

Tabla de contenido

Análisis del efecto Pasteur en la obtención de bioetanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
Estudios fitoquímicos sobre cultivos celulares de <i>Buddleja cordata Kunth</i>	5
Aislamiento de Bacterias Nativas del Norte de Tamaulipas con Potencial de Degradación de Hidrocarburos	8
Identificación de Bacterias Degradadoras de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos	11
Biocompatible magnetic nanoparticles as intranasal drug delivery carriers for the brain.....	15
Estudios previos de la citotoxicidad del compósito poli-ε-caprolactona/ plata.....	18
Uso de d-l triptófano y semilla de girasol (<i>Helianthus annuus</i>) como sustrato para la producción de pigmentos indólicos por <i>Candida glabrata</i> con aplicaciones biotecnológicas	21
Evaluación del efecto de algunos compuestos volátiles sobre la síntesis de celulosa bacteriana por <i>Gluconobacter xylinum</i> ..	25
Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i> de <i>Moringa oleifera</i> : desarrollando avances biotecnológicos sobre la producción de compuestos hipoglucemiantes.	28
Cambios Estructurales y de Composición Temporales de la Biopelícula Generados Durante la Biooxidación de Arsenopirita por <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	31

Sociedad Química de México, A.C.
"La química nos une"

Trabajos estudiantiles

Análisis del efecto Pasteur en la obtención de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae*

Análisis del efecto Pasteur en la obtención de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae*.

Rodrigo Emmanuel Saucedo González¹, Susana Valdes Salazar¹, Ana Gabriela Rojas Labrada¹, Daniel Anzaldo Anzaldo¹, Jesús Soto Bartolo², **Luz Mariana Pérez Montoya¹**.

¹ Universidad Mexiquense del Bicentenario, Unidad de Estudios Superiores de Tultitlán.

² Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN.

luz.perez@umb.mx

Resumen

Actualmente se buscan nuevas fuentes de obtención de bioetanol. Por lo que el desarrollo del presente trabajo se basa en evaluar uno de los efectos metabólicos más importantes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de etanol, conocido como “efecto Pasteur”. Se llevaron a cabo experimentos operados en lote bajo dos condiciones ambientales diferentes: condiciones aerobias y anaerobias y como sustrato se utilizaron tres residuos agroindustriales: piña, mandarina y banana.

Palabras clave: bioetanol, *Saccharomyces cerevisiae*, efecto Pasteur, aerobio, anaerobio

Introducción

Actualmente, el tema de los biocombustibles, en especial el bioetanol, está adquiriendo cada vez mayor relevancia en el mundo, y consecuentemente en México, como una opción que podría favorecer el sector energético e incluso, en muchos casos, tener implicaciones ambientales favorables.

El bioetanol es un producto químico obtenido a partir de la fermentación de los azúcares que se encuentran en diferentes productos vegetales. Existen una gran cantidad de microorganismos productores de etanol, de los cuales *S. cerevisiae* es la especie de levadura más utilizada para la obtención de etanol a nivel industrial debido a que es un microorganismo con características de fácil mantenimiento, manipulación y recuperación ^[1]. Dentro del metabolismo de este microorganismo se ha encontrado que en condiciones aerobias aumenta la biomasa y se produce poco alcohol, pero en anaerobiosis el crecimiento celular es lento y la producción de etanol es alta (**Figura 1**). Esta situación fue observada por Pasteur en 1861, y se denomina efecto Pasteur ^[2].

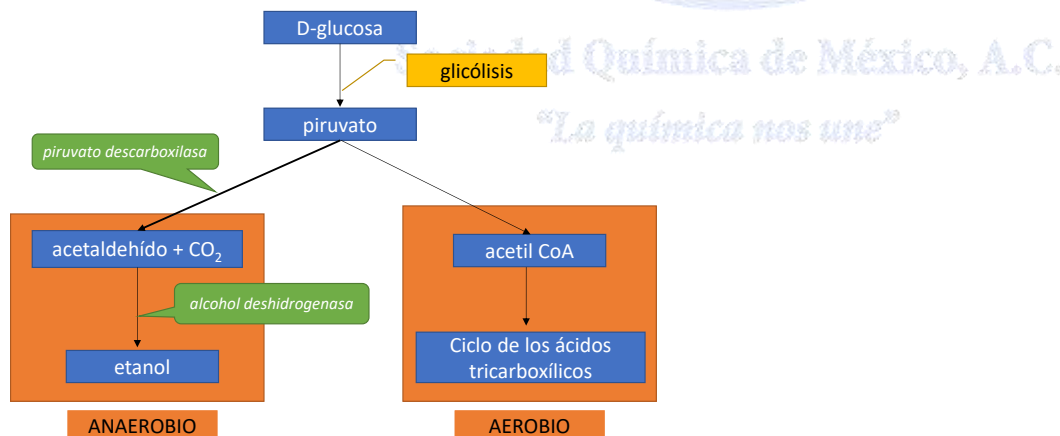


Figura 1. Rutas metabólicas anaerobias y aerobias del catabolismo de azúcar en levaduras.

La importancia actual de tomar en cuenta lo descubierto por Pasteur, permite un mejor aprovechamiento de los sustratos orgánicos. Según datos reportados por el INEGI en el 2012, la cantidad promedio diaria de residuos orgánicos enviados a tratamiento es de 2, 748,727 kg ^[3], esta cifra es un área de oportunidad para el aprovechamiento de estos residuos sobretodo en el sector energético, para la producción de etanol.

Conjuntando el beneficio energético y el aprovechamiento de los desechos orgánicos en México, uno de los países más poblados del planeta y por consiguiente un generador potencial de residuos, se pueden lograr mejores rendimientos en la producción de biocombustibles de 2ª generación.

Metodología

Las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad total. Se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La preparación del inóculo se realizó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 250 mL de medio de cultivo YM (10 g/L glucosa, 3 g/L extracto de malta, 5 g/L de peptona de caseína y 3 g/L de extracto de levadura), a temperatura constante de 30 °C y con una velocidad de agitación de 150 rpm durante 24 h ^[4].

Después de las 24 h el medio en fase de crecimiento exponencial fue inoculado a una concentración del 10% v/v en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de operación de 200 mL de medio de cultivo YM para la cinética control y 200 mL de jugo de los siguientes residuos agroindustriales: piña, mandarina y banana. Las condiciones de operación para cada fermentación fueron: 1) fermentación aerobia (aireación, °T de 30 ± 2 °C, pH de 5, 150 rpm), 2) fermentación anaerobia (ausencia de aire, °T de 30 ± 2 °C, pH de 5, 150 rpm). Se tomaron muestras a diferentes tiempos durante 48 h y en cada muestra se determinó la cantidad de biomasa por el método de peso seco, sustrato por la técnica de Miller y etanol por refractometría y destilación; en donde se tomó el P_{EtOH} de 78.4°C. Los experimentos se realizaron por triplicado para determinar desviación estándar y ANOVA.

Resultados

De acuerdo a los resultados obtenidos, a condiciones anaerobias con medio YM, se alcanzó una producción máxima de etanol de 4.9 g/L y a condiciones aerobias en medio YM, se alcanzó una producción máxima de etanol de 2.5 g/L.

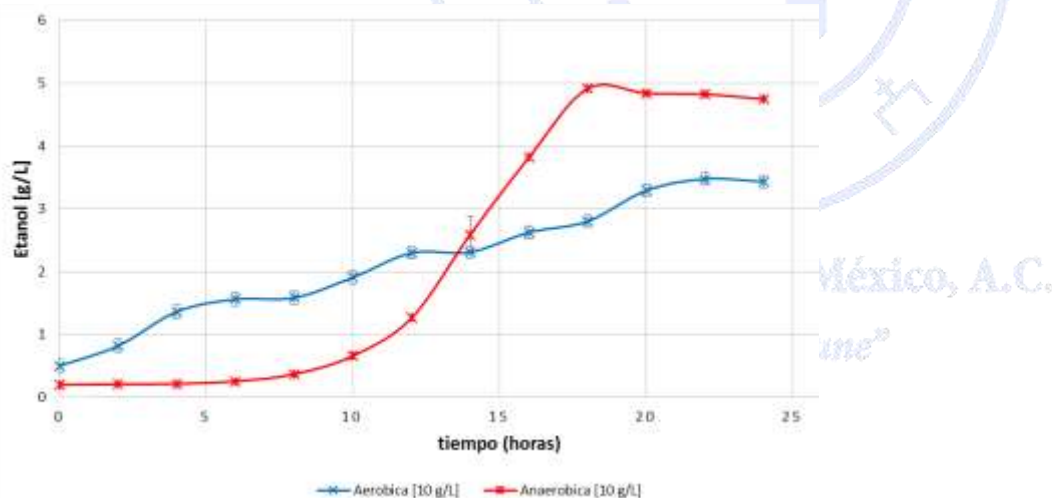


Figura 2. Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* en medio YM en condiciones aerobias y anaerobias

Con el residuo agroindustrial de piña, a condiciones aerobias se tuvo una producción máxima de etanol de 12.9 g/L y a condiciones anaerobias de 15.4 g/L. Por otra parte, con el residuo agroindustrial de mandarina, a condiciones aerobias se tuvo una producción máxima de etanol de 17.3 g/L y a condiciones anaerobias de 19.3 g/L. Finalmente, con el residuo agroindustrial de banana, a condiciones aerobias se tuvo una producción máxima de etanol de 7.6 g/L y a condiciones anaerobias de 11.4 g/L.

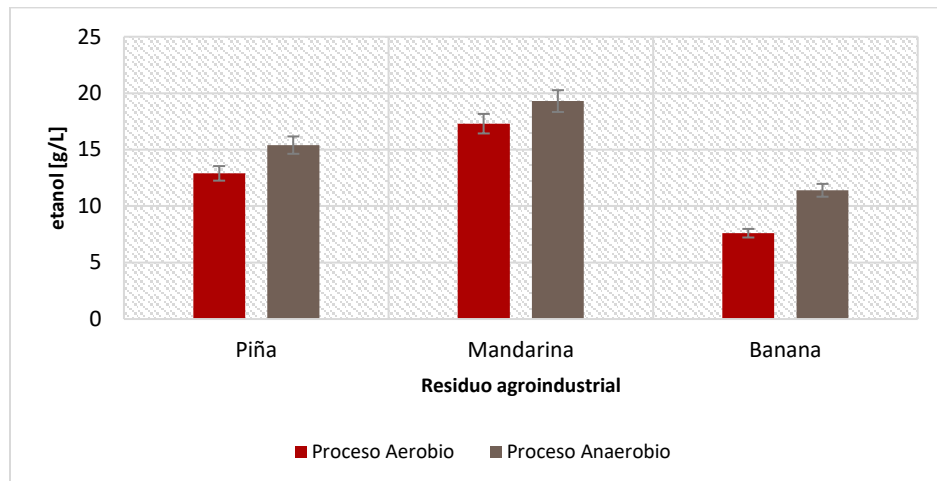


Figura 3. Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* en residuos agroindustriales de piña, mandarina y banana en condiciones aerobias y anaerobias.

Conclusiones

Con base a los resultados obtenidos, se observa que a condiciones anaerobias la producción de etanol es mayor que a condiciones aerobias, situación que se observa en los tres residuos agroindustriales analizados. Con ello, se confirma lo que Pasteur analizó ya hace tiempo, existe una producción máxima de etanol cuando *S. cerevisiae* se encuentra en condiciones anaerobias. Además, con el residuo agroindustrial de mandarina se muestra una mayor producción comparado con los otros residuos.

El estudio del metabolismo celular de *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo, enfocado en el campo de Bioprocesos, ha tenido gran importancia para la producción de ciertos metabolitos de interés, particularmente del etanol, el cual puede tener varias aplicaciones industriales dentro de las cuales se prevé que destinarlo al sector de combustibles puede ser una alternativa viable debido a la problemática ambiental, económica y social que se ha desarrollado con el uso de los hidrocarburos.

Referencias

1. Barnett JA, Entian KD, "A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism", *Yeast*, Vol. 22, No. 11, p. 835-894, 2005.
2. Pasteur Louis, "Influencia del oxígeno en el desarrollo de fermentación alcohólica", *Bulletin de la Société de Paris*, p. 79-80, 1861.
3. INEGI, 2012. Residuos Orgánicos, tomado de www.inegi.com
4. Alma Rosa Domínguez-Bocanegra, Jorge Antonio Torres-Muñoz, Ricardo Aguilar López, "Production of Bioethanol from agro-industrial wastes", *Fuel*, Vol. 149, p. 85-89, 2015.
5. Miller Gail Lorenz. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Analytical Chemistry*.

Estudios fitoquímicos sobre cultivos celulares de *Buddleja cordata* Kunth

Carol Cristina Cejudo-González¹, Edwin A Giles-Mazón¹, Guadalupe García-Díaz¹, Valente Ordoñez-Colín², María Elena Estrada-Zúñiga³

¹Facultad de Ciencias; ²Centro de Investigación y Estudios en Salud Animal; ³Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, Piedras Blancas Carretera Toluca-Ixtlahuaca Kilómetro 15.5 C.P. 50200 Toluca Estado de México, México.
lena21382@yahoo.com.mx

Resumen

Buddleja cordata es una planta distribuida en México a la que se le atribuyen propiedades antisépticas, analgésicas, entre otras, dichas propiedades se deben a la presencia de metabolitos secundarios (MS). La producción de los MS puede ser controlada en cultivos celulares (CC); en *B. cordata* dichos CC produjeron MS tipo fenilpropanoide. El objetivo de este trabajo fue obtener extractos de CC de la especie, identificar la presencia de MS y compararlos con los de hoja. En extractos de CC se observaron alcaloides, lactonas sesquiterpénicas y flavonoides dependiendo del tipo de solvente empleado. En las hojas se observaron los mismos MS que en CC, indicando su posible potencial como fuente de MS bioactivos de la especie; las hojas son el material utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos.

