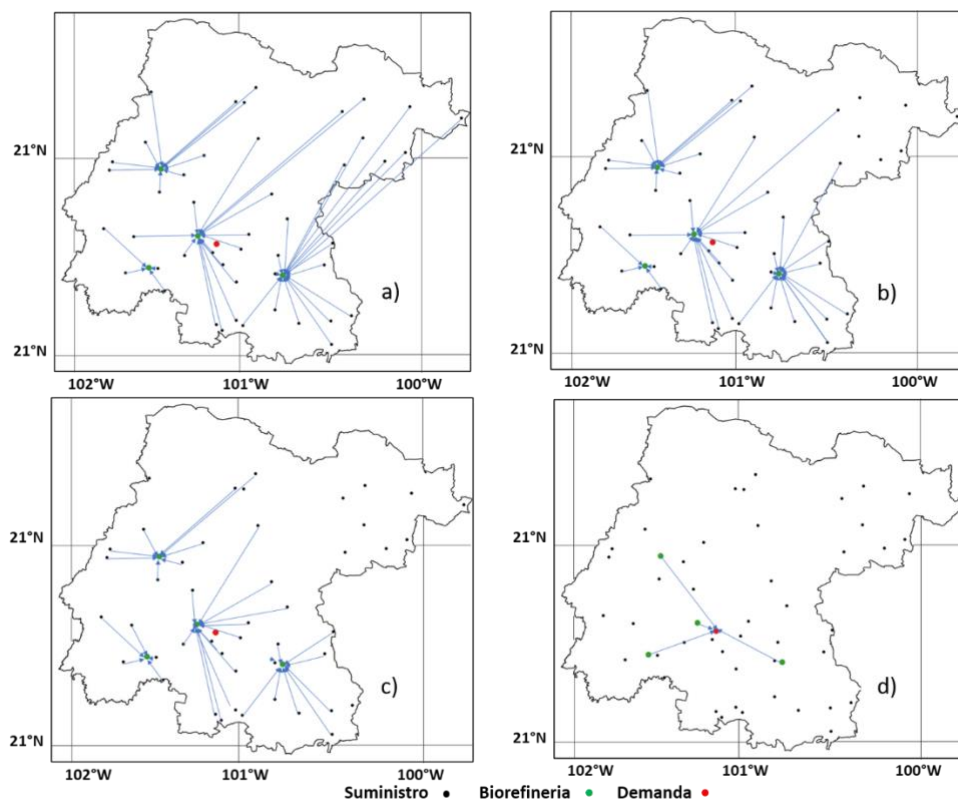


Figura 4. Clearing flows para diferentes biomazas y productos derivados: a) Rastrojo de maíz, b) Paja de sorgo, c) Paja de trigo y d) Productos derivados, en el estado de Guanajuato.

Es importante mencionar que el marco coordinado nos proporciona más información sobre las condiciones que maximizan el beneficio social, por mencionar algunas: porcentaje de suministros involucrados, cantidad de materia prima aportan, tecnologías están involucradas y las cantidades finales de productos, etc.

Conclusiones

Presentamos un sistema coordinado para facilitar la gestión de los residuos agrícolas de manera escalable mediante la realización coordinada de intercambio, transporte y transformación de biomasa en productos de valor agregado. El marco opera como un mercado coordinado bajo el cual los proveedores y consumidores de residuos, así como el transporte y la tecnología, brindan servicios de oferta a un operador de sistema independiente. Los precios de los residuos y productos derivados en diferentes ubicaciones geográficas se obtienen resolviendo un problema de despacho que maximiza el bienestar social y equilibra los productos en toda la región. La coordinación permite manejar interdependencias complejas entre productos y ubicaciones. Demostramos que el sistema ofrece precios y asignaciones que satisfacen las propiedades económicas y de eficiencia fundamentales que se esperan de un mercado competitivo. También mostramos que el sistema propuesto proporciona un marco sistemático para monetizar los impactos ambientales, los impactos en la salud y los beneficios de la remediación. Además, los precios revelan el verdadero valor de

los flujos de residuos y capturan variaciones espaciotemporales que ayudan a priorizar áreas y que revelan la necesidad de inversión en tecnologías de procesamiento, transporte, reubicación de instalaciones y almacenamiento estacional. El marco propuesto es escalable en el sentido de que puede proporcionar un acceso abierto que fomente las transacciones geográficas entre un gran número de pequeños y grandes actores porque permite la coordinación con otras infraestructuras. Un marco coordinado será cada vez más necesario a medida que la población humana crezca y se movilice, y a medida que la disponibilidad de recursos se vuelva más incierta.

Bibliografía

- [1] (FAO) (2012). *“Transición de la quema a la práctica de no quema”*. United Nations Food and Agriculture Organization
- [2] CEDRSSA. (2020) *“La agricultura y su relación con la pobreza en México”*. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria.
- [3] Banco Mundial (2019) *“Agricultura y alimentos”* <https://www.bancomundial.org/es/topic/agriculture/overview>
- [4] Blumstein, C., Friedman, L.S. y Green, R. (2002) *“The history of electricity restructuring in California”*. *J Ind Compet Trade*, 2(1-2):9–38.
- [5] SAGARPA. (2015) *“Plan de manejo de residuos generados en actividades agrícolas primera etapa: diagnóstico Nacional”*. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.
- [6] McIlveen-Wright, D.R., Huang, Y., Rezvani, S., Redpath, D., Anderson, M., Dave, A. y Hewitt, N.J. (2013) *“A technical and economic analysis of three large scale biomass combustion plants in the uk”*. *Appl. Energy*, 112:396-404.
- [7] Sampat, A.M., Hu, Y., Sharara, M., Horacio Aguirre-Villegas, H., Ruiz-Mercado, M., Larson, R.A. y Zavala, V.M. (2019). *“Coordinated management of organic waste and derived products”* *Comput Chem Eng*, 128:352–363.
- [8] SIAP. (2019) *“Datos abiertos”*. <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>.

MODELADO Y SIMULACIÓN DE UN PROCESO DE GASIFICACIÓN DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE HIGUERILLA Y *Jatropha curcas* PARA LA OBTENCIÓN DE HIDRÓGENO

Araceli Guadalupe Romero-Izquierdo ^{a*}, Claudia Gutiérrez-Antonio^a, Fernando Israel Gómez-Castro^b, Salvador Hernández^b

^a Departamento de Ingeniería Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Colonia Noria Alta, Guanajuato, Gto., 36050, MÉXICO.

ag.romeroizquierdo@ugto.mx

^b Departamento de Ingeniería Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Colonia Noria Alta, Guanajuato, Gto., 36050, MÉXICO

Resumen

Actualmente la producción limpia y sustentable de hidrógeno es de gran relevancia, debido a sus excelentes propiedades como combustible y transportador de energía. Es por ello que en este trabajo se presenta el modelado y la simulación en Aspen Plus V.10.0 de un proceso de gasificación en dos etapas para la producción de hidrógeno, a partir de los residuos lignocelulósicos de *Jatropha curcas* (cáscara externa e interna) e higuierilla (tallos, hojas y cáscara), cultivos con alto potencial productivo en México. De acuerdo con los resultados, 23.7% de rendimiento a hidrógeno es obtenido al final del proceso con una pureza molar de 0.72. Productos adicionales de valor en el mercado, como bio-aceite de pirólisis y CaCO₃ son obtenidos en el proceso.

Palabras clave: Hidrógeno, residuos lignocelulósicos, gasificación, Aspen Plus.

Introducción

La búsqueda de fuentes alternativas de energía ha sido una constante en las últimas décadas, debido al incremento de la población, al crecimiento en la demanda de energía, al uso excesivo de los combustibles fósiles y al grave impacto ambiental derivado de las actividades humanas. Una de las principales fuentes de energía renovable es la biomasa, la cual puede ser utilizada como materia prima para la producción sustentable de bioenergéticos [1]; siendo el bio-hidrógeno uno de los más importantes, gracias a sus propiedades como combustible y transportador de energía [2]. Típicamente el hidrógeno es producido en la industria del petróleo a partir del reformado catalítico del metano, contribuyendo significativamente a las emisiones de gases de efecto invernadero [3]. De acuerdo con Florin y Harris [4], la producción de hidrógeno limpia y sustentable permitirá reducir las emisiones de gases efecto invernadero, mejorando la seguridad energética. En este sentido, diversos procesos han sido desarrollados para la producción sustentable de hidrógeno, tales como foto-electrólisis, membranas de intercambio iónico, producción fotobiológica, gasificación y pirólisis de la biomasa, entre otros [2]. De acuerdo con Inayat y col. [1], la gasificación de la biomasa para la producción de hidrógeno es el proceso más competitivo económicamente, respecto a la pirólisis. En un gasificador, la producción de hidrógeno varía significativamente de acuerdo con el tipo de agente gasificante utilizado, la temperatura de operación y el uso de materiales adsorbentes de CO₂ [1-4]. La cantidad de hidrógeno producida puede incrementarse hasta más del 80% al usar la técnica de adsorción de CO₂ con vapor como agente gasificante [1]. Diversos trabajos experimentales y teóricos han sido publicados respecto al uso de agentes adsorbentes de

CO₂ para incrementar la producción de hidrógeno en la gasificación de biomasa, carbón y otras materias primas [1-5]. En este trabajo se presenta el modelado y la simulación de un proceso de gasificación para la producción de hidrógeno, utilizando CaO como agente adsorbente; a partir de biomasa residual de dos cultivos con alto potencial productivo en México, *Jatropha curcas* (JC) e higuierilla (HG). La biomasa residual de *Jatropha curcas* son las cáscaras externa e interna que recubren a la semilla del fruto; mientras que en el caso de la higuierilla se consideran los tallos, las hojas y la cáscara de la semilla. Es importante señalar que todos los residuos mencionados anteriormente son residuos lignocelulósicos, cuyos componentes mayoritarios son celulosa, hemicelulosa y lignina.

Metodología

La cáscara externa e interna de JC son obtenidas en dos etapas consecutivas de descascarillado, antes de la extracción del aceite vegetal. La cáscara externa representa el 37.5% en peso del fruto de JC, mientras que la interna, el 42% en peso de su semilla [6]. El perfil lignocelulósico normalizado en peso de ambos residuos es 61% celulosa, 21% hemicelulosa y 18% lignina [7]. En este trabajo se consideran 214.05 kg/h y 146.26 kg/h de cáscara externa e interna, respectivamente, para alimentarse al gasificador. En el caso de la HG, los tallos representan el 38.8% del peso total de la planta, mientras que las hojas y semillas el 14.4% y 46.8%, respectivamente; siendo la cáscara, el 30% en peso de la semilla [8]. La composición normalizada en peso de los tallos y hojas es 47.4% celulosa, 28.6% hemicelulosa y 25% lignina; mientras que en el caso de la cáscara se tiene 53% celulosa, 22.7% hemicelulosa y 24.3% lignina [7]. La alimentación de residuos de higuierilla al gasificador es de 279 kg/h y 1055.62 kg/h de cáscara y residuos (tallos + hojas), respectivamente. El modelado de la conversión de estos residuos lignocelulósicos hacia la obtención de hidrógeno se lleva a cabo en dos etapas consecutivas: pirólisis y gasificación. En la primera se obtiene bio-carbón, materia prima para la gasificación (segunda etapa). La pirólisis de las cáscaras de JC e HG se representa a través del modelo cinético de Haseli y col. [9]. Por su parte, la pirólisis del residuo se describe utilizando los datos cinéticos presentados en el trabajo de Kaur y col. [8]. De acuerdo con [9, 10], 950°K de temperatura, 1 bar de presión y una relación másica biomasa: aire 1:1 han sido consideradas como condiciones operativas para el reactor de pirólisis. El bio-aceite, producto de pirólisis, para los residuos de JC se describe como ácido-6-octadecanoico ($C_{18}H_{34}O_2$) y ácido-hexadecenoico ($C_{16}H_{32}O_2$); mientras que, para los residuos de HG como fenol (C_6H_6O), 2-methyl-ciclopentanona ($C_6H_{10}O_2$) y 2-6-dmetoxi-fenol ($C_8H_{10}O_3$). Respecto al bio-carbón, dos fórmulas empíricas han sido propuestas para describir al bio-carbón de JC e HG, $C_{1.2}H_2O$ y $C_{3.4}H_{4.3}O$, respectivamente [7]. Los datos cinéticos de la pirólisis de cáscaras de JC e HG se presentan en la Tabla 1; mientras que en la Tabla 2 se presentan los datos cinéticos de la pirólisis del residuo. Para un mayor detalle sobre las reacciones que describen la pirólisis de cada residuo consultar [7].

Tabla 1. Datos cinéticos para la pirólisis de las cáscaras de JC e HG [9].

Reacciones	Factor de frecuencia (s ⁻¹)	Energía de activación (kJ/mol)
$Biomasa \xrightarrow{k_1} Bio - gases$	1.3×10^8	140
$Biomasa \xrightarrow{k_2} Bio - oil$	2.0×10^8	133
$Biomasa \xrightarrow{k_3} Bio - char$	1.08×10^7	121

Tabla 2. Datos cinéticos para la pirólisis del residuo de HG [8].

Modelo cinético	Factor de frecuencia (s ⁻¹)	Energía de activación (kJ/mol)
$r_A = -kC_A$ $k = A_0 e^{-E_a/RT}$ $A = biomasa$ $Biomasa \xrightarrow{k} volátiles + bio - carbón$	$7.68e^7$	95.35

El bio-carbón obtenido de la pirólisis de cada residuo es la materia prima para la gasificación, la cual fue descrita por Inayat y col. [1] con un modelo cinético de segundo orden, a 950 K, relación vapor/biomasa de 3, y CaO como agente adsorbente de CO₂, CaO/biomasa de 1.52. En la Tabla 3 se presenta el modelo cinético de [1], ajustando las reacciones al bio-carbón obtenido para cada residuo.

Tabla 3. Datos cinéticos para la gasificación del bio-carbón de cada residuo [1,7].

Cinética de reacción	Reacciones	Parámetros de Arrhenius (mol/m ³ *s)
$r_i = -k_i C_A C_B$ $A, B:$ $reactantes$	JC $C_{1.2}H_2O + 0.2H_2O_{(g)} \rightarrow 1.2CO + 1.2H_2$ HG $C_3H_{4.3}O + 2H_2O_{(g)} \rightarrow 3CO + 4.15H_2$	$2 \times 10^5 \exp\left(\frac{-6000}{T}\right)$
	JC $C_{1.2}H_2O + 14H_2 \rightarrow 12CH_4 + 5O_2$ HG $C_3H_{4.3}O + 1.85H_2 \rightarrow 2CH_4 + CO$	$4.40 \exp\left(\frac{-1.62 \times 10^8}{T}\right)$
	JC $C_{1.2}H_2O + CO_2 \rightarrow 2.2CO + 2H_2 + 0.4O_2$ HG $C_3H_{4.3}O + CO_2 \rightarrow 3CO + 0.15H_2 + CH_4$	$0.12 \exp\left(\frac{-17921}{T}\right)$
	JC $CH_4 + H_2O \rightarrow CO + 3H_2$ HG $CH_4 + H_2O \rightarrow CO + 3H_2$	$3 \times 10^5 \exp\left(\frac{-15000}{T}\right)$
	JC $CO + H_2O \leftrightarrow CO_2 + H_2$ HG	$10^6 \exp\left(\frac{-6370}{T}\right)$ $K_w = 520 \exp\left(\frac{-7230}{T}\right)$
	JC $CO_2 + CaO \rightarrow CaCO_3$ HG	$10.20 \exp\left(\frac{-44.5}{T}\right)$

Los productos de la gasificación son gases condensables (bio-aceite) y no-condensables (CO , CH_4 , H_2O , O_2), de los cuales el H_2 debe separarse. La simulación de este proceso en Aspen Plus V.10.0 se realiza en los módulos RBatch para la pirólisis y la gasificación, SSplit para la remoción de sólidos y Flash para la condensación del bio-aceite. El modelo termodinámico utilizado para la simulación es NRTL.

Resultados

De acuerdo con la simulación de la gasificación en dos etapas para la producción de hidrógeno a partir de los residuos lignocelulósicos de JC e HG, en la Figura 1 se presenta el diagrama de flujo del proceso en Aspen Plus.

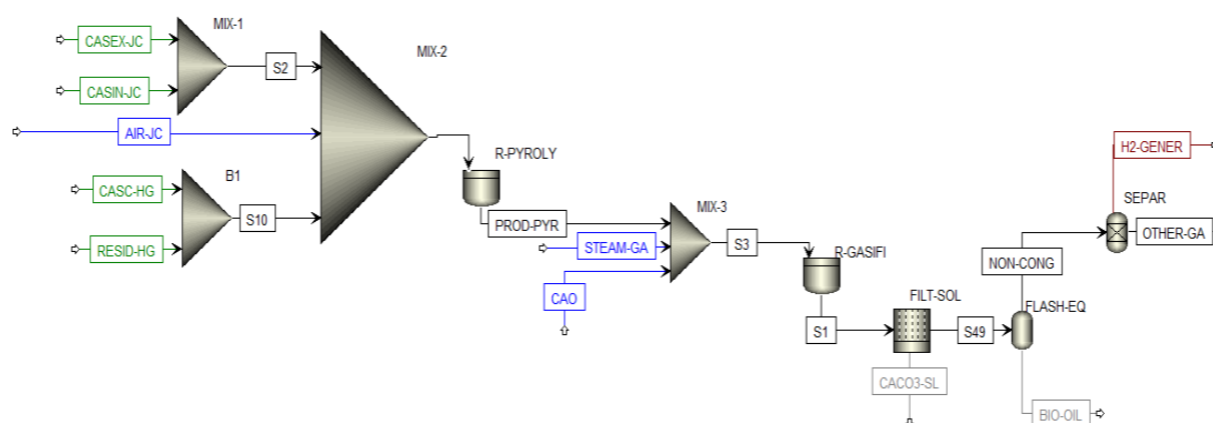


Figura 1. Diagrama de flujo en Aspen Plus de la gasificación de los residuos lignocelulósicos de las cáscaras de JC e HG para la producción de hidrógeno.

De acuerdo con los resultados de simulación, 33.66% de bio-aceite, 27.47% de bio-carbón y lo restante de bio-gases (no condensables) son obtenidos en la etapa de pirólisis de residuos. Por su parte, 401.7 kg/h de H_2 son obtenidos al final de la condensación del bio-aceite, lo que corresponde a 23.7% de rendimiento respecto a la biomasa de entrada. La pureza molar del hidrógeno obtenido es 0.72. Subproductos adicionales de este proceso son bio-aceite (596.3%) y CaCO_3 (4080.01 kg/h).

Conclusiones

En este trabajo se ha presentado el modelado y la simulación de un proceso de gasificación de dos etapas para la producción de hidrógeno a partir de los residuos lignocelulósicos de *Jatropha curcas* e higuera, dos cultivos energéticos con alto potencial productivo en México. De acuerdo con los resultados, 23.7% de rendimiento a H_2 son obtenidos, respecto a la biomasa de entrada, lo que corresponde a 401.7 kg/h con pureza molar de 0.72. Derivados de este proceso, bio-aceite y CaCO_3 son obtenidos como subproductos. El hidrógeno obtenido podría emplearse como materia prima en un entorno de aprovechamiento integral de estos cultivos, tal como un esquema de biorefinación.

Bibliografía

- [1] Inayat, A., Ahmad, M.M., Yiusiup, S., Mutallb, M.I.A. (2010) “*Biomass steam gasification in situ with CO₂ capture for enriched hydrogen gas production: a reaction kinetics modelling approach*”, *Energ.*, 3 (1), pp. 1472-1484.
- [2] González, J.F., Román, S., Bragado, D., Calderón, M. (2008) “*Investigation on the reactions influencing biomass air and air/steam gasification for hydrogen production*”, *Fuel Proce. Techn.*, 89 (8), pp. 764-772.
- [3] Mahishi, M. R., Sadrameli, M.S., Vijayaghvan, S., Goswami, D.Y. (2014) “*A novel approach to enhance the hydrogen yield of biomass gasification using CO₂ sorbent*”, *Jour. Eng. Gas Turb. Power* 130 (1), pp. 1-8.
- [4] Florin, N.H., Harris, A.T. (2007) “*Hydrogen production from biomass coupled with carbon dioxide capture: the implications of thermodynamic equilibrium*”, *Int. Jour. Hydro. Ener.*, 32 (17), pp. 4119-4134.
- [5] Molino, A., Chianese, S., Musmarra, D. (2016) “*Biomass gasification technology*”, *Jour, Ener. Chem.*, 25 (1), pp. 10-25.
- [6] Singh, R.N., Vyas, D.K., Srivastava, N.S.L., Narra, M. (2008) “*SPRERI experience on holistic approach to utilize all parts of *Jatropha Curcas* fruit for energy*”, *Ren. Ene.*, 33 (1), pp. 1868-1873.
- [7] Romero-Izquierdo, A.G. (2020) “*Diseño, modelado y simulación de un esquema de biorefinería para el aprovechamiento integral de mezclas de materias primas renovables*”, Tesis de Doctorado, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México.
- [8] Kaur, R., Gera, P., Kumar-Jha, M., Bhaskar, T. (2018) “*Pyrolysis kinetics and thermodynamic parameters of castor (*Ricinus communis*) residue using thermogravimetric analysis*”, *Biores. Techn.*, 250 (1), pp. 422-428.
- [9] Haseli, Y., Van Oijen, J. A. and De Goey, L. P. H. (2011) “*Modeling biomass particle pyrolysis with temperature-dependent heat of reactions*”, *J. Anal. Appl. Pyr.*, 90 (2), pp. 140–154.

MODULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE NEUTRÓFILOS HUMANOS EN INTERACCION CON *Trichomonas vaginalis*

Julieta Sepúlveda Angulo^a, Patricia Cuéllar Mata^a, Eva Edilia Ávila Muro^a

^aDepartamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Noria Alta s/n, Guanajuato, Guanajuato, CP 36050 MÉXICO

Resumen

Objetivo: Determinar el efecto de ácido palmítico en la interacción de neutrófilos humanos con *T. vaginalis* para entender los mecanismos de la defensa inmune innata frente al parásito.

Metodología: Por medio de técnicas de biología celular y molecular se evaluaron los niveles de expresión de IL-8, la producción de especies reactivas de oxígeno y la migración de neutrófilos humanos extraídos de sangre periférica en co-incubación con *T. vaginalis* y en presencia de ácido palmítico en un modelo de células semejantes a neutrófilos (nHL60).

Resultados: Las células nHL60 produjeron ROS e incrementaron 0.8 veces la expresión de IL-8 y 0.6 veces la expresión de IL-1 β , al ser estimuladas con *forbol miristato acetato* y lipopolisacárido, respectivamente, mostrando una respuesta semejante a neutrófilos humanos. El ácido palmítico indujo una respuesta inflamatoria incrementando 0.25 veces los niveles de expresión del mRNA de IL-8 y de elementos de la vía de señalización del receptor TLR4, así como un incremento de 1.5 veces en la producción de ROS, sugiriendo su efecto inmunomodulador. Los neutrófilos mostraron resultados similares apoyando esta hipótesis. Además, se observó reducción en la migración de neutrófilos incubados con ácido palmítico hacia un sobrenadante de monocitos THP1 incubados previamente con el parásito.

Conclusiones: Se sugiere la activación de mecanismos de defensa inmune innata de neutrófilos por ácido palmítico induciendo la producción de mediadores inflamatorios, lo que llevaría a una infección más eficiente por parte de *T. vaginalis* y una defensa menos efectiva por parte del hospedero.

Palabras clave: Neutrófilos, ácido palmítico, *Trichomonas vaginalis*, respuesta inmune.

Introducción

Tricomoniasis es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente causada por el parásito extracelular *T. vaginalis*, asociada a consecuencias severas que la convierten en una importante preocupación de salud pública [1]. *T. vaginalis* se adhiere a las células epiteliales y sobrevive en el tracto genitourinario del huésped detonando la respuesta inmune como la primera línea de defensa contra el patógeno. Particularmente el sistema inmune innato juega un papel crítico en la contención y eliminación de esta infección a través de la acción de neutrófilos, células dendríticas y macrófagos [2]. Los neutrófilos son considerados responsables del cambio citológico observado en el sitio de infección y son excelentes contribuyentes en la respuesta inflamatoria contra el parásito [3]. Además, existen evidencias que señalan la producción por neutrófilos de una diversidad de productos como aniones superóxido, óxido nítrico e interleucina-8 (IL-8) inducidos por *T. vaginalis* [4].

El receptor TLR4 es uno de los miembros de la familia *Toll- like receptors* expresados por los neutrófilos y especializado en la detección de microorganismos. Después de la unión a su ligando, el TLR4 induce la señalización intracelular mediada por el factor de diferenciación mieloide (MyD88), conllevando a la activación del factor de transcripción NFkB para la producción de IL-8. Una parte del ligando que se une a TLR4, el lipopolisacárido (LPS), contiene en su mayoría ácido palmítico (AP), lo que puede detonar una señalización inapropiada en TLR4 al ser expuesto a ciertas grasas saturadas con mayor frecuencia, cantidad y homogeneidad que en un balance biológico [5]. El AP es el ácido graso saturado más abundante en el plasma humano y el segundo en la sangre y tejido adiposo, bien conocido por estimular respuestas proinflamatorias en macrófagos [6]. A pesar de los diversos reportes sobre el efecto del AP en células inmunes como macrófagos y linfocitos, existen pocos estudios relacionados con su efecto sobre neutrófilos. Joshi y Barbe (2007) demostraron que el sobrenadante de hepatocitos tratados con AP contiene IL-8, induciendo la migración celular *in vitro*. Akamatsu reporta que no hay producción de ROS en presencia del AP mientras que Wanten (2002) reporta un efecto inductor de neutrófilos en presencia de AP [7,8]. También se ha demostrado que el AP activa diferentes respuestas inflamatorias por medio de la activación de la vía del receptor TLR4 [9]. Sin embargo, se desconoce si estos mecanismos inflamatorios son también modulados por el AP en neutrófilos y cómo afecta la respuesta a parásitos.

En este sentido y tomando como base que la infección por *T. vaginalis* dirige el proceso inflamatorio al incrementar el número de neutrófilos en los fluidos vaginales y que el AP induce la producción de ROS, es de esperar que este ácido graso desempeñe un papel importante en la modulación de la respuesta a la infección en células inmunes. En este proyecto tenemos la hipótesis de que el AP y otros ácidos grasos pueden tener un efecto inmunomodulatorio en la respuesta sobre neutrófilos humanos incubados con *T. vaginalis*. Para ello evaluamos el efecto del AP en la respuesta de neutrófilos obtenidos por diferenciación de células HL60 tratadas previamente con el ácido y expuestas posteriormente a *T. vaginalis* para investigar cómo se modifica su respuesta al parásito.

Metodología

Con la finalidad de conocer el efecto del ácido graso sobre la respuesta inmune innata de neutrófilos contra *T. vaginalis* GT-13, en este trabajo se estableció un modelo de estudio celular semejante a los neutrófilos humanos al diferenciar células HL60 incubándolas con 1.3 % de dimetilsulfóxido (DMSO), durante seis días a 37°C con 5% de CO₂. La diferenciación se comprobó evaluando la producción de ROS mediante la reducción de azul de tetrazolio (NBT) y los niveles de expresión de IL-1b e IL-8 por medio de RT-PCR. Brevemente, las células fueron incubadas con NBT y con el estimulante por 30 minutos. El formazan depositado en las células, resultado de la reducción del NBT, fue disuelto y se determinó la absorbencia en cada reacción. La determinación de los niveles de expresión de interleucinas se llevó a cabo extrayendo el RNA con Trizol, se trató con DNAsa y se sintetizó el cDNA. Se realizó la amplificación, seguida de la electroforesis de los productos de

amplificación para determinar los niveles de expresión por análisis densitométrico usando el gen de actina como control de expresión constitutiva.

En forma similar, se evaluó la modulación del AP primero en células nHL60 determinando los niveles de expresión de IL-8 y de genes involucrados en la vía de activación por TLR4 así como la producción de ROS. Posteriormente se aislaron neutrófilos de sangre periférica y se incubaron con *T. vaginalis* para evaluar el efecto del AP a través de estos parámetros. Finalmente se determinó la capacidad migratoria de los neutrófilos humanos incubados con AP hacia un sobrenadante obtenido de monocitos THP-1 incubados con *T. vaginalis* utilizando una cámara de Boyden.

Resultados

El tratamiento de células HL60 con DMSO generó células capaces de producir ROS al estimular con PMA en un 80%. Los niveles de expresión de IL-8 e IL-1b en neutrófilos aislados de sangre periférica y en células tratadas con DMSO estimuladas con LPS mostraron un incremento similar en el nivel de expresión de las interleucinas en presencia de LPS, 0.5 veces más que las células control no sometidas a estimulación (**Figura 1**).

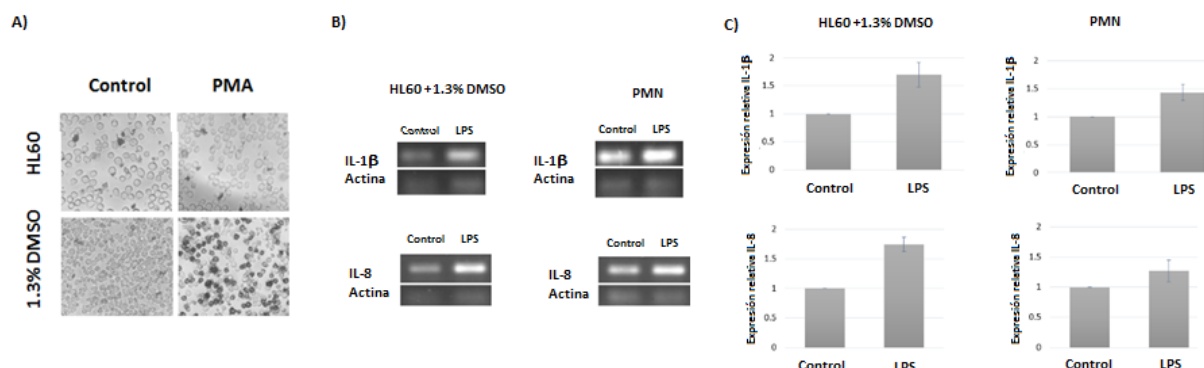


Figura 1. Diferenciación de células HL60 a células semejantes a neutrófilos. A) Evaluación de la producción de ROS mediante la reducción de NBT. B) Electroforesis y C) análisis densitométrico de RT-PCR para la expresión de IL-8 e IL-1b en neutrófilos. Se muestra la DE de 2 experimentos.

Los resultados obtenidos demuestran que se estableció un modelo celular (nHL60) con características morfológicas y funcionales semejantes a neutrófilos humanos para el estudio de la respuesta inmune innata inducida por ligandos de TLR4.

Para determinar el efecto del AP sobre la activación de las células nHL60, éstas fueron incubadas durante 4h con 1mM de ácido y se determinó su efecto sobre la expresión de las interleucinas proinflamatorias y elementos de la vía de TLR4. Los resultados muestran un incremento de 0.25 veces en la expresión de IL-8, 0.5 veces la de MyD88, 1 vez para NFκB y 1 vez para TLR4, revelando la activación de esta vía por AP. Por otro lado, la estimulación de células nHL60 con PMA previamente tratadas con el ácido graso, incrementó los depósitos de formazán, producto de la reducción de NBT, demostrando que el AP es un inductor de ROS en células nHL60 (**Figura 2**). Estos resultados sugieren la activación por AP, de la respuesta inmune innata asociada a TLR4 en

células semejantes a neutrófilos. Cabe mencionar que de manera contraria, al utilizar el ácido docosaheptaenoico (DHA), ácido graso insaturado, no solo no observamos incremento en estas respuestas sino una aparente reducción.

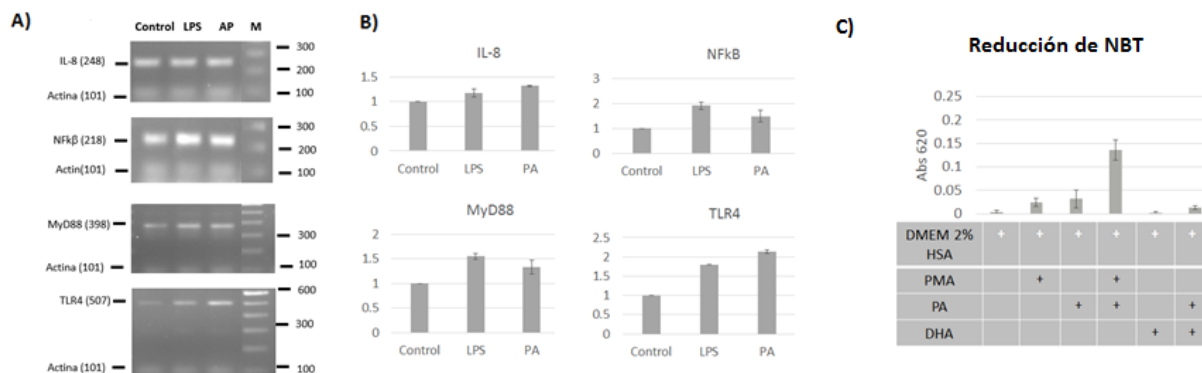


Figura 2. Inmunomodulación por AP en células nHL60. A) Electroforesis y B) análisis densitométrico de la determinación por RT-PCR de la expresión relativa de genes en nHL60 estimuladas con AP. B) Evaluación de la generación de superóxido por la reducción de NBT en células nHL60 tratadas con ácidos grasos. Los resultados muestran la DE de 2 experimentos.

Para estudiar el efecto del AP sobre la activación de neutrófilos que interaccionan con *T. vaginalis*, los neutrófilos fueron incubados independientemente con AP o con AP y trofozoítos del parásito durante 4 horas y se determinó la expresión de IL-8. Los resultados muestran un ligero incremento en la expresión de IL-8 durante la co-incubación de los neutrófilos con el parásito y con AP sugiriendo la participación de este ácido graso en la interacción hospedero- parásito. Aunado a ello, la producción de ROS en los neutrófilos incubados con el parásito en presencia del AP se incrementó y fue mayor que cuando los neutrófilos se incubaron solamente con los trofozoítos. Lo anterior muestra que el AP es un inductor de la producción de ROS en neutrófilos humanos aislados de sangre periférica que se enfrentan con *T. vaginalis*. Además, los neutrófilos que migran 0.8 veces más hacia el medio condicionado que hacia el medio control de RPMI, migraron en menor proporción al aumentar las concentraciones de AP de 100 a 500 μ M (**Figura 3**).

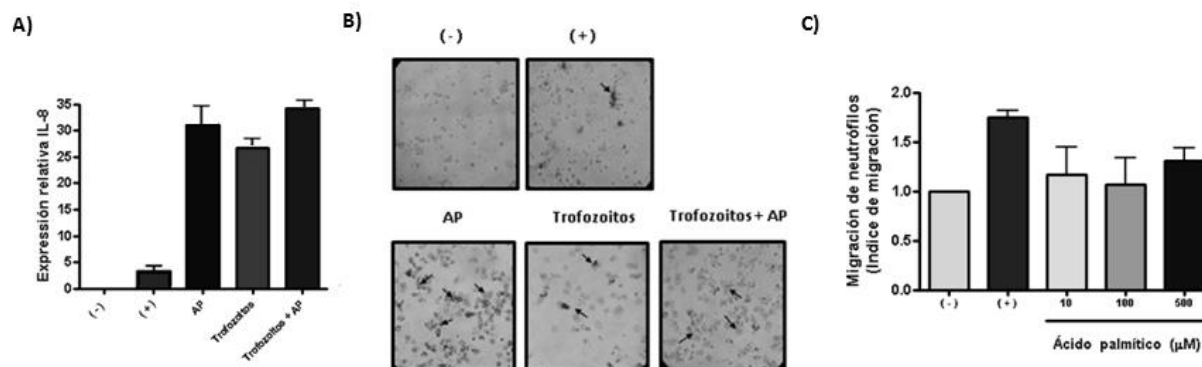


Figura 3. Respuesta inflamatoria de neutrófilos humanos en presencia de AG co-incubados con *T. vaginalis* A) Expresión relativa de IL-8 durante la co-incubación de neutrófilos aislados de sangre periférica con 1mM de ácido palmítico y 10,000 trofozoitos. Los resultados muestran la DE de 2 experimentos. B) Producción de ROS en neutrófilos incubados con ácido palmítico en co-incubación con *T. vaginalis*. C) Migración de neutrófilos en la cámara de Boyden en presencia o ausencia de ácido palmítico. Los resultados muestran la DE de 2 experimentos.

Los resultados de la co- incubación de neutrófilos aislados de sangre periférica con AP y *T. vaginalis* mostraron la modulación de la respuesta inflamatoria al modificar la estimulación de mediadores inflamatorios y reducir la capacidad migratoria de los neutrófilos.

Conclusiones

Los avances de este trabajo sugieren la modulación por AP de los mecanismos de defensa inmune innata contra *T. vaginalis* en neutrófilos humanos. Este proyecto requiere investigar más a fondo el efecto de otros ácidos como el DHA para contribuir en el entendimiento del papel de los AG en la activación de las células inmunes frente al parásito.

Bibliografía

- [1] Mielczarek E, B. J. (2016). *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure. *Infection*.
- [2] RS, P. D. (2013). Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sexually transmitted infections*.
- [3] Ryu JS, K. J. (2004). Production of interleukin-8 by human neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Infection and Immunity*.
- [4] Ryu, H. O.-S. (2013). Superoxide Anion production by human neutrophils activated by *Trichomonas vaginalis*.
- [5] Nguyen MT, F. S.-B. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *The journal of biological chemistry*.
- [6] Rodrigues, H. G. (2016). Fatty acids as modulators of neutrophil recruitment, function and survival. *European Journal of Pharmacology*, 50-58.
- [7] Akamatsu, H. Niwa, Matsunaga K. (2001). Effect of palmitic acid on neutrophil functions in vitro. *International Journal of dermatology*.
- [8] Wanten GJ, J. F. (2002). Saturated triglycerides and fatty acids activate neutrophils depending on carbon chain-length. *European journal of clinical investigation*.
- [9] Huang S, R. J.-M. (2012). Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *Journal of lipid research*.

OBTENCIÓN DE UNA CEPA RECOMBINANTE PARA LA SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Cdd-His₆ DE *Bacillus subtilis*

Adriana Guadalupe Patlán Vázquez¹, Víctor Ayala García² Mario Pedraza Reyes¹.

¹División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, CP.3600

²Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez de Durango, Durango, Dgo, Av. Veterinaria s/n Circuito Universitario, CP.34120

ag.patlanvazquez@ugto.mx, pedrama@ugtomx.onmicrosoft.com

Resumen

Tres de las cuatro bases presentes en el DNA sufren desaminación espontánea o inducida por diversos factores, produciendo uracilo, hipoxantina y xantina a partir de citocina, adenina y guanina respectivamente, las cuales pueden generar mutaciones por transición. Se ha reportado la participación de los sistemas de reparación de bases (BER), por escisión alternativa (AER) y de malos apareamientos (MMR) en el procesamiento de bases desaminadas [1,2]. Por otra parte, se desconoce cómo sistema MMR discrimina entre la cadena nueva y antigua. En bacterias Gram positivas y eucariotes que no metilan su DNA se ha sugerido que el sistema MMR puede ser dirigido por roturas de cadena sencilla. En humanos se ha propuesto que la formación de uracilo en DNA por una citidina deaminasa y posterior remoción provee las discontinuidades necesarias para discriminar entre las dos cadenas. *B. subtilis* posee una citidina deaminasa (Cdd) altamente similar a nivel estructural con la citidina deaminasa de humanos [3]. Para elucidar si Cdd de *B. subtilis* podría llevar a cabo el direccionamiento de MMR a través de la desaminación enzimática, en el presente trabajo se emplearon técnicas de biología molecular en la obtención de una construcción génica para sobreexpresar y purificar heterológamente la proteína recombinante Cdd-His₆. Los ensayos bioquímicos revelaron que, de acuerdo con un posible papel en señalar la ruta MMR, Cdd-His₆ mostró capacidad de desaminar la citocina *in vitro*.

Palabras clave: Bases desaminadas, citidin deaminasa, proteína recombinante.

Introducción

La desaminación de las bases es una de las lesiones más comunes en el DNA. Tres de las cuatro bases presentes en el DNA, citosina (C), adenina (A) y guanina (G) poseen un grupo amino exocíclico, que es susceptible de ser hidrolizado de manera espontánea bajo condiciones fisiológicas o inducida por radiación ionizante, radiación ultravioleta, radicales de oxígeno, ácido nitroso (HNO₂), óxido nítrico (NO) y bisulfito de sodio (SB). Produciendo así las bases desaminadas uracilo (U), xantina (X) e hipoxantina (Hx) respectivamente. Estas bases análogas poseen propiedades de apareamiento distintas a sus correspondientes bases originales. Las bases desaminadas son potencialmente pre-mutagénicas si no son reparadas antes de la siguiente ronda de replicación, produciendo mutaciones por transición C:G→T:A, A:T→G:C o transversión G:C→A:T [4]. Por lo que el correcto procesamiento de estas bases es sumamente importante para la supervivencia celular. Se ha reportado que en *B. subtilis* la reparación de las bases desaminadas ocurre a través de tres sistemas, reparación por escisión de bases (BER), reparación por escisión

alternativa (AER) [2] y reparación de bases erróneamente apareadas (MMR) [1]. Por otra parte, para que el sistema MMR pueda reparar los malos apareamientos es necesario que distinga entre la cadena molde y la de *síntesis de novo*. sin embargo, a la fecha se desconoce como ocurre esta discriminación. En bacterias Gram positivas y eucariotes que no metilan su DNA se ha sugerido que el sistema MMR puede ser dirigido por rupturas de cadena sencilla. En células B de ratón y humano, se ha propuesto que la formación de uracilo en DNA por una citidina deaminasa y posterior remoción provee las discontinuidades necesarias para discriminar entre las dos cadenas. *B. subtilis* posee una citidina deaminasa (Cdd) altamente similar a nivel estructural con la citidina deaminasa de humanos [3]. De la cual, se ha reportado que es capaz de desaminar secuencias específicas en DNA de cadena sencilla a pesar de no poseer un dominio de unión al DNA. Por lo tanto, la caracterización bioquímica de la citidina deaminasa Cdd es crucial para elucidar si Cdd de *B. subtilis* podría llevar a cabo el direccionamiento de MMR a través de la desaminación enzimática de la citocina.

Metodología

Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas y plásmidos que se utilizaron en este estudio se listan en las tablas 1.

Tabla1. Cepas empleadas en este estudio

<i>B. subtilis</i>	Genotipo	Referencia
168	Wild Type	Cepario PERM Lab
<i>E. coli</i>	Genotipo	Referencia
DH5α	F - ,80d lacZ &M15 &(lacZYA-argF) U169 delR recA endA1 hsdR17 (rk -mk +) supE44 thi-1gyrA96	Cepario PERM Lab
PERM 1163 Rossetta	F - ompT hsdSB(rB - mB -) gal dcm (DE3) pRARE. Cm ^R	Cepario PERM Lab
PERM 1325	<i>E. coli</i> DH5α + pET28b Kn ^R	Cepario PERM Lab
PERM 1586	DH5α conteniendo la construcción pJET-Blunt + ORF del gen <i>cdd</i> de <i>B. subtilis</i> . Con sitios de restricción <i>NcoI</i> y <i>BamHI</i> . Amp ^R	Este estudio
PERM 1589	DH5α conteniendo la construcción pET28b + ORF del gen <i>cdd</i> de <i>B. subtilis</i> . Con sitios de restricción <i>NcoI</i> y <i>BamHI</i> . Kn ^R	Este estudio
PERM 1607	Rossetta conteniendo la construcción pET28b + ORF del gen <i>cdd</i> de <i>B. subtilis</i> . Con sitios de restricción <i>NcoI</i> y <i>BamHI</i> , Cm ^r Kan ^r	Este estudio
Plásmido	Descripción	Referencia
pJET1.2/blunt	Vector de clonación. Amp ^R	ThermoFischer Scientific
pET28b	Vector de expresión para <i>E. coli</i> conteniendo un promotor Pspac-inducible por IPTG. Kn ^R	Donado por el Dr. Luis Brieba de Castro

Medios de cultivo

Para el crecimiento y propagación de las diferentes cepas se empleó el medio Luria-Bertani (LB). Cuando se requirió los medios de cultivo se suplementaron con ampicilina (Amp) a una concentración final de 100 µg/ml, kanamicina (Kn) a una concentración final de 50 µg/ml y Cloranfenicol (Cm) 25 µg/ml.

Técnicas de biología molecular

La purificación de fragmentos de ADN en geles de agarosa de bajo punto de fusión, la obtención de ADN plasmídico a pequeña escala (mini-preparaciones), así como la preparación de células competentes y su transformación con ADN plasmídico se efectuó de acuerdo con los protocolos previamente descritos [4].

Resultados

Amplificación del gen *cdd*

Para la amplificación del fragmento del gen *cdd* se utilizó ADN genómico aislado de la cepa *B. subtilis* 168 y los oligonucleótidos directo, 5'CGCCATGGCAGACAAGAATTAATAACAG 3' y reverso 5'CGGGATCCAGCTTTCGTTTCGTCATGT3' conteniendo sitios de restricción *Nco*I y *Sal*I, respectivamente (secuencias subrayadas). Utilizando una temperatura de alineamiento de 57°C y la ADN polimerasa de alta fidelidad Vent (New England BioLabs) se obtuvo una única banda con del tamaño esperado, 411 pb, como se muestra en la figura 1.

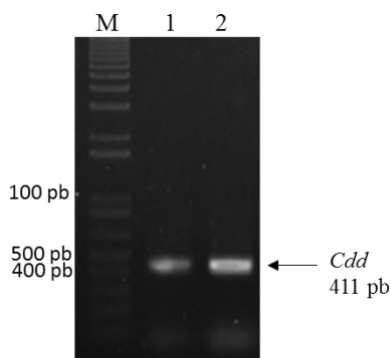


Figura 1. Amplificación por PCR de un fragmento de ADN de aprox. 411pb del ORF *cdd*. Se obtuvo ADN genómico de *B. subtilis* 168 con el cual se montaron reacciones de PCR. Amplificación del fragmento de 411 pb del gen *cdd* (carriles 1 y 2). La temperatura de alineamiento utilizada fue de 53 y 57°C en carriles 1 y 2.

Obtención de un plásmido para la sobre-expresión del gen *cdd* de *B. subtilis* en el plásmido pET28b.

El producto de PCR del gen *cdd* obtenido, se purificó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se ligó en el vector pJET1.2/blunt. Los productos de la ligación se introdujeron por transformación a células competentes de la cepa *E. coli* DH5α. Se seleccionaron varias colonias transformantes, se purificó su plásmido y se realizó un análisis de restricción, obteniendo la cepa PERM1586. Posteriormente, un fragmento de 411 pb correspondiente al gen *cdd* fue liberado del

plásmido pPERM 1586 por restricción con las enzimas *NcoI* y *SalI*, a la vez que se linearizó el vector pET28b con las mismas enzimas, ambos fragmentos se purificaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión y ligados entre sí. Los productos de la ligación se introdujeron por transformación en células competentes de la cepa *E. coli* DH5 α mediante choque térmico. Las colonias transformantes obtenidas fueron corroboradas mediante análisis de restricción como se muestra en la figura 2, 3 de las 4 colonias analizadas liberaron un fragmento de aproximadamente 411 pb correspondiente al gen *cdd*, corroborando así la construcción pET28-*cdd*. La colonia 4 fue almacenada como PERM1589. Posteriormente la construcción de la cepa PERM1589 se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* Rosetta para sobre-expresar la proteína Cdd-His₆ (cepa PERM1607)

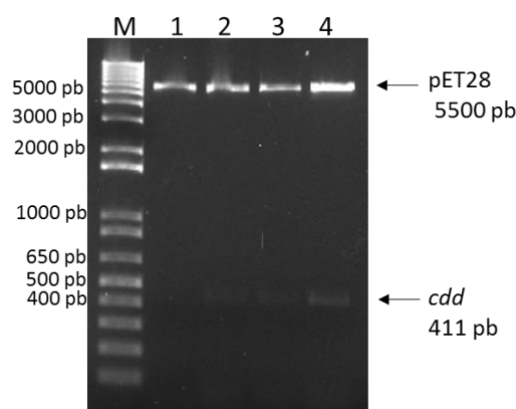


Figura 2. Análisis electroforético de la construcción pET28-*cdd*. Se realizó la digestión de DNA plasmídico de distintas clonas obtenidas con las enzimas *NcoI* y *BamHI*. **Carriles: 1**, marcadores de tamaño (pb); **2-5** diferentes clonas probadas. Las bandas esperadas se indican con flechas.

Sobreproducción de la proteína Cdd-His₆

Para corroborar la expresión de Cdd-His₆ en la cepa PERM1607, distintas colonias transformantes que contenían la construcción pPERM1586, se incubaron a 37°C en medio LB hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,5. En este punto se agregó al cultivo IPTG a una concentración final de 1mM y se continuó la incubación por 2h a 37°C. Se analizó por SDS-PAGE del extracto crudo de las distintas colonias a las que se les indujo o no la expresión de Cdd-His₆. Como se muestra en la figura 3, todas las colonias analizadas mostraron una banda más abundante de aproximadamente 14kDa correspondiente a Cdd-His₆.

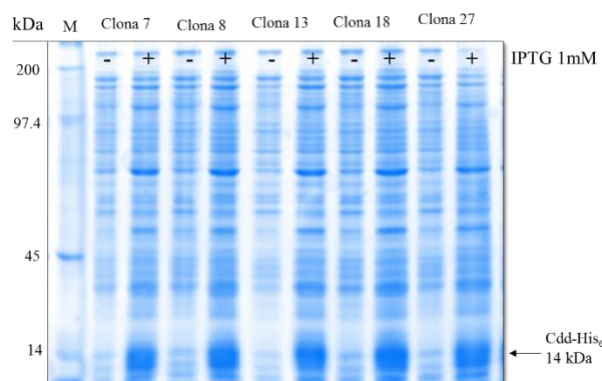


Figura 3. Análisis electroforético (SDS-PAGE) de la sobreexpresión y síntesis de la proteína *cdd-his6* en extractos celulares completos de distintas colonias de *E. coli* portando la construcción *pET28b-cdd*. En los cultivos que se indujo la expresión (+) se observa una banda más abundante de aproximadamente 14kDa.

Purificación de la proteína recombinante Cdd-His₆

Para llevar a cabo la purificación de la proteína Cdd-His₆, la cepa PERM1607 fue crecida en 200 mL de medio LB hasta una DO_{600nm} de 0.5, posteriormente se realizó la inducción de la síntesis de proteína, mediante la adición de 0.25 mM de IPTG, durante 2 h a 37°C. Las células se colectaron por centrifugación lavaron y re-suspendieron en un buffer de lisis (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazol 10 mM), se lisaron por sonicación y la fracción soluble se aplicó a una columna de Ni-NTA, previamente equilibrada con el mismo buffer de lisis. Para eliminar las no proteínas no unidas a la columna, esta se lavó con 100 mL de buffer de lavado (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazol 20 mM) y en seguida la proteína de interés se eluyó con 5 mL de buffer de elución (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300mM, imidazol 250 mM). Alícuotas de las fracciones soluble, no unida, lavados y las correspondientes eluciones se analizaron en un gel de DSD-PAGE al 17%. Los resultados mostrados en la Figura 4, indican que se logró obtener una proteína Cdd-His₆ purificada a homogeneidad como se puede observar en los carriles 5, 6 y 7, del tamaño esperado de 14 kDa. Experimentos preliminares mostraron que la proteína Cdd-His₆ fue capaz de desaminar *in vitro* citosina

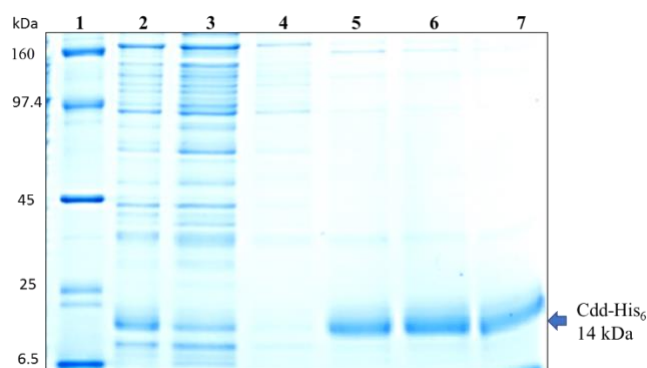


Figura 4. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de la proteína Cdd-His₆. Los extractos libres de células de un cultivo con IPTG de la cepa *E. coli* PERM 1589 se purificaron en una columna de Ni-Agarosa. **Carriles: 1**, marcador de peso molecular para proteínas (kDa), **2**, fracción soluble inducida, **3**, fracción no unida a la columna, **4**, lavados, **5-7**, eluciones.

Conclusiones

Se generó una cepa recombinante para la sobreexpresión y síntesis heteróloga de la proteína Cdd de *B. subtilis*, la cual fue purificada mediante cromatografía de afinidad metálica obteniendo como resultado fracciones de la proteína recombinante con alto grado de pureza.

Agradecimientos

Al Dr. Mario Pedraza Reyes por su excelente dirección al CONACYT por la beca otorgada y por el trabajo financiado (Grants 221231 y A1-S-27116) y la Universidad de Guanajuato (Grant CIIC 228/2019).

Bibliografía

- [1] López-Olmos, K., Hernández, M. P., Contreras-Garduño, J. A., Robleto, E. A., Setlow, P., Yasbin, R. E., & Pedraza-Reyes, M. (2012). Roles of endonuclease V, uracil-DNA glycosylase, and mismatch repair in *Bacillus subtilis* DNA base-deamination-induced mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 243–252.
- [2] Patlán, A. G., Ayala-García, V. M., Valenzuela-García, L. I., Meneses-Plascencia, J., Vargas-Arias, P. L., Barraza-Salas, M., Pedraza-Reyes, M. (2019). YwqL (EndoV), ExoA and PolA act in a novel alternative excision pathway to repair deaminated DNA bases in *Bacillus subtilis*. *PLoS ONE*, 14(2), 1–22.
- [3] Chung, S. J., Fromme, J. C., & Verdine, G. L. (2005). Structure of human cytidine deaminase bound to a potent inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(3), 658–660.
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). “Molecular cloning: a laboratory manual”. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

PAPEL DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Mfd Y GreA EN LA MUTAGÉNESIS ADAPTATIVA DE *Bacillus subtilis*

^aHilda Cecilia Leyva Sánchez, ^aMario Pedraza Reyes

^aDepartamento de Biología. Universidad de Guanajuato. Noria Alta S/N. Guanajuato, Guanajuato. 36050. MÉXICO.

hc.leyvasanchez@ugto.mx; pedrama@ugto.mx

Resumen

La mutagénesis adaptativa o de fase estacionaria (MFE) permite a poblaciones estresadas de células adquirir mutaciones que favorecen su crecimiento bajo una presión selectiva no letal, como la limitación de nutrientes. Este proceso ocurre tanto en bacterias como en eucariotas. Previos estudios demostraron que la mutación adaptativa ocurre en *B. subtilis*, mediante el empleo de la cepa YB955, una cepa que mide la reversión de las auxotrofías cromosómicas *hisC952*, *metB5* y *leuC452*. Estudios posteriores demostraron que la inactivación genética del sistema GO (YtkD, MutM y MutY) o las AP endonucleasas Nfo, ExoA y Nth promovían la MFE en la cepa YB955 de *B. subtilis*. Además, la MFE inducida por MutY requirió de Mfd, lo que sugiere que las transacciones transcripcionales sobre lesiones de ADN no voluminosas son una fuente potencial de variabilidad genética en esta bacteria. Por otra parte, en un estudio reciente se demostró la participación del factor de elongación de la RNAP, GreA, en promover la MFE en *B. subtilis*. Estas observaciones sugieren que los factores de transcripción Mfd y GreA coordinan los eventos mutagénicos que ocurren en las células de *B. subtilis* deficientes del sistema GO o las proteínas de reparación Nfo ExoA Nth.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, Mutagénesis adaptativa, Factores de transcripción.