Introducción

El presente trabajo se realizó con la finalidad de rastrear la presencia de metabolitos secundarios en cultivos celulares de *Buddleja cordata* y compararlos con hojas, para estimar el potencial de los cultivos celulares para producir metabolitos secundario presentes en hojas.

Exposición

Buddleja cordata, especie ampliamente distribuida en México, es una planta a la que se le atribuyen propiedades cicatrizantes, antifúngicas, eupépticas, diuréticas, analgésicas, antisépticas y efectos sedantes; estas últimas debido a su efecto antibacteriano¹. Dichas propiedades se deben a la presencia de metabolitos secundarios (MS), componentes del metabolismo vegetal que tienen un papel muy importante en la interacción planta-entorno, ya que sus funciones garantizan la supervivencia de las especies vegetales. Los MS se agrupan en cuatro clases principales: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides² y su producción en la planta es menor al 1%; es por dicha razón que el cultivo de células y tejidos vegetales constituye una importante alternativa en la producción de MS, ya que las técnicas de cultivo *in vitro* permiten crecer de manera aséptica células, tejidos y órganos bajo un control de las condiciones físico-químicas, haciendo posible la manipulación sobre la producción de los mismos³.

En *B. cordata* se ha observado la presencia de diferentes MS, como flavonas. Una de ellas es la linarina, que posee actividad antiinflamatoria, analgésica, antipirética y también demostró una inhibición significativa a dolores producidos por estímulos térmicos⁴. Otras flavonas presentes en dicha especie son la luteolina y la quercetina, que actúan como potentes inhibidores de la liberación de histamina. Otros MS son el iridoide aucubina⁵ registrado con efectos diuréticos y como estimulante para la secreción de ácidos, el fenilpropanoide verbascósido que actúa como antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus*⁶. Los cultivos *in vitro* de *B. cordata* han demostrado ser capaces de producir MS tipo fenólicos; en cultivos celulares en suspensión el verbascósido fue producido como compuesto mayoritario, siendo su concentración significativamente superior a la determinada en explantes de la planta completa⁷. Sin embargo, están faltando estudios fitoquímicos sobre la producción de otros MS por los cultivos celulares de *B. cordata*.

Materiales y Método

La biomasa de cultivos celulares de *B. cordata* (CC) fue donada por el laboratorio de Cultivo *in vitro* y Fitoquímica del CIRB-UAEMéx. Hojas apicales (jóvenes = HJ) y maduras (=HM) de una planta madura de la especie fueron recolectadas en abril del 2016 en el Campus El Cerrillo; las hojas fueron deshidratadas. Las hojas y las células obtenidas fueron maceradas y el material obtenido fue utilizado para preparar extractos. El material vegetal fue inmerso de manera secuencial en diferentes solventes (cloroformo, acetato de etilo, etanol y metanol) (1g/100ml). Se obtuvieron tres extractos por cada uno de los

solventes para cada tipo de material vegetal (Tabla 1), resultando un total de 36 extractos. Posteriormente cada extracto fue concentrado en rotavapor (30ml) y sujeto a un rastreo cualitativo de MS⁸.

Discusión y resultados

Mediante el rastreo de metabolitos secundarios se observó que los extractos de cultivos celulares (CC) de *B. cordata* presentaron alcaloides (AK), lactonas sesquiterpénicas (LS) y flavonoides (FLA); esta respuesta fue dependiente del tipo de solvente empleado. Los AK se presentaron en extractos de cloroformo y acetato de etilo; las LS en todos los extractos excepto cloroformo; los FLA se observaron en acetato de etilo y metanol (Tabla 1). Los extractos positivos a flavonoides podrían contener linarina, luteolina y/o quercetina de acuerdo a la literatura consultada sobre la especie. No se tiene registro de la presencia de LS en la especie, por lo que se deben realizar pruebas que corroboren su presencia en los extractos obtenidos. Tampoco ha sido reportada la presencia de alcaloides en la especie, podría ser que las pruebas hayan presentado un falso positivo debido a la presencia de iridoides; Con frecuencia las pruebas para alcaloides en especies de *Buddleja* provocan un falso positivo debido a los iridoides⁹.

Se observó que la producción de MS en extractos de de hojas de *B. cordata* (HJ y HM) también estuvo en función del solvente con el que fueron preparados y además dependió del tipo de hoja. En las HJ se observaron AK, LS y FLA mientras que en HM fueron LS y FLA. Al comparar los extractos HJ y HM con los de CC, se observó una mayor similitud con aquellos de HJ (Tabla 1). Los extractos de CC al presentar similitud en el rastreo de MS respecto a los de las hojas, podrían indicar el potencial de los CC como fuente de MS bioactivos, ya que las hojas son el material utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de diversos padecimientos^{1,5}.

Tabla 1. Relación de extractos obtenidos de cultivos celulares y hojas de *Buddleja cordata* y resultados del rastreo de sus metabolitos secundarios.

Material vegetal	Extracto en función al solvente	Tipo de metabolito secundario			
		Alcaloides	Terpenos		Fenólicos
			Saponinas	Lactonas sesquiterpénicas	Flavonoides
CC	Cloroformo	+	-	-	-
HJ		+	-	-	-
HM		-	-	-	-
CC	Acetato de Etilo	+	-	+	+
HJ		-	-	-	+
HM		-	-	-	+
CC	Etanol	-	-	+	-
HJ		-	-	+	+
HM		-	-	-	+
CC	Metanol	-	-	+	+
HJ		-	-	+	+
HM		-	-	+	+

Los resultados mostrados representan la media de tres repeticiones efectuadas para cada extracto. CC= cultivo celulares; HJ = hojas jóvenes; HM = hojas maduras

Conclusiones

Los cultivos celulares de *B. cordata*, acorde al rastreo fitoquímico, producen alcaloides, lactonas sesquiterpénicas y flavonoides, los cuales también fueron detectados en hojas, indicando su posible potencial como fuente de metabolitos secundarios bioactivos de la especie. Otros análisis fitoquímicos deben realizarse para cotejar e identificar los metabolitos secundarios encontrados en el presente trabajo.

Bibliografía

- 1 Ortiz, Z. (1996) **Actividad antibacteriana de la raíz de *Buddleia cordata***. Tesis licenciatura, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
- 2 Ávalos García, A.; Pérez Urria E. (2009) Metabolismo secundario de plantas. **Reduca**, 2, p. 119-145.
- 3 Georgiev, M. I.; Weber J.; Maciuk, A. (2009) Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. **Applied Microbiology Biotechnology**, 83, p. 809-823.
- 4 Martínez Vázquez, M.; Ramírez Apan, T. O.; Lastra, A. L.; Bye, R. (1998) A comparative study of the analgesic and anti-inflammatory activities of pectolinarin isolated from *Cirsium subcoriaceum* and linarin isolated from *Buddleia cordata*. **Planta Médica**, 64(2), p. 134-137.
- 5 Houghton, P. J.; Mensah, A. Y. (1999) Biologically active compounds from *Buddleia* species. **Phytochemicals in Human Health Protection, Nutrition, and Plant Defense**, 33(13), p. 344-366.
- 6 Avila, J. G.; De Liverant, G. J.; Martínez, A.; Martínez, G.; Muñoz, J. L.; Arciniegas, A.; Romo de Vivar, A. (1999) Mode of action of *Buddleia cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, 66(1), p. 75-78.
- 7 Estrada Zúñiga, M. E.; Cruz Sosa, F.; Verde Calvo, R.; Rodríguez Monroy, M.; Vernon Carter, E.J. (2009) Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleia cordata* Kunth. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, 97, p. 39-47.
- 8 Hinojosa, D. J.; Gutiérrez L. M.; Siller, L. F.; Rodríguez, S. A.; Morales del Río, J. A.; Guerrero, M. P.; Del Toro, S. C. (2013) Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. **Biotechnia**, 15(2), p. 53-60.
- 9 Jensen Rosendal, S. (2000) Chemistry of Buddlejaceae. **Flora Neotropica**, 81. P. 42-61.

Sociedad Química de México, A.C.
"La química nos une"

Aislamiento de Bacterias Nativas del Norte de Tamaulipas con Potencial de Degradación de Hidrocarburos

Lorena Alejandra Reyes Camberos, Alma Delia Paz González, Samanta Elizabeth Álvarez Cruz, Gilberto Pinto Liñán, Valeria González Muñoz, **Gildardo Rivera Sánchez***

Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Blvd. Del Maestro s/n Esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, 88700, Reynosa, México.

*gildardos@hotmail.com

Resumen

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos representan una de las principales fuentes de contaminación en suelos y aguas. La técnica más amigable para su remoción del medio ambiente se basa en el uso de microorganismos con capacidad de degradación de estos contaminantes. En este proyecto se llevó a cabo el aislamiento e identificación de bacterias nativas de la Ciudad de Reynosa, Tamaulipas de suelos contaminados con hidrocarburos con el objetivo de evaluar su capacidad de degradación de uno de los principales contaminantes (naftaleno). Los resultados muestran que 4 bacterias tienen la capacidad de producir un porcentaje de emulsión estable después de 48 horas (P3-2; 39.02%, S5-3; 26.76%, P4-1; 40%, P5-2; 43.07%), así como de crecer a concentraciones del 5% de naftaleno.

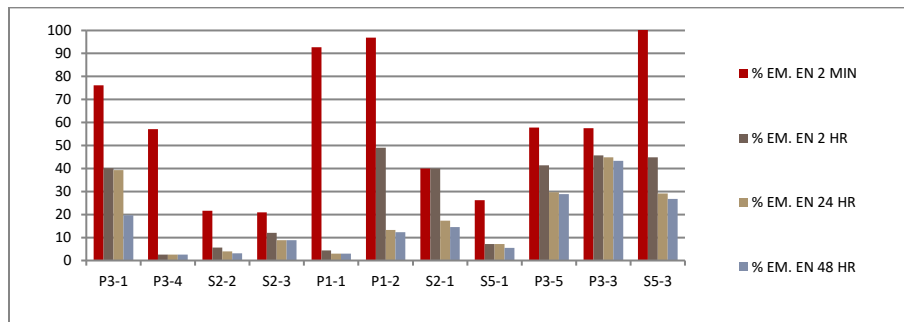
Extenso

Introducción

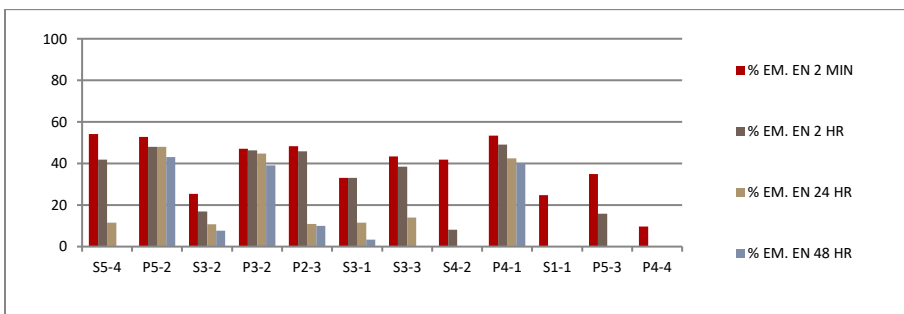
Un problema en el medio ambiente es el efecto que produce la contaminación por hidrocarburos generados por distintas actividades del ser humano. Los hidrocarburos son compuestos orgánicos insolubles formados por átomos de carbono e hidrogeno, están compuestos por dos o más anillos de benceno. Una de las técnicas prometedoras para la remoción de los hidrocarburos es la biorremediación que sirve para dar tratamiento a zonas contaminadas, es rentable y realiza una mineralización completa de los contaminantes presentes. En este sentido, Toledo y colaboradores seleccionaron quince cepas aisladas (*Bacillus* sp, *Bacillus pumilus* y *Bacillus subtilis*) de muestras de aceites sólidos por su capacidad de crecimiento en presencia de hidrocarburos. El crecimiento de las cepas en medios líquidos minerales modificados con naftaleno, fenantreno, fluoranteno o pireno como única fuente de carbono mostró que toleran y eliminan diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos. Adicionalmente, en Colombia Narváez-Flórez y colaboradores realizaron 31 aislamientos bacterianos en medio mínimo salino (MMS) suplementado con hidrocarburos como única fuente de carbono. Las cepas aisladas fueron sometidas a pruebas como la de selección horizontal a diferentes concentraciones de hidrocarburos y la determinación de la concentración mínima inhibitoria, seleccionando 11 de ellas tolerantes a los hidrocarburos. Posteriormente, con las cepas seleccionadas, se conformó un cultivo bacteriano mixto y se evaluó su capacidad degradadora de hidrocarburos en un periodo de 21 días. El cultivo mixto degradó el 68.6 % de los hidrocarburos alifáticos con preferencia de los n-alcenos de cadena larga, alcanzando un crecimiento máximo de 3.13×10^9 UFC/mL. Con base en lo anterior el objetivo de este trabajo fue aislar e identificar bacterias nativas del norte de Tamaulipas con potencial de degradación de hidrocarburos.

Discusión de resultados

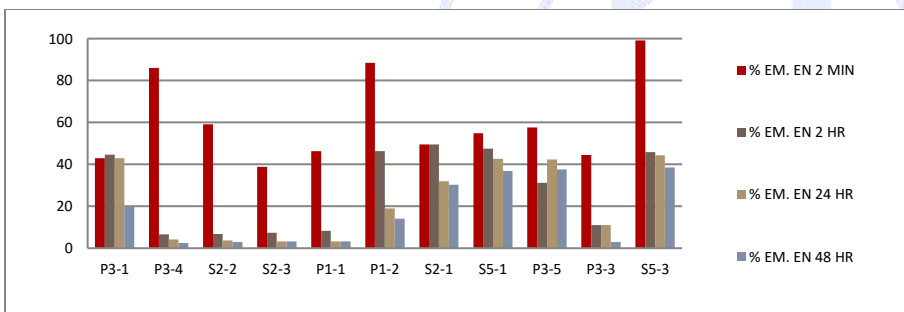
En este trabajo se llevó a cabo el aislamiento e identificación de bacterias nativas del Norte de Tamaulipas, en particular de suelos contaminados por hidrocarburos del lugar denominado Laguna “La Escondida”, en la Ciudad de Reynosa, Tamaulipas. 23 bacterias fueron aisladas e identificadas, de las cuales 16 corresponden a bacterias Gram-negativas y 7 a bacterias Gram-positivas, pertenecientes principalmente a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, entre otros. Otra prueba realizada fue la de catalasa, la cual fue positiva en 8 bacterias. En la selección de las 4 bacterias con mayor capacidad de degradación, se notó que las denominadas S5-3, P5-2 Y P4-1 resultaron ser negativas a la prueba y solamente la denominada P3-2 resultó positiva. Las bacterias fueron sometidas a una prueba denominada como determinación del porcentaje de emulsión, a cuatro tiempos bajo dos condiciones: con células y libre de células. Los resultados del porcentaje de emulsión por todas y cada una de las bacterias se muestran en las gráficas 1, 2, 3 y 4.