Introducción

La integridad y la transmisión fiel de la información genética, desde el ADN hasta el ARN y las proteínas, es esencial para la vida. Sin embargo, todos los organismos se ven frecuentemente afectados por distintos factores físicos y químicos, capaces de alterar la estructura del ADN y sus precursores, provocando mutaciones. Aunque muchas de estas mutaciones pueden llegar a ser letales, otras resultan favorables para la célula, brindándole ventajas de sobrevivencia en condiciones de estrés celular, a este proceso se le conoce como Mutagénesis Adaptativa o de Fase Estacionaria (MFE) [1]. Mientras que en la mayoría de las investigaciones de mutación adaptativa se ha utilizado a *Escherichia coli* como modelo de estudio, también se han observado resultados similares en otros modelos procarióticos y eucarióticos [2, 3, 4, 5]. En *Bacillus subtilis* se demostró la existencia de MFE mediante el empleo de un sistema de generación de revertantes a las auxotrofías cromosómicas *hisC952*, *metB5* y *leuC425* en la cepa YB955 [5].

Utilizando este sistema, se ha demostrado que los sistemas de reparación juegan papeles cruciales en este proceso. Sustentando la participación del sistema de Reparación por Escisión de Bases (BER) en la MFE, **Barajas-Ornelas y col. (2014)** investigó el papel que desempeñan las AP endonucleasas: Nfo, ExoA y Nth en *B. subtilis* [6]. Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que la acumulación de sitios AP y posiblemente roturas de cadena, podrían constituir un

mecanismo importante por el cual se generen mutaciones durante fase estacionaria en *B. subtilis* [6]. Por otra parte, **Vidales y col. (2009)** demostraron que la inactivación genética del sistema GO (*ytkD*, *mutM* y *mutY*) generó un efecto hipermutagénico en los alelos *hisC952* y *metB5* de células de *B. subtilis* carentes de división, sugiriendo fuertemente que la MFE es exacerbada por las especies reactivas de oxígeno [7]. Interesantemente, para el alelo *leuC425* de la cepa YB955 no se observaron cambios en el número de revertantes entre la mutante deficiente en GO y la cepa parental [7]. Posteriormente, se encontró que la regulación de la actividad de MutY por el sistema de bases erróneamente apareadas (MMR) modula la MFE que ocurren en el alelo *leuC425* [8]. Además, la MFE inducida por MutY requirió de Mfd, lo que sugiere que las transacciones transcripcionales sobre lesiones de ADN no voluminosas son una fuente potencial de variabilidad genética en esta bacteria. Así mismo, se reportó que una mutante deficiente en *greA* afectó la frecuencia de reversión para los alelos *his*, *met* y *leu* con respecto a la cepa parental YB955, sugiriendo que GreA promueve eventos mutagénicos en células en ayuno de *B. subtilis*, para escapar de las condiciones limitantes del crecimiento [9].

Reportes recientes han postulado que el procesamiento con propensión a errores de los desajustes de ADN y las bases oxidadas originan eventos mutagénicos en genes transcripcionalmente activos [10]. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo investigar si el procesamiento de las lesiones de ADN que son sustratos del sistema GO y las AP endonucleasas: Nfo, ExoA y Nth, modulan los eventos mutagénicos dependientes de Mfd y GreA que ocurren en células de *B. subtilis* YB955 que no se dividen.

Metodología

Tabla 1. Cepas utilizadas en este estudio

<i>B. subtilis</i>	Genotipo	Referencia
YB955	<i>hisC952 metB5 leuC427</i>	Sung and Yasbin, 2002
PERM1036	YB955 Δnfo <i>exoA nth</i> Neo ^R Tet ^R Em ^R	Barajas Ornelas y col., 2014
PERM1409	YB955 Δnfo <i>exoA nth mfd</i> Neo ^R Tet ^R Em ^R Cm ^R	Leyva-Sánchez y col., 2020
PERM1516	YB955 $\Delta ytkD$ <i>mutM mutY</i> Neo ^R Tet ^R Em ^R	Vidales y col., 2009
PERM1517	YB955 $\Delta ytkD$ <i>mutM mutY mfd</i> Neo ^R Tet ^R Em ^R Cm ^R	Leyva-Sánchez y col., 2020
PERM1580	YB955 $\Delta ytkD$ <i>mutM mutY greA</i> Neo ^R Tet ^R Em ^R Cm ^R	Leyva-Sánchez y col., 2020
PERM1581	YB955 Δnfo <i>exoA nth greA</i> Neo ^R Tet ^R Em ^R Cm ^R	Leyva-Sánchez y col., 2020

^RResistencia a: Neo, neomicina; Tet, tetraciclina; Em, eritromicina Cm, cloranfenicol.

Ensayos de mutación adaptativa

El procedimiento utilizado para la realización de estos análisis ha sido previamente descrito por Sung y Yasbin (2002). Brevemente, se tomaron 250 μ l de un preinóculo para inocular 25 ml de medio A3, el cultivo se incubó a 37°C y 250 rpm. El crecimiento fué monitoreado con un colorímetro (Biochrom WPA CO7500) ajustado a una D.O. de 600 nm hasta localizar la fase T₉₀ (90 min después de T₀). Se colectó el cultivo a 4800 x g durante 10 min a temperatura ambiente, la pastilla celular, se lavó y resuspendió en 10 ml de sales Spizizen [(NH₄)₂SO₄ 0.2%, K₂HPO₄ 1.4%, KH₂PO₄ 0.5%, citrato de sodio 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.02%] [11]. Finalmente, se plaquearon 100

μL de la suspensión celular por sextuplicado en Medio Mínimo Spizizen (SMM: Sales Spizizen 1; glucosa al 5%, Histidina, Metionina y Leucina 50 $\mu\text{g/mL}$ o 200 ng/mL ; ácido glutámico e Isoleucina 50 $\mu\text{g/mL}$) y se incubaron a 37°C. El número de colonias revertantes se contó diariamente durante 10 días. La cantidad inicial de células usadas en el ensayo fue determinada por dilución seriada y siembra de alícuotas de 100 μL en medio LB-agar de las diluciones 10^{-6} y a la 10^{-7} (por triplicado).

Análisis de las frecuencias de reversión de los alelos *his*, *met* y *leu* dependientes del crecimiento mediante ensayos de fluctuación

Las frecuencias de reversión para los alelos *his*, *met* y *leu*, representativas de la fase de crecimiento, fueron obtenidas mediante ensayos de fluctuación [5]. Las cepas de interés fueron crecidas hasta saturación en 2 mL de medio A3 suplementado con los antibióticos apropiados durante 12 h a 37°C en agitación constante. Posteriormente, se realizó una dilución de 10^{-4} en 50 mL de medio A3 y se distribuyó en alícuotas de 1 mL en 42 tubos de ensaye estériles de 18 mm, los cuales fueron incubados a 37°C y a 250 rpm durante 15 h. Pasado este tiempo, las células se colectaron por centrifugación a temperatura ambiente en tubos de eppendorf estériles; se lavaron con 1 mL de SS 1X y se resuspendieron en un volumen final de 100 μL de SS 1X. Se sembraron 100 μL de cada tubo en placas de medio mínimo carentes del aminoácido de interés (tubos 1-38). Las células de 38 tubos fueron sembradas en placas de medio mínimo selectivo para cada aminoácido. De los 4 tubos restantes se efectuaron diluciones seriadas para realizar la cuenta viable en placas de medio LB. La frecuencia de reversión dependientes del crecimiento para *his*, *met* y *leu* se determinó por la prueba de fluctuación donde el número de mutaciones por cultivo (m) se calculó con la fórmula de Lea-Coulson $r/m \ln(m)=1.24$, donde r es la mediana de los 38 tubos; la frecuencia de mutación se estimó con la fórmula $m/2Nt$, donde Nt es el número total de UFC. Las colonias revertantes fueron contadas después de 48 h de incubación a 37°C.

Resultados

Mfd y GreA promueven eventos mutagénicos en células de *B. subtilis* en ayuno deficientes de las AP endonucleasas Nfo / ExoA / Nth o del sistema GO

Con la finalidad de conocer el papel de Mfd y GreA en la MFE, fueron inactivados genéticamente en los fondos genéticos carentes del sistema GO o de las AP endonucleasas. Los resultados revelaron que la interrupción de *greA* o *mfd* disminuyeron la producción de revertantes para los alelos *his* y *met* y los anularon para el caso de *leu*. Estos resultados sugieren que en las células de *B. subtilis* estresadas nutricionalmente, la acumulación de lesiones espontáneas de ADN no voluminosas, son procesadas con propensión al error con la participación de GreA y Mfd.

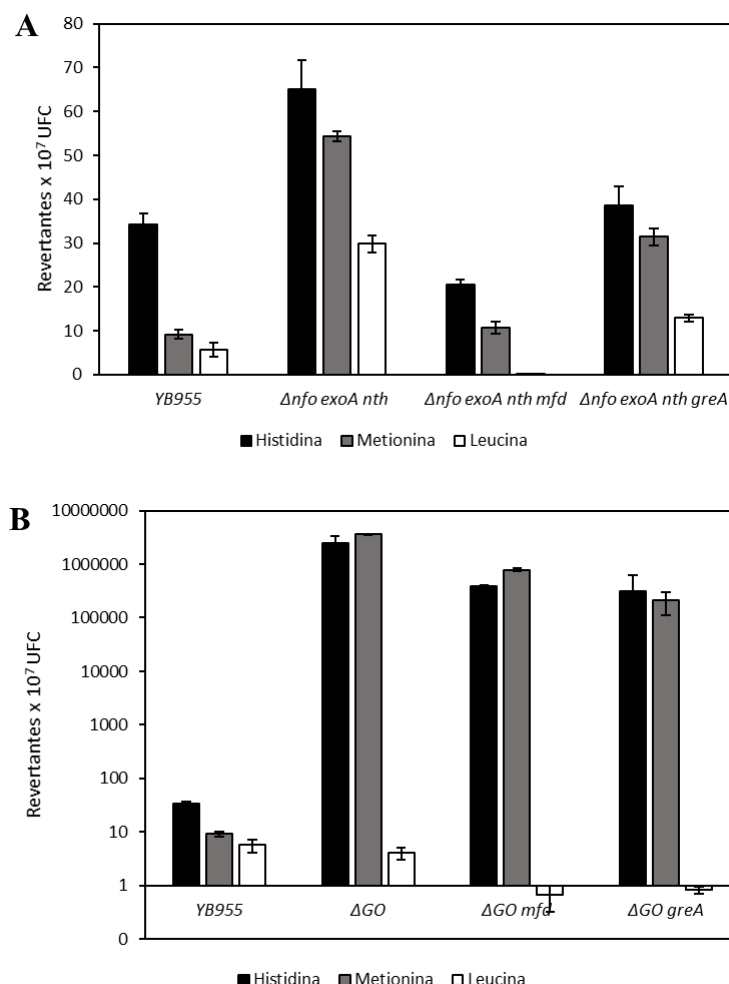


Figura 1. Frecuencia de reversión asociada a fase estacionaria. Frecuencia de generación de revertantes His^+ (barras negras), Met^+ (barras grises) y Leu^+ (barras blancas) **A)** Cepas de *B. subtilis* YB955 (parental), $\Delta nfo\ exoA\ nth$ (PERM1036), $\Delta nfo\ exoA\ nth\ greA$ (PERM1581) y $nfo\ exoA\ nth\ mfd$ (PERM1409). **B)** Cepas de *B. subtilis* YB955 (parental), ΔGO (PERM1516), $\Delta GO\ greA$ (PERM1581) y $\Delta GO\ mfd$ (PERM1580).

Mfd y GreA previenen la mutagénesis en células de *B. subtilis* en crecimiento con sistemas de reparación por escisión de bases (BER) inhabilitados

Las condiciones que prevalecen en el crecimiento de bacterias conducen a la reparación de alta fidelidad de las lesiones genéticas promovidas por especies reactivas de oxígeno (ERO) [8]. Congruentemente, nuestros resultados revelaron que en células en crecimiento de la cepa *B. subtilis* YB955, la ausencia simultánea de las AP endonucleasas: Nfo, ExoA y Nth aumentaba significativamente las tasas de reversión de los alelos *hisC952*, *metB5* y *leuC427* (Fig. 2). Sin embargo, en marcado contraste con lo observado en las células con estrés nutricional (Fig. 1), la interrupción de *mfd* o *greA* aumentó las tasas de mutación de la cepa deficiente en las AP endonucleasas (Fig. 2). Estos resultados sugieren fuertemente que ambos factores de transcripción

son parte de vías de reparación de alta fidelidad que procesan los sitios AP en las células de *B. subtilis* en crecimiento. Ampliamos nuestro análisis al cultivo de células de la cepa deficiente en GO. Esta cepa exhibió tasas de reversión significativamente más altas de los genes *his*, *met* y *leu* que la cepa YB955 (Fig. 3). La inactivación de *mfd* o *greA* indujo aumentos adicionales en los niveles de revertantes de His⁺ y Met⁺ producidos por la cepa deficiente en el sistema GO, mientras que las tasas de reversión Leu⁺ disminuyeron en las cepas analizadas (Fig. 3).

Cepa	His ⁺	Met ⁺	Leu ⁺
YB955	3	1.9	2.5
$\Delta nfo\ exoA\ nth$	6.4	14.7	21.8
$\Delta nfo\ exoA\ nth\ mfd$	45	161	218
$\Delta nfo\ exoA\ nth\ greA$	10.8	31.7	49.7

Figura 2. Frecuencia de mutación asociada al crecimiento. Frecuencia de generación de revertantes His⁺, Met⁺ y Leu⁺ en las cepas de *B. subtilis* YB955 (cepa parental), $\Delta nfo\ exoA\ nth$ (PERM1036), $\Delta nfo\ exoA\ nth\ mfd$ (PERM1409) y $\Delta nfo\ exoA\ nth\ greA$ (PERM1581).

Cepa	His ⁺	Met ⁺	Leu ⁺
YB955	3	1.9	2.5
ΔGO	700	1000	80
$\Delta GO\ mfd$	3350	2390	51
$\Delta GO\ greA$	2632	3222	35

Figura 3. Frecuencia de mutación asociada al crecimiento. Frecuencia de generación de revertantes His⁺, Met⁺ y Leu⁺ en las cepas de *B. subtilis* YB955 (cepa parental), ΔGO (PERM1516), $\Delta GO\ mfd$ (PERM1517) y $\Delta GO\ greA$ (PERM1580).

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este informe proporcionan evidencia novedosa que sugiere que las lesiones de ADN generadas espontáneamente por factores metabólicos que son sustratos del sistema BER activan la función de Mfd y GreA de inducir eventos de reparación con propensión al error posiblemente en sitios AP, rupturas de cadenas sencilla y lesiones oxidativas como la 8-oxoG promoviendo eventos mutagénicos divergentes durante las fases de crecimiento y estacionarias de *B. subtilis*.

Trabajo financiado por CONACyT (Subsidio A1-S-27116) y la UG (Subsidio CIIC 228/2019 y 178/2020). HCLS, agradece la beca otorgada por CONACyT para la realización de este trabajo.

Bibliografía

[1] Cairns, J., y P.L. Foster. (1991). "Adaptative reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*", Genetics, 128: 695-701.

- [2] Foster, P.L., y J.M. Trimarchi. (1994). “Adaptative reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli* by sample base deletions in homopolymeric runs”. *Science*, 265: 407-409.
- [3] Kasak, L., R. Horak, y M. Kivissar. (1997). “Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria”. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94: 3134-3139.
- [4] Halas, A., Baranowska, H. y Policinska, Z. (2002). “The influence of the mismatch repair system on stationary-phase mutagenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”. *Curr. Genet.*, 42: 140–146.
- [5] Sung, H. M., y Yasbin, R. E. (2002). “Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis*”. *J. Bacteriol.*, 184(20), 5641–5653.
- [6] Barajas Ornelas, R. del C., Ramírez Guadiana, F. H., Juárez Godínez, R., Ayala García, V. M., Robleto, E. A., Yasbin, R. E. y Pedraza Reyes, M. (2014). “Error-Prone Processing of Apurinic/Apyrimidinic (AP) Sites by PolX Underlies a Novel Mechanism That Promotes Adaptive Mutagenesis in *Bacillus subtilis*”. *J. Bacteriol.*, 196: 3012-3022.
- [7] Vidales, L. E. Cárdenas, L. C. Robleto, E. Yasbin, R. E. y Pedraza-Reyes, M. (2009). “Defects in the error prevention oxidized guanine system potentiate stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*”. *J. Bacteriol.*, 191: 506–13.
- [8] Débora, B. N., Vidales, L. E., Ramírez, R., Ramírez, M., Robleto, E. A., Yasbin, R. E. y Pedraza Reyes M. (2011). “Mismatch repair modulation of MutY activity drives *Bacillus subtilis* stationary-phase mutagénesis”. *J. Bacteriol.*, 193: 236–245.
- [9] Villegas Negrete N. (2017). “Papel de GreA, NusA y Mfd en la mutagénesis adaptativa asociada a la transcripción de *Bacillus subtilis*”, Tesis de Doctorado, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México, 39-42.
- [10] Gómez Marroquín, M., Martin, H. A., Pepper, A., Girard, M. E., Kidman, A. A., Vallin, C., Yasbin, R. E., Pedraza Reyes, M., y Robleto, E. A. (2016). “Stationary-Phase Mutagenesis in Stressed *Bacillus subtilis* Cells Operates by Mfd-Dependent Mutagenic Pathways”. *Genes*, 7(7).
- [11] Spizizen, J. (1958). “Transformation of biochemically deficient strain of *Bacillus subtilis* by deoxiribonucleate”. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*. 44: 1072-1078.

PARTICIPACIÓN DE LA ESFINGOMIELINASA ÁCIDA EN LA REPARACIÓN DE DAÑOS A LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE *Entamoeba histolytica*

Fátima Ramírez-Montiel^a, Claudia Mendoza-Macías^b, Ángeles Rangel-Serrano^a, Itzel Páramo-Pérez^a, B. Liliana España-Sánchez^c Fernando Anaya-Velázquez^a, Bernardo Franco^{a*}, Felipe Padilla-Vaca^{a*}

^a Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto, C.P. 3600, MÉXICO. ^b Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto, C.P. 3600, MÉXICO. ^c CONACYT Centro de Investigación y Desarrollo en Electroquímica (CIDETEQ) S.C. Parque 16 Tecnológico Querétaro s/n San Fandila, Qro, C. P. 76703, MÉXICO

*Autores correspondientes: email: padillaf@ugto.mx (FPV); bfranco@ugto.mx (BFB)

Resumen

La relación hospedero-amiba se basa en una serie de interacciones entre los mecanismos de defensa del anfitrión y las estrategias de supervivencia del parásito. Las células del hospedero tienen diversos mecanismos para la eliminación de patógenos, mientras que *Entamoeba histolytica* ha desarrollado estrategias para contrarrestar la respuesta inmune del hospedero y facilitar su supervivencia. Cuando *E. histolytica* se expone a proteínas formadoras de poros, aumentó la actividad de la esfingomielinasa ácida (aSMasa) secretada, que se relacionó con una mayor viabilidad amibiana. La formación de poros en la membrana plasmática (MP) de los trofozoítos inició la entrada no controlada de Ca^{2+} , que favoreció la migración de los lisosomas a la periferia de la célula, su fusión con la MP y la liberación de aSMasa al lado externo de la célula favoreciendo la internalización de la lesión para su degradación. La sobreexpresión aSMasa6 favoreció la reparación de la lesión y la supervivencia de los trofozoítos. Por primera vez se demostró, que *E. histolytica* posee un mecanismo para la reparación de daños a la MP mediado por las aSMasas similar al sistema descrito en células de mamíferos.

Palabras clave: *Entamoeba histolytica*; amibiasis; esfingomielinasa ácida; membrana plasmática; lisosomas.

Introducción

La amebiasis intestinal es una infección parasitaria que afecta a los seres humanos y es causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. La primera línea de defensa inmune innata que enfrentan las amibas es la capa de moco que previene el daño a las células epiteliales intestinales, que al ser infringida secreta mediadores proinflamatorios y quimiocina que reclutan neutrófilos, liberando especies reactivas de oxígeno [1] y/o péptidos antimicrobianos [2] que dañan la MP de los trofozoítos. El sistema del complemento humano forma el complejo de ataque de membrana que lisa a los trofozoítos [3]. En respuesta al sistema inmunológico humano, la amiba enfrenta el daño a través sus factores de virulencia: lectina Gal/GalNAc, las cisteín proteasas y los amebaporos. Además, existen, los determinantes de virulencia, que son moléculas indirectamente involucradas en el proceso patogénico al regular la expresión de factores de virulencia, con alta plasticidad de

expresión génica y que confieren adaptación y supervivencia a la amiba [4]. Recientemente, se ha descrito que las aSMasas de células de mamífero participan en la reparación de lesiones en la MP [5], a través de la hidrólisis de la esfingomielina (SM) de la cara externa de la MP generando ceramida, que favorece la formación de endosomas para internalizar la lesión [6].

En este trabajo, se evaluó la participación de las aSMasas en la reparación de daños a la MP de *E. histolytica*. El análisis del genoma amibiano tiene seis genes que codifican aSMasas, siendo el gen *EhaSM6* el más transcrito y el cual genera una proteína funcional. La sobreexpresión de *EhaSM6* en los trofozoítos induce un aumento de la actividad secretada y tolerancia a la lisis con moléculas formadoras de poros como la estreptolisina-O (SLO), β -Defensina y complemento humano, en un proceso dependiente de Ca^{2+} . Proponemos que el daño a la membrana promueve la migración de los lisosomas hacia el sitio de daño donde secretan aSMasas que inducen la formación de endosomas para internalizar la lesión, regenerando la integridad de la MP. Se presenta por primera vez que *E. histolytica* posee un mecanismo de reparación del daño a la MP mediado por aSMasas.

Metodología

Determinación de actividad secretada de *E. histolytica*. Se colocaron 3×10^5 amibas en cada pozo de una placa de cultivo celular y se incubaron con medio DMEM a 37 °C. El sobrenadante libre de células fue colectado. La actividad de aSMasa secretada se determinó utilizando el kit “Amplex Red Sphingomyelinase” (Molecular Probes).

Ensayos de daño a la membrana plasmática. Para los ensayos de daño a la MP, se añadió la SLO de *S. pyogenes*, β -Defensina 2, Magainina II (Sigma-Aldrich), complemento humano y H_2O_2 a los trofozoítos amibianos incubados en una placa de cultivo celular con medio DMEM a 37 °C.

Visualización de lisosomas, endosomas y núcleos por microscopía confocal. Para la tinción de los compartimentos lisosómicos, a las amibas se les adicionó LysoTracker Red DND-99 (Molecular Probes) durante 14 h a 36 °C. Los endosomas se marcaron con FITC-Dextran (Molecular Probes) a 37 °C. Las imágenes se registraron usando un microscopio confocal Zeiss LSM 700.

Generación de trofozoítos transfectantes de *E. histolytica* que sobreexpresan aSMasa6-HA. Para la obtención de trofozoítos que sobreexpresan la aSMasa6-HA, se amplificó por PCR el marco de lectura del gen *EhaSM6* a partir de cDNA. Se clonó en el plásmido pEhEx-HA que contiene una etiqueta del péptido hemaglutinina (HA) en la región C-terminal de la aSMasa6 [7].

qPCR. Para la PCR en Tiempo Real (qPCR) se utilizó el kit “Fast SYBR Green Master Mix”. El cDNA se cuantificó de cada una de las cepas y se realizaron las diluciones para efectuar las curvas estándar.

Resultados

El análisis del genoma de *E. histolytica* reveló la presencia de seis genes anotados como aSMasas, los cuales conservan los aminoácidos importantes en la catálisis descritos en aSMasas de otros organismos. Para evaluar la expresión a nivel de transcrito de los genes anotados como aSMasas en la cepa virulenta HM1:IMSS, se realizó un análisis de qPCR. Se encontró que todos los genes que codifican para aSMasas se transcriben, sin embargo, el nivel más alto de transcrito fue el del gen *EhaSM6* que corresponde al 54.9 % de expresión total (Tabla 1).

Dado que el gen *EhaSM6* es el de mayor expresión en *E. histolytica* se produjo la proteína recombinante (rEhaSM6) la cual incrementó su actividad en presencia de Mg^{2+} y se inhibió con Co^{2+} , similar a la actividad secretada detectada en sobrenadantes de la amiba [8]. Para evaluar la función biológica de las aSMasas, se generaron trofozoítos transfectantes que sobreexpresan el gen *EhaSM6* fusionado con una etiqueta de HA (HM1-SM6HA) [7,8], que presentó un nivel de expresión de 7.2 veces y un incremento de 2.3 veces en la actividad de aSMasa secretada con respecto a la cepa control con el plásmido vacío (HM1-HA).

Tabla 1. Niveles de expresión de los genes *EhaSMs* en la cepa HM1:IMSS

Cepa Gene	HM1:IMSS
<i>EhaSM1</i>	3.4 ± 1.22
<i>EhaSM2</i>	1
<i>EhaSM3</i>	1.5 ± 0.57
<i>EhaSM4</i>	21.9 ± 2.18
<i>EhaSM5</i>	10.3 ± 2.63
<i>EhaSM6</i>	46.5 ± 3.71

Los datos se normalizaron empleando el método ΔCt utilizando la expresión del gen *Ehagpdh* como control. El gen *EhaSM2* es el de menor expresión y se le asignó el valor relativo de 1. Los valores de los otros genes *EhaSM* representan las veces de expresión con respecto al gen *EhaSM2*.

Se evaluó el efecto de la SLO y la presencia de Ca^{2+} en el medio de secreción de la actividad de aSMasa en los trofozoítos de las cepas HM1-HA y HM1-SM6HA, las cuales mostraron un aumento en la actividad secretada 8 veces mayor en presencia de 1.6 ng/ μ L de SLO y Ca^{2+} en el medio con respecto a su control sin daño. Bajo las mismas condiciones de daño, pero en ausencia de Ca^{2+} no se detectó un aumento de la actividad de aSMasa secretada por los trofozoítos de ambas cepas (Figura 1Aa). En presencia de SLO y Ca^{2+} , la viabilidad de la cepa control fue del 30%, y de la cepa sobreexpresante fue del 80 %, mientras que en presencia de toxina y ausencia de Ca^{2+} , la viabilidad disminuyó dramáticamente al 11 % para ambas cepas (Figura 1Ab). Por lo tanto, el Ca^{2+} fue necesario para la exocitosis de los lisosomas y la secreción de la actividad de la aSMasa, que se correlacionó con mantenimiento de la viabilidad amibiana.