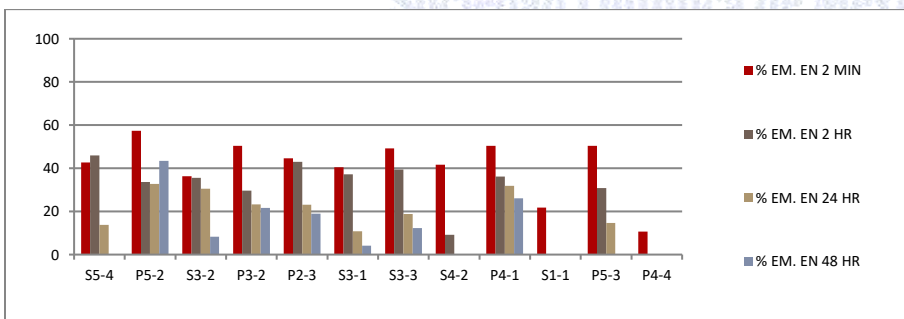
Grafica 1. Porcentaje de emulsión producido por las bacterias.



Grafica 2. Porcentaje de emulsión producido por las bacterias.



Grafica 3. Porcentaje de emulsión producido libre de bacterias.



Grafica 4. Porcentaje de emulsión producido libre de bacterias.

La emulsión presentada se evaluó en diferentes tiempos debido a que inicialmente una emulsión se puede formar por factores físicos y químicos, por lo cual a un tiempo de 2 minutos la emulsión formada se debe principalmente a la fuerza mecánica

ejercida, sin embargo, una emulsión derivada de la producción de surfactantes intracelulares o extracelulares por las bacterias se mantendrá estable durante más tiempo en proporción a la cantidad y tipo de surfactante generado.

En la graficas anteriores se observa que en el tiempo de medición de 2 minutos y 2 horas algunas bacterias presentan un alto porcentaje de emulsión, pero al llegar a las 24 o 48 horas existe una notable disminución de la emulsión. Finalmente, 4 cepas presentaron un mayor porcentaje de emulsión a las 48 horas, lo cual nos indica la potencial presencia de un surfactante producido por la bacteria. Cabe mencionar que el porcentaje de emulsión determinado en las bacterias nativas del noreste de Tamaulipas se puede considerar dentro del valor medio informado por otros autores, por ejemplo Narváez-Flores y colaboradores informaron de especies del genero *Klebsiella*, *Psuedomona* y *Bacillus* con un porcentaje de emulsión del 68%, Panjiar y colaboradores, encontraron cepas con un porcentaje de emulsión del 0 al 50%, destacando bacterias del genero *Lysinibacillus* y *Bacillus* con un porcentaje del 60-80% y Toledo y colaboradores informan de distintos porcentajes de emulsión de acuerdo a los tiempos evaluados, siendo el valor menor con respecto al tiempo.

Materiales y Métodos

Muestras: Las muestras de suelos contaminados fueron tomadas de la laguna "La Escondida", sitio reconocido como vertedero de residuos de refinería "PEMEX" en Reynosa, México. En el lugar (26.047692, -98.270419) se tomaron dos muestras (1 Kg): 10 cm (muestra de la superficie "S") y a 20 cm (muestra profunda "P"). Las muestras de suelo se secaron en un horno de tiro en un intervalo de 35 a 40 °C durante 3 a 5 días. **Aislamiento:** Se añadieron muestras de suelo (1 g) en 100 mL de medio salino mínimo (HSH) (NaCl 24 g; KCl 0,7 g; KH₂PO₄ 2 g, 1 g MgSO₄·7H₂O; Na₂HPO₄ 3 g; 0,2 g CaCl₂·2H₂O; pH 7,0, 1 l de agua destilada estéril), pH 7,0 se ajustó usando NaOH, en un matraz de Erlenmeyer 250 mL. Los matraces se incubaron a 30 °C y 37 °C a 200 rpm durante 72 h. posteriormente, las diluciones en serie se realizaron a 1:1000 y 100 se inocularon mediante dispersión y se incubaron de nuevo a 30 °C y 37 °C durante 48 h. Las colonias obtenidas se recogieron para obtener un cultivo puro en *Pseudomonas* agar, que se caracterizaron macroscópica y microscópicamente. Los aislamientos puros fueron sometidos a la prueba de la catalasa y la tinción de Gram. Todos los aislamientos fueron refrigerados a 4 °C hasta su uso en agar inclinado. **Porcentaje de emulsión:** Se reactivaron las cepas en 5 mL de caldo nutritivo incubándolas a 37°C por 24 h a 120 rpm hasta ajustar a una absorbancia de 1. Después se colocó 1 mL de cultivo celular en un matraz con MMG para su crecimiento y se incubó a 37°C por 24 h a 120 rpm hasta ajustar la absorbancia a 1. Posteriormente se llega a las dos etapas finales donde el cultivo celular y el sobrenadante se ponen en contacto con el hidrocarburo para poder determinar el porcentaje de emulsión a distintos tiempos: 2 minutos, 2 h, 24h y 48h.

Conclusiones

Bacterias nativas de la Ciudad de Reynosa, Tamaulipas, presentan la capacidad de formar una emulsión en contacto con hidrocarburos, lo cual demuestra su potencial capacidad de degradación de dichos contaminantes.

Referencias

1. Panjiar, N., Sachan, S.G. Sachan, A. (2015). Screening of bioemulsifier-producing micro-organism isolated from oil-contaminated sites. *Ann Microbiol.* 65, 753.
2. Das, N., Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 2011941810.
3. Yang, Y., Wang, J., Liao, J., Xie, S., Huang, Y. (2014). Distribution of naphthalene dioxygenase genes in crude oil-contaminated soils. *Microbial Ecology*, 68(4), 785-793.
4. Toledo FL1, Calvo C, Rodelas B, González-López J. (2006) Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Syst Appl Microbiol.* 29(3), 244-52.
5. Narváez-Flórez, S., Gómez M.L., Martínez. M.M. 2008. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano.

Identificación de Bacterias Degradadoras de Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos

Samanta Elizabeth Álvarez Cruz^{1,2}, Alma Delia Paz González¹, Gilberto Pinto Liñán¹, Lorena Alejandra Reyes Camberos², Valeria González Muñoz², Virgilio Bocanegra García¹, Guadalupe Aguilera Arreola³, **Gildardo Rivera Sánchez^{1*}**

¹ Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional.

² Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Rodhe, Universidad Autónoma de Tamaulipas.

³ Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional

*gildardors@hotmail.com

Resumen

Los suelos que rodean la laguna “La Escondida” en Reynosa, Tamaulipas fueron impactados durante muchos años por desechos de la industria petroquímica. A través de la biorremediación, se desea remover los residuos derivados de hidrocarburos, por ser una técnica amigable al medio ambiente. En el presente estudio se llevó a cabo la selección de 32 cepas provenientes de sedimentos de suelo de Reynosa, Tamaulipas para determinar su potencial de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos. La prueba de emulsión indicó que 5 bacterias fueron capaces de formar una emulsión estable a 48 horas (MP 1-1= 12.5%, MS 1-3= 15.83%, MP 3-1= 41.66%, MS 5-1= 13%, y MS 5-2= 21.70%). Finalmente las bacterias fueron identificadas por espectrometría de masas como *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium*.

Extenso

Introducción

Diversos tipos de microorganismos han sido analizados para mejorar procesos de biorremediación en ambientes contaminados por hidrocarburos. Entre los aspectos que caracterizan a las bacterias con potencial de degradación se encuentran la capacidad de producir bio-emulsificadores, debido a que estos pueden emulsionar hidrocarburos aumentando su solubilidad en agua y el desplazamiento de sustancias oleosas de las partículas del suelo. Con este objetivo en el estudio de Panjiar y cols aislaron ochenta y ocho microorganismos de suelos contaminados con aceite para comprobar su potencial bioemulsionante extracelular. El bioemulsificador producido por 12 de los microorganismos seleccionados fue estable, soportando variaciones en temperatura y distintos valores de pH. Los bioemulsionantes prometedores tuvieron un índice de emulsión mayor a 50% a 24 horas, seleccionando las cepas SP1001, SP1002, SP1003, SP1004, SP1014, SP1017, SP1025, SP1035, SP2058, SP2061, SP2065 y SP3092 para la prueba de colapso de gota. En otro estudio realizado por Hajar y cols, se analizaron los géneros *Pseudomonas* sp y *Bacillus* sp y su capacidad de emulsificación en aceite crudo y queroseno. Los resultados del estudio sugirieron que *Pseudomonas* sp tiene una mayor capacidad para producir una emulsión con petróleo y queroseno, produciendo de mejor manera el biosurfactante. Con base en lo anterior en este proyecto se planteó la identificación de bacterias con la capacidad de producir una emulsificación como una característica para determinar su capacidad de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Discusión de resultados

32 cepas recolectadas del suelo de la laguna “La Escondida”, fueron sometidas a pruebas de crecimiento con hidrocarburos policíclicos aromáticos a distintas concentraciones, de las cuales algunas cepas resultaron resistentes a naftaleno a una concentración del 5% (Figura 1).



Figura 1. Crecimiento de bacterias aisladas a una concentración del 5% de naftaleno como única fuente de carbono.

De las cepas aisladas, 11 fueron Gram negativas, y 8 Gram positivas, las cuales en su mayoría corresponden al género de *Pseudomonas*. Además, 11 cepas presentaron la prueba de catalasa positiva. Posteriormente, a todas las cepas se les realizó la prueba de la determinación del índice de emulsión, esta prueba determina si el biosurfactante tiene propiedades emulsionantes o no calculando la relación de la altura de la capa de emulsión estable y la altura total del líquido formado después del vórtex. La prueba se elaboró a cuatro tiempos bajo dos condiciones: con células y libre de células. Los resultados del índice de emulsión se muestran en las figuras 2, 3, 4 y 5.

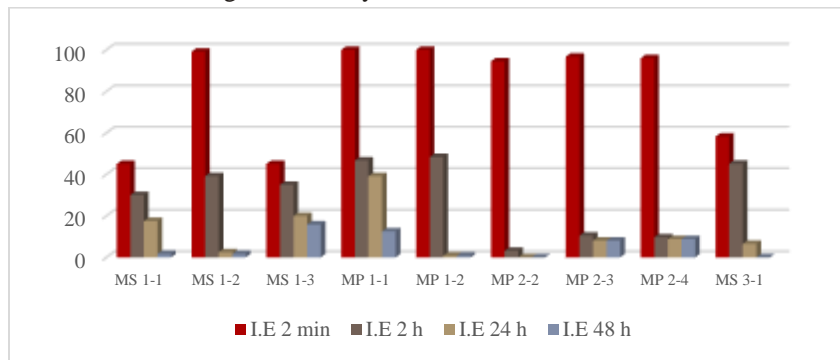


Figura 2. Porcentaje de emulsión producido por las bacterias aisladas con células.

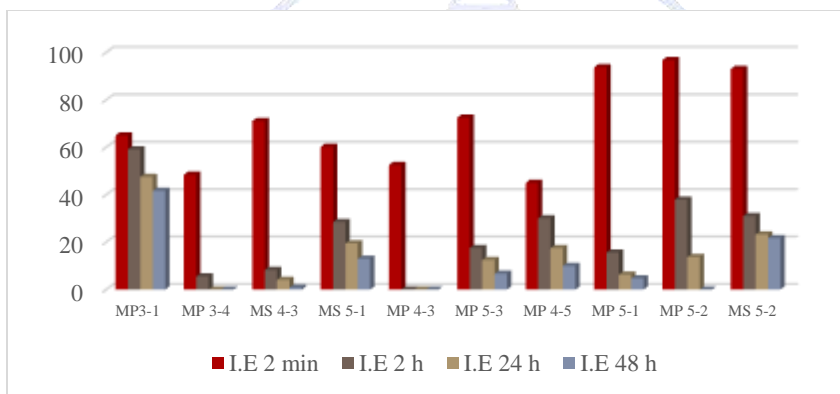


Figura 3. Porcentaje de emulsión producido por las bacterias aisladas con células.

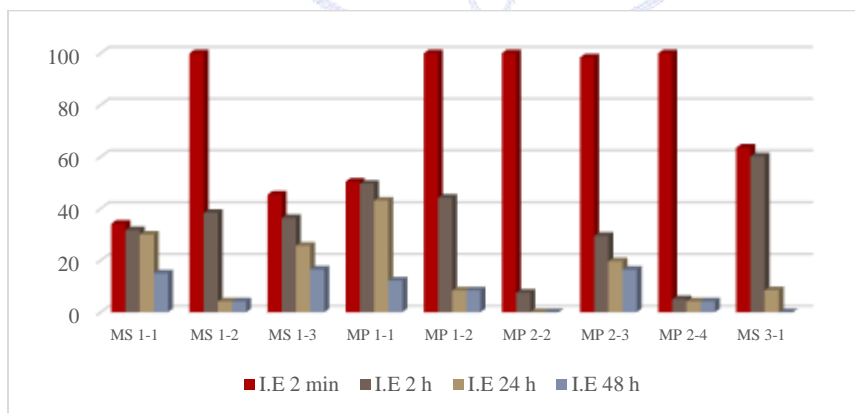


Figura 4. Porcentaje de emulsión producido por las bacterias aisladas libre de células.

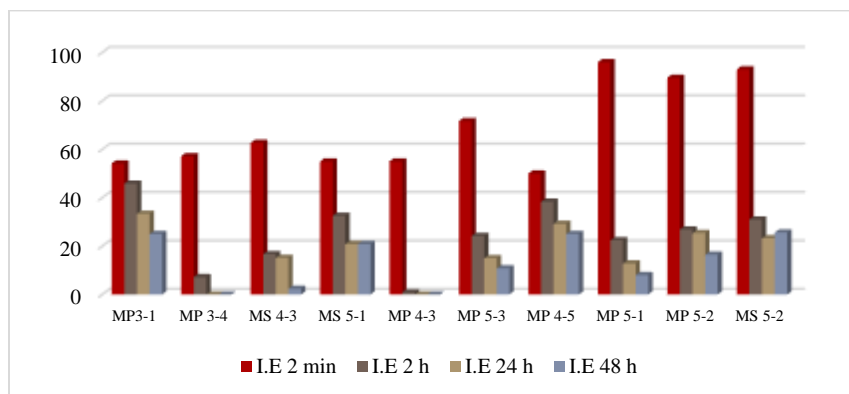


Figura 5. Porcentaje de emulsión producido por las bacterias aisladas libre de células.

En las gráficas se puede observar una mayor emulsificación donde se consideró en la prueba a las bacterias, lo cual indica que el tipo de surfactante principalmente producido es intracelular. Algunas cepas alcanzaron entre 2 min y hasta 24 horas un valor alto de emulsificación (90-100%), sin embargo, estos valores fueron descartados ya que los índices de emulsión a las 48 horas, no fueron estables. Considerando lo anterior se seleccionaron 4 cepas para su identificación por espectrometría de masas (Figura 6), identificando a las bacterias como *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium*.

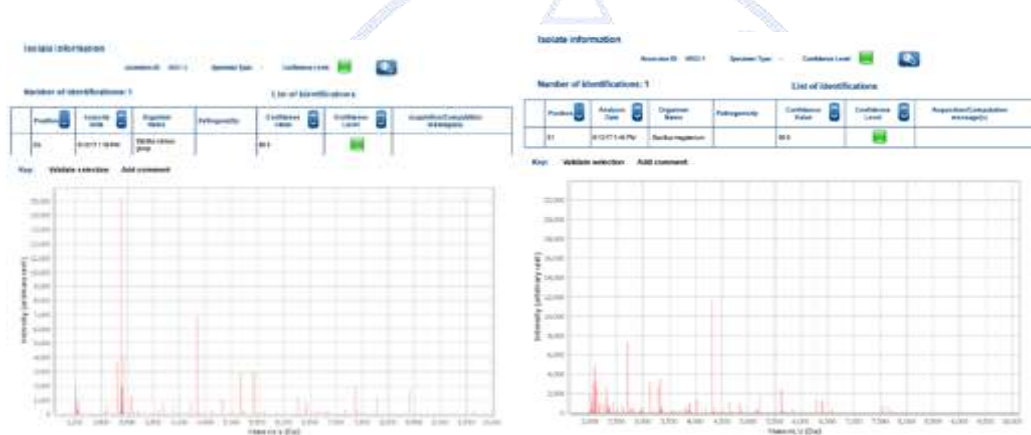


Figura 6. Identificación de las bacterias *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* por espectrometría de masas.

Materiales y Métodos

Las muestras de suelos contaminados fueron recolectadas de la laguna "La Escondida", sitio reconocido como vertedero de residuos de refinería "PEMEX" en Reynosa, México. Ubicación geográfica (26.047692, -98.270419) se recogieron dos muestras (1 Kg): a 10 cm (muestra de la superficie "S") y 20 cm (muestra de profundo "P"). Las muestras de suelo se secaron en un horno de tiro en un intervalo de 35 a 40 °C durante 3 a 5 días. Después, las muestras se molieron y se tamizaron (No. 20, 850 M) y se pesó 1 g para ser procesada más tarde. Se añadieron muestras de suelo (1 g) en 100 mL de medio salino mínimo (MSM) (NaCl 24 g; KCl 0,7 g; KH₂PO₄ 4,2 g; 1 g MgSO₄·7H₂O; Na₂HPO₄ 3 g; 0,2 g CaCl₂·2H₂O; pH 7,0, 1 L de agua destilada estéril), el pH a 7,0 se ajustó usando NaOH. Los matraces se incubaron a 30 °C y 37 °C a 200 rpm durante 72 h. Posteriormente, las diluciones en serie se realizaron a 1: 1000 y 100 l, se incubaron de nuevo a 30 °C y 37 °C durante 48 horas. Las colonias obtenidas se recogieron para obtener un cultivo puro en pseudomonas agar, que se caracterizaron macroscópicamente y microscópicamente. Los aislamientos puros fueron sometidos a la prueba de catalasa y de tinción de Gram. Todos los aislamientos fueron refrigerados a 4 °C hasta su uso en agar inclinado.

El proceso de evaluación de la actividad emulsificante se llevó a cabo con algunas modificaciones que se realizaron al método descrito por Panjiar y cols. Se inoculó cada cepa en 5 mL de caldo nutritivo en tubos falcón con capacidad de 45 mL, se incubaron a 30 °C con agitación a 120 rpm, entre 24 y 48 horas, hasta alcanzar una

absorbancia mayor a 1 a 600 nm. En matraces de 100 mL se adicionó 1 mL del cultivo, 18 mL de MMG, 36 mL de aceite para motor y 36 mL de etanol, realizadas por triplicado. Se llevaron nuevamente a incubación de 24 a 48 horas hasta llegar a una absorbancia de 1. Se realizaron después las pruebas de emulsión en dos etapas llamadas con células y libre de células. La prueba con células (realizada por triplicado) consistía en adicionar en tubos falcón con capacidad de 15 mL, 2 mL de aceite para motor, 2 mL de cultivo celular el cual debía tener absorbancia 1, la cual era controlada por medio de la fórmula $(C1*V1)=(C2*V2)$ utilizando agua miliQ estéril. La prueba libre de células, igualmente fue realizada por triplicado, en tubos falcón de 15 mL depositando 10 mL de cultivo celular y centrifugando a 5000 rpm durante 20 minutos a 25°C, después en tubos de 15 mL se depositaron 2 mL del sobrenadante y se adicionaron 2 mL de aceite para motor. Se realizó una medición del volumen inicial total y después se agitaron durante 5 minutos en vórtex y 1 minuto manualmente, para facilitar la ruptura de la tensión superficial y generar emulsión. Se colocaron en gradillas dejando reposar las muestras y se monitorearon medidas a los 2 min, 2, 24 y 48 horas. Se determinó el índice de emulsión utilizando la fórmula: % I.E = (Altura de emulsión/Altura total de emulsión) *100

Conclusiones

Se identificaron por espectrometría de masas a las bacterias *Bacillus cereus* y *Bacillus megaterium* como cepas capaces de producir un bioemulsificante estable a las 48 horas, lo cual indica su potencial de degradación de hidrocarburos.

Referencias

Echeverri, G.E., Manjarrez, G., Cabrera, M. Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. Nova. 2010; 77-78.

Shahaliyan, F., Safahieh, A. Abyar, H. Evaluation of emulsification index in marine bacteria. Arab J Sci Eng (2015) 40: 1849.

Panjiar, N., Sachan, S.G. Sachan, A. Screening of bioemulsifier producing micro-organisms isolated from oil-contaminated sites. Ann Microbiol (2015) 65: 753.

Sociedad Química de México, A.C.
"La química nos une"

Biocompatible magnetic nanoparticles as intranasal drug delivery carriers for the brain

María Fernanda Veloz-Castillo¹, M en C. Jessica Cordero-Arreola², Dra. Silvia Hidalgo-Tobón³, Dr. Oscar Arias-Carrión², Dr. Miguel Ángel Méndez-Rojas¹

¹ Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de las Américas Puebla, Ex Hacienda Santa Catarina Mártir, San Andrés Cholula, 72820, Puebla, México

² Unidad de Trastornos del Sueño y Movimiento, Hospital General “Dr. Manuel Gea González, 14080, Ciudad de México, México.

³ Hospital Infantil de México “Dr. Federico Gómez” y Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Ciudad de México, México.

maria.velozco@udlap.mx

Resumen

Magnetic nanoparticles (MNPs) have been explored for their potential uses in biomedicine. We have evaluated the use of nearly monodispersed, water soluble and stable Fe₃O₄ MNPs (~30 nm) modified with a biocompatible coating as drug delivery agents to the brain. The nanocarriers were characterized by FTIR and Raman spectroscopy, SEM and TEM electron microscopies; drug loading and release was monitored during 48 hours using UV-Vis spectroscopy. The MNPs were administered via intranasal to male Wistar rats with a brain injury and the biological response and brain biodistribution was evaluated. The presence of MNPs was confirmed by histopathological analysis, and verified by MRI tracking. Results suggest that this system may be an interesting, non-invasive method for drug transport into the brain for the treatment of several neurodegenerative disorders.

Extenso

Introduction

Nanotechnology is currently being used in almost all aspects of the investigation of neurodevelopmental, neurodegenerative, and neuropsychiatric disorders, to find effective genetic, pharmacological, or neurophysiological tools that can modify and correct aberrant neural functions and for the treatment of these disorders. Additionally, nanotechnology offers non-invasive imaging tools that aid in early diagnosis and the assessment of therapeutic efficacy. Magnetic nanoparticles, in particular of magnetite (Fe₃O₄), have been explored for their potential use as drug delivery systems, contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI) and hyperthermal therapy.^{1, 2}

Purpose & Hypothesis

In this work, the usefulness of intranasal administration of magnetic nanoparticles, as drug delivery carriers, to the brain, is intended to be evaluated. The analysis of the obtained results will be important to understand the pathway of biodistribution of the particles in the brain, using Magnetic Resonance Imaging (MRI) to track them *in vivo* and histopathological analysis for *post mortem* studies.

Materials

Magnetic nanoparticles with average sizes around 20 nm were prepared by the co-precipitation method. Coating with a biocompatible polysaccharide (carboxymethylcellulose, CMC) was used as a strategy to increase biodistribution and lower potential toxicity. After loading the nano-systems with dopamine, studies of *in vivo* biological effects on a murine model were performed and the biodistribution monitored using MRI. After that, *post mortem* analysis of the animals' olfactory bulb and brain was performed in order to determine the presence of morphological anomalies as well as presence of nanoparticles in the tissues. Histological analysis was carried out using Perl's Prussian blue staining.

Methods

The magnetic nanoparticles were synthesized via co-precipitation method and covered with a biocompatible polysaccharide, obtaining particles of approximately 30nm. Characterization was made using FTIR and Raman spectroscopy, and SEM and TEM microscopies. The drug used was dopamine and the loading and release of it was followed during periods up to 48 hours in a closed vessel.

The dopamine loaded nanoparticles were administered via intranasal to a set of 16 Wistar rats each 12 hrs during 7 days. The doses were 10 μ L, 20 μ L, and 40 μ L in a 50% concentration. This was a preliminary test where the biological response at different concentrations as well as nanoparticle biodistribution in the brain was intended to be evaluated. A Parkinson Disease rat model is being carried out to prove the effectiveness of the particles as drug carrier.

The particles were followed in vivo via Magnetic Resonance Imaging. Seven days after the last administration the rats were sacrificed and brains and olfactory bulb was obtained for histopathological analysis. In this analysis, the Perls' Prussian blue staining was performed to detect exogenous Fe (III).

Results and Discussion

The bulk samples look different at plain sight with the polysaccharide coating as showed in figure 1. The particles were characterized with SEM (figure 2) and TEM (figure 3) microscopies, which allowed the determination of its morphology, showing spherical particles with diameters of approximately 14.05nm.

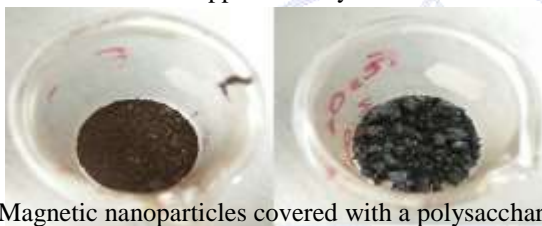


Figure 1. Magnetic nanoparticles covered with a polysaccharide vs magnetic nanoparticles

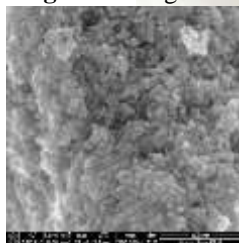


Figure 2. SEM micrograph of

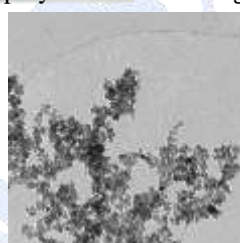


Figure 3. TEM micrograph of

Using FTIR spectroscopy (figure 4) the particles' coating with the polysaccharide was confirmed. The XRD analysis (figure 5) exhibited the crystallographic planes characteristic to the mineral phase of the magnetite, in its cubic lattice. The characterization by DLS exhibits a hydrodynamic radius of approximately 30 nm (figure 6).