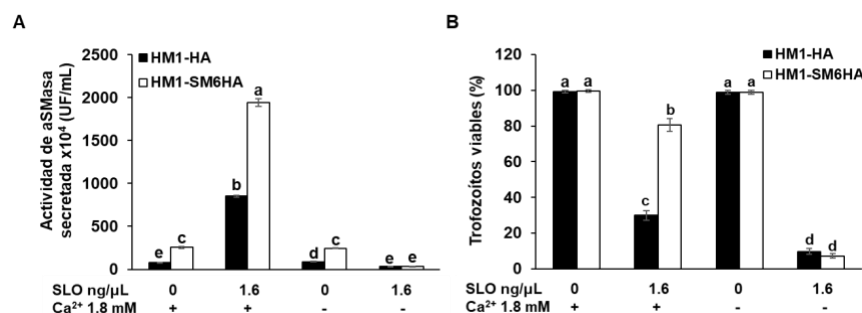


Figura 1. Efecto de la SLO y el Ca²⁺ sobre la actividad de aSMasas secretada y viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*. **A.** Actividad de aSMasa secretada de los trofozoítos en medio DMEM con o sin Ca²⁺. **B.** Viabilidad de los trofozoítos tratados con SLO con o sin Ca²⁺.

Para evaluar los eventos relacionados con la reparación del daño a la MP mediada por las aSMasas, se analizaron los eventos de exocitosis y endocitosis mediante microscopía confocal. La cepa control HM1-HA y la cepa sobreexpresante HM1-SM6HA sin tratamiento con SLO, mostraron la presencia de pocos lisosomas (rojo) y endosomas (verde) en el citoplasma de los trofozoítos (Figura 2Aa y 2Ba). En las amibas de la cepa HM1-HA incubadas con SLO se observó la migración de los lisosomas a la periferia de la MP, donde algunos de ellos se fusionan formando estructuras alargadas, denominadas “parches”, como se ha descrito en células de mamífero [5], donde, además, algunos endosomas en la MP co-localizaron con lisosomas, en las estructuras tipo parche (Figura 2Ab). Después de 3 min de exposición a SLO, los “parches” desaparecieron y el número de endosomas aumentó en la región subcortical a la MP (Figura 2Ac). A los 10 min de exposición a SLO, se perdió la polarización de los endosomas y se observaron algunas vesículas en las cuales co-localizó la etiqueta de lisosomas y endosomas, formando el compartimento endolisosomal (amarillo) (Figura 2Ad).

Los trofozoítos transfectantes de la cepa HM1-SM6HA expuestos a SLO en las mismas condiciones que la cepa HM1-HA, después de 1 min de tratamiento, mostraron un mayor número de estructuras alargadas (parches) en la MP (Figura 2Bb). Después de 3 min de tratamiento con SLO, los parches ya no están presentes, y se observó el aumento de endosomas cercanos a la MP donde ocurrió la lesión (Figura 2Bc). Después de 10 min hubo gran número de endosomas fusionados con lisosomas (endolisomas) (Figura 2Bd), lo que sugirió una endocitosis más eficiente de las lesiones en la MP de la cepa HM1-SM6HA. La sobreexpresión de la aSMasa6 indujo un mecanismo de reparación más eficiente, evidenciado por un aumento en la formación de endosomas, los cuales internalizaron la lesión, reforzando el papel de la aSMasa6 en la reparación de daño a la MP.

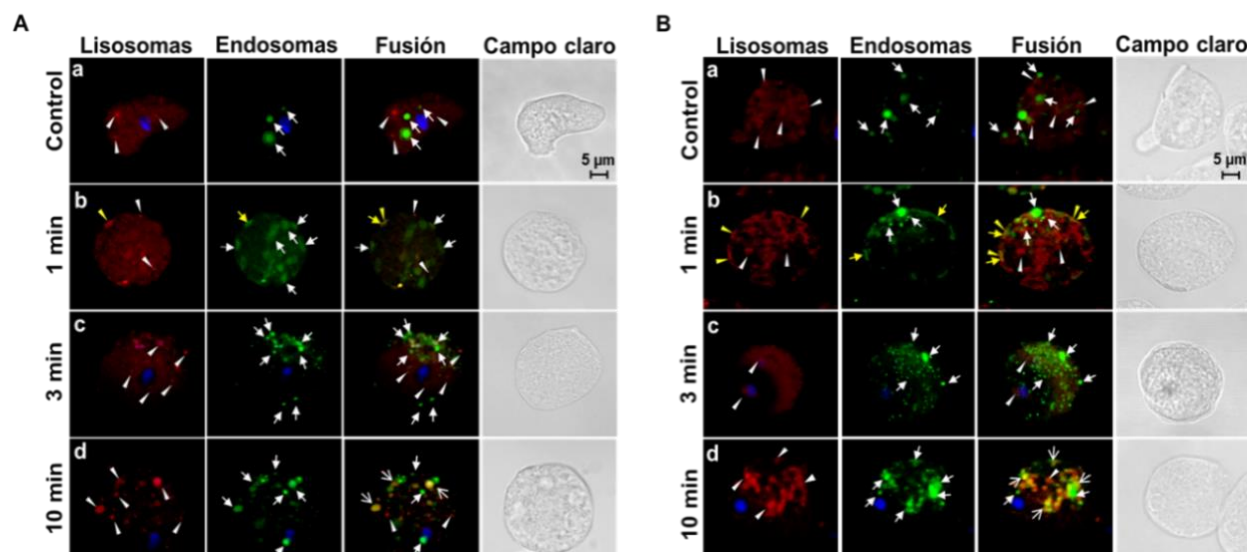


Figura 2. Presencia de endosomas y lisosomas en trofozoítos de *E. histolytica* tratados con SLO. Trofozoítos de las cepas HM1-HA (A) y HM1-SM6HA (B). Las puntas de flecha blanca muestran compartimentos positivos a Lysotracker, las flechas cerradas blancas indican endosomas, las puntas de flecha y flechas amarillas indican la formación de parches y las flechas abiertas el compartimento endolisosomal.

Se evaluó el efecto del péptido antimicrobiano β -Defensina 2, el cual se produce durante las infecciones humanas intestinales [2]. Las cepas HM1-HA y HM1-SM6HA fueron expuestas a β -Defensina 2. Los resultados mostraron que concentraciones entre 20–30 ng/mL de β -Defensina 2 indujeron 6 y 7 veces más actividad secretada de aSMasa para las cepas control y sobreexpresante, respectivamente (Figura 3Aa). Los mayores niveles de actividad secretada de aSMasa de la cepa sobreexpresante se correlacionaron con una mayor capacidad de reparación de la MP y, en consecuencia, una mayor viabilidad (Figura 3Ab).

El complemento es un mecanismo defensa inmune el cual forma poros en la MP lisando al patógeno [3]. Ambas cepas al interactuar con complemento humano incrementaron la actividad de aSMasa secretada, 20 veces para la cepa control y 21 veces para la cepa sobreexpresante, con respecto a su control sin tratamiento (Figura 3Bc). Se observó una disminución de la viabilidad de las amibas en interacción con el complemento, esta disminución fue más evidente para la cepa control que para la cepa sobreexpresante (Figura 3Bd), la cual presentó un mecanismo de reparación de daños a la MP más eficiente debido a la mayor secreción de aSMasa.

La secreción de la aSMasa también se ha detectado en células de mamíferos en respuesta al estrés oxidativo como el causado por H_2O_2 [9]. Por lo cual, se determinó el efecto del H_2O_2 sobre la actividad secretada de aSMasa y la viabilidad celular en las cepas HM1-HA y HM1-SM6HA. En ambas cepas la actividad de aSMasa se incrementó en todas las concentraciones evaluadas, la cual fue 3 veces más alta con respecto a su control sin H_2O_2 , y mayor en la cepa HM1-SM6HA (Figura 4A). Este aumento en la actividad de aSMasa secretada, se relacionó con el mantenimiento de la viabilidad en la cepa sobreexpresante (Figura 4B). Probablemente la secreción de la aSMasa con

H₂O₂ pudiera estar activando, además de la reparación de MP, redes de señalización para la activación de los mecanismos de defensa antioxidante.

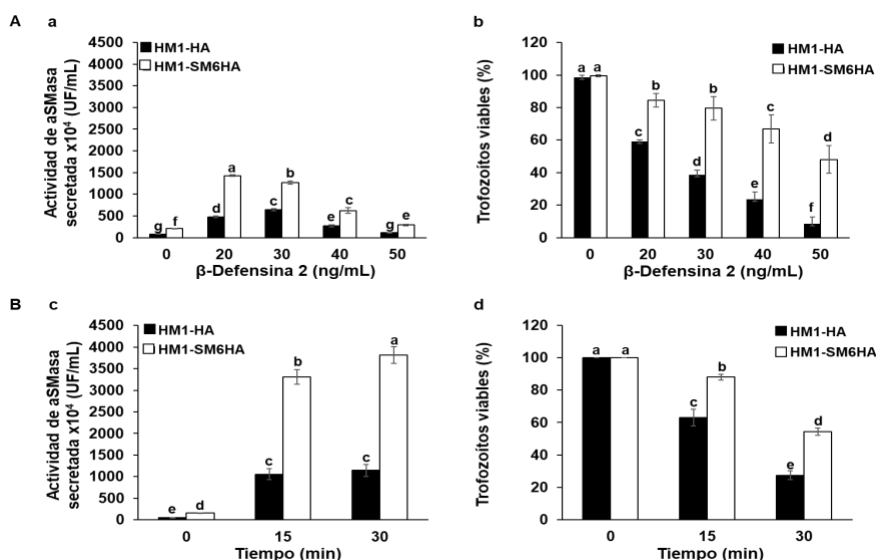


Figura 3. Efecto de la β -Defensina 2 y del complemento humano sobre la secreción de la actividad de aSMasa y la viabilidad de los trofozoítos de *E. histolytica*. A. Trofozoítos tratados con β -Defensina 2. B. Trofozoítos en interacción con el complemento humano.

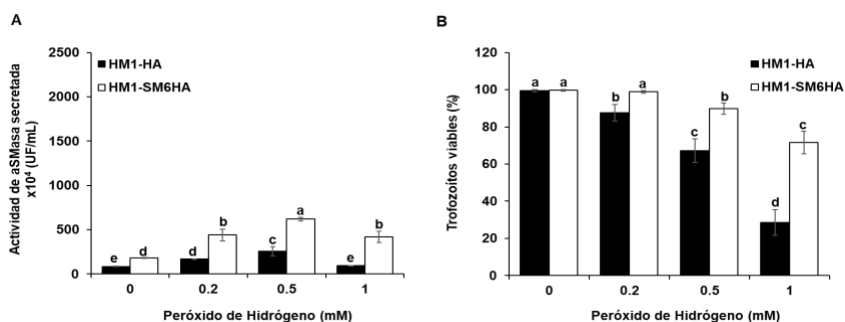


Figura 4. Efecto del H₂O₂ sobre los niveles de actividad de aSMasa secretada y la viabilidad de trofozoítos de *E. histolytica*. A. Actividad de aSMasa secretada por trofozoítos expuestos a H₂O₂. B. Viabilidad de trofozoítos tratados con H₂O₂.

Conclusión

Entamoeba histolytica posee un sistema de reparación de daños a la MP mediado por aSMasas causados por múltiples agentes perturbadores de la membrana. El proceso de reparación de la MP por aSMasa consiste en la exocitosis de lisosomas en el sitio de la lesión, liberación de aSMasa, formación de parches de contención, seguido de endocitosis de la MP dañada en un proceso dependiente de Ca²⁺. Por tanto, la aSMasa6 actúa como un determinante de virulencia reparando el daño causado a su MP por agentes líticos.

Para más información sobre el tema consultar la referencia [10]

Bibliografía

- [1] Denis, M., & Chadee, K. (1989). Human Neutrophils Activated by Interferon- γ and Tumor Necrosis Factor- α Kill *Entamoeba histolytica* Trophozoites In Vitro. *Journal of leukocyte biology*, 46(3), 270-274.
- [2] Selsted, M. E., & Ouellette, A. J. (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature immunology*, 6(6), 551-557.
- [3] Bohlson, S. S., Fraser, D. A., & Tenner, A. J. (2007). Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Molecular immunology*, 44(1-3), 33-43.
- [4] Anaya-Velázquez, F., & Padilla-Vaca, F. (2011). Virulence of *Entamoeba histolytica*: a challenge for human health research. *Future microbiology*, 6(3), 255-258.
- [5] McNeil, P. L., Vogel, S. S., Miyake, K., & Terasaki, M. (2000). Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *Journal of Cell Science*, 113(11), 1891-1902.
- [6] Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M.C., ... & Andrews, N. W. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *Journal of Cell Biology*, 189(6), 1027-1038.
- [7] Mendoza Macías Claudia Leticia. (2010). “Caracterización bioquímica y molecular de una esfingomielinasa de *Entamoeba histolytica*”. Tesis de Doctorado. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Gto., México.
- [8] Ramírez-Montiel Fátima. (2015). “Caracterización de la actividad de esfingomielinasa ácida secretada por *Entamoeba histolytica*”. Tesis de Maestría. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Gto., México.
- [9] Ferranti, C. S., Cheng, J., Thompson, C., Zhang, J., Rotolo, J. A., Buddaseth, S., & Kolesnick, R. N. (2020). Fusion of lysosomes to plasma membrane initiates radiation-induced apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 219(4).
- [10] Ramírez-Montiel, F., Mendoza-Macías, C., Andrade-Guillén, S., Rangel-Serrano, Á., Páramo-Pérez, I., ... & Padilla-Vaca, F. (2019). Plasma membrane damage repair is mediated by an acid sphingomyelinase in *Entamoeba histolytica*. *PLoS pathogens*, 15(8), e1008016.

REMOCIÓN DE ARSÉNICO DE AGUA DE MANANTIAL EN UN DISTRITO MINERO EN GUANAJUATO MÉXICO CON UN HIDRÓXIDO DOBLE LAMINAR Mg/Fe

José. I. Ceseña^a, Esthela. Ramos^b, Norma. L. Gutiérrez^c, Alma. H. Serafín^c, Joel. Moreno^d & Gabriela. A. Zanor^e.

^a Doctorado en Ciencias y Tecnología del Agua, División Ingenierías, Universidad de Guanajuato, Juárez 77, Centro, Guanajuato, Gto, C.P. 36000, MÉXICO. ji.cesenaquinonez@ugto.mx

^b Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto, C.P. 36000, MÉXICO.

^c Departamento de Ingeniería Civil, Universidad de Guanajuato, Juárez 77, Centro, Guanajuato, Gto, C.P. 36000, MÉXICO.

^d Departamento de Ingeniería en Minas, Metalurgia y Geología División de Ingenierías, Campus Guanajuato, MÉXICO.

^e Departamento de Ciencias Ambientales, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Gto MÉXICO.

Resumen

El agua contaminada por arsénico es un problema de salud en el mundo entero. El uso de compuestos mesoporosos tipo hidrotalcita para la adsorción de arsénico es una opción práctica y eficiente debido a su alta tasa de remoción y bajo costo. Se sintetizó por el método de coprecipitación un hidróxido doble laminar Mg/Fe (HDL MgFe) y se empleó para la adsorción de arsénico de agua contaminada de manantial de la comunidad de Tajo De Adjuntas Guanajuato. Este HDLMgFe fue tratado a 100°C y 350°C, consecutivamente fue caracterizado por DRX. La prueba de remoción de arsénico se llevó a cabo por contacto al equilibrio en sistema por lotes con la muestra natural de manantial. El material tratado térmicamente a 350°C fue el que mostro la mejor capacidad de remoción con una capacidad de adsorción de 145.9 µg de arsénico por gramo de material adsorbente en un tiempo de 180 minutos. Esta capacidad de adsorción se atribuye a la modificación estructural causada por el tratamiento térmico.

Palabras clave: *Arsénico, hidróxido doble laminar, adsorción, manantial, Guanajuato.*

Introducción

Actualmente, el arsénico es el contaminante del agua potable más estudiado en todo el mundo. La relación entre la ingesta crónica de arsénico en el agua potable es cada vez más estudiada, con un aumento en la prevalencia de diabetes [1][2], así como la disminución del CI en niños [3]. En México, las concentraciones más altas se han encontrado en Zimapán, Hgo., Con un rango de 14 a 1000 µg/l. Otros lugares son la Región Lagunera y en los estados de San Luis Potosí, Zacatecas y Guanajuato [4]. En Guanajuato capital se han encontrado varios pozos y manantiales con presencia de arsénico, como en el caso de la comunidad de tajo de adjuntas donde se encontraron flujos con más de 25 µg/l.

Los materiales mesoporosos de hidrotalcita (HT), también conocidos como hidróxidos dobles laminares (HDL) tienen un área superficial relativamente grande y una alta capacidad de intercambio de aniones. Estos materiales tienen capas de sitios octaédricos que pueden ser ocupados por iones trivalentes como Al^{3+} o Fe^{3+} . Estos generan una carga positiva que se compensa con la inclusión de aniones A^{Z-} en el espacio interlaminar. Dado que el arsénico tiene una alta

afinidad por ser adsorbido por óxidos de hierro, como a menudo se observa en un ambiente natural [5], Para este trabajo se tomaron muestras de agua de manantial de la comunidad de Tajo de adjuntas Guanajuato, se evaluó su contenido de arsénico y se utilizó un sólido sintético similar al HT con el sistema Mg^{2+}/Fe^{3+} como material adsorbente. Se evaluó la capacidad del hidróxido doble laminar Mg/Fe para remover arsénico de la muestra de agua de manantial.

Metodología

Síntesis del HDL sólido Mg^{2+} / Fe^{3+} .

La síntesis de HT con relación Mg / Fe = 3 se realizó por el método de coprecipitación, mezclando las sales precursoras de Mg^{2+} y Fe^{3+} , en una solución de agua desionizada. Esta solución se mezcla para coprecipitación con otra solución de NaOH y Na_2CO_3 con agitación constante. El pH se controla manteniéndolo en 11,5. La muestra se deja reposar durante 20 horas y luego se lava hasta alcanzar un pH de 8,0. Finalmente se seca el precipitado a 60°C durante 24h. Para el tratamiento térmico se calcinó el sólido a 100°C y 350°C obteniendo los materiales HDL100 y HDL350 respectivamente.

Caracterización

La caracterización por difracción de rayos x se realizó con un difractómetro RIGAKU ULTIMA IV, lámpara $Cu\alpha=1.54\text{\AA}$, $2\theta=5^{\circ}-80^{\circ}$, PASO=0.02 VELOCIDAD DE BARRIDO: $5^{\circ}/\text{min}$ en el Laboratorio De Investigación Y Caracterización De Minerales Y Materiales de la División De Ingenierías. Departamento En Minas, Metalurgia Y Geología De La Universidad De Guanajuato. La porosidad y área superficial se determinó con un analizador de área superficial y porosidad TriStar II Plus de micrometrics Silica Alumina Reference Material. Software MicroActive for TriStar II Plus Version 2.03 en el Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Físicoquímicas y Estructura Molecular (LACAPFEM UG-UAA-CONACYT)

Muestreo.

Para obtener muestras naturales de agua contaminada con arsénico, se realizó una campaña de muestreo en la comunidad Tajo De Adjuntas Guanajuato, Gto. Figura 1. En un pequeño arroyo que presenta un caudal constante incluso en la época seca. Este arroyo contribuye al suministro de agua de los residentes de la comunidad y desemboca en la presa de Santa Ana. Este arroyo recibe dos aportes de minas abandonadas, escorrentías y flujos de medios fracturados. El muestreo se realizó en botellas de polietileno. Las botellas se lavaron, se dejaron reposar durante 24 horas en HNO_3 al 10% y se enjuagaron con agua destilada. A la muestra tomada se le nombro surgencia.

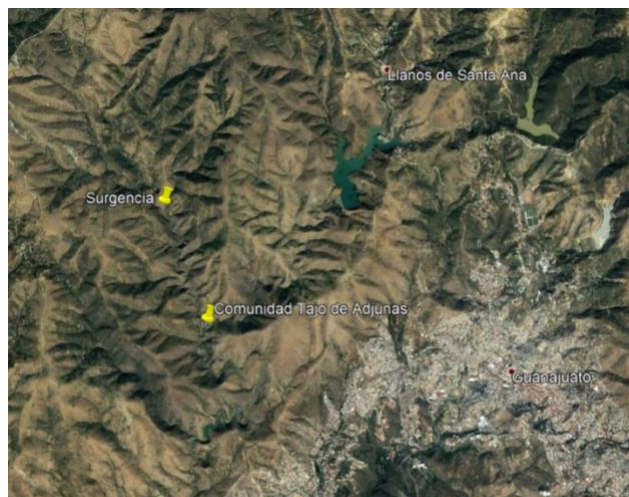


Figura 1. Vista aérea de Guanajuato y el punto de muestreo (surgencia) en la comunidad de Tajo De Adjuntas

Prueba de adsorción de arsénico

La prueba de adsorción se realizó por lotes mediante técnica de contacto hasta el equilibrio a temperatura ambiente con agitación de 47 rpm durante 24 h en un mezclador rotatorio. Al final de todos los experimentos de contacto, el material adsorbente se separó por filtración de la solución, que, junto con un control de la muestra natural, se le determinó la concentración de arsénico remanente. La determinación de la concentración de Arsénico total remanente se realizó por triplicado en Absorción Atómica. Se utilizó un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 200. Una vez obtenida la concentración de arsénico remanente en los experimentos, la cantidad de soluto en (μg) adsorbido por unidad de peso en (g) de material adsorbente "q" ($\mu\text{g/g}$) se determinó mediante la isoterma de adsorción.

Resultados

Caracterización

Los difractogramas en la figura 2 exhiben que el sólido HT100 presenta los picos característicos de un compuesto tipo hidrotalcita haciendo la comparación con la tarjeta JCPDS 22-0700 (003), (006), (009), (015), (018), (010) y (013), con lo cual la obtención de dicho compuesto se verifica. El material calcinado a 350 °C (HT350) presenta claramente los picos característicos de MgO (200), (220), (222) y Fe_2O_3 maghemita (220) de las tarjetas JCPDS 00-004-0829 y JCPDS 00-039-1346 [6]. Es evidente el cambio en la estructura del material debido al tratamiento térmico.

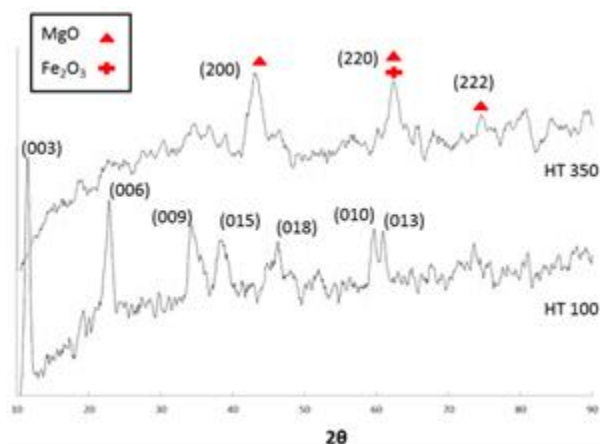


Figura 2. Difracción de rayos X del material calcinado a 100 °C (HT100) y material calcinado a 350 °C (HT350)

El Análisis textural por Fisisorción de N₂ BET para los HDLMgFe muestra una gran diferencia en el área superficial de 102.2292m²/g para el HT 350 con respecto de 50.5712 m²/g para HT 100. Dicha diferencia se puede explicar por el cambio de estructura por el tratamiento térmico que conlleva la aparición de mayor porosidad. En la figura 3. se pudo interpretar una adsorción de N₂ en multicapa hasta una presión relativa de alrededor de 0.6 para ambos casos. A partir de ahí se puede considerar el inicio de la adsorción por condensación. El diámetro de poro promedio 13.00664nm se interpreta como el espacio que se da entre partículas que a espacios interlaminares.

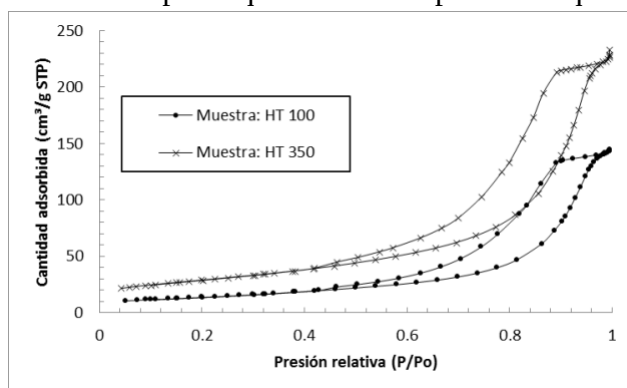


Figura 3. isotermas de adsorción de N₂ para el material calcinado a 100 °C (HT100) y material calcinado a 350 °C (HT350)

Ensayo de remoción de arsénico por contacto con una muestra natural.

Para el contacto con la muestra de manantial, se utilizaron 50 ml de muestra y aproximadamente 0,0306 g de material adsorbente por triplicado. Para la muestra de Surgencia, la concentración inicial de arsénico fue de 89 µg/l. Para esta muestra el sólido HT 350 logró reducir la concentración inicial a 1.4 µg/l, concentración por debajo de la norma oficial mexicana 25µg/l NOM-127-SSA1-1994[7], este material tiene un valor de “q”, con 145.9 µg/g como se muestra en figura 4

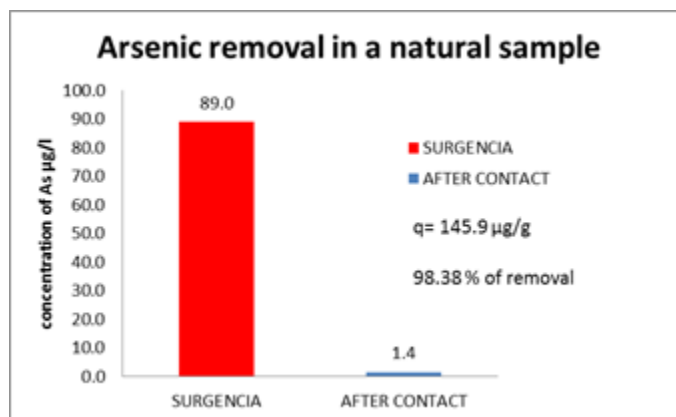


Figura 4. Concentración de arsénico antes y después de la adsorción en la muestra natural

Debido a la cantidad de material empleado en la prueba de contacto y el área superficial reportada, se estima que se tendría aproximadamente 3.12m² de superficie disponible. De la concentración inicial de la muestra y el volumen utilizado sabemos que el arsénico disponible era de aproximadamente 4.45µg. Tener un área tan grande de material adsorbente para una cantidad tan pequeña de arsénico y aun así no alcanzar el 100% de remoción nos hace pensar que probablemente la intervención de otros iones presentes en el agua de manantial han interactuado en los sitios activos del material.

Conclusiones

En el caso de contaminantes traza como es el caso del arsénico tener remociones de 98% es bastante valorado, sobre todo tratándose de muestras naturales donde se tienen diversos iones competidores en grandes concentraciones. El experimento de contacto con la muestra natural contaminada con arsénico demuestra la aplicabilidad de este material adsorbente HT 350, dada la eliminación favorable de arsénico a niveles por debajo del estándar oficial de mexicano 25µg/l NOM-127-SSA1-1994[7].