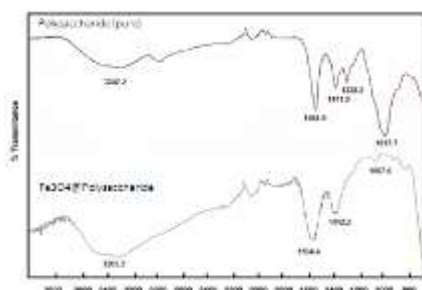


Figure 4. FTIR Spectroscopy

"La química nos une"

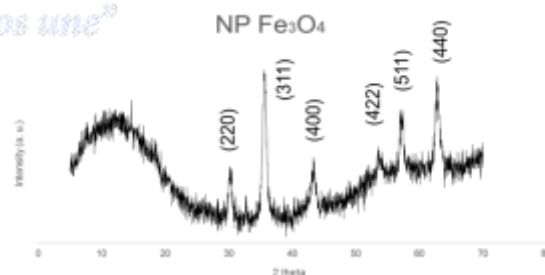


Figure 5. Powder XRD diffractogram clearly

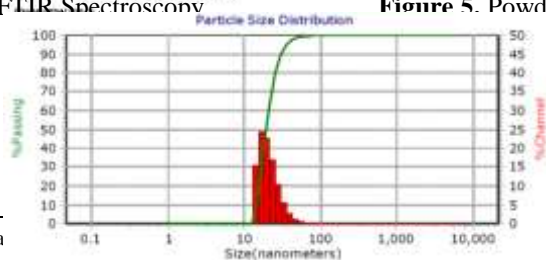


Figure 6. Characterization by DLS showing nanoparticles with a hydrodynamic radius of approximately 30nm.

An MRI tracking was performed and it showed different contrast zones, indicating the presence of nanoparticles in the brain (figure 7). The histopathological analysis, performed by the Perls' Prussian blue staining to detect Fe (III), confirmed the hypothesis that the magnetic nanoparticles coated with a polysaccharide are able to cross the blood brain barrier and be distributed in the brain; the particles were mostly found in the choroid plexus (figure 8).



Figure 8. Histopathology of the rat brain showing

Resonance Imaging of Drug loading (figure 9) and release (figure 10) (dopamine) was followed in a closed vessel until a pseudo-equilibrium was reached during periods up to 48 hours using a UV-Visible spectrophotometer.



Figure 9. Loading profile of dopamine

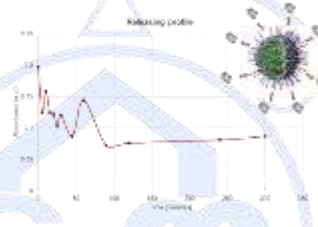


Figure 10. Releasing profile of dopamine

Conclusions

The nanoparticles prepared under the conditions established in this work, having a hydrodynamic radio of ~30nm showed, show good biodistribution in the brain and no negative toxic effect. The results demonstrate that the designed nanoparticulated system may become an interesting and non-invasive method to introduce small molecules with therapeutic activity into the brain and therefore become a potential treatment of several neurodegenerative disorders such as Parkinson or Alzheimer diseases.

References

1. Veloz-Castillo, MF; West, R.; Cordero-Arreola, J.; Arias-Carrión, O.; Méndez-Rojas, MA. (2016). Nanomaterials for Neurology: State-of-the-Art. *CNS & Neurol. Dis.* 93, 1306-1324.
2. F. Arteaga-Cardona, E. S. Urquiza, et.al. (2016). Enhanced magnetic properties and MRI performance of bi-magnetic core-shell nanoparticles. *RSC Advances*, 6, 77558-77568.

Estudios previos de la citotoxicidad del compuesto poli-ε-caprolactona/ plata.

Marlon Joel Montelongo Corral, Q.F.B. Cristian Alfonso González Torres y Dr. Simón Yobanny Reyes López

Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

al133914@alumnos.uacj.mx

Resumen

En este estudio se realizó la fabricación de nanofibras de poli-ε-caprolactona con nanopartículas de plata (AgNPs) por medio de la técnica de electrohilado, con el objetivo de utilizarse como apósitos biológicos para la regeneración de tejidos. En primer lugar, se sintetizaron AgNPs con concentraciones de 12.5 mM, 25 mM, 75 mM y 100 mM de nitrato de plata. Se encontraron AgNPs con diámetros de alrededor de 15 a 30 nm. Las fibras presentaron una estructura fibrilar de alrededor de 900 nm. La determinación de la toxicidad *in vivo* del compuesto PCL-AgNPs mostró nula toxicidad dérmica desde la concentración mínima de 12 mM hasta la concentración máxima de 100 mM. La determinación de la citotoxicidad *in vitro* del compuesto PCL/AgNPs mostró una disminución en el porcentaje de viabilidad celular conforme aumenta la concentración de las AgNPs.

Extenso

Introducción

La nanotecnología se ha enfocado en el desarrollo de nanomateriales que puedan ser efectivos contra compuestos biológicos que son patógenos para el ser humano. La síntesis de nanopartículas metálicas ha despertado el interés científico debido a las propiedades bactericidas que presentan algunos metales como el oro, el cobre y la plata¹. La actividad antimicrobiana de la plata es conocida desde la antigüedad y actualmente la plata a escala nanométrica ha demostrado ser un poderoso agente antimicrobiano por las distintas propiedades fisicoquímicas que adquiere. Sin embargo estudios toxicológicos revelan que las nanopartículas de plata (AgNPs) inducen toxicidad tanto en seres humanos, nanopartículas de plata (AgNPs) inducen toxicidad tanto en seres humanos, animales y a nivel celular². En la actualidad no hay un material con AgNPs que a bajas concentraciones tenga un carácter bactericida y no ocasione daño celular. Debido a ello en este estudio se propone la fabricación de una membrana polimérica que pueda mantener estable las nanopartículas de plata así como no mostrar ningún efecto tóxico sobre las células epidérmicas apoyando la idea que a bajas concentraciones no ocasiona ningún daño celular, el cual podrá utilizarse como apósito biológico para recubrimiento de heridas y así evitar la infección causada por bacterias comunes.

Discusión y resultados

Las concentraciones de 12.5 mM y 25 mM de AgNO₃ presentan un tamaño de partícula de entre 15-20 nm, al aumentar la concentración de la sal precursora (AgNO₃) aumentó el tamaño de las nanopartículas de forma directa, generando partículas de 25-30 nm en las concentraciones de 50 mM y 100 mM.³ En la figura 1 se presentan en micrografía electrónica de fibras PCL/AgNPs 12/5mM (x50, 000) de un diámetro aproximado de 900 nm, con microestructura fibrilar lisa, de forma cilíndrica y sin rupturas. (a) Fibras presentan características de microestructura fibrilar, forma cilíndrica, sin rupturas al igual que fibras de 12.5 mM, con un diámetro entre 900-1000 nm. (b) presentan una microestructura fibrilar de forma cilíndrica, no presentan rupturas, pero a diferencia de las concentraciones de PCL/AgNPs de 12.5 mM y 25 mM, presentan aglomerados del polímero PCL y un diámetro entre 1000-1050 nm. (c) Las fibras PCL/AgNPs 100mM presentan una microestructura fibrilar rugosa, de forma cilíndrica, con presencia de aglomerados y un diámetro de 1000-1200 nm (d).

De acuerdo con el aumento de la concentración de AgNPs se genera una disminución en la adhesión celular de la cepa IEC6 tras exposición a 24 h. Se obtuvo porcentajes de adhesión de 0.33%±0.02 para la concentración de 12mM, 0.32%±0.12 para

25 mM, $0.24\% \pm 0.11$ para 50 mM y $0.10\% \pm 0.01$ para 100 mM. La fibra de PCL sin AgNPs obtuvo un rendimiento del $1.70\% \pm 0.16$. Todos los tratamientos fueron comparados respecto al inoculó inicial ($n=50,000$ células) el cual presenta un porcentaje de adhesión del 100%.

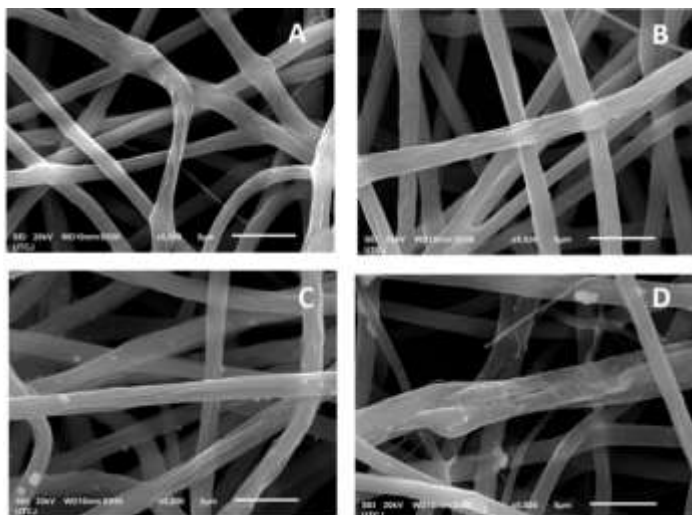


Figura 1. a) Micrografía electronica de las fibras PCL/AgNPs (x50,000). b) PCL/AgNPs 25mM. c) PCL/AgNPs 50 mM. d) PCL/AgNPs 100mM.

En la figura 2, se muestra la remoción del pelaje del conejo (a), que posteriormente fueron adheridos los tratamientos de PCL y PCL/AgNPs 12.5 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, para finalizar observando los signos de edema y eritema en el modelo de experimentación (b). Presenta nula toxicidad dérmica desde la concentración mínima de 12.5 mM hasta la concentración máxima de 100 mM tras exposición de los tratamientos de PCL y PCL/AgNPs a 24, 48 y 72 horas. (c)



Figura 2. a) Prueba de irritacion dermica. b) Adhesion de los tratamientos de PCL/AgNPs. c) Remocion de los tratamientos y visualizacion de edema o eritema.

Conclusiones

Se logró sintetizar AgNPs por método de reducción química obteniendo nanopartículas de 5 a 20 nm. No existe formación de enlace entre el polímero y las AgNPs, solo se encuentran embebidas en él, de acuerdo al espectrograma de IR. El compósito de PCL con distintas concentraciones de AgNPs causa nula irritación dérmica tras exposición de 72 horas en conejos albinos. El compósito PCL/AgNPs podría utilizarse con fines terapéuticos.

Materiales

Para la síntesis de AgNPs se empleó una solución de N, N-dimetilformamida (DMF) y Tetrahidrofurano (THF), disoluciones en concentraciones de AgNO₃ al 12.5mM, 25mM, 50mM, 100mM. Se empleó como modelo animal conejos albinos sanos

para la determinación de la toxicidad dérmica del compósito PCL/AgNPs. Para determinación de la citotoxicidad del compósito PCL-AgNPs se utilizó línea celular IEC6 (ATCC CRL-1592)..

Métodos

Síntesis nanopartículas: Para la síntesis de AgNPs se utilizó el método de reducción química empleando una solución de N, N-dimetilformamida (DMF) y Tetrahidrofurano (THF), posteriormente se agregó nitrato de plata (AgNO_3) como sal precursora. La preparación de AgNPs es por reducción de iones de plata por DMF. La disolución se mantuvo bajo agitación magnética. Este procedimiento se llevó a cabo para obtener disoluciones en concentraciones de AgNO_3 al 12.5mM, 25mM, 50mM, 100mM. Se caracterizó la solución resultante con AgNPs por medio de espectroscopia UV-visible (Agilent 8543). El tamaño y la distribución de partículas se obtuvieron a partir de un analizador de nanopartículas (Horiba ZS-100) por la técnica de dispersión dinámica de luz. Una vez caracterizado el tamaño de las partículas se agregó la poli- ϵ -caprolactona (PCL) manteniendo la agitación magnética hasta disolución completa para su posterior electrohilado.

Electrohilado: Se empleó la técnica de electrohilado para la fabricación del compósito PCL-AgNPs con las cuatro concentraciones diferentes de AgNO_3 que fueron evaluadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) utilizando un equipo JEOL JSM-7000F. Para el análisis de la nanofibra por medio de espectroscopia IR, se utilizó un equipo Bruker. Para el análisis por espectroscopia Uv/vis, se utilizó un equipo Agilent 8453, se tomó una muestra de la solución Ag^+ y fue leída en un rango de 400 – 700 nanómetros. Las fibras colectadas fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido (MEB) utilizando un equipo JEOL JSM-7000F.

Ensayo irritación dérmica: Con 24 horas de anticipación a la prueba, el pelaje se removió de la zona dorsal del tronco del animal evitando la abrasión de la piel. Posteriormente fueron colocados los cuadrados de 1 cm^2 que contenían concentraciones del compósito PCL-AgNPs. El compósito PCL-AgNPs fue cubierto con cinta no irritante e hipoalergénica (micropor). El periodo de exposición fue de 4 horas, luego el animal fue examinado para detectar signos de edema y eritema de acuerdo al test de Draize y las respuestas fueron clasificadas en 60 minutos, 24, 48 y 72 horas posteriores al del tiempo de exposición. Se evaluaron los parámetros de edema y eritema. *Ensayo adhesión celular:* El ensayo de citotoxicidad se realizó mediante el ensayo de tinción diferencial nuclear (DNS) con dos intercaladores de ADN fluorescentes, Hoechst y yoduro de propidio (PI). Los tratamientos se visualizaron por microscopia fluorescencia para determinar la viabilidad celular.

Referencias

1. Reyes López S. Y; Cornejo-Monroy, D; y González-García, G. **2015.** A Novel Route for the Preparation of Gold Nanoparticles in Polycaprolactone Nanofibers. *Journal of Nanomaterials*, 501, 485121.
2. Beer, C; Foldbjerg, R; Hayashi, Y; S. Sutherland D; Autrup, H. **2012.** Toxicity of silver nanoparticles—Nanoparticle or silver ion?. *Toxicology Letters* (208):286– 292.
3. López Esparza J. Espinosa Cristobal L. Donohue Cornejo A. Reyes López S. 2016. Antimicrobial Activity of silver Nanoparticles in Polycaprolactone Nanofibers against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 55 (49), pp 12532–12538.

Uso de d-l triptófano y semilla de girasol (*Helianthus annuus*) como sustrato para la producción de pigmentos indólicos por *Candida glabrata* con aplicaciones biotecnológicas

Ricardo Casillas González¹, Candy Andreina Montaña Pérez^{1,2}, Valeria Guadalupe Aguayo García^{1,2} M. en C. Marcelo Victorio de los Santos¹, Dr. en F. Gabriela Ávila Villarreal^{1,2}, Dr. Javier German Rodríguez Carpena²

¹ Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas, ² Unidad Especializada en I+D+i en Calidad de Alimentos y Productos Naturales - CENiT², Universidad Autónoma de Nayarit.

ricardo.casillas@uan.edu.mx

Resumen

Candida glabrata, una levadura saprofita comensal, considerada no patógena y no pigmentadora en medios convencionales, al ser sometida a un medio sólido enriquecido con D-L triptófano como fuente de nitrógeno, semilla de girasol como fuente de biotina y sustrato para la fermentación se indujo de manera positiva la producción pigmentos indólicos; estos fueron fraccionados por técnicas cromatográficas convencionales obteniéndose 3 pigmentos diferentes.

Extenso

Introducción

Candida glabrata, una levadura saprofita comensal, considerada no patógena y no pigmentadora en medios convencionales, fue reportada por primera vez como productora de pigmentos indólicos en medio líquido cuando la única fuente de nitrógeno es el L-triptófano¹. La generación de pigmentos mediante procesos biotecnológicos ha ido incrementando debido a las ventajas que ofrecen en comparación con un proceso químico, pues son procesos de fácil manipulación, bajo costo y de tiempos reducidos para una mayor producción. A la fecha no hay registros de obtención de pigmentos indólicos producidos por *Candida glabrata* usando fermentación en medio sólido, pues los compuestos indólicos obtenidos han sido por fermentación sumergida². El presente trabajo evaluó la producción de los pigmentos indólicos por fermentación en medio sólido usando D-L triptófano como fuente de nitrógeno, semilla de girasol como fuente de biotina y sustrato para la fermentación, la extracción de los pigmentos indólicos se realizó por técnicas cromatográficas convencionales.

Exposición

Los pigmentos microbiológicos son estructuras químicas que por medio de la refracción de la luz dan color a diversos materiales³. Este tipo de compuestos tiene diversas aplicaciones industriales como en el área de los alimentos en donde son utilizados para resaltar propiedades organolépticas, en lo que respecta al ámbito farmacéutico son implementados en la fabricación de medicamentos y cosméticos⁴. Particularmente los pigmentos indólicos como el ácido indól acético cuentan con un especial interés en el sector agrícola por su acción de auxinas⁵, mientras que otros de este mismo grupo como la violaceína tienen actividad antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante e insecticida⁶. Los procesos de biotecnología industrial en los cuales los pigmentos son generados por microorganismos son una opción para la producción de pigmentos a partir de materias primas renovables con la potencialidad de ser menos tóxicas en sus procesos de producción.⁷

¹ Mayser P. (2007)

² Brunke S. (2010)

³ Vladimir E. (2011)

⁴ Cho, J. P. (2002)

⁵ Castillo, B. A. (2005).

⁶ Cortez, N. (2013)

⁷ Ortega, V. P. (2004).

C. glabrata es una levadura saprofita comensal incapaz de formar hifas e históricamente considerada no patógena y no pigmentadora. En el año 2007 Mayser y cols¹ desarrollaron una metodología en la cual se formuló un medio de cultivo que presentaba como única fuente de nitrógeno el L-triptófano y al cual se le adicionó biotina para inducir la metabolización de este aminoácido, para finalmente por fermentación líquida obtener la producción de pigmentos indólicos⁸.

Dadas las necesidades actuales por encontrar metodologías asequibles, seguras y económicas para la obtención de pigmentos de interés industrial como lo son aquellos de carácter indólico, en el presente trabajo se desarrolló una técnica de producción de estos pigmentos, implementando una fermentación sólida, utilizando semilla de girasol (*Helianthus annuus*) como base y como fuente de biotina. Este método presenta ciertas ventajas frente a las técnicas descritas hasta ahora de fermentación líquida, ya que permite una mayor disponibilidad de oxígeno que es un factor clave para obtener un mayor rendimiento de pigmentos, además que el método se vuelve económico y amigable con el medio ambiente.

Una vez obtenidos los pigmentos indólicos producidos por *C. glabrata*, se realizó un fraccionamiento cromatográfico en columna abierta para purificar los componentes mayoritarios. Las fracciones colectadas fueron reunidas por similitud cromatográfica y monitoreadas por cromatografía en capa fina (CCF).

Materiales

Aislamiento.	Biosíntesis	Extracción del compuesto	Separación
*Semilla de yaca (<i>Artocarpus heterophyllus</i>) *Medio LB *CHROMagar®,	*Semilla de girasol (<i>Helianthus annuus</i>) *Dextrosa *Buffer de fosfatos * Triptófano (Trp) *Candida glabrata	*Tween 20 *Acrodiscos® LC PVDF (membrana con poros de 0.45 mm de diámetro y un diámetro total de 25 mm)	*FM: metanol 100%, acetona, acetato de etilo, diclorometano, metanol/ acetona (5:5), acetona/agua (5:5) *Rotavapor *Cromatoplaça *Columna (silica gel 254F) *Revelador (H ₂ SO ₄ 10%)

Métodos

Aislamiento

Se aisló *C. glabrata* de semillas de yaca (*Artocarpus heterophyllus*) propagándola en medio LB (extracto de levadura 5 g/L; peptona 10 g/L; NaCl 10 g/L pH 7.0) para una posterior identificación implementando el medio comercial CHROMagar® (BD) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Producción de pigmentos indólicos

Se utilizó 100 g de semilla de girasol de triturados del grano sin cáscara y posteriormente se colocó en un matraz Erlenmeyer de 3L adicionado con buffer de fosfatos 100 mM, pH 5.8 y dextrosa al 2.5 %. El matraz se esterilizó a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente se agregó D-L triptófano 30 mM previamente filtrado ajustando la humedad al 60 % y se inoculó 1.2×10^6 células/mL de la levadura, se incubó a 37 °C, con monitoreo cada 24 horas durante 7 días.

⁸ García N. (2001)

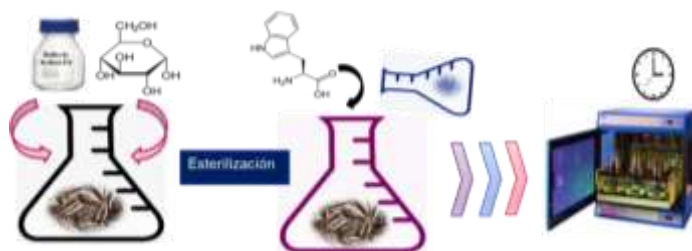


Figura 1. Proceso de producción de pigmentos indólicos por *C. glabrata*

La

fermentación sólida se suspendió en solución de 20 mL de agua y Tween 20 (0.02%) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se re-centrifugó a las mismas condiciones. En el sobrenadante se determinó la presencia de compuestos indólicos cualitativamente utilizando el método de Salkowski⁹.

Una alícuota de 1 mL se colocó en un microtubo de 1.5 mL de capacidad, para posteriormente ser filtrado con acrodiscos[®] LC PVDF, la muestra fue filtrada se colocó en viales previamente pesados y se secó a 40 °C.

El fraccionamiento cromatográfico del pigmento obtenido se realizó por columna abierta empacada con fase estacionaria sílica gel 254F y como fase móvil inicial acetato de etilo. Se realizó un gradiente cromatográfico comenzando por acetato de etilo y terminando con metanol. Las fracciones se colectaron y rotaevaporaron a 60 °C con una presión reducida de 240 bar y 110 rpm. Las fracción colectadas fueron monitoreadas por CCF y reveladas con ácido sulfúrico al 10%.



Figura 2. Proceso de extracción de pigmentos indólicos

Resultados y discusión.

C. glabrata fue aislada de semilla de yaca (*Artocarpus heterophyllus*) junto con otras variantes de *Candidas* las cuales se muestran en la figura 3. Los pigmentos indólicos fueron inducidos en presencia de *C. glabrata* a las 48 horas de su inoculación, que fue aumentando en cuanto intensidad hasta alcanzar su máximo punto a las 168 horas, con un rendimiento de 150 mL del sobrenadante de la fermentación junto con los 20 mL de la solución de extracción. Una muestra del sobrenadante fue sometida a la prueba de Salkowski¹ para la determinación de compuestos indólicos dando un resultado positivo.

Como resultado del fraccionamiento cromatográfico del pigmento se separaron 3 compuestos diferentes, los cuales serán sometidos a cromatografías sucesivas para su purificación y posterior elucidación estructural.

⁹ Yu X (2016)

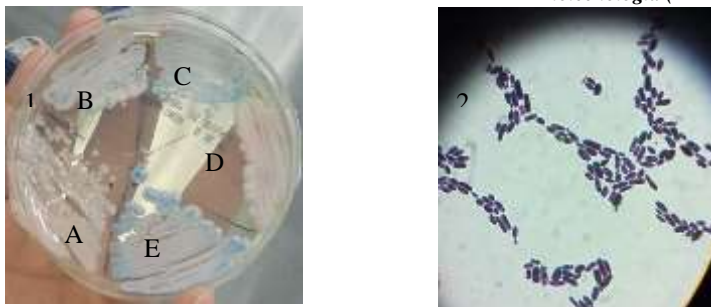


Figura 3. Panel 1) morfología colonial característica en CHROMagar® de (A) *C. glabrata*; (B) *C. albicans*; (C) *C. tropicalis*; (D) *C. crusei*; (E) *C. albicans*. Panel 2), tinción Gram de *C. glabrata* , obtenida del aislamiento de CHROMagar®

Conclusiones

C. glabrata, al ser sometida a un medio sólido enriquecido con D-L triptófano como fuente de nitrógeno, semilla de girasol como fuente de biotina y sustrato para la fermentación tiene la capacidad de producir pigmentos indólicos, los cuales tienen potenciales aplicaciones en la industria agroalimentaria, farmacéutica y como potenciales biopesticidas.

Referencias

1. Mayser P., Wenzel M., Joachim H., Bernhard L., Kindler J., Spiteller P., & HAASE G. (2007) Production of indole pigments by *Candida glabrata*. *Medical Mycology* S. 45, 519-524
2. Brunke S., Seider K., Almeida R.S., Heyken A., Fleck C.B., Brock M., Barz D., Rupp S and Hube B. (2010). *Mol Microbiol.* 76(1), 25-47.
3. Vladimir E. Parra Elizondo, L. B. (2011). Pigmentos naturales: un futuro prometedor. *Revista de divulgación científica CIENCIA CIERTA*. Pag 43- 56.
4. Cho, J. P. (2002). Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. *Letters in Applied Microbiology* , 195-202.
5. Castillo, B. A. (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología*, 137-142.
6. Cortez, N. (2013) Evaluación de la influencia de factores ambientales sobre la producción de violaceína sintetizada por *Janthinobacterium lividum* , Pontificia Universidad Javeriana, 1-5.
7. Ortega, V. P. (2004). Estudio comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico. Valdivia , Chile .
8. García N. (2001). La Jaca. *Ciencia y desarrollo*. MÉXICO, 27: 12-19
9. Yu X., Jiang J., Liang C., Zhang X., Wang J., Shen D. & Feng Y. (2016). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 62, 31–37.

Evaluación del efecto de algunos compuestos volátiles sobre la síntesis de celulosa bacteriana por *Gluconobacter xylinum*

Priscila Vázquez García¹, Martha Patricia Llamas Parra¹, Yolanda González García², Juan Carlos Meza Contreras²,

¹ Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Blvd. Marcelino García Barragán 1421, Ciudad Universitaria, C.P. 44430 Guadalajara, Jal.

² Departamento de Madera, Celulosa y Papel Carretera a Nogales, Km. 15,5 AP 5293, C.P. 45020, Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México.

priscila.vgarcia@hotmail.com

Resumen

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar la capacidad de *Gluconobacter xylinum* de sintetizar celulosa en medio Hestrin Schramm en presencia de compuestos orgánicos volátiles (COV's: hexano, xileno, tolueno, benceno, piridina y disulfuro de dimetilo). La adición de COV's al medio resulta ser tóxico para la bacteria, retardando la producción de dicho biopolímero (48 h) y provocando una disminución en el grosor de las películas (2 mm). El tolueno resultó ser el más inhibitorio, en tanto que dicho efecto fue variable dependiendo de la naturaleza química del COV's. Además éstos propiciaron una mayor susceptibilidad al desgarre de la película de celulosa en su forma hidratada. Además en presencia de disulfuro de dimetilo ésta se observa con mayor transparencia.

Extenso

Introducción

La celulosa es el biopolímero más abundante en la Tierra, formada por glucosas unidas linealmente mediante enlaces β -1,4. Es reconocida como el mayor componente de la biomasa de las plantas, pero también es representativo de los polímeros extracelulares de algunos microorganismos. La celulosa proveniente de plantas suele extraerse acompañada de ligninas, hemicelulosas y otros residuos, por lo que es necesaria la purificación de ésta para ciertos fines industriales, biotecnológicos y de investigación (Chávez Pacheco et al, 2004). La celulosa bacteriana (CB) es producto del metabolismo primario de algunos bacilos Gram-negativas, aerobios estrictos (J. Kucinska-Lipka et al, 2015). Las principales bacterias que producen celulosa bacteriana son las pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, y *Sarcina*, entre las cuales por su rendimiento destaca *Acetobacter* (A. Retegi et al, 2010). La CB ha atraído atención ya que tiene alta pureza y no contiene residuos de otros polímeros, aunado a sus excelentes características como resistencia mecánica, alta captación de agua, cristalinidad, biodegradabilidad, ser un recurso renovable, biocompatible (Zhong et al, 2012), inerte metabólicamente, no tóxica, hipoalérgica al contacto, por lo que es de gran interés para fines biomédicos y cosméticos (Chávez Pacheco et al, 2004).

Exposición

La celulosa tiene una amplia gama de aplicaciones en la actualidad, en diversos procesos es necesaria la modificación de la estructura y características fisicoquímicas, en búsqueda de distintos grados de cristalinidad, de aumentar o disminuir su resistencia, biodegradabilidad, entre otras características. La purificación y modificación química de la celulosa implica procesos que pueden tener un alto costo, bajo rendimiento y gran cantidad de residuos, por lo que la CB resulta ser una interesante alternativa, la cual evita el proceso exhaustivo de purificación implícita en la celulosa de biomasa vegetal. En el presente trabajo se busca la modificación de celulosa bacteriana desde su origen, es decir modificando las condiciones y sometiendo a estrés a la bacteria *Gluconobacter xylinum*, adicionando al medio compuestos volátiles, los cuales pueden interactuar con la celulosa que se está formando, obteniendo como producto de metabolismo diversas CB funcionalizadas *in situ*.