Bibliografía

- [1] Del Razo L.M., G.-V. G.-P. (2011). Exposure to arsenic in drinking water is associated with increased prevalence of diabetes: a cross-sectional study in the Zimapán and Lagunera regions in Mexico. *Environ Health.*, 10:73.
- [2] Kim Y., L. B. (2009). The association between arsenic and children's intelligence: a meta-analysis. *Biol Trace Elem Res.*, 129:88-93.
- [3] Kim Y., L. B. (2011). Association between urinary arsenic and diabetes mellitus in the Korean general population according to KNHANES 2008. *Sci Total Environ*, 409:4054-62.
- [4] Alvarado Silva, L. F. (2001). Cuantificación de Arsénico y Flúor en agua de consumo en localidades de seis Estados de la República Mexicana con hidrofluorosis endémica. Tesis de Licenciatura en Q.F.B. San Luis Potosí, San Luis Potosí, México: UASLP.
- [5] Nishida S, T. S. (2004). Attempt of arsenic removal in wasted water by inorganic materials. 14th International Conference on the Properties of Water and Steam. Japan., 387–390.

- [6] Fahami, A., Nasiri-Tabrizi, B. (2013) Characterization of mechanochemical-synthesized hydroxyapatite–magnesium titanate composite nanopowders. *Journal of Advanced Ceramics*. 2(1), 63–70
- [7] DOF. (22 de noviembre de 2000). Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, “Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización”. *Diario Oficial*, pág. 73.

SÍNTESIS DE BENZOFURANO SUSTITUIDO CON HETEROCICLOS TIPO BOND

Gabriela Rodríguez Valdez ^a, Luis Chacón García ^b.

^a Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo. Edificio B-1, Ciudad Universitaria. Morelia Michoacán. CP. 58066. 0912661c@umich.mx

^b Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo. Edificio B-1, Ciudad Universitaria. Morelia Michoacán. CP. 58066. lchacon@umich.mx

Resumen

Los heterociclos son compuestos de gran relevancia en la naturaleza, productos biológicos y farmacéuticos. El núcleo de benzofurano es muy atractivo por la diversidad de aplicaciones que tiene en distintas áreas, por su parte el pirrol es la unidad fundamental en compuestos vitales para la vida. El empleo de quinonas para la síntesis de benzofurano no es muy explorada ya que no son la principal vía para su formación, por la complejidad que representa. La síntesis del compuesto 2,4,7-trimetil-6-(1*H*-pirrol-2-il)benzofuran-5-ol, parte de 2-5-dimetil-1-4-benzoquinona que se presenta parte de una quinona a la cual se han incorporado sustituyentes heterociclos unidos de tipo bond, empleando condiciones suaves de reacción y en pocos pasos. Lo que resulta en un aporte interesante a la investigación científica.

Palabras clave: *Heterociclo, Benzofurano, Benzoquinona-pirrol, Pall Knorr.*

Introducción

La química heterocíclica es considerada la base de moléculas de interés biológico y farmacológico. Los compuestos heterociclos son compuestos orgánicos cíclicos formados por carbono e hidrógeno y al menos un heteroátomo, principalmente nitrógeno, oxígeno y azufre. El alcance sintético de la química heterocíclica se debe a la gran diversidad de combinaciones posibles entre estos átomos, esta diversidad estructural se ve apreciada en productos naturales como la clorofila, alcaloides y en compuestos tan importantes para la existencia de la vida como el ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). [1] Los heterociclos que contienen nitrógeno u oxígeno son los que se encuentran con mayor frecuencia. El benzofurano es considerado un núcleo privilegiado gracias a la versatilidad de propiedades biológicas y farmacológicas, [2] compuesto resultado de la fusión del furano con un anillo de benceno. Los derivados benzofuranos son farmacóforos centrales en química médica por lo cual se encuentran en una gran cantidad de compuestos con actividad farmacológica reconocida. Como son los fármacos metoxaleno **1** y trioxaleno **2** utilizado en el tratamiento de la psoriasis y el vitiligo, la dronedarona **3** es un fármaco antiarrítmico indicado en el tratamiento de los trastornos del ritmo cardíaco y la vilazodona **4** es un antidepresivo indicado en el tratamiento de la depresión mayor (Fig. 1).

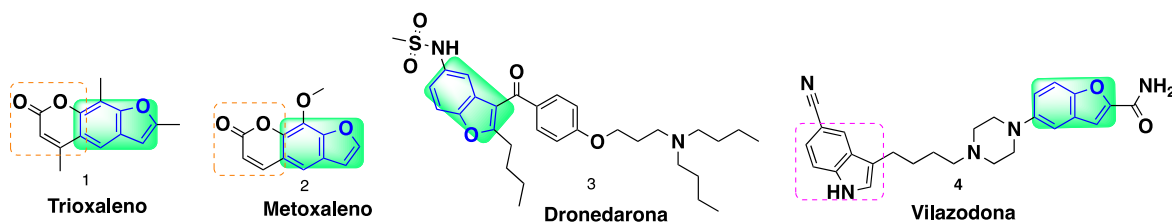


Figura 1. Derivados benzofurano con actividad farmacológica.

Los bis-heterociclos se forman por la unión de dos núcleos heterociclos, estos pueden ser de tipo linked, bond, fused o spacer (**fig. 2**). El propósito de la combinación de los heterociclos es mejorar su actividad.

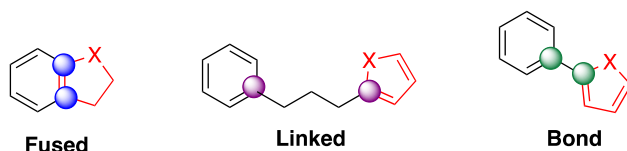


Figura 2. Unión de los bis-heterociclos

Por su parte la benzoquinona tiene como estructura base una 1,4-benzoquinona o p-benzoquinona que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. Las quinonas desempeñan un papel fundamental en las funciones biológicas, lo que exhibe su principal característica su actividad oxido-reductora, el equilibrio quinona- hidroquinona. [1]

El uso de las quinonas en síntesis orgánica es muy importante y aprovechando estas propiedades a la fecha nuestro grupo de trabajo ha logrado la síntesis de una gran variedad de derivados a partir de ellas, llamados compuestos pirrolilquinona. [3] (**Fig. 3**)

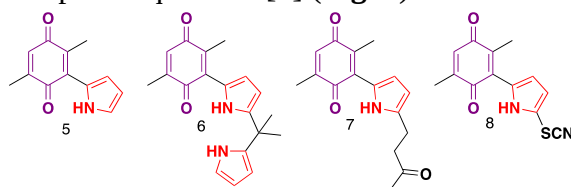
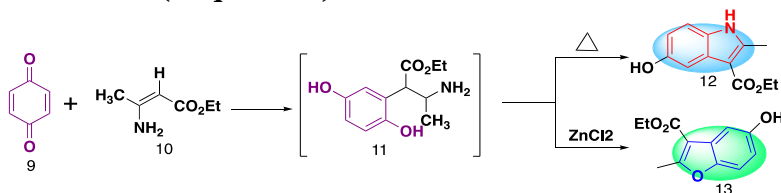


Figura 3. Derivados pirrolilquinona.

Referente a la síntesis del núcleo de benzofurano a partir de quinonas la reacción más conocida es la condensación de Nentizescu, reportada en 1929 que es una reacción para obtención del indol, que posteriormente Monti en 1996, reporta la síntesis del benzofurano al utilizar ZnCl_2 . Reacción involucra la condensación de una 1,4-benzoquinona con enaminas para proporcionar derivados de 5-hidroxiindol sustituidos. [4] (**Esquema 1**).

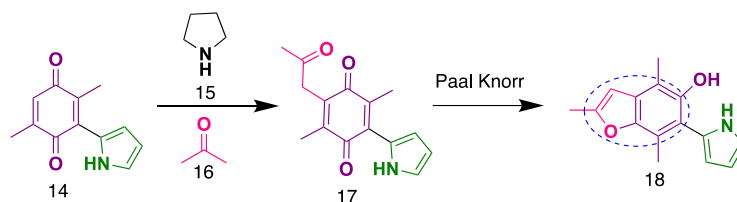


Esquema 1. Reacción de Nentizescu y Monti.

Metodos

Los espectros de RMN ^1H se obtuvieron con un equipo Varian Mercury Plus de 400 MHz, utilizándose CDCl_3 como disolvente y TMS como referencia interna. Los reactivos utilizados fueron de la marca Sigma-Aldrich, el pirrol no fue destilado antes de su uso. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente. La purificación fue realizada por cromatografía en columna utilizando sílice gel 70-230 mesh marca Aldrich y como eluyente una mezcla de Hexano, AcOET.

La síntesis del benzofuranos se llevará en varias etapas de reacción, con base al esquema general de síntesis 2.



Esquema 2. Esquema general de síntesis para la obtención del benzofurano **18**.

1. Se iniciará con la síntesis de la pirrolilquinonas **14**, mediante condiciones de reacción ya reportadas.[5]
2. Una vez teniendo la pirrolilquinona **14**, se incorporará el grupo acetono en la posición 2 de la benzoquinona mediante una adición nucleofílica, para la obtención del sistema de dicetona. [6]
3. Mediante una reacción de Paal Knorr en la dicetona **17**, se obtendrá el benzofurano **18**. [7]

Resultados

La síntesis del benzofurano **18** se llevó a cabo con base al esquema general de síntesis esquema 2. Se partió de la pirrolilquinona **14** la cuál se sintetizó con la metodología ya reportada, [7] que consiste en una adición del pirrol a la 2,5-dimetil-1,4-benzoquinona en ausencia de disolvente y como catalizador SiO_2 .

El método de elección para incorporar el acetono **17** fue mediante adición nucleofílica de la enamina de la propanona al doble enlace activado de la quinona, estrategia ampliamente usada para la obtención de dicetonas. [8] con la utilización de pirrolidina como catalizador, el empleo de dos reactivos de condensación en este caso la cetona de la pirrolilquinona **14** y la cetona **16**.

Las condiciones de reacción se describen en la tabla 1, en la que se describen los cambios, con el fin de obtener el mejor rendimiento, se estudio el cambio en los equivalentes de la pirrolidina y el componente ácido probando el ácido de bronsted-Lowry el p-TSA y el ácido de lewis ZnCl_2 con la finalidad de estudiar su efecto en la reacción. Mostrando los mejores resultados en la entrada 6.

Tabla 1. Condiciones de reacción para el compuesto 17.

	Pirrolidina (eq)	Ácido (0.2 eq)	Tiempo	Rendimiento %
1	0.5	metansulfónico	147 h	Trazas
2	0.5	ZnCl ₂	3.5 h	9
3	0.2	p-TSA	47 h	-
4	0.5	p-TSA	48h	38
5	0.7	p-TSA	23 h	44
6	1	p-TSA	4 h	49
7	1	-	4 h	23

La importancia de la síntesis de heterociclos es debido a que son bloque central en la construcción de compuestos con actividad biológica.

El benzofurao es el heterociclo central en el presente proyecto, el cuál se obtendría a partir del compuesto funcionalizado con oxa-propilo seguido de la ciclación mediante una reacción de Paal Knorr (Esquema general de síntesis 1).

Con base a la literatura se siguieron las condiciones de reacción, las cuales se describen en la **tabla 2**. En la entrada 1 se describen las condiciones clasicas para la obtención del benzofurano la utlización de medio ácido en este caso de utilizo una mezcla de metanol-ácido acetico (1:1), obteniendo un rendimiento del 7%. En la entrada 2 se utilizaron las condiciones de reacción reportadas por Banik, [9] la cual utiliza como catalizador el nitrato de bismuto y la presencia de la anilina, reacción procedó a temperatura ambiente con formación de productos, después de la purificación se obtuvo un rendimiento de 23% el cuál fue muy alentador, con el fin de seguir explorando condiciones de reacción y con teniendo en cuenta que con la presencia de la anilina se favorecia la formación del benzofurano de hizo un ensayo mas. Entrada 3, repitiendo la mezcla ácido acético metanol en proporción 1:1 pero ahora con la presencia de la anilina, el rendimiento bajo a 14%. Esto permite analizar que se requiere la presencia de una anilina.

Tabla 2. Condiciones de reacción para la formación de benzofurano.

	Amina	Cat	Disolvente	Tiempo	Rend. %
1	--	Ácido acético	MeOH (70°C)	24 h	7
2	p-Cl anilina	Bi(NO ₃) ₃	CH ₂ Cl ₂	72 h	23
3	p-Cl-anilina	Ácido acético	MeOH (70°C)	4.5 h	14

El benzofurano **18** fue caracterizado por análisis de RMN ¹H (**Fig.4**) donde se pudo apreciar una señal en 6.35 ppm, sugerente de furano, las señales del pirrol monosustituido, y el NH del pirrol en 8.3 ppm.

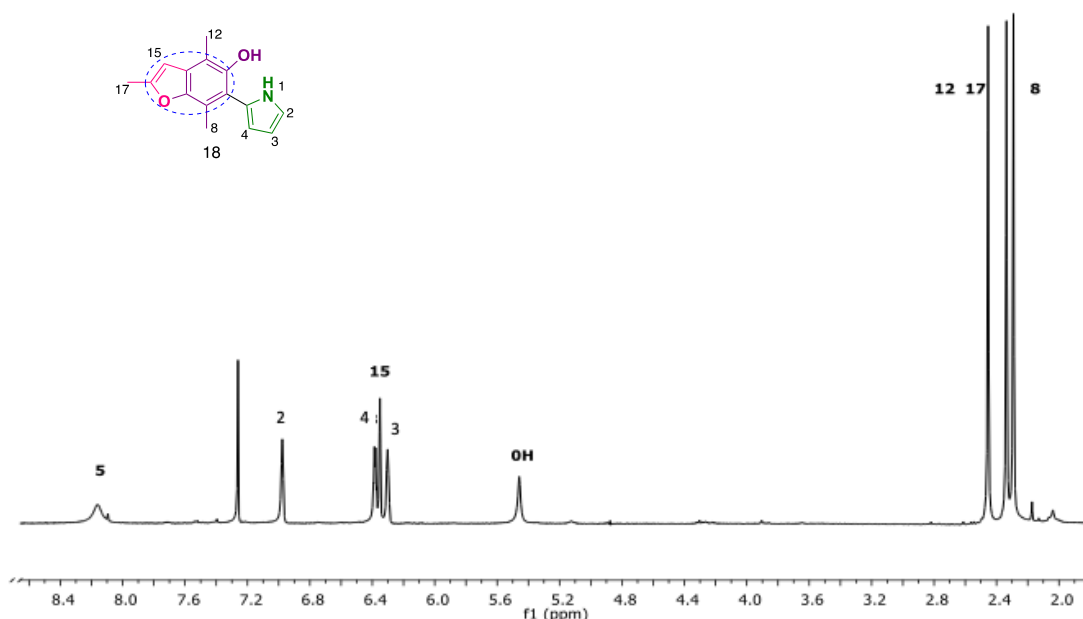


Figura 4. Espectro de RMN ^1H para el compuesto **18** en CDCl_3 a 400 MHz.

El mecanismo de reacción que se propone se ilustra en la **Fig. 4**, el cual inicia con un ataque nucleofílico por parte de amina hacia el carbonilo de la acetona que da lugar a la formación del ion iminio, y este al estabilizarse forma la enamina la cuál es atacada por el oxígeno del carbonilo de la benzoquinona, donde posteriormente da lugar a la eliminación de la amina y a la ciclación y aromatización del sistema.

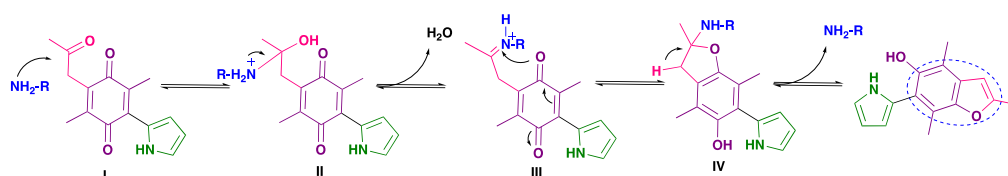


Figura 4. Mecanismo de reacción propuesto para la formación del benzofurano **18**.

Conclusión

El uso de las pirrolilquinonas como bloques sintéticos para la construcción de heterociclos es una vía poco explorada, que resulta ser una alternativa muy útil ya que le confiere entre otras cualidades, una diversidad estructural. Prueba de ello fue la obtención del benzofurano **18** que cuenta como sustituyente un pirrol con una unión tipo bond.

Bibliografía.

[1] (a) Van der Eycken, E. V. (2018). Metal-catalyzed synthesis of heterocycles, 54(3), 213. (b) Al-Mulla, A. (2017). A review: biological importance of heterocyclic compounds. *Der Pharma Chemica*, 9(13), 141-1472. (c) Balaban, A.

- T., Oniciu, D. C., & Katritzky, A. R. (2004). Aromaticity as a cornerstone of heterocyclic chemistry. *Chemical reviews*, 104(5), 2777-2812.
- [2] Abraham, I., Joshi, R., Pardasani, P., & Pardasani, R. T. (2011). Recent advances in 1, 4-benzoquinone chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(3), 385-421.
- [3] Rodriguez, G. (2016). "Síntesis de nuevos sistemas derivados de Pirrolilquinonas". Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 22-34.
- [4] Monti, S. A. (1966). The Nentizescu Condensation of Ethyl 3-Aminocrotonate and 1, 4-Benzoquinone. *The Journal of Organic Chemistry*, 31(8), 2669-2672.
- [5] Tapia, J. M.; González, C. J. B.; Contreras, C. C.; Corona, D.; Cuevas, Y. E.; Chacón, G. L.; *RSC Advances*, (2014), 4, 5660-5665.
- [6] Banik, B. K., Banik, I., Renteria, M., & Dasgupta, S. K. (2005). A straightforward highly efficient Paal–Knorr synthesis of pyrroles. *Tetrahedron letters*, 46(15), 2643-2645.
- [7] Sakthivel, K., Notz, W., Bui, T., & Barbas, C. F. (2001). Amino acid catalyzed direct asymmetric aldol reactions: a bioorganic approach to catalytic asymmetric carbon– carbon bond-forming reactions. *Journal of the American Chemical Society*, 123(22), 5260-5267.
- [8] Sakthivel K.; Notz W.; Bui T.; Barbas F.C.; *J. Am. Chem. Soc.* (2001), 123, 5260-5267.
- [9] Banik, B. K., Banik, I., Renteria, M., & Dasgupta, S. K. (2005). A straightforward highly efficient Paal–Knorr synthesis of pyrroles. *Tetrahedron letters*, 46(15), 2643-2645.
- [10] Kürti, L., & Czakó, B. Strategic Applications of Organic Named Reactions in Organic Synthesis (2005). *University of Pennsylvania*.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDRÓXIDOS DOBLES LAMINARES MG/AL Y SU APLICACIÓN COMO CATALIZADORES EN LA REACCIÓN DE FOTODEGRADACIÓN DE COLORANTE ROJO CONGO.

Sara Guadalupe Argote Fuentes ^a, Norma Leticia Gutiérrez Ortega ^b, Rossy Feria Reyes ^c, Esthela Ramos Ramírez ^c,
Gustavo Cruz Jiménez ^d, Raúl Miranda Avilés ^e

^a Doctorado en Ciencia y Tecnología del Agua, División de Ingenierías, Universidad de Guanajuato. Av. Juárez 77
Centro Histórico, Guanajuato, Guanajuato, C.P 36000, México. sg.argotefuentes@ugto.mx.

^b Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental, División de Ingenierías, Universidad de Guanajuato. Av. Juárez 77
Centro Histórico, Guanajuato, Guanajuato, C.P 36000, MÉXICO.

^c Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. Noria Alta S/N,
Guanajuato, Guanajuato, C.P 36000, MÉXICO.

^d Laboratorio de farmacia, Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus
Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Guanajuato, C.P 36000, MÉXICO.

^e Departamento de Ingeniería en Minas, Metalurgia y Geología, División de Ingenierías, Campus Guanajuato,
Universidad de Guanajuato, Ex Hacienda de San Matías S/N, San Javier, Guanajuato, Guanajuato, C.P: 36020,
MÉXICO.

Resumen

Los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian el potencial de los hidróxidos dobles laminares, de ser empleados como catalizadores en el proceso de fotocátalisis, para la eliminación de colorantes presentes en aguas residuales y así contribuir a la remediación de sistemas acuosos. Se presenta la síntesis de dichos materiales por el método de coprecipitación a partir de sales de magnesio y aluminio en medio básico, así como su caracterización fisicoquímica para la determinación de las propiedades estructurales y texturales. La capacidad catalítica de los materiales se probó en la degradación del colorante rojo Congo de soluciones acuosas con lo que se demostraron las propiedades que tienen dichos materiales de regenerarse y foto activarse al entrar en contacto con una solución acuosa en presencia de luz UV, lo cual favoreció la producción de los radicales $\bullet\text{OH}$ responsables de la degradación del colorante. Se obtuvieron degradaciones del colorante de más del 90% de soluciones concentradas a 400mg/L, equivalente a más de 2g de colorante por gramo de catalizador, en un tiempo de reacción de 4,5 h.

Palabras clave: *Catalizadores, Fotocátalisis, rojo Congo.*

Introducción

La contaminación del agua por colorantes, utilizados en las industrias del papel, textil, plásticos, cosmética, y alimenticia representa graves riesgos para la salud humana, los organismos acuáticos y los ecosistemas, debido a que son compuestos no biodegradables; la mayoría se han reportado como altamente tóxicos, mutagénicos y cancerígenos. Por tanto, estudiar métodos eficientes y amigables con el medio ambiente, para eliminar colorantes presentes en aguas residuales de origen industrial, antes de su liberación a cuerpos receptores, se ha convertido en un tema transcendental. [1-4]

La fotocátalisis heterogénea, ha sido investigada en las últimas décadas para la descomposición de colorantes presentes en soluciones acuosas en productos no peligrosos, es considerada una técnica

de bajo costo, con ausencia de subproductos secundarios, eficiente y ecológica. Convencionalmente dicho proceso utiliza semiconductores metálicos como ZnO, TiO_2 , SnO_2 o CdS , Bi_2MoO_6 , BiOBr , Ag_3PO_4 , y semiconductores no metálicos como gC_3N_4 . [3-6]

Los hidróxidos dobles laminares (HDL) han recibido una atención considerable por su potencial aplicación en el campo de los catalizadores.[7–9] La composición química de los HDL se puede expresar como la fórmula general $[\text{M}_1 - x^{2+}\text{M}_x^{3+}(\text{OH})_2]^{x+} [\text{A}_{x/n}^{n-}]^{x-} \cdot m\text{H}_2\text{O}$. Los cationes divalentes M^{2+} (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}) están parcialmente sustituidos por trivalentes M^{3+} (Al^{3+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , Mn^{3+} , Ni^{3+} , Cr^{3+}), lo que lleva a la generación de una capa cargada positivamente.[7], [8], [10]

Metodología

Obtención de materiales tipo hidrotalcita: Los materiales HDL se sintetizaron por el método de coprecipitación [11], a partir de nitrato de magnesio [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$], nitrato de aluminio [$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$] y carbonato sódico (Na_2CO_3) en medio básico a pH de 11.5, a partir de las cantidades estequiométricas de $\text{Mg}/\text{Al} = 1$. El HDL sintetizado se secó en una estufa a 80°C por 24 h y posteriormente, una porción se calcino en una mufla a 400°C durante 4 horas. Los sólidos obtenidos fueron molidos en un mortero hasta obtener un tamaño de partícula fino, y se etiquetaron como HT-1 a la muestra fresca y HT-2 a la muestra calcinada a 400°C , para su posterior caracterización.

Caracterización estructural, textural y morfológica: Para la caracterización e identificación de las estructuras cristalinas presentes, se empleó un difractómetro de polvos INEL equinox acoplado a un ánodo de cobre y usando una fuente de radiación monocromatizada de $\text{CuK}\alpha$, cuya longitud de onda (λ) es de $1.5418\text{\AA}$, en un rango de 5° a 90° con un tamaño de paso de 0.02° y una velocidad de barrido de $2^\circ/\text{min}$.

Para la identificación de grupos funcionales, tipos de vibración en los enlaces presentes en los materiales y los aniones en el espacio interlamina; se utilizó en un equipo Spectrum 100 FT-IR Spectrometer en un intervalo de onda de $400\text{--}4500\text{cm}^{-1}$. Las muestras fueron preparadas mezclando el sólido HT-1 con KBr (el blanco) en una relación 1:100. La caracterización textural se realizó en un equipo Micromeritics TriStar II Plus. Las muestras antes de ser analizadas fueron desgasificadas a 110°C por 3 horas en una atmósfera de helio. Empleando la teoría BET se determinaron las propiedades texturales de los sólidos.

La morfología superficial, el tamaño y distribución de las partículas en las HT sintetizadas se determinó por microscopía electrónica de barrido con energía dispersiva de rayos X (MEB-EDS) empleando en un microscopio JSM 6010/ LV con un voltaje de aceleración de 20 Kv, con un equipo EDS modelo JEOL Inca Energy 250 EDS System LK-IE250 de Oxford, con un detector de silicio para elementos ligeros y resolución de 138eV.

Evaluación de la capacidad catalítica de la muestra HT-2 en la degradación del colorante rojo Congo. Prueba de fotolisis. Se llevo a cabo con 300mL de solución a una concentración de 400

mg/L de rojo Congo. Se utilizó un foto reactor en una cabina de seguridad para fase oscura, que consta de una plancha de agitación, un contenedor de vidrio y una lámpara ultravioleta de radiación de 254 nm. El flujo de aire se mantuvo constante a una velocidad de 2mL/s. Se tomaron 3mL de muestra que fueron filtradas mediante un filtro para jeringa con membranas de acetato de celulosa de 0.45 μm , antes de ser analizadas por cromatografía líquida de alta resolución HPLC

Prueba de fotocatalisis. Se utilizaron 300mL de solución a una concentración de 400mg/L de rojo Congo, con 300mg de HT-2. Se utilizó un foto reactor en una cabina de seguridad para fase oscura, que consta de una plancha de agitación, un contenedor de vidrio y una lámpara ultravioleta de radiación de 254 nm. El flujo de aire se mantuvo constante a una velocidad de 2mL/s. Las mediciones se tomaron cada 30 min hasta completar 6 h; a pH del medio entre 7 -7.5 y a temperatura ambiente de 26°C. Se tomaron 3mL de muestra que fueron filtradas mediante un filtro para jeringa con membranas de acetato de celulosa de 0.45 μm antes de ser analizadas por cromatografía líquida de alta resolución HPLC.

Resultados

- *Caracterización de los Hidróxidos Dobles Laminares HT-1 y HT-2*

Difracción de rayos x (DRX): En la Figura 1. se muestra el difractograma de rayos X de la muestra HT-1 de relación Mg/Al=1 donde se identifican los picos característicos del material tipo hidrotalcita con índices de Miller (003), (006), (009), (012), (015), (018), (110) y (113) (Tarjeta JCPDS 22 0700); lo cual indica que el sólido sintetizado presenta estructura cristalina y de simetría romboédrica. Para la muestra HT-2, se observa que el material sintetizado y calcinado a 400 °C ha evolucionado estructuralmente; se identifica una mezcla de fases cristalinas y amorfas. La fase cristalina del tipo periclase (MgO) con los picos característicos (111), (200) y (220) (Tarjeta JCPDS 4-0829), indica que el sólido ha perdido cristalinidad tras el tratamiento térmico. La fase dispersa amorfa del tipo espinela magnesio aluminio MgAl_2O_4 con índices (111), (311) y (440) (JCPDS espinela de magnesio y aluminio 21-1152), indica que el sólido comienza a rehidratarse debido a su efecto memoria. También se muestran los patrones de difracción de la muestra HT-2 usado en las pruebas de fotocatalisis (HT2-Foto), se observa que los catalizadores, conformados por la mezcla de óxidos mixtos y simples de Mg-Al, han regenerado su estructura tipo hidrotalcita, el material emplea la molécula aniónica del colorante para reconstruir su estructura doble laminar original, incluso se observa que la estructura es más definida.

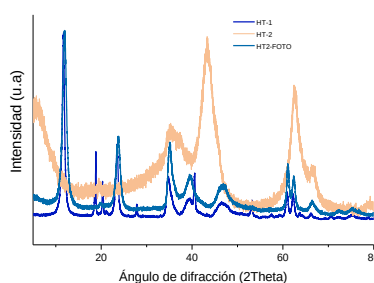


Figura 1. Difractograma de rayos X de las muestras HT-1, HT-2 y HT2-Foto.

Espectroscopia Infrarroja: En la Figura 2. se muestran los espectros infrarrojos de las muestras HT-1, HT-2 y HT2-Foto. Para la muestra HT-1, se observa la banda ancha centrada en 3452 cm^{-1} atribuida a las vibraciones de tensión de los O-H de los grupos hidroxilos de las láminas tipo brucita y al agua interlaminar. Las bandas de 1015 a 1636 cm^{-1} están asociadas a la frecuencia de deformación angular del grupo H-OH del agua situada en la capa interlaminar de la estructura tipo hidrotalcita. El pico en 1355 cm^{-1} corresponde a la frecuencia de vibración del ion carbonato interlaminar y las bandas entre 400 y 800 cm^{-1} son asignadas a las vibraciones catión-oxígeno de los óxidos metálicos Al-O y Mg-O. La banda a 552 cm^{-1} se asigna a las vibraciones de red de las láminas octaédricas de tipo brucita, Al-O-Mg, característica de los hidróxidos dobles laminares Mg-Al. Para la muestra HT-2 se presentan una absorción ancha entre 2961 y 3432 cm^{-1} atribuida a las vibraciones de tensión de los O-H de los grupos hidroxilos de las láminas tipo brucita. El pico en 1368 cm^{-1} corresponde a la frecuencia de vibración del ion carbonato interlaminar y las bandas entre 400 y 800 cm^{-1} son asignadas a los estiramientos de los óxidos metálicos Al-O y Mg-O. Se observa que la estructura doble laminar se modifica con el tratamiento térmico lo que se verifica con la disminución en las bandas correspondientes a las moléculas de agua, a los oxidrilos y a los iones carbonato. En el espectro obtenido de la muestra HT2-FOTO, están presentes las bandas 1667 y 1645 cm^{-1} correspondiente a la presencia de enlaces dobles en los grupos diazo ($-\text{N}=\text{N}-$) del colorante rojo Congo; se observa que la banda característica de las vibraciones de tensión de los grupos hidroxilos situada de los 2961 a 3453 cm^{-1} , ha disminuido significativamente debido a que los grupos O-H han sido consumidos durante la reacción fotocatalítica para la degradación del colorante rojo Congo.

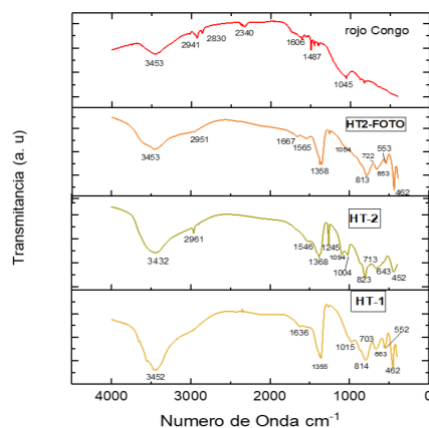


Figura 2. Espectros infrarrojos de las muestras HT-1, HT-2, HT2-Foto y del colorante rojo Congo.

Fisisorción de N_2 (BET): En la Figura 3. Se presentan las isotermas de adsorción-desorción de N_2 de los sólidos HT-1 y HT-2 las cuales presentan isotermas tipo IV de acuerdo con la clasificación IUPAQ, así como un lazo de histéresis del tipo H_3 , lo que confirma la existencia de agregados de partículas laminares que a su vez origina poros en forma de grietas o fisuras.

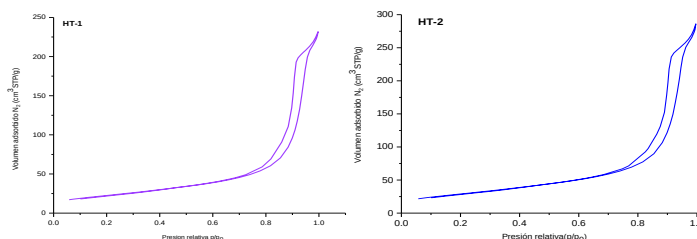


Figura 3. Isotermas de adsorción-desorción de N_2 de las muestras HT-1 y HT-2.

En la Tabla 1. se presentan los valores del área específica, volumen de poro y diámetro de poro de la HT-1 y HT-2, se observa que el área superficial de la muestra HT-1, es menor ($105.12 \text{ m}^2/\text{g}$) debido a la aglomeración de partículas, mientras que, para la muestra HT-2, es mayor ($133.50 \text{ m}^2/\text{g}$), lo que se atribuye a que durante el tratamiento térmico sus estructuras dobles colapsan y se expanden los poros del material. Para ambas muestras analizadas, sintetizadas por coprecipitación, se manifestaron moderados valores de área superficial específica.

Tabla 1. valores obtenidos del análisis textural

Muestra	Área específica (m^2/g)	Volumen de poro (cm^3/g)	Tamaño de poro (nm)
HT-1	105.12	0.29	7.60
HT-2	133.50	0.29	7.43

Microscopia electrónica de barrido (MEB- EDS): Las micrografías obtenidas del sólido HT-1 se presenta en la Figura 4. (a), la cual muestra que el material está formado por agregados de partículas regulares y homogéneos, con una estructura laminar plana, la que provoca su porosidad en forma de huecos intersticiales mesoporos. En la Figura 4. (b) se muestra la micrografía del sólido HT-2, donde se observa que cuando las HT se calcinan a 400°C tiene lugar la eliminación de los aniones carbonato e hidroxilo durante la descomposición de los sólidos lo que supone la formación de canales, responsables del aumento del área específica. Para HT2-FOTO se observa en la Figura 4. (c) la regeneración de la estructura laminar, conformada por agregados de láminas planas.

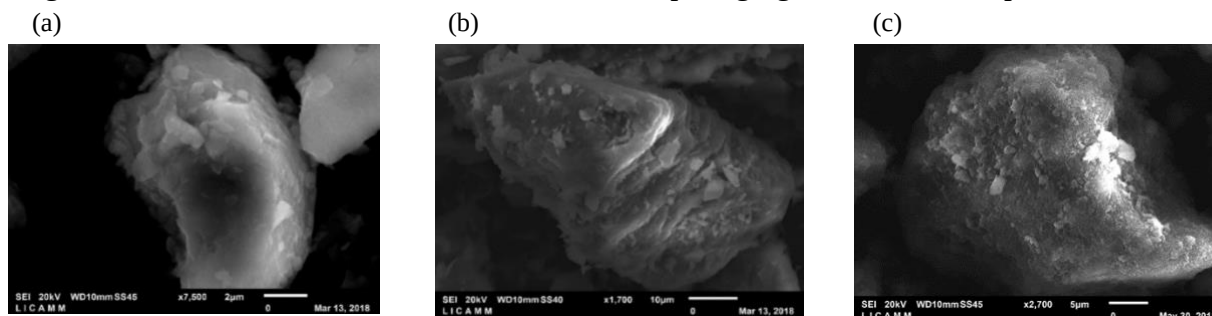


Figura 4. Imágenes SEM de las muestras (a) HT-1, (b) HT-2, (c) HT2-FOTO.

En la Tabla 2. se muestra el análisis elemental de las muestras analizadas, se obtuvo una relación metálica muy cercana a la teórica ($x=0.5$), para la muestra HT-2 se observa que tiene mayor contenido de magnesio, lo que se comprueba la formación de la periclasa.

Tabla 2. Análisis elemental de las muestras HT-1, HT-2 y HT2-FOTO.

Muestra	Análisis de elemental				
	(%Peso)		(mol)		x
	Mg	Al	Mg	Al	
HT-1	20.96	18.72	16.24	13.07	0.44
HT-2	28.53	24.17	23.44	17.89	0.43
HT2-FOTO	22.93	22.95	18.22	16.43	0.47

Análisis Termo gravimétrico (TGA) y Análisis Térmico Diferencial (DTA): En la Figura 5. Se muestra el termograma de la muestra HT-1, se observa una pérdida de masa del 21% en el intervalo de 100°C y 200°C, temperatura a la cual se elimina el agua adsorbida físicamente en la superficie del sólido. Presenta una segunda pérdida en el intervalo de temperaturas de 200°C y 400°C que corresponde a la deshidroxilación parcial de las láminas y pérdida del agua interlaminar, con una pérdida de masa del 25%. En el intervalo de 400°C-500°C ocurre la descomposición química de los grupos hidróxido y de los aniones interlaminares, con una pérdida de masa de 5%, se produce el colapso total de la estructura laminar para formar la espinela del óxido mixto Mg/Al. La muestra analizada, muestra una ligera y progresiva pérdida de masa del 1%, entre 500°C y 600°C, debido a una difusión gradual de vapor de agua ocluido en el óxido, por encima de dicho intervalo el material se vuelve estable; se obtiene una pérdida total de masa del 52 %. La deshidroxilación completa ocurre entre 400° y 500°C, con lo que se determinó la temperatura óptima de tratamiento térmico de 400°C para garantizar que el sólido sintetizado se encuentre en su forma de óxido metálico y su fase sea activa catalíticamente para el proceso de fotodegradación.

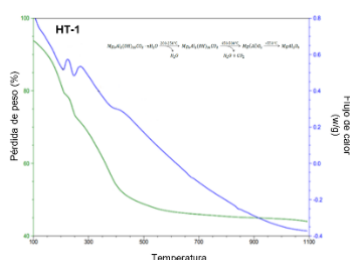


Figura 5. Perfil de descomposición térmica de la muestra HT-1

- Evaluación de la capacidad catalítica de la muestra HT-2 en la degradación del colorante rojo Congo

Prueba de fotolisis: Los resultados obtenidos del análisis por HPLC de la prueba de fotolisis se muestran en la Figura 6 (a). Donde se observa una disminución de la concentración de colorante rojo Congo hasta 200 mg/L en un la primera hora de reacción, tras 1,5 h más de reacción se llega una concentración de 150 mg/L la cual se mantiene constante; la degradación alcanzada en esta prueba se atribuye a que los fotones de luz y el O_2 son capaces de romper el enlace $N=N$ presente en la molécula del colorante rojo Congo por un mecanismo de radicales libres. En la Figura 6 (b). se muestra el cromatograma de la prueba de fotolisis donde se observa en el tiempo de elución de 1,8 minutos la señal correspondiente al colorante rojo Congo, se observa que la unidad de absorbancia de la concentración del colorante disminuye con respecto al tiempo de reacción. En el análisis por cromatografía se puede observar que no existe la generación de subproductos durante el proceso de fotolisis.

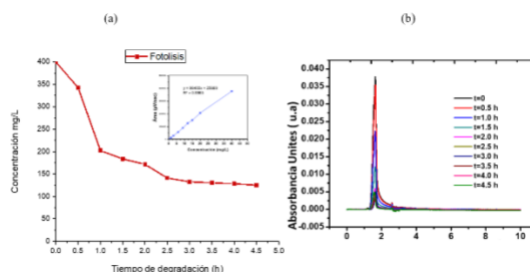


Figura 6. Análisis por HPLC de la prueba de fotolisis

Prueba de fotocatalisis: Los resultados obtenidos para la degradación catalítica del colorante se muestran en la Figura 7 (a). En la cual se observa para 1 h de reacción una disminución en la concentración hasta 200 mg/L y tras 3 h de la prueba se alcanza una degradación del 93% de la concentración inicial, lo que supone una concentración final de 26.9 mg/L. En la figura 8 (b). se presenta el cromatograma del análisis por HPLC, donde se observa a 1,5 minutos la señal que corresponde a los radicales hidroxilos presentes en la solución, se observa un incremento de la generación de los radicales libres con respecto al tiempo de tratamiento. En 1,8 minutos la señal corresponde al colorante rojo Congo y se puede observar que la unidad de absorbancia de la concentración del colorante disminuye con respecto al tiempo de tratamiento. También se puede observar que no existe la generación de subproductos de degradación durante el proceso de fotocatalisis.

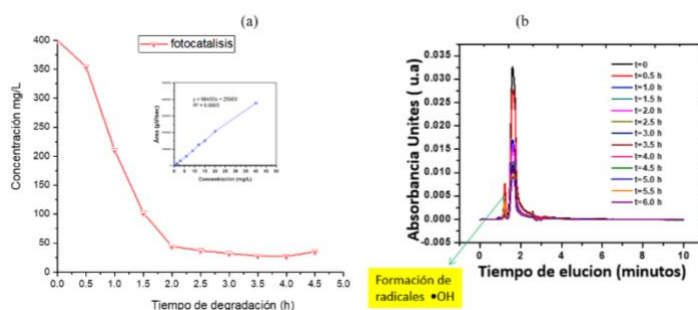


Figura 7. Análisis por HPLC de la prueba de fotocatalisis

Conclusiones

La Hidróxidos Dobles Laminares Mg/Al=1, sintetizados por coprecipitación fueron capaces de foto activarse con 2.56 eV a una longitud de onda de 254 nm y una potencia de 9W, confiriéndole propiedades semiconductoras y que, contenido en solución acuosa en presencia de luz UV, produjo los radicales $\bullet\text{OH}$ los cuales promovieron la fotodegradación del colorante rojo Congo a una concentración de 400 ppm, obteniéndose un descenso de coloración de la concentración inicial del colorante.

La concentración de rojo Congo se determinó mediante análisis por HPLC; con dicho análisis también se descarta la generación de subproductos más tóxicos que la molécula del rojo Congo.

Bibliografía

- [1] A. Rajeswari, E. Jackcina Stobel Christy, and A. Pius, "New insight of hybrid membrane to degrade Congo red and Reactive yellow under sunlight," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 179, pp. 7–17, 2018.
- [2] B. Saritha, M. P. Chockalingam, and M. Aswathy, "Degradation of anionic dye using Fe/TiO₂ composite by photocatalysis," *Int. J. Innov. Technol. Explor. Eng.*, vol. 8, no. 9 Special, pp. 788–791, 2019.
- [3] D. B. Miklos, C. Remy, M. Jekel, K. G. Linden, J. E. Drewes, and U. Hübner, "Evaluation of advanced oxidation processes for water and wastewater treatment – A critical review," *Water Res.*, vol. 139, pp. 118–131, Aug. 2018.
- [4] Z. Li, X. Zhang, J. Lin, S. Han, and L. Lei, "Azo dye treatment with simultaneous electricity production in an anaerobic-aerobic sequential reactor and microbial fuel cell coupled system," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 12, pp. 4440–4445, 2010.
- [5] U. Arellano *et al.*, "Transition metal oxides dispersed on Ti-MCM-41 hybrid core-shell catalysts for the photocatalytic degradation of Congo red colorant," *Catal. Today*, vol. 349, pp. 128–140, 2020.
- [6] W. W. Loo, Y. L. Pang, K. H. Wong, S. Lim, and S. K. Mah, "Adsorption-photocatalysis of organic dyes using empty fruit bunch activated carbon-metal oxide photocatalyst," in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 2018, vol. 458, no. 1.
- [7] C. Lei, X. Zhu, B. Zhu, C. Jiang, Y. Le, and J. Yu, "Superb adsorption capacity of hierarchical calcined Ni/Mg/Al layered double hydroxides for Congo red and Cr(VI) ions," *J. Hazard. Mater.*, vol. 321, pp. 801–811, 2017.
- [8] R. ran Shan *et al.*, "Highly efficient removal of three red dyes by adsorption onto Mg-Al-layered double hydroxide," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 21, pp. 561–568, 2015.
- [9] N. Van Hung, B. T. M. Nguyet, N. H. Nghi, and D. Q. Khieu, "Photocatalytic Degradation of Methylene Blue by Using ZnO/Longan Seed Activated Carbon Under Visible-Light Region," *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, 2020.
- [10] N. Ali *et al.*, "Photocatalytic Degradation of Congo Red Dye from Aqueous Environment Using Cobalt Ferrite Nanostructures: Development, Characterization, and Photocatalytic Performance," *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 231, no. 2, 2020.
- [11] E. Ramos-Ramírez *et al.*, "Activated Hydrotalcites Obtained by Coprecipitation as Photocatalysts for the Degradation of 2,4,6-Trichlorophenol," *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2018, 2018.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE SiO₂ UTILIZANDO ARENA SÍLICA COMO PRECURSOR NATURAL

Hernández Guillén Eréndira^a, Villegas Gasca J. A.^a, Guerra Contreras J. A.^a, Cervantes Jauregui J.A.^a

^a Posgrado en Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Gto.C.P. 36030, MÉXICO. e.hernandezguillen@ugto.mx

Resumen

En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas (NP's) basadas en la sílice (SiO₂). El interés es el de utilizar a éstas como precursores para el diseño de materiales cerámicos, con potenciales aplicaciones a altas temperaturas (~800°C). Las NP's de SiO₂ se sintetizaron utilizando como precursor natural a la arena sílica (AS), a la que se le realizó un lavado con H₂O DI y, posteriormente, se lixivió en dos etapas para eliminar la concentración de otros metales contenidos. Enseguida, la AS lixiviada, fue sometida a la técnica de fusión alcalina a temperaturas de 500, 600, 700 y 800°C para así obtener las NP's. Estas NP's de SiO₂ se caracterizaron empleando las técnicas de DRX, FTIR, SEM y FRX.

Palabras claves: Sílice, nanopartículas de sílice, alta temperatura, caracterización.

Introducción

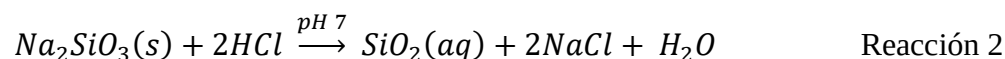
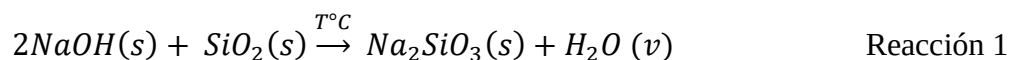
En la actualidad, el campo de las nanopartículas ha tenido un gran interés tanto en la investigación básica como en su aplicaciones tecnológicas, tales como: Puntos cuánticos de referencia, luminóforos, catalizadores o disolventes debido a sus diferentes propiedades únicas que se originan por su pequeño tamaño o alta superficie específica.[1] Vargas-Estrada y colaboradores[2] mencionan, que las NP's presentan varias ventajas sobre sus partículas a granel, por ejemplo, al tener mejores propiedades, que como consecuencia de una alta área superficial/volumen poseen una mayor conductividad térmica, una mayor velocidad de disolución, una alta capacidad de adsorción así como una mayor actividad catalítica, además tienen diversas funcionalidades debido a la abundancia de sitios activos superficiales con propiedades eléctricas y ópticas óptimas.

Por otra parte, la sílice es uno de los compuestos más abundantes en la corteza terrestre. Este material de inicio ha teniendo un gran interés tanto en la investigación científica como en la industria, dentro de la cual ha sido considerado para importantes aplicaciones, tales como en el desarrollo de nuevos materiales cerámicos .[3–5] En particular, en el presente trabajo, se utilizó AS con un grado de pureza en la sílice del 95%. Así, esta AS fue la que se empleó como precursora para obtener las NP's en base sílice.

Es importante mencionar que, para la obtención de las NP's de sílice, se utilizó el enfoque de síntesis Top-Down, el cual es destructivo. De acuerdo con Khan y colaboradores,[6] dicho enfoque consiste en que, partiendo de una molécula más grande, se descompone en unidades más pequeñas y luego estas se convierten en NP de tamaño y homogeneidad adecuadas, por ejemplo, a través de

la trituración/molienda seguida de una descomposición térmica y de una deposición química en presencia de vapor.[7] Basándose en dicho enfoque, en el presente trabajo, se empleó una metodología de descomposición térmica empleando altas temperaturas llamada fusión alcalina. Al respecto, existen trabajos en la literatura en donde emplearon la fusión alcalina, por ejemplo, Wahyudi y colaboradores la emplearon,[8] para sintetizar nano sílice junto con el NaOH en un intervalo de temperaturas de 400 a 1100°C. El tamaño de partícula que obtuvieron osciló entre los 40 y 60 nm. El gel obtenido se lavó con agua y se ajustó su pH 7 con HCl, se filtró y se caracterizó fisicoquímicamente. Así mismo, Munasir y colaboradores,[4] obtuvieron nano sílice a partir de un proceso térmico mezclando un % peso de AS con un % en peso de NaOH, enseguida se realizó un calentamiento a 500°C para formar el silicato de sodio sólido ($\text{Na}_2\text{O} \cdot x\text{SiO}_2$). A éste al cual se le adicionó HCl (1M) hasta obtener un pH 7 y formar así el gel $\text{Si}(\text{OH})_4$, se lavó con H_2O DI, se filtró y se secó a una temperatura de 80°C por un tiempo de 24 h. Las nanopartículas de SiO_2 presentaron un tamaño de alrededor de los 30 nm, mostrando una morfología esférica aglomerada. Recientemente Quang y colaboradores,[9] sintetizaron nanopartículas de sílice (SiO_2) mediante la descomposición de arena de sílice en sal fundida de NaOH en un intervalo de temperatura entre los 300 hasta los 900 ° C bajo ondas de ultrasonido. Los efectos de las diferentes proporciones en masa de NaOH: sílice (1:1, 1.5: 1 y 2:1), se presentaron en la relación de conversión fraccional de sílice, siendo mayor conforme aumentaron las relaciones entre las masa; por lo anterior, se recomendó utilizar una proporción de 1.5:1. El compuesto vítreo resultante se disolvió en agua caliente para preparar silicato de sodio hidratado, enseguida se le adicionó H_2SO_4 , se lavó con H_2O DI, se filtró y se secó a una temperatura de 90°C por 24 h. Con la metodología anterior, las nanopartículas de sílice presentaron una morfología esférica y con un tamaño medio entre los 10 a los 50 nm. Por lo tanto, considerando, los trabajos anteriores, a partir de la AS, en el presente trabajo, se sintetizaron nanopartículas de sílice con el objetivo de estandarizar la técnica por fusión alcalina, con la perspectiva de utilizar dichas NP's como precursores de materiales cerámicos que resisten temperaturas $\geq 500^\circ\text{C}$.

En adición a lo anterior, para el presente trabajo, se siguieron las siguientes dos reacciones para la síntesis de las NP's de base sílice. En la reacción 1, se muestra la síntesis del silicato de sodio Na_2SiO_3 empleando la técnica de fusión alcalina, mientras que con la reacción 2 se obtuvieron las NP's de sílice mediante el ajuste del pH con HCl, las cuales se obtuvieron en forma de un gel.[8]



Por otro lado, es importante mencionar que, la metodología de fusión alcalina podría emplearse en la formación de nanosílice, empleando materiales de reciclaje ricos en sílice, por ejemplo, materiales de vidrio que diariamente se tiran a la basura y que contribuyen con la contaminación del medio ambiente.[10] Finalmente, cabe destacar que, en adición al objetivo básico del presente

trabajo, también se pretende plantear el potencial uso de materiales naturales como precursores, tal como la AS, para el desarrollo de nuevos materiales nanoestructurados que permiten tener un menor costo en la síntesis de las NP's de sílice.

Materiales y Métodos

Dentro del trabajo experimental, la AS (>95 %w SiO₂) se lavó para eliminar impurezas y disolver trazas de iones, que son solubles en agua, tales como el Na, K, Ca⁺, Mg así como materia orgánica, enseguida se secó a 90°C en un tiempo de 24 h. La síntesis de las NP's fue realizada en dos etapas. Para la primera, se lixivió a la AS para eliminar las impurezas metálicas como iones de Fe, Al, K, Mg, Zn, Ti y Cu utilizando H₂SO₄ al 20% y se dejó en agitación a 400 rpm por 4 horas.[11] Se realizó una segunda lixiviación con HCl a 20% a 400 rpm por 4 h.[11] A la AS lixiviada se le llamó ASL. En la segunda etapa, se mezclaron SiO₂:NaOH en una relación estequiométrica 1:2 respectivamente, y mediante una fusión alcalina a temperaturas de 500, 600, 700 y 800°C se obtuvo el Na₂SiO₃ que, posteriormente, fue disuelto en H₂O DI, manteniéndose a 90°C por 4 h con una agitación permanente de 400 rpm.[4,8,9] Dicha disolución se filtró y se recuperó la fase acuosa, la cual se neutralizó con HCl (8M) empleando una agitación de 400 rpm durante 24 h, hasta la obtención de un gel viscoso. Este gel fue sometido a un calentamiento de 90°C para obtener así un polvo de NP's de SiO₂. Las fases cristalinas de los materiales estudiados fueron analizadas a través de la técnica de DRX, utilizando un difractómetro modelo Equinox System, utilizando como contraste CuK α ($\lambda = 1.5408 \text{ \AA}$), operando con una radiación a 20 mA y 30 KV y con un barrido de 2 θ entre los 5 a los 80°. Los patrones de DRX obtenidos se compararon con la base de datos del The Powder Diffraction File (PDF) y del Crystallography Open Database (COD) para determinar las estructuras cristalinas correspondientes. Los grupos funcionales y las vibraciones moleculares se determinaron por un análisis de absorción en el infrarrojo, esto es, a través de FTIR. Para el FTIR se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer 100, las muestras se prepararon por dilución con KBr, en una relación en peso 1:100 de muestra y KBr respectivamente, utilizando un intervalo en el número de onda de 400 cm⁻¹ - 4000 cm⁻¹, por transmitancia (Fernández Navarro, 2003). El equipo de SEM-EDS proporcionó un análisis morfológico y de análisis elemental para cada uno de los materiales, el equipo empleado fue ZEISS con detector SE2. Finalmente, la caracterización por FRX fue realizada en un equipo modelo RIGAKU NEX CG.

Resultados y Discusión

Un objetivo central de este trabajo fue el de sintetizar nanopartículas de sílice empleando un tratamiento de fusión alcalina para la Reacción 1, con lo cual se logró romper los enlaces químicos de la AS para crear así nuevas estructuras. La Reacción 1 de fusión alcalina se llevó a cabo a las temperaturas de 500, 600, 700 y 800°C para la obtención de las NP's de sílice, obteniéndose los rendimientos del 91, 92, 91 y 91 % respectivamente, mientras que para la Reacción 2, se obtuvieron los rendimientos del 81, 84, 80 y 82 % respectivamente para las correspondientes temperaturas. Cabe destacar que, la reacción con mayor rendimiento en la obtención de las NP's de sílice fue la que corresponde a la temperatura de 600°C, esto pudo deberse a que hubo menos pérdidas de NP's

debido a los lavados del gel obtenido después del ajuste del pH 7. Los resultados de los rendimientos obtenidos no se pudieron comparar al no encontrarse reportes previos en la literatura. Analizando los patrones de difracción de DRX (ver Figura 1) de las NP's se observa el carácter amorfo de la sílice al notarse la presencia de una banda ancha en el rango para 2θ desde los 15° hasta los 50° , aproximadamente. [4,12]. Mientras que en la AS se observó un carácter muy cristalino, con picos bien definidos, principalmente la señal correspondiente al SiO_2 en la fase mineralógica de α -cuarzo (*) (PDF #33-1161). Cabe destacar, que los patrones de difracción de la arena sílica confirman la naturaleza silíceica con la presencia del α -cuarzo, [13] aspecto importante para la formación de la red cerámica. De acuerdo con Wahyudi, Munasir y Quang [4,8,9] las NP's sintetizadas por el método de fusión alcalina deben tener una aspecto amorfo, lo cual coincide con resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación. En adición, en los difractogramas en las NP's sintetizadas se observó una especie cristalina, la cual corresponde al NaCl en la fase Halita (COD # 9006374); esto, como consecuencia de que los lavados finales fueron insuficientes. [14,15]

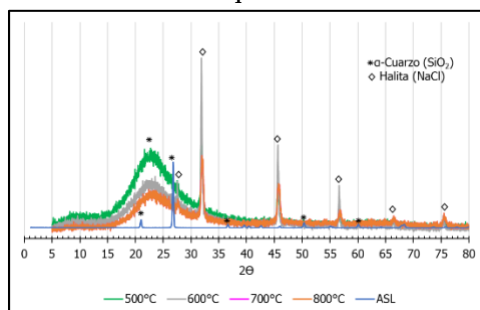


Figura 1. Patrón de DRX de la ASL y las NP's obtenidas por fusión alcalina (500, 600, 700 y 800°C respectivamente).