Materiales y Métodos

Se utiliza la bacteria *Gluconobacter xylinum* DSMZ 2004. El medio base es el caldo el caldo Hestrim Schramm (HS) el cual está compuesto de glucosa (20g/L), peptona (5 g/L), extracto de levadura (5 g/L), ácido cítrico (1.5 g/L), fosfato disódico (2.7 g/L) ajustado pH a 6 ± 0.2 y esterilizado a 121 °C y 15 Psi por 15 minutos (A. Retegi et al, 2010). La producción de CB se llevó a cabo en botellas serológicas de vidrio de 25ml, provistas de válvulas de teflón mininert ó tapón de algodón (según el caso) conteniendo 5ml de medio HS estéril e inoculadas con 100 μ L de una suspensión celular. Posteriormente se adicionó de forma aséptica 1 μ L del COV correspondiente y fueron incubadas de manera estática a 30°C, durante 15 días. Al término de la fermentación, las películas de CB formadas fueron medidas antes de ser recuperadas. Finalmente éstas fueron lavadas con agua destilada, seguidas de una solución de NaOH (0.1 M) a 80°C, durante 30 minutos. A continuación, fueron lavadas con agua destilada y en agitación durante 24h y nuevamente, se realizaron lavados con agua destilada hasta obtener un pH neutro, para posteriormente, ser secadas a temperatura ambiente para su análisis químico estructural.

Discusión y resultados

Se observó que la formación de CB en el medio (Control) apareció después de 48h y fue incrementando su grosor hasta los 15 días, mientras que en presencia de COV's esta se retrasó su aparición hasta el cuarto (Piridina y hexano) y sexto día (Benceno y Xileno). Esto mostró un efecto tóxico para la bacteria, lo cual fue confirmado por un menor desarrollo celular en medio HS sólido, y para el caso de Tolueno una ausencia de UFC, evidenciado la inhibición total de la misma. Este desarrollo celular determinado fue asociado a la formación de CB, encontrando una variación en el espesor (cantidad) de ésta. En ausencia de COV's (Control) ésta alcanzó un tamaño promedio de 5mm, mientras que en presencia de éstos, la CB no excedió los 3mm. Para el caso de disulfuro de dimetilo (DDM) además el diámetro de la película resultó ser el menor (20 mm) respecto al control (25 mm), mientras que para los otros COV's éste fue muy similar al control. El aspecto final de la CB hidratada fue muy similar en la mayoría de las condiciones incluido el control, presentando un color blanquecino opaco, en tanto que con DDM éste tiende a ser transparente cristalino y con una resistencia mayor al desgarre manual.



Figura 1. Medios de cultivo en frascos serológicos conteniendo placas de celulosa bacteriana tras 15 días de incubación

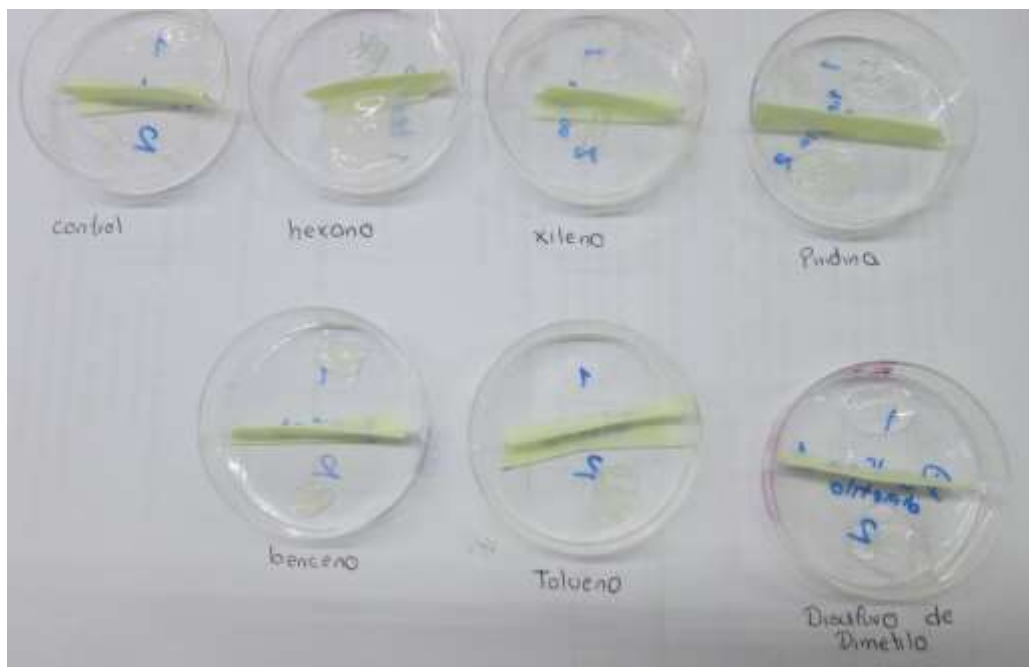


Figura 2. Placas de celulosa bacteriana provenientes de medios de cultivo adicionados con compuestos volátiles.

Conclusiones

Se encontró que dependiendo de la naturaleza química del compuesto volátil adicionado al medio líquido existe variación en el aspecto y grosor (cantidad) de la CB obtenida, pudiendo inferir una variación en las características químicas estructurales (grado de cristalinidad) y mecánicas, lo cual se encuentra en proceso de realizarse.

Referencias.

- Kucińska-Lipka, J., Gubanska, I. and Janik, H. (2015). Bacterial cellulose in the field of wound healing and regenerative medicine of skin: recent trends and future perspectives. *Polymer Bulletin*, 72(9), pp.2399-2419.
- Retegi, A., Gabilondo, N., Peña, C., Zuluaga, R., Castro, C., Gañan, P., de la Caba, K. and Mondragon, I. (2009). Bacterial cellulose films with controlled microstructure–mechanical property relationships. *Cellulose*, 17(3), pp.661-669.
- Zhong et al. (2012). Metabolic flux analysis of *Gluconobacter xilinus* for bacterial cellulose production. *Application Microbiology Biotechnology* 97:6189-6199.
- Chávez-Pachecho, Martínez-Yee, Contreras-Zentella, Escamilla-Marván. (2004). Celulosa Bacteriana en *Gluconobacter xylinum*: biosíntesis y aplicaciones. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 7(1):18-25.

Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Moringa oleifera*: desarrollando avances biotecnológicos sobre la producción de compuestos hipoglucemiantes.

Guadalupe García-Díaz¹ Carol Cristina Cejudo-González¹, Edwin A Giles-Mazón¹, María Elena Estrada-Zúñiga²

¹Facultad de Ciencias; ²Centro de Investigación en Recursos Bióticos, Universidad Autónoma del Estado de México, Campus El Cerrillo, Piedras Blancas Carretera Toluca-Ixtlahuaca Kilómetro 15.5 C.P. 50200 Toluca Estado de México, México. lena21382@yahoo.com.mx

Resumen

Moringa oleifera (“moringa”) es una planta originaria de la India que ha sido utilizada durante años por la medicina tradicional como anticancerígeno, antioxidante, antiinflamatorio, fungicida, bactericida, hepatoprotectora, nutraceutica y antidiabética. Se realizó un cultivo *in vitro* de semillas de *Moringa oleifera*, de las cuales se obtuvo un 90% de germinación. Las plántulas fueron fuente de explantes (nodo, hoja y tallo), los cuales fueron tratados con reguladores de crecimiento vegetal [RCV] (cinetina [KIN], ácido naftalenacético [ANA], belcilaminopurina [BAP], ácido 2,4-diclorofenoxiacético [2,4-D]) en concentraciones específicas para inducir desdiferenciación/diferenciación. Los RCV indujeron a callo (desdiferenciación) y a raíces en los explantes evaluados, ocurriendo el mejor tratamiento para formación de raíz bajo ANA 0.1mg/L en nodo, y para formación de callo bajo 1.5BAP+ 1.52,4-D (mg/L) en tallo.

Extenso

Introducción

El presente trabajo se realizó con la finalidad de establecer cultivos *in vitro* de *Moringa oleifera* a través de evaluar el efecto de diferentes tratamientos basados en reguladores de crecimiento vegetal sobre explantes (tallo, nodo y hoja) obtenidos de plántulas germinadas *in vitro*.

Exposición

Moringa oleifera (“moringa”) es una planta de origen Indio de uso popular, con bastas propiedades para tratamiento de problemas de salud (Farooq y col., 2002), que han sido atribuidas a todas sus partes, raíces, hojas, flores, semillas, fruto y corteza (Ramachandran y col., 1980). Desde 1998 la FAO la declaró como un importante alimento suplementario para tratar malnutrición y recomienda su consumo constante. Debido a sus múltiples propiedades, esta especie ha sido utilizada durante años por la medicina tradicional de la India como anticancerígeno, antioxidante, antiinflamatorio, , fungicida, bactericida, hepatoprotectora, nutraceutica y antidiabético (Olson y Fahey, 2011; Farooq, et al., 2012). Es comúnmente denominado “árbol de la vida”, “regalo de Dios” o “árbol milagro” (Mbikay, 2012). Mbikay (2012) hace referencia a que diversas partes de moringa, sobre todo sus hojas, son utilizadas como tratamiento de VIH, hipertensión y diabetes de manera auto-medicada. En estudios recientes se ha demostrado que la moringa contiene fitoquímicos a los que se les atribuyen dichas propiedades curativas. Benett y col. (2003) demostraron que la planta es rica en glucosinatos, isotiocinatos, flavonoides, antioianinas, proantocianidinas y cinamatos, además de un amplio espectro de aminoácidos esenciales, vitaminas y calcio. Recientemente Hafiz y col. (2017) asociaron el efecto hipoglucemiante a los flavonoides quercetina 3-β-D-glucosidO y kaempferol-3-O-glucosidO que se encuentran en la moringa. Estudios *in vivo* en ratones inducidos a diabetes mellitus demostraron el efecto hipoglucemiante de hojas (Jaiswal y col. 2009; Yassa y Tohamy 2014), flores (Arise y col. 2017) y semillas (Al-Malki 2015) de la moringa. Las plantas con efecto antidiabético y sus cultivos *in vitro* (una forma de producir de manera controlada agentes hipoglucemiantes), pueden ser fuente útil de nuevos tratamientos para la enfermedad, tal es el caso de *M. oleifera*.

Materiales y métodos

Se desinfectaron semillas de *M. oleifera* empleando inmersiones secuenciales de solución jabonosa, etanol al 70%, Bravo 720® al 2%, cefotaxime 100mg/L, yodo 5gotas/L e hipoclorito de sodio 25% durante 15, 0.5, 15, 30 y 30min, respectivamente. Posteriormente, se removió las testa de cada semilla y fueron inoculadas en medio de cultivo semisólido consistiendo de medio MS al 50%, sacarosa 30g/L y phytigel 4g/L. Cuando las plántulas alcanzaron una altura de 10±2 cm, estas fueron empleadas como fuente explantes (tallos, hojas y nodos). Los explantes fueron inoculados en frascos conteniendo medio MS semisólido al 50% adicionado de RCV: ANA, KIN, BAP y 2,4-D en concentraciones específicas

(Tabla 1). Los cultivos fueron incubados en luz fluorescente blanca a 16hrs luz/8hrs oscuridad a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se determinó el porcentaje de explantes presentando un tipo de respuesta de dediferenciación (callo) o diferenciación (raíz o brotes) respecto al total de explantes tratados. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, y fueron sujetos a análisis estadístico (software SPSS).

Código del tratamiento	Regulador de crecimiento vegetal [RCV] (mg/L)
T1	1.5 de BAP+ 1.5 de 2,4-D
T2	0.1 de ANA+0.1 de BAP
T3	0.1 de BAP+0.1 de 2,4-D
T4	0.1 de BAP
T5	0.1 de ANA
T6	0.1 de 2,4-D
T7	0.2 de KIN
T8	0.5 de ANA
T9	SIN RCV

Tabla 1. Formulación de tratamientos para establecer cultivos *in vitro* de *M. oleifera* a partir de reguladores de crecimiento vegetal (RCV)

Discusión de resultados

Las semillas de *M. oleirifera* presentaron *in vitro* un porcentaje alto de germinación (90%) y las plántulas presentaron un rápido crecimiento (alcanzaron una longitud de 10 ± 2 cm a los 13 días de incubación). Los RVC en los diferentes tipos de explantes (hoja, nodo, tallo) empleados de *M. oleifera* en términos generales promovieron la formación de callo y raíces (Figura 1); el tratamiento control no formó ninguna de las respuestas anteriores. Sin embargo, dichas respuestas formadas dependieron del tipo de explante usado y del tipo y concentración de RCV. La mayor producción de callo (100%) ocurrió en explantes de hoja tratados con la combinación de 1.5+1.5 (mg/L) de BAP y 2,4-D, mientras que la mayor producción de raíz (100%) ocurrió en nodos tratados con 0.5 mg/L de ANA (Figura 1). En la literatura existen pocos trabajos con inducción a callo y ninguno a raíz (Asma G. Oriabi (2016).. Actualmente se están proliferando las respuestas de callo y raíz bajo el tratamiento que formó mayor porcentaje de inducción de las mismas. Futuros experimentos se encaminarán a establecer cultivos en suspensión, seguido de la obtención de extractos para la evaluación de su efecto hipoglucemiante en ratones con diabetes inducida.