En relación con los resultados obtenidos a través de la técnica de FTIR (ver Figura 2), y para todas las temperaturas de la fusión alcalina, los espectros de las NP- SiO_2 muestran una banda intensa y en 1109 cm^{-1} con un hombro a 1196 cm^{-1} asignados, ambos, a los modos de las vibraciones de estiramiento asimétricas Si-O-Si, aunque también se observan señales en 3433 y en 1634 cm^{-1} que indican la presencia de H_2O ligada a las estructuras de NP- SiO_2 . [4,16] Note, que con esta caracterización de las NP's de SiO_2 se comprueba la naturaleza silíceica de las NP's obtenidas por fusión alcalina, lo cual coincide con Munasir y Mourhly. [4,16]

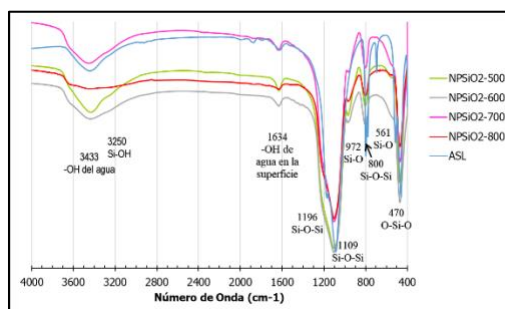


Figura 2. FT-IR de la ASL y NP's obtenidas por fusión alcalina (500, 600, 700 y 800°C respectivamente).

El análisis de las micrografías obtenida a través de SEM ilustra, que las partículas de sílice que se formaron mediante el tratamiento de fusión alcalina (ver Figura 3), muestran una distribución relativamente homogénea con formas esferoidales. [4,8,9] Aunque, cabe destacar que la morfología de las NP's de SiO₂ fue difusa dada su aglomeración irregular, por lo tanto, debido a dicha aglomeración, el contorno de las NP's impidió, en esta instancia, el cálculo del tamaño de partícula.

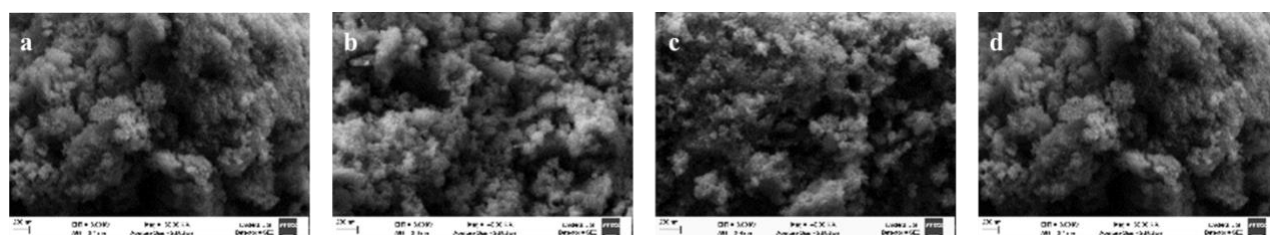


Figura 3. Micrografía SEM de las NP's de sílice obtenidas por fusión alcalina (500, 600, 700 y 800°C respectivamente).

Continuando con el análisis de los datos de FRX, que se muestran en la Tabla 1, la concentración de la sílice en las NP's sintetizadas estuvo por arriba del 97% peso. Lo anterior se debió al alto grado de purificación de la ASL que se obtuvo después de la lixiviación.[4] Es importante resaltar, que se observa una concentración muy baja de Na₂O, que muy posiblemente se deba al tratamiento térmico de fusión alcalina al que se sometieron los precursores, principalmente del NaOH, pudiendo representar una cantidad que no logro fusionarse con la ASL. De esto último, no se encontró en la literatura algún reporte al respecto.

Tabla 1. Resultados de FRX de las NP's de sílice obtenidas por fusión alcalina.

	% Peso				
Óxido	500 °C	600 °C	700 °C	800 °C	ASL
SiO ₂	97.92	97.79	98.27	97.89	97.76
Al ₂ O ₃	0.25	0.23	0.2	0.22	1.03
Na ₂ O	1.12	1.152	1.175	1.114	0.164

K₂O	0.0112	0.0114	0.0225	0.026	0.0096
CaO	0.019	0.0194	0.0182	0.0399	0.0268
Fe₂O₃	0.0194	0.0121	0.0175	0.0108	0.0155
Otros	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%

De acuerdo con Munasir y colaboradores,[4] el fenómeno que ocurre durante la fusión alcalina puede explicarse de la siguiente manera: La separación de la AS se realiza haciendo fases disueltas y no disueltas en agua. El primero se obtiene agregando el sodio del NaOH para formar al Na₂SiO₃. Independientemente de la formación de la fase disuelta, el sodio también puede dañar la estructura tetraédrica del SiO₂, por lo que el proceso de separación se puede llevar a cabo a una temperatura no demasiado alta. Entonces, si la temperatura de fusión aumenta, la asociación del enlace entre el anión y el catión en el sistema del tetraedro será débil y, como consecuencia, se romperá. Por lo tanto, cuanto más alta sea la temperatura, más separadas se vuelven y más pequeñas serán las partículas del tetraedro y, como consecuencia, el área superficial aumentará con la formación de partículas a escala nanométrica.

Conclusiones

Se obtuvo polvo de nanosílice de alta pureza mediante un tratamiento de fusión alcalina empleando a la AS como precursor principal. Durante dicho proceso, el rendimiento fue arriba del 91%. Además, se confirmó que las NP's de sílice obtenidas presentaron una morfología amorfa al presentar en DRX un halo ancho en alrededor de los 22° para el ángulo 2θ, aproximadamente. Esto fue confirmado con la técnica de FTIR al mostrar la presencia de grupos siloxano (Si-O-Si) y silanol (Si-O). Mientras que en las micrografías SEM se muestra una aglomeración de la NP's de SiO₂, pero con una distribución relativamente homogénea con formas esferoidales. Finalmente, con la técnica FRX se corroboró, que las NP's así obtenidas contienen arriba del 97% en peso de SiO₂. Resaltar, que la técnica de fusión alcalina es una técnica de bajo costo para la síntesis de NP's de SiO₂, las cuales tienen una potencial aplicación en el desarrollo de nuevos materiales cerámicos basados en NP's al conferirles a dichos materiales propiedades mejoradas, tales como la disminución del punto de fusión de la SiO₂ y propiedades ópticas óptimas.

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación agradece a CONACyT, al LICAMM UG (Laboratorio de Investigación y Caracterización de Minerales y Materiales) por las caracterizaciones DRX y FRX. También se agradece al Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Fisicoquímicas y Estructura Molecular de la UG por la caracterización realizada por SEM. Finalmente, se agradece al Laboratorio de Análisis Instrumental de la Sede Noria Alta de la DCNE por la caracterización por FTIR.

Bibliografía

- [1] K. Čubová, V. Čuba, Synthesis of inorganic nanoparticles by ionizing radiation – a review, *Radiat. Phys. Chem.* 169 (2020). doi:10.1016/j.radphyschem.2020.108774.
- [2] L. Vargas-estrada, A. Longoria, D.M. Arias, P.U. Okoye, P.J. Sebastian, Role of nanoparticles on microalgal cultivation : A review, 280 (2020). doi:10.1016/j.fuel.2020.118598.
- [3] M. Khalifa, R. Ouertani, M. Hajji, H. Ezzaouia, Hydrometallurgy Innovative technology for the production of high-purity sand silica by thermal treatment and acid leaching process, *Hydrometallurgy*. 185 (2019) 204–209. doi:10.1016/j.hydromet.2019.02.010.
- [4] Munasir, Triwikantoro, M. Zainuri, Darminto, Synthesis of SiO₂ nanopowders containing quartz and cristobalite phases from silica sands, *Mater. Sci.* 33 (2015) 47–55. doi:10.1515/msp-2015-0008.
- [5] Ahmad Taufiq, Ainun Nikmah, Arif Hidayat, Sunaryono Sunaryono, Nandang Mufti, Nurul Hidayat, Hendra Susanto, New coloured coatings to enhance silica sand absorbance for direct particle solar receiver applications, 152 (2020) 1–8. doi:10.1016/j.renene.2020.01.053.
- [6] I. Khan, K. Saeed, I. Khan, Nanoparticles : Properties, applications and toxicities, *Arab. J. Chem.* 12 (2019) 908–931. doi:10.1016/j.arabjc.2017.05.011.
- [7] V. Pareek, A. Bhargava, R. Gupta, N. Jain, J. Panwar, Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles : A Review, 9 (2017). doi:10.1166/ase.2017.2027.
- [8] A. Wahyudi, A. Dessy, Sariman, Preparation of Nano Silica from Silica Sand Through Alkali Fusion, *Indones. Min. J.* 16 (2013) 0–5.
- [9] N. Duc, V. Quang, O.V. Alexandrov, B.I. Bulgakov, L.D. Vuong, Synthesis and characterization of silica nanoparticles from Vietnam, (2019) 1–5.
- [10] M.H. Al-maamori, J.K. Ahmed, H.M. Ali, Production of Nano-Silica from Water Glass Production of Nano-Silica from Water Glass, 6 (2015).
- [11] S.A. Boussaa, A. Kheloufi, N.B. Zaourar, S. Bouachma, B.P. El Alia, B. Ezzouar, Iron and Aluminium Removal from Algerian Silica Sand by Acid Leaching, *Acta Phys. Pol. A.* 132 (2017) 1082–1086. doi:10.12693/APhysPolA.132.1082.
- [12] U. Zulfiqar, T. Subhani, S.W. Husain, Synthesis and characterization of silica nanoparticles from clay, *J. Asian Ceram. Soc.* 4 (2016) 91–96. doi:10.1016/j.jascer.2015.12.001.
- [13] A. Sdiri, T. Higashi, S. Bouaziz, M. Benzina, Synthesis and characterization of silica gel from siliceous sands of southern Tunisia, *Arab. J. Chem.* 7 (2014) 486–493. doi:10.1016/j.arabjc.2010.11.007.
- [14] N. Day, P. Murray-Rust, University of Cambridge, Crystallography Open Database, (2020). <http://www.crystallography.net/cod/index.php> (accessed January 7, 2019).
- [15] ICDD, Powder Diffraction File (PDF), (2020). <https://www.icdd.com/pdfsearch/>.
- [16] A. Mourhly, M. Khachani, A. El Hamidi, M. Kacimi, M. Halim, S. Arsalane, The Synthesis and Characterization of Low-Cost Mesoporous Silica SiO₂ from Local Pumice Rock, *Nanomater. Nanotechnol.* 5 (2015) 35. doi:10.5772/62033.

TRIENAMINE CATALYSIS FOR ORGANOCATALYTIC THIO-DIELS-ALDER/RING-CLOSING CASCADE REACTION FORMING THIO-PYRANO-PIPERIDONE FUSED RINGS

M.Sc. Suhas Balasaheb Mitkari, Alberto Medina Ortiz, Dr. Clarisa Villegas Gómez*, Dr. David Cruz Cruz*.

Departamento de Química, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. (Noria Alta S/N, CP 36050).

Guanajuato, Gto, MÉXICO

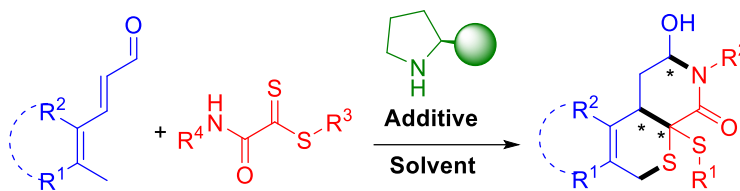
E-mail (alumini): suhasmitkari@gmail.com

Abstract: We are reporting new cascade reaction to access highly enantioriched heterocyclic fused rings compound. The asymmetric [4+2] thio-Diels Alder/nucleophilic ring closing reaction furnish enantioriched thio-pyrano-piperidone fused rings compounds via trienamine intermediate. Additionally, by linking an indole moiety on the dithioamide, a Pictet-Spengler type reaction can be promoted once the cascade sequence has been achieved, leading to more complex penta- hexa- and heptacyclic fused ring derivatives in a one-pot process. The enantioriched compound gained up to three stereocentres and extend up to hexacyclic and heptacyclic membered compounds with good to excellent yield and excellent distereomeric ratio, enatiomeric excess.

Keywords: *aminocatalysis, asymmetric catalysis, cascade reactions, Bis-cascade reaction, Dithioamides.*

Introduction

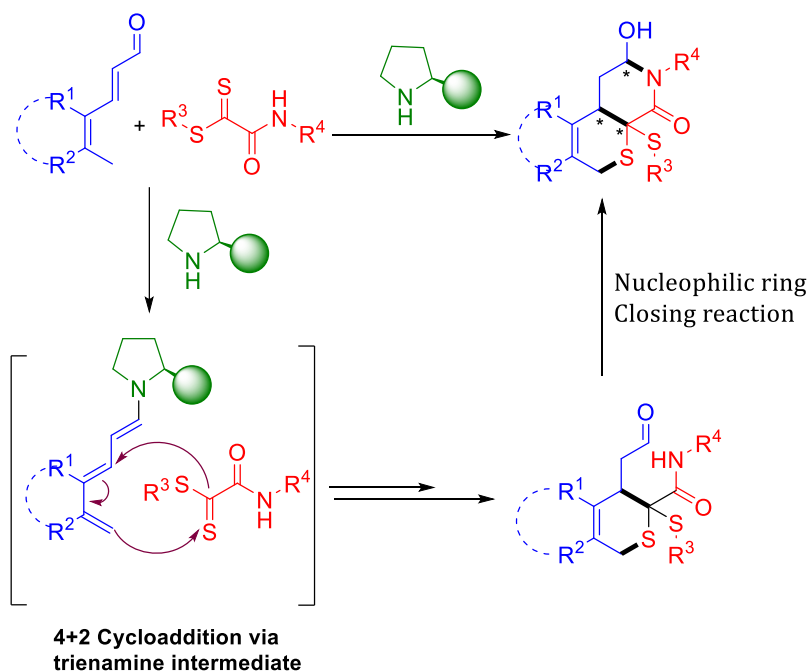
The construction of carbon-carbon and carbon-heteroatom bonds, along with the creation of stereogenic centers, constitutes a demanding area. In this sense, the research focused in the development of processes in which, compounds are synthesized in optically active forms are of growing interest. During this development, novel biologically active compounds have been prepared. However, the drug discovery through the synthesis of new compounds is still a challenge for chemists. The expansion of the newly developed activation mode such trienamine activation bring great importance to this project. In the present research, we have proposed explore the diversification of different substituted dithioamide through organocatalytic cascade reactions, which will furnish fused bicyclic and tetracyclic enantioenriched compounds with up to three stereogenic centres. It is known that such privileged structures have been not yet reported before and a series of structures containing these type of rings by separated are biologically active, such as thio-pyrano, piperidone and indole. In the proposed strategy, the trienamine intermediate formed by condensation of 2,4-dienals can react with a variety of dienophiles in a [4+2] fashion.^[1] Trienamine activation is an efficient HOMO-raising strategy in organocatalysis for both simple and organocatalytic cascade transformations. It would be tremendous to apply this new activation mode to provide an efficient methodology to access to thio-pyrano-piperidone and thio-pyrano-piperidone-indole fused rings. It will be an important contribution because of the application of the organocatalysis in the synthesis and diversification of enantioenriched compounds. This strategy is based on an organocatalytic thio-Diels-Alder reaction/ nucleophilic ring-closing cascade sequence (Scheme 1).



Scheme 1: Synthesis of thio-pyrano-piperidone bicyclic and tetracyclic rings.

Methodology

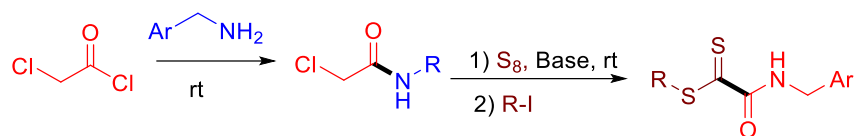
The Diels-Alder reaction is one of the most effective strategies in the field of aminocatalysis. We are going to apply this methodology for the asymmetric functionalization of dithioamide via trienamine activation. Once the trienamine intermediate will form with the corresponding chiral secondary aminocatalyst, it will react with dithioamide in a [4+2] cycloaddition in order to form corresponding cycloadduct. After, a nucleophilic ring closing by nitrogen on the aldehyde will result in a second ring formation with a hydroxy group and three chiral centres (Scheme 2).



Scheme 2: Cascade sequence through trienamine activation Diels-Alder reaction/nucleophilic ring closing with dithioamides.

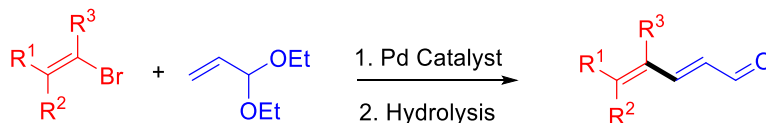
Synthesis of Starting material

For the corresponding dithioamide, we need enough chloroacetyl amide. A mixture chloroacetyl chloride and benzyl amine will obtain chloroacetyl amide, which will be treated with sulphur under basic conditions and then an alkyl halide will furnish dithioamide compound (Scheme 3).



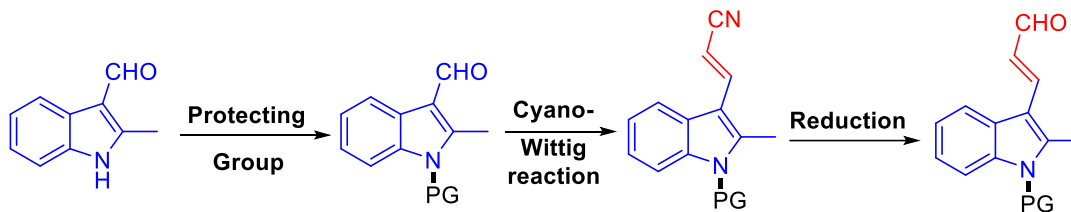
Scheme 3: General procedure for the synthesis of dithio-amides.

The hexadienal derivatives can be prepared by heck reaction. The vinyl bromide will be reacted with acrolein diethylacetal and then the hydrolysis will furnish the corresponding hexadienal derivatives (Scheme 4).



Scheme 4: Synthesis of dienal.

Propenyl indole aldehyde also play an important role like hexadienal for that, we require amine protected indole carbaldehyde. Then, a wittig reaction with the corresponding cyano compound and then a reduction will furnish the desired propenyl indole aldehyde (Scheme 5).



Scheme 5: General synthesis of propenyl indole aldehyde.

Result and Discussion

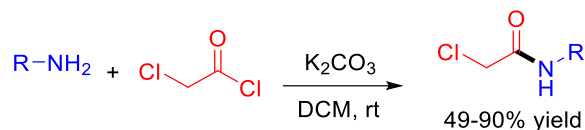
The Diels–Alder reaction via trienamine catalysis is an useful tool in organocatalysis. Its power has been demonstrated in the formation of C-C and C-S new bonds stereoselectively. Here, we developed an organocatalytic cascade thio-Diels Alder/ nucleophilic ring closing sequence.

Starting Material

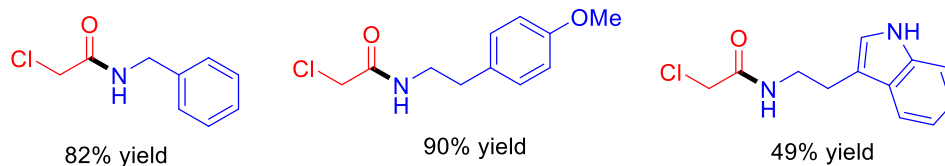
Dithioamides have been prepared following the methodology in scheme 2. ^[3] In the first step, primary amines are reacted with chloroacetyl chloride in presence of K₂CO₃ and DCM as solvent to form the corresponding chloro acetyl amides (Scheme 5a).

The reaction with sulphur in presence of triethyl amine and then an alkyl halide, gave the desired products in moderate to good yields (Scheme 6b).^[4]

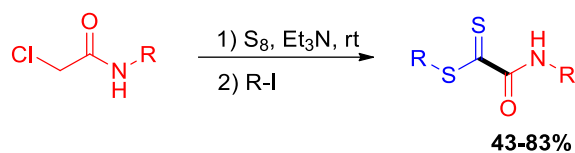
a)



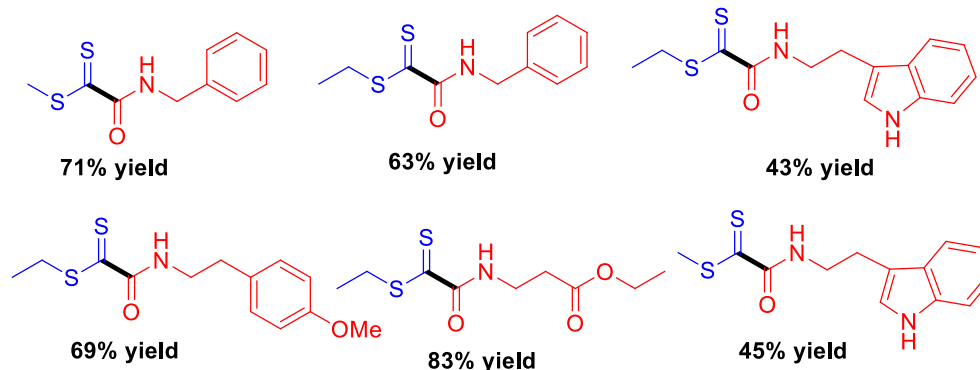
Derivatives:



b)

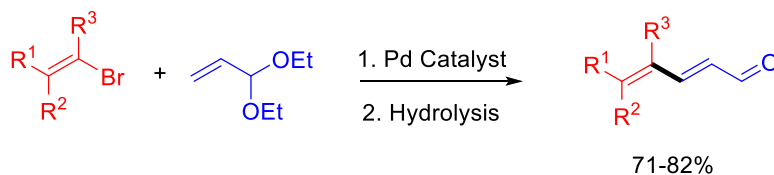


Derivatives:

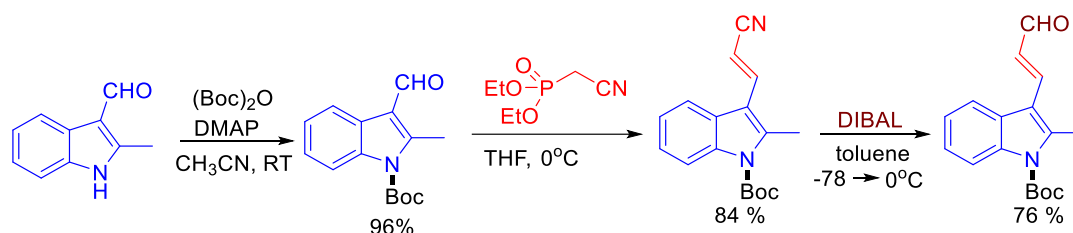


Scheme 6: Synthesis of dithio-amide.

For the trienamine activation, we require some applicable and different substituted chain and cyclic aldehyde derivatives, which easily undergo thio-Diels-Alder cycloaddition reaction. The chain aldehydes can be prepared by a Heck reaction by using vinyl bromides and acrolein diethylacetal to form the corresponding dienals (Scheme 7).^[5]



The propenyl aldehyde can be prepared by following strategy: In first step, the indole carbaldhyde reacted (Boc)₂O in presence of DMAP and CH₃CN as solvent to form corresponding *N*-protected indole carboxylat, it will be treated with cyano-wittig reagent then underwent reduction will furnish propenyl indole aldehyde with good yield (Scheme 8).

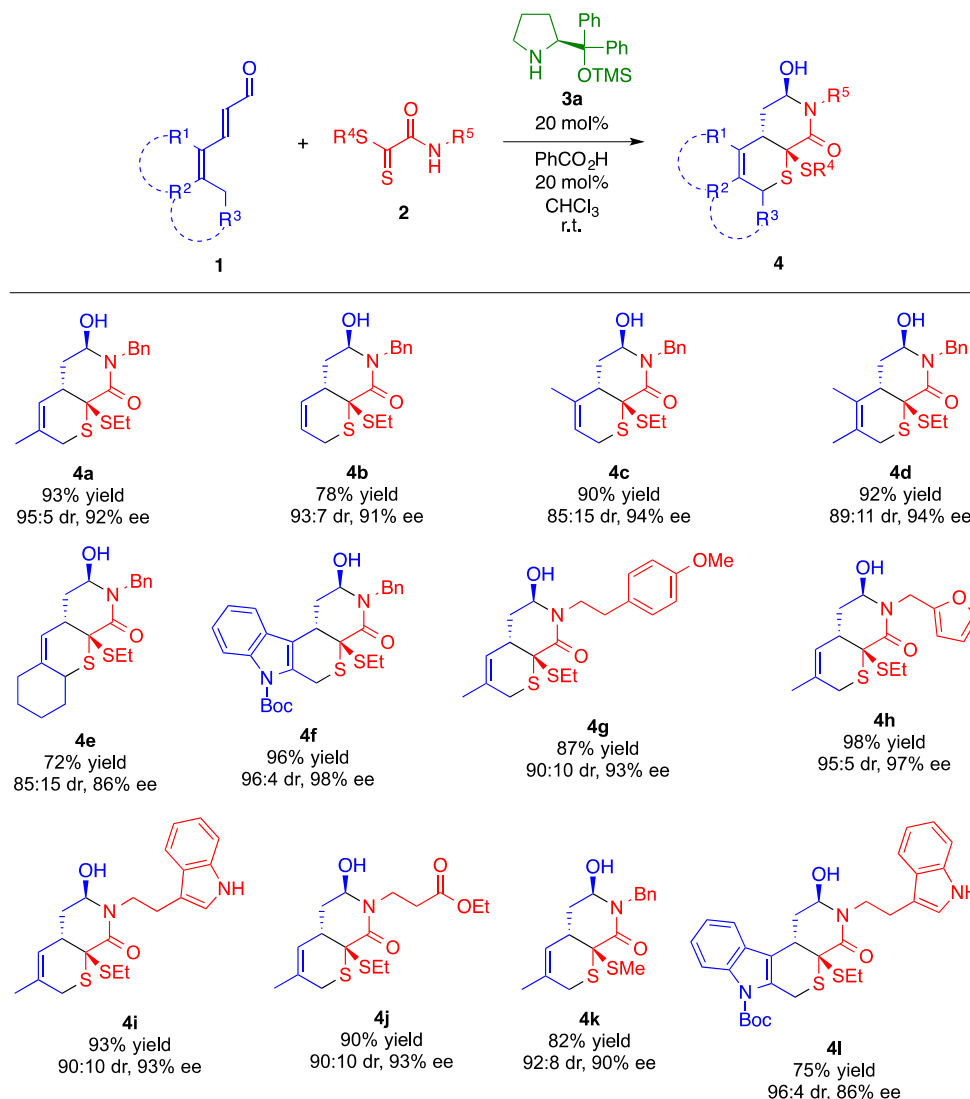


Scheme 8: Synthesis of propenyl indole aldehyde.

Organocatalytic Cascade Reaction

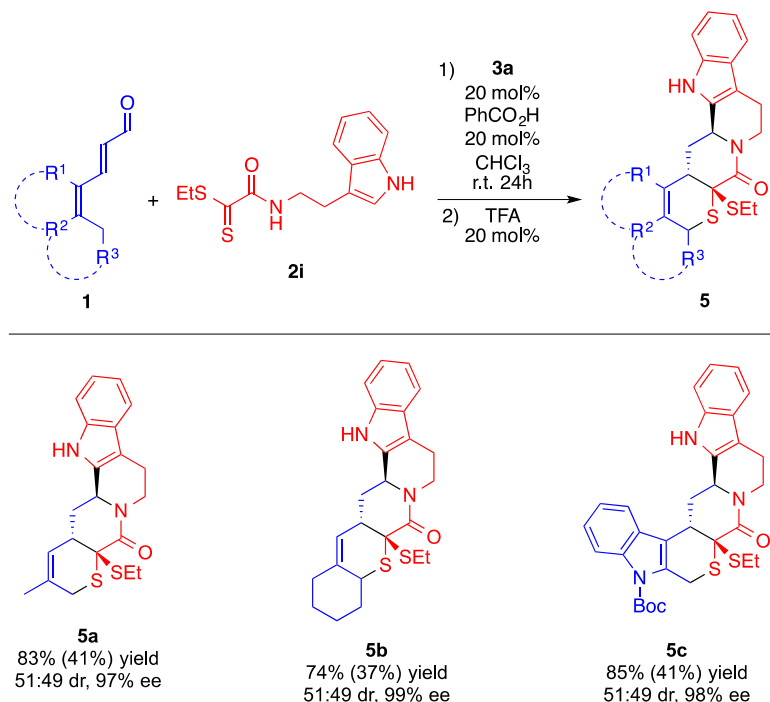
To find the optimal conditions for the Diels–Alder/ring closing cascade reaction, we started to study the reaction between hexadienal and dithioamide. In a first attempt, when reaction was carried out with 20 mol% of chiral secondary amine and mild acid as additive in CHCl₃, only moderate yield of the desired compound was observed after 16h at room temperature. Under these conditions, we noticed that part of aldehyde was degraded and no improvements in yield.

However, when the equivalents of aldehyde were increased, the product was obtained in excellent yield and excellent dr. Above reaction conditions proved to be the most suitable for this reaction, and the desired cascade adduct proceeded smoothly to furnish bicyclic thio-pyrano-piperidone fused rings.



Scheme 9: Synthesis of thio-pyrano-piperidone bicyclic rings and thio-pyrano-piperidone-indole tetracyclic rings.

It is notably that by introducing tryptamine moiety instead of benzyl group in dithioamide, a Pictet–Spengler type reaction can be achieved after the cascade sequence, leading to complex frameworks in a one pot process. (Scheme 10)



Scheme 10. Scope of the thio-Diels–Alder/nucleophilic ring closing Pictet–Spengler one-pot reaction.

Conclusion

In conclusion, we have developed a new thio-Diels–Alder/nucleophilic ring-closing cascade sequence for the enantioselective synthesis of thio-pyrano-piperidone fused ring compounds through trienamine catalysis. The reaction proceeds efficiently with high levels of stereocontrol. Additionally, by promoting an intramolecular Pictet–Spengler reaction after the cascade sequence, different thiopyrano-piperidone-carboline fused ring compounds were constructed in a one-pot with good yield and excellent enantiocontrol.

References

1. a) K. L. Jensen, G. Dickmeiss, H. Jiang, L. Albrecht, K. A. Jørgensen, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 248; b) J.-L. Li, T.-Y. Liu, Y.-C. Chen, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 1491; c) E. Arceo, P. Melchiorre, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 5290; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 5384; d) I. Kumar, P. Ramaraju, N. A. Mir, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 709; e) H. Jiang, L. Albrecht, K. A. Jørgensen, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 2287; f) B. S. Donslund, T. K. Johansen, P. H. Poulsen, K. S. Halskov, K. A. Jørgensen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 13860; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 14066; g) J. Kun, Y.-C. Chen, *Prog. Chem.* 2015, 27, 137.
2. Sumpter, W. C. *Chem. Rev.* **1944**, 34, 393.
3. A.K Valiveti, U. M. Bhalerao, J. Acharya, H. N. karade, R. Gundapu, A. K. Halve, M. P. Kaushik; *Chembioint j*, **2015**, 237, 125-132.
4. H. Jiang, D. C. Cruz, Y. Li, V. H. Lauridsen, K. A. Jørgensen, *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 5200.
5. G. Battistuzzi, S. Cacchi, G. Fabrizi : *Org. Lett.*, **2003**, 5(5), 777-780.

VALIDACIÓN DEL MODELO DE TRANSFERENCIA DE MASA PARA UNA COLUMNA DE DESTILACIÓN POR LOTES

Mayra Margarita May-Vázquez ^a, Mario Alberto Rodríguez-Ángeles ^b, Fernando Israel Gómez-Castro ^a, Edilberto Murrieta-Luna ^b

^a Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Ingeniería Química, Noria Alta S/N Col. Noria Alta, Guanajuato, Guanajuato, MÉXICO 36050

^b Universidad Politécnica de Juventino Rosas, Hidalgo No. 102, Comunidad de Valencia, Juventino Rosas, Guanajuato, MÉXICO 38253

Resumen

En este trabajo se desarrolla un modelo de transferencia de masa para representar las interacciones de las fases en los platos de una columna por lotes en escala piloto, incorporando dicho modelo en el sistema de ecuaciones en no-equilibrio para la determinación de los perfiles de composiciones y temperaturas. La columna a escala piloto consta de 4 platos perforados, un calderín y un condensador total. Se ha separado una mezcla de 75% metanol y 25% mol etanol. Las velocidades de transferencia de masa se obtendrán por medio de la adecuación de un modelo previamente reportado para platos perforados. Estos datos se introducen en el modelo de no-equilibrio, y el conjunto de ecuaciones diferenciales y algebraicas resultantes se resuelven empleando el software Matlab. Se obtuvieron las composiciones, temperaturas y velocidades de transferencia de masa para cada una de las etapas cada 10 minutos. La solución del modelo ha arrojado los perfiles de composición simulados, de los cuales se observa una composición final en el calderín de 72.77% mol de metanol. Los datos simulados presentan una desviación de 3% con respecto a la información experimental. El modelo de no-equilibrio permite predecir con exactitud el comportamiento de la columna experimental, evidenciando la importancia de contar con un modelo de transferencia de masa adecuado al sistema de interés.

Palabras clave: *Destilación por lotes, transferencia de masa, no-equilibrio*

Introducción

La destilación por lotes es la operación más antigua para la separación de mezclas líquidas [1], esta ha sido ampliamente utilizada para la producción de líquidos finos y productos especializados; tales como bebidas alcohólicas, aceites esenciales, productos farmacéuticos y perfumes. En las últimas décadas, diferentes estrategias han sido propuestas para el modelado, optimización y simulación de columnas de destilación por lotes. Para la destilación por lotes se han categorizado modelos dependiendo de su complejidad [2], y éstos son el modelo de Rayleigh, el método corto, el método simple y el método riguroso; a su vez, en el modelo riguroso es posible asumir que las fases se encuentran en equilibrio o no. En el modelo de equilibrio se asume que la fase líquida y vapor están en equilibrio termodinámico, usando la eficiencia de Murphree para describir la desviación del equilibrio; este modelo es relativamente simple. El modelo en no-equilibrio elimina la necesidad de usar eficiencias. Este modelo es más exacto, pero a su vez más complicado en comparación con el modelo de equilibrio, ya que está conformado por un sistema de ecuaciones más complejas que requieren mayor esfuerzo de cómputo. En este modelo se toman en cuenta la transferencia de masa

y de energía para cada fase, asumiendo que el equilibrio termodinámico se alcanza solo en la interfase. Krishnamurthy y Taylor [3] han presentado un modelo en no-equilibrio de una columna de destilación multicomponente usando diferentes correlaciones de transferencia de masa binarias. El modelo de no-equilibrio está conformado por las ecuaciones MERSHQ: balances de materia, balances de energía, velocidad de transferencia de masa y energía, restricciones de sumatorias, hidráulica y ecuaciones de equilibrio. Para calcular la velocidad de transferencia de masa es necesario usar un modelo de transferencia adecuado al sistema de estudio, requiriendo a su vez del cálculo de propiedades de transporte, tales como las difusividades. Existe un modelo de transferencia de masa para platos que fue desarrollado por Taylor y Krishna [4] y se consideran dos regímenes de operación: régimen de spray y de burbujeo [5]. En el régimen de burbujeo existen la zona de formación de chorro, de burbujeo libre y de rompimiento. En cada una de las zonas se modela considerando diversos parámetros como el diámetro del chorro, velocidad de vapor, altura de zona, diámetro de las burbujas y velocidad de ascenso de las burbujas. El modelo matemático obtenido de la columna de destilación por lotes está conformado por un sistema de ecuaciones diferenciales y algebraicas (EDA). Las ecuaciones diferenciales provienen de los balances de masa globales y por componentes y los balances de energía en cada fase, y las ecuaciones algebraicas son obtenidas de las relaciones de equilibrio, restricción de sumatorias y velocidad de transferencia de masa y energía.

Metodología

Se realizó la separación de una mezcla metanol-etanol con una composición inicial de metanol de 75% mol y 25% etanol en una columna de destilación por lotes a escala piloto con una carga inicial de 10 L de la mezcla. La columna se operó a reflujo total durante 10 minutos para posteriormente operarla por 80 minutos y tomar muestras cada 10 minutos, analizándolas en un cromatógrafo de gases para conocer la concentración de cada uno de los componentes. La columna consta de un calderín, 4 platos perforados y un condensador total (Figura 1). La columna se encuentra instalada en la Universidad Tecnológica del Suroeste del Estado de Guanajuato (UTSOE).

Algunas de las consideraciones para el modelo en no equilibrio son las siguientes:

- La interfaz líquido-vapor se encuentra en equilibrio termodinámico.
- Los platos están en equilibrio mecánico.
- El transporte de masa y energía se lleva a cabo de la fase vapor a la fase líquida.
- La fase líquida y vapor se encuentran perfectamente mezcladas.
- La retención de líquido y vapor en los platos es constante.
- La operación del condensador es total.
- El calderín y condensador están en equilibrio.
- Las paredes de la columna están perfectamente aisladas.



Figura 20.- Columna de destilación por lotes a escala piloto

El modelo matemático condensado de la columna por lotes en no equilibrio para la separación de dos componentes (metanol y etanol) se muestra a continuación. Cada etapa se denota con la letra j y los componentes con la letra i , siendo el metanol el componente 1.

Condensador

Balance en el acumulador

$$\frac{dM_a}{dt} = L_D \quad (1)$$

Balance de materia por componente en el acumulador

$$\frac{dx_{i,a}}{dt} = \frac{L_D (x_{i,j} - x_{i,a})}{M_a} \quad (2)$$

Platos internos, $j=1, \dots, 4$; $i=1$ a 2

Balance de materia

$$\frac{dM_j^V}{dt} = V_{j-1} - V_j + N_{T,j} \quad (3)$$

$$\frac{dM_j^L}{dt} = L_{j+1} - L_j - N_{T,j} \quad (4)$$

Donde $N_{T,j}$ es la velocidad de transferencia de masa total en la interfase

Balance de materia por componente en la fase líquido y vapor

$$\frac{dy_{i,j}}{dt} = \frac{V_{j-1}}{M_j^V} y_{i,j-1} - \frac{V_j}{M_j^V} y_{i,j} + \frac{N_{i,j}^V}{M_j^V} \quad (5)$$

$$\frac{dx_{i,j}}{dt} = \frac{L_{j+1}}{M_j^L} x_{i,j+1} - \frac{L_j}{M_j^L} x_{i,j} - \frac{N_{i,j}^L}{M_j^L} \quad (6)$$

Balance de energía en la fase vapor y líquido

$$0 = V_{j-1}H_{j-1} - V_jH_j + e_j^V \quad (7)$$

$$0 = L_{j+1}h_{j+1} - L_jh_j - e_j^L \quad (8)$$

e_j^f es la velocidad de transferencia de energía.

Velocidad de transferencia de masa y energía a través de la interfase

$$e_j^V = e_j^L \quad (9)$$

$$\sum_{i=1}^c N_{i,j}^V = \sum_{i=1}^c N_{i,j}^L = N_{T,j} \quad (10)$$

$$N_{i,j}^V = N_{i,j}^L \quad (11)$$

Restricciones (sumatorias)

$$\sum_{i=1}^c y_{i,j}^I = 1.0 \quad (12)$$

$$\sum_{i=1}^c x_{i,j}^I = 1.0 \quad (13)$$

Equilibrio

$$y_{i,j}^I = K_{i,j} x_{i,j}^I \quad (14)$$

Para calcular la velocidad de transferencia de masa en los platos de la columna, es necesario adaptar el modelo propuesto por Taylor y Krishna [4] al sistema de estudio. Para resolver el modelo existen parámetros que son necesarios encontrar como son: correlaciones para el cálculo de las densidades, viscosidades y difusividades para cada componente, así como para las mezclas en las fases líquida y vapor. El modelo de transferencia de masa se muestra a continuación.

El flujo molar promedio del componente i está dado por:

$$N_i = c_t^V K_{OV} (\Omega^V)^{-1} (y_E - y_1^*) \quad (15)$$

Donde K_{OV} es el coeficiente global de transferencia de masa, obtenida del coeficiente de transferencia de masa líquido (k^L), el coeficiente de transferencia de masa del vapor (k^V) y la constante de equilibrio (K).

$$\frac{1}{K_{OV}} = \frac{1}{k^V} + \frac{c_t^V}{c_t^L} \frac{K}{k^L} \quad (16)$$

$$k^V = \frac{-\ln(1-F)}{a't} \quad (17)$$

$$k^L = 2 \left(D^L / \pi t \right)^{1/2} \quad (18)$$

F es un factor de equilibrio y es función del número de Fourier (Fo)

$$F = 1 - 4 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-\lambda_n^2 r^2 Fo)}{\lambda_n^2 r^2} \quad (19)$$

$$Fo = \frac{D^V t}{d^2} \quad (20)$$

t es tiempo de residencia de las burbujas, la cual depende de la altura del líquido y la velocidad de ascenso de las burbujas.

Dos parámetros importantes en el modelo de transferencia de masa son la velocidad de ascenso y el diámetro de la burbuja. Los parámetros antes mencionados fueron obtenidos usando la dinámica de fluidos computacional, según se describe en el trabajo de May-Vázquez y col. [6].

La simulación del modelo en no equilibrio se realizó en el software Matlab R2013a, donde el sistema de ecuaciones diferenciales y algebraicas fueron introducidas. Para la inicialización de la columna se realizó la simulación del modelo de no-equilibrio durante 10 minutos a reflujo total. Los valores obtenidos de la inicialización fueron usados como valores iniciales para la simulación en no-equilibrio. Para la resolución del sistema de ecuaciones diferenciales y algebraicas se utilizó el método de Runge-Kutta con un tamaño de paso constante de 0.01 s.

Resultados

El sistema de ecuaciones del modelo en no-equilibrio de la columna de destilación por lotes binaria consta de 28 ecuaciones diferenciales y 270 ecuaciones algebraicas, siendo éste un sistema complejo.

En la **Error! Reference source not found.** se muestran los errores en cada uno de los platos, estos errores son el promedio durante todo el tiempo de operación (80 minutos). Posteriormente se calculó el promedio de los errores en todos los platos.

Tabla 15.-Errores en el modelo

Plato	Modelo de no-equilibrio
1	2.35%
2	3.00%
3	3.67%
4	4.30%
Promedio	3.33%

En la **Error! Reference source not found.** se muestra la variación de la composición de metanol con el tiempo. Como se esperaba, la fracción mol de metanol tiende a aumentar de las etapas inferiores a las superiores. Conforme el tiempo aumenta la fracción de metanol líquido disminuye en cada etapa.

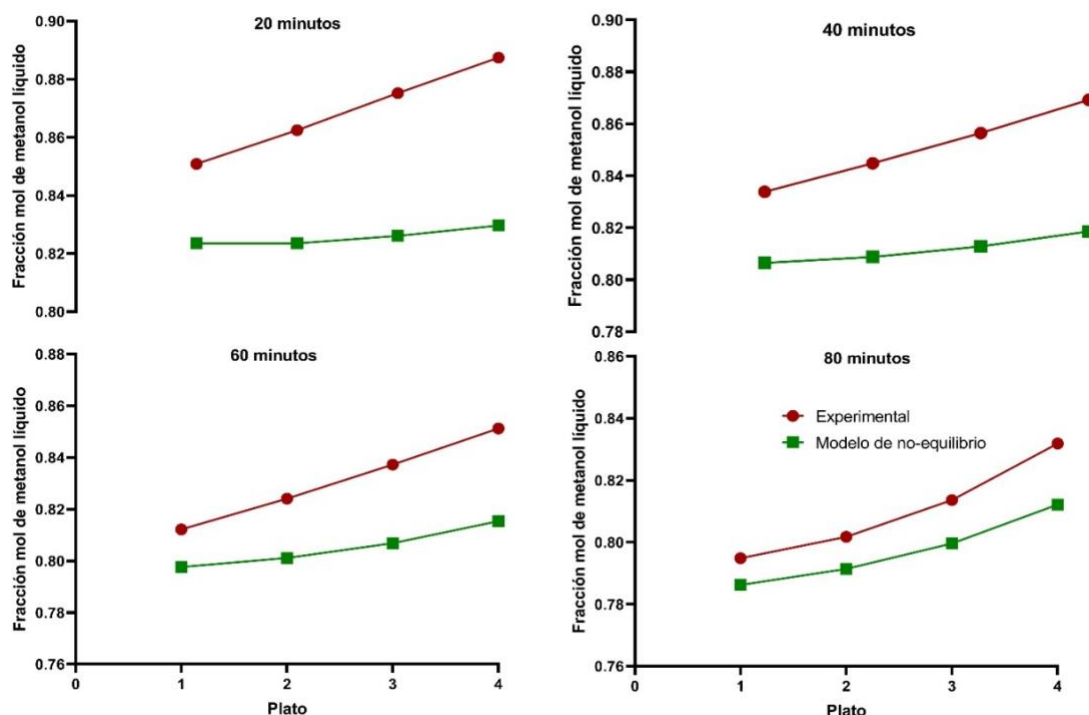


Figura 21.-Perfil de composiciones

En la Figura 2 se observa un buen ajuste entre los resultados experimentales y los del modelo de no-equilibrio. La velocidad de transferencia de masa cambia con el tiempo, y ésta es afectada también por la velocidad de ascenso y diámetro de la burbuja. Por lo tanto, el perfil de composiciones con el modelo de no-equilibrio puede mejorar si se predicen de mejor forma esos dos parámetros. Al comparar la magnitud de la pendiente entre la parte experimental y el modelo de no-equilibrio, se obtiene que la del caso experimental es mayor. Se asume que la velocidad de transferencia de masa predicha por el modelo es menor al caso experimental debido a que este último presenta una menor variación en las composiciones.

Conclusiones

Al operar la columna en régimen de burbujeo, en el modelo de transferencia de masa existen dos parámetros muy importantes que son el diámetro de la burbuja y la velocidad. Se observó que durante la operación no se formaban chorros, sólo burbujas. Se comprobó que el modelo de transferencia de masa juega un papel muy importante para la simulación en no-equilibrio, a mayor velocidad de transferencia de masa la composición final es menor. Una propuesta para mejorar el modelo de transferencia de masa es una nueva correlación de velocidad de la burbuja.

Bibliografía

- [1] Lucet M., Charamel A., Guido G., Chapuis A., Loreau J., 1992, “Role of Batch Processing in the Chemical Process Industry”, *Batch Processing Systems Engineering*, Springer, New York, 143, 43-48.
- [2] Mujtaba I., 2004. *Batch Distillation Design and Operation*. Imperial Collage Press. London.
- [3] Krishnamurthy R., Taylor R., 1985a, Nonequilibrium stage model of multicomponent separation processes I– Model development and method of solution, *AIChE J.*, 31, 449-456.
- [4] Taylor, R., Krishna, R. 1993. *Multicomponent Mass Transfer*. John Wiley & sons, Inc. New York, US.
- [5] Lockett M. J. and Kirkpatrick R., 1975, Ideal bubbly flow and actual flow on bubble columns. *Trans. Inst. Chem. Eng.*, 53, 267-273.
- [6] May-Vazquez M. M, Rodríguez-Ángeles M. A. Gómez-Castro F. I., Zamora-Espinoza J., Murrieta-Luna E., 2020, Development of a mass transfer model for the rate-based simulation of a batch distillation column, *Comput Chem Eng.*, 140, 1-10

LISTA DE AUTORES

Autor	Página	Autor	Página
Alcocer Garcia Heriberto	227	Fuentes Ramírez Rosalba	221
Alonso Castro Ángel Josabad	59	García Carnero Laura Cristina	203
Caudillo Ortega Lucía	01, 101	Gómez Castro Fernando Israel	138, 178, 297
Ceseña José I.	263	González Guerra Guillermo Manuel	90
Chávez López Jorge Luis	01	González Muñoz María del Pilar	29
Flores Martínez Alberto	23, 167	Guerra Contreras J. A.	283
Gasca Martínez Deisy	59	Gutiérrez Antonio Claudia	210, 234
González Guerra Guillermo Manuel	95	Gutiérrez Granados Silvia	47, 160, 216
Gutiérrez Ortega Norma Leticia	275	Gutiérrez Norma. L.	263
Huchin Mian Juan Pablo	29, 41, 66, 112, 150	Hernández Guillén Eréndira	283
Jaime Ferrer Jesús Salvador	160	Hernández Salvador	234
Jesús Antonio Amezola Rivera	167	Julio César Villagómez Castro	23, 167, 210, 234
López Cabrera Sara Danaé	10	Lara Gamez Josué Armando	160
Ramos Esthela	263	Lara Montañón Oscar Daniel	210
Sepúlveda Angulo Julieta	239	Lara Morales Alfredo	101
Abundiz Yáñez Karen	144	Leyva Sánchez Hilda	83, 144, 250
Aguilar Pérez Paulina Irais	41	López Caamal Fernando	125
Alatorre Ordaz Martín Alejandro	90, 95	Lozoya Pérez Nancy Edith	203
Alatorre Ornelas Esthela Jaqueline	41	Luna González Cinthya Ximena	47
Alba Clara	59	Martínez Duncker Iván	203
Alpuche Avilés Mario	47	Martínez Magaña Lissett E.	184
<i>Alva Murillo Patricia Nayeli</i>	29, 41	Martínez Sainz Carlos Manuel	112
Álvarez Rivera Karla Yuritzi	90	Martínez Sánchez Osiris	138
Amezcu Hernández Diana Guadalupe	29, 66	May Vázquez Mayra Margarita	297
Anaya Velázquez Luis Fernando	189, 256	Medina Ortiz Alberto	290
Argote Fuentes Sara Guadalupe	275	Medina Ramírez Adriana	196, 221
Ávila Muro Eva Edilia	239	Méndez Alvarado Lorena N.	221
Ávila Rodríguez Mario	154	Mendoza Macías Claudia	256
Ayala García Victor M.	150, 244	Miranda Avilés Raúl	275
Barraza Colón Jennifer	173	Mitkari Suhas Balasaheb	290
Bedioui Fethi	216	Montañez Frausto María Aurora	72
Blanco Arroyo Nancy Angélica	101	Mora Montes Héctor Manuel	203
Cantador Gámez Andrea	83	Mora Soto Sergio Josafat	106
Carreón Delgado Daniel Fernando	41	Morales Rico Jorge Andrés	29, 66
Caudillo Ortega Lucía	72	Moreno Joel	263
Cea Barcia Glenda	125	Moreno Pulido Ma. Elvira	72, 101
Cervantes Jauregui J.A.	283	Muñoz Carranza Sergio Rodrigo	53
Cervantes Velázquez Lizbeth Karina	189	Murrieta Luna Edilberto	10, 297
Chacón García Luis	269	Nava Barrios Lucia	106
Contreras Vargas Roberto David	66	Navarro Segura Diana Laura	154
Corona Elizarrarás Cristina	47, 216	Niño Vega Gustavo A.	16
Cortés Mendoza Laura Vianey	59	Ortega Ramírez Gloria Guadalupe	72
Cruz Cruz David	290	Ortiz Alvarado Rafael	106
Cruz Jiménez Gustavo	275	Padilla Vaca Luis Felipe	53, 189, 256
Cuéllar Mata Patricia	239	Pantoja Canova Rosa Ivon	131
<i>Eduardo Sánchez Ramíre</i>	118	Páramo Pérez Itzel	189, 256
España Sánchez B. Liliana	256	Patlán Vázquez Adriana Guadalupe	244
Espinoza Vázquez Yulissa M.	178	Pedraza Reyes Mario	83, 144, 150, 184, 244, 250
Feria Reyes Rossy	275	Peralta Hernández Juan Manuel	221
Ferreira Rivera Mario Alfonso	125	Pérez Díaz Perla Judith	196
Flores Villavicencio Lérida Liss	23, 167	Pérez Landeros Miguel Ángel	95
Franco Bárcenas Bernardo	53, 189, 256	Pérez Méndez Martha Lizeth	23

Autor	Página
Picón Núñez Martin	173
Pineda Xoconoxtlea Ana Magdalena	10
Ponce Noyola Patricia	23
Ponce Ortega José María	178
Ponce Rocha Jaime David	131
Quiroz Ramírez Juan José	118
Ramírez Corona Nelly	138
Ramírez Montiel Fátima Berenice	189, 256
Ramírez Ramírez Norma	150, 184
Ramos Ramírez Esthela	275
Rangel Mata Francisco Javier	41
Rangel Pérez Juan Manuel	16
Rangel Serrano Ángeles	189, 256
Razo Soria Tannia	16
Rivera Arredondo Marisa	10
Rodarte de la Fuente Abraham	77
Rodríguez Angeles Mario Alberto	10, 297
Rodríguez Bravo María Fernanda	95
Rodríguez Valdez Gabriela	269
Romero García Ana G.	227
Romero Hernández Michelle	35
Romero Izquierdo Araceli Guadalupe	234
Ruiz Rocha Juan Emanuel	160
Ruiz Camacho Beatriz	196
Salazar García Luis Mauricio	23
Salinas Marín Roberta	203
Sanchez Ramirez Eduardo	227
Segovia Hernández Juan Gabriel	118, 227
Serafín Alma. H.	263
Sophie Griveau	47, 216
Suarez Castro Valeria P.	184
Torres Zúñiga Ixbalank	125
Valenzuela García Luz I.	150
Vallejo Blancas David	118
Vargas Maya Nauru Idalia	53
Vásquez Morales Suria G.	83, 112
Villegas Barrón Angelica Arlet	160
Villegas Gasca J. A.	283
Villegas Gómez Clarisa	290
Villegas Quintero Dania Verónica	41
Wrobel Katarzyna	203
Wrobel Kazimierz	203
Yáñez Barrientos Eunice	35
Zanor Gabriela. A.	263
Zapata Blanca L.	150
Zavala Victor M.	227

UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO



Campus Guanajuato | División de Ciencias
Naturales y Exactas



DCNE Semana de
Innovación,
Emprendimiento
e Investigación