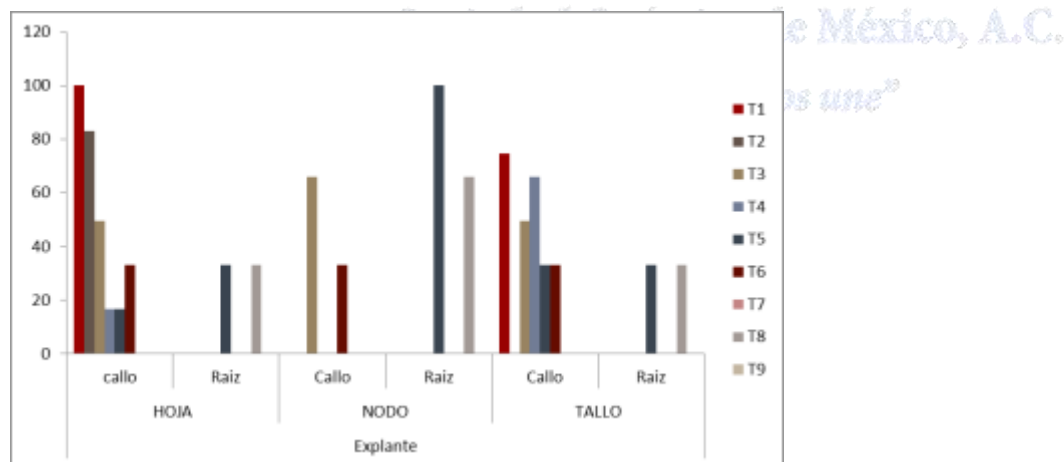


Figura 1. Porcentajes de inducción de callo y raíz obtenidos en explantes de hoja, nodo y raíz tratados con diferentes reguladores de crecimiento vegetal.

Conclusiones

Las semillas *M. oleífera* presentaron un alto porcentaje de germinación y un rápido crecimiento. Las plántulas fueron fuente de explantes (hojas, tallo y nodos), los cuales fueron capaces de formar callo y raíz al tratarse con RCV. La mayor inducción de callo (100%) ocurrió en hojas tratadas con 1.5+1.5 (mg/L) de BAP y 2,4-D, mientras que la de raíz (100%) ocurrió en nodos tratados con 0.5 mg/L de ANA.

Referencias

- Arise, R., Aburo, O., Farohunbi, S. (2016). ANTIDIABETIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF ETHANOLIC EXTRACT OF DRIED FLOWERS OF MORINGA OLEIFERA IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS. *Acta Facultatis Medicae Maissensis*, 33(4), p. 259-272.
- Abdulrahman L. Al-Malki; Haddad A. El Rabey, (2015). THE ANTIDIABETIC EFFECT OF LOW DOSES OF MORINGA OLEIFERA LAM. SEEDS ON STREPTOZOTOCIN INDUCED DIABETES AND DIABETIC NEPHROPATHY IN MALE RATS. *Biomed Research International*
- Asma G. Oriabi (2016). MORINGA OLEIFERA IN VITRO CULTURE AND ITS APPLICATION AS ANTI-DIABETIC IN ALLOXAN INDUCED DIABETIC ALBINO MICE. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 5(2) p 43-49.
- Bennet, R. N., Mellon, F. A., Foidl, N., Pratt, J. H., Dupont, M. S., Perkins, L. And Kroon, P. A. (2003). PROFILING GLUCOSINOLATES AND PHENOLICS IN VEGETATIVE AND REPRODUCTIVE TISSUES OF THE MULTI-PURPOSE TREES MORINGA OLEIFERA L. (HORSE RADISH TREE) AND MORINGA STENOPETALA L. *J Agric. Food chem.* 51 (12), p 3546-3553.
- Farooq, F., M. Rai, A. Tiwari, A. Arif y S. Farooq. (2012). MEDICINAL PROPERTIES OF MORINGA OLEIFERA: AN OVERVIEW OF PROMISING HEALER. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(27), p 4368-4374.
- Hafiz, M.I., Mohd Zaini A, Nurzalina Abdul K.; Amirin S.; Mohd N. M.; (2017) ANTI-DIABETIC ACTIVITY-GUIDED SCREENING OF AQUEOUS-ETHANOL MORINGA OLEIFERA EXTRACTS AND FRACTIONS: IDENTIFICATION OF MARKER COMPOUNDS. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 16 (3) p 543-552.
- Jaiswal, D.; Kumar, R. P.; Kumar, A.; Mehta, S.; Watal, G.; (2009) EFFECT OF MORINGA OLEIFERA LAM. LEAVES AQUEOUS EXTRACT THERAPY ON HYPERGLYCEMIC RATS. *Journal Ethnopharmacology*. 123,(3) p. 392-396.
- Mbikay, M. (2012). THERAPEUTIC POTENTIAL OF MORINGA OLEIFERA LEAVES IN CHRONIC HYPERGLYCEMIA AND DYSLIPIDEMIA: A REVIEW *Frontiers in Pharmacology* 3,(249).
- Olson, M. Y J. Fahey. (2011). MORINGA OLEÍFERA: UN ÁRBOL MULTIUSOS PARA LAS ZONAS TROPICALES SECAS. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 82(4), p 1071-1082.
- Ramachandran, C.; Peter, K.V.; Gopalakrishnan, P.K.; Econ Bot; (1980) DRUMSTICK (MORINGA OLEIFERA): A MULTIPURPOSE INDIAN VEGETABLE. *Economic Botany*. 34 (3) p 276-283.
- Yassa H.D.; Tohamy A.F.; (2014). EXTRACT OF MORINGA OLEIFERA LEAVES AMELIORATES STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS IN ADULT RATS. *Acta Histochem*. 116 (5), p. 844-854

Sociedad Química de México, A.C.
"La química nos une"

Trabajos profesionales

Cambios Estructurales y de Composición Temporales de la Biopelícula Generados Durante la Biooxidación de Arsenopirita por *Acidithiobacillus thiooxidans*

René Homero Lara Castro¹, Hugo Ramírez Aldaba¹, Jorge Vázquez Arenas², Miguel Ángel Escobedo Bretado¹, María Azucena González Lozano¹, Patricia Ponce Peña¹, Diola Marina Núñez Ramírez¹, Ángel Rodríguez Vázquez³, Gabriel Trejo Córdova⁴, Donato Valdez Pérez⁵, Fabiola Sagrario Sosa Rodríguez⁶

¹Universidad Juárez del Estado de Durango

²Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

³CIACyT-Universidad Autónoma de San Luis Potosí

⁴CIDETEQU-Querétaro

⁵Instituto Politécnico nacional

⁶Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco

lcrh75@ujed.mx

Resumen

En este trabajo se analizaron los cambios temporales ocurridos en la biopelícula de *Acidithiobacillus thiooxidans* generados durante 120 h de biooxidación de arsenopirita, evaluados mediante SEM, CLSM, SDS-PAGE 1D y GDS. Se encontró que la biopelícula evoluciona de células dispersas (incipiente) a micro-colonias poco estratificadas, las cuales modifican significativamente la relación estructura-reactividad de arsenopirita (p.e. superficie-bulk del mineral). Durante su evolución, la biopelícula involucra cambios progresivos de hidropatía que van de un carácter hidrofílico a uno hidrofóbico, expresándose cualitativamente diferentes proteínas asociadas a la matriz bacteriana de sustancias poliméricas extracelulares. Estos cambios permitieron sugerir diferentes aplicaciones en materia ambiental y/o industrial.

Extenso

Introducción

Controlar las etapas de la evolución de biopelículas de microorganismos lixiviantes, para aplicaciones en biominería, es uno de los factores clave para el desarrollo eficiente de procesos de biolixiviación de arsenopirita [1]. A la fecha se han realizado varios estudios de caracterización de biopelículas de bacterias ferrooxidantes, tales como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, pero ninguno para bacterias sulfurooxidantes como *Acidithiobacillus thiooxidans* [1, 2]. Lo anterior permitiría comprender mejor el rol específico de bacterias sulfurooxidantes como *A. thiooxidans* durante la biolixiviación de arsenopirita por cultivos mixtos (p.e. *A. thiooxidans* y *A. ferrooxidans*), ayudando a definir mejor los parámetros que controlan la interacción de este tipo de microorganismos y los procesos complejos que de ello se derivan (p.e. procesos redox, difusión de iones intra-biopelícula, reacciones mixtas mineral-solución). Por tal motivo, en este trabajo se presenta un análisis sistemático de la evolución de biopelículas (estructura y composición) de *Acidithiobacillus thiooxidans* durante el proceso de biooxidación de arsenopirita a 120 h, utilizando entre otros, microscopía de barrido láser confocal (CLSM), espectroscopia de descarga global (GDS), y técnicas bioquímicas para análisis cualitativo de proteínas (SDS-PAGE).

Materiales y Métodos

Se utilizaron muestras de arsenopirita mineral provenientes de la región aurífera de Velardeña, Durango. Estas muestras fueron caracterizadas por SEM-EDS (Philips XL 30, EDAX-4i), espectroscopia de emisión de plasma con inducción de plasma por microondas (MP-AES-4100) y difracción de rayos X (XRD) para corroborar la pureza del mineral e identificar sus principales impurezas. Con este mineral, se obtuvieron láminas de arsenopirita (0.5 x 0.5 cm, con superficie pulida tipo espejo) las cuales fueron utilizadas para fabricar electrodos masivos de arsenopirita (EMA). Los experimentos de biooxidación y control fueron realizados utilizando electrodos masivos de arsenopirita (EMA), inoculando sistemas batch con 10 mL de células de *A. thiooxidans* (ATCC # 19377) a temperatura ambiente y bajo agitación orbital durante 1, 12, 24, 48, 72, 120 y 240 h (107 cel/mL). Los análisis de la biopelícula sobre superficies biooxidadas EMA fueron realizados mediante

CLSM y SDS-PAGE 1D utilizando un equipo ZIESS LSM 710 y un Mini-protean III Cell (Bio-Rad), respectivamente. Mayores detalles metodológicos se describen en la literatura [3].

Discusión de Resultados

La Figura 1 muestra el análisis por CLSM para células planctónicas (sin colonizar) (Fig. 1a) y formando biopelículas para diferentes tiempos de biooxidación (Figs. 1b-1g). La presencia de exopolisacáridos se presenta en verde, mientras que la de lípidos en rojo. Este análisis muestra un cambio progresivo de hidropatía de las biopelículas de *A. thiooxidans* de hidrofílica a tiempos hasta de 24 h, e hidrofóbica a tiempos mayores, principalmente a 120 h (Fig. 1g). El carácter hidrofílico hasta 24 h se atribuye a la presencia predominante de exopolisacáridos, en relación al contenido de lípidos; y viceversa para tiempos mayores [4]. Se considera que el cambio de hidropatía está relacionado en parte, al tipo de interacción que ocurre en el sistema *A. thiooxidans* y arsenopirita, lo cual incluye etapas donde varía la presencia de fases secundarias tipo pirita (FeS_2), realgar (As_2S_3) y mezclas de azufre elemental y polisulfuros ($\text{S}_n^{2-}/\text{S}^0$); éstos últimos evidentemente hidrofóbicos.

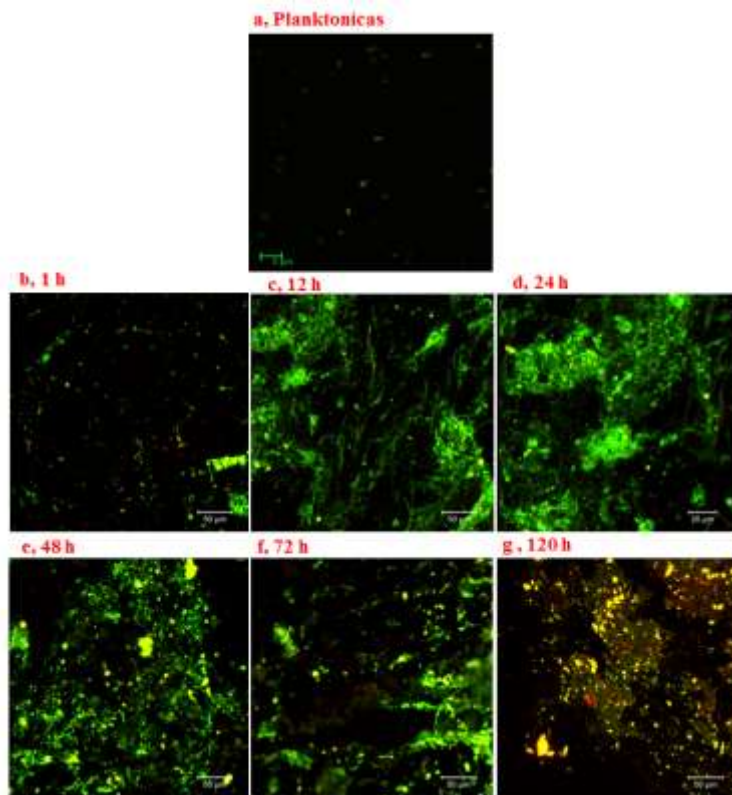


Figure 1. Imágenes de epifluorescencia obtenidas mediante CLSM para células planctónicas (a) y formando biopelículas en función del tiempo (b-g). La imagen presenta un traslape entre la epifluorescencia de lípidos (rojo) y exopolisacáridos en EPS (verde), con fines de estimar la abundancia relativa temporal de estos compuestos.

El análisis diferencial de proteínas asociadas a biopelículas (se extrajo principalmente la fracción de proteínas incluidas en la matriz de sustancias poliméricas extracelulares, EPS) indicó variaciones significativas (cualitativo) exhibiendo diferentes tipos de proteínas relacionadas con la estabilidad de la estructura de la biopelícula (glicoproteínas) y de adhesión a la superficie de sulfuros minerales [4, 5]. Estos resultados son consistentes con lo obtenido durante el análisis por CLSM (Fig. 1), donde se ilustra la presencia de compuestos hidrofóbicos ricos en lípidos (p.e. glicoproteínas). Cabe señalar que cuando los sistemas de experimentación fueron enriquecidos con arsénico adicional (As(V)), las proteínas experimentaron una limitación en la producción de ciertos tipos, y generando nuevas proteínas, probablemente asociadas a resistencia estructural al arsénico (Fig. 2).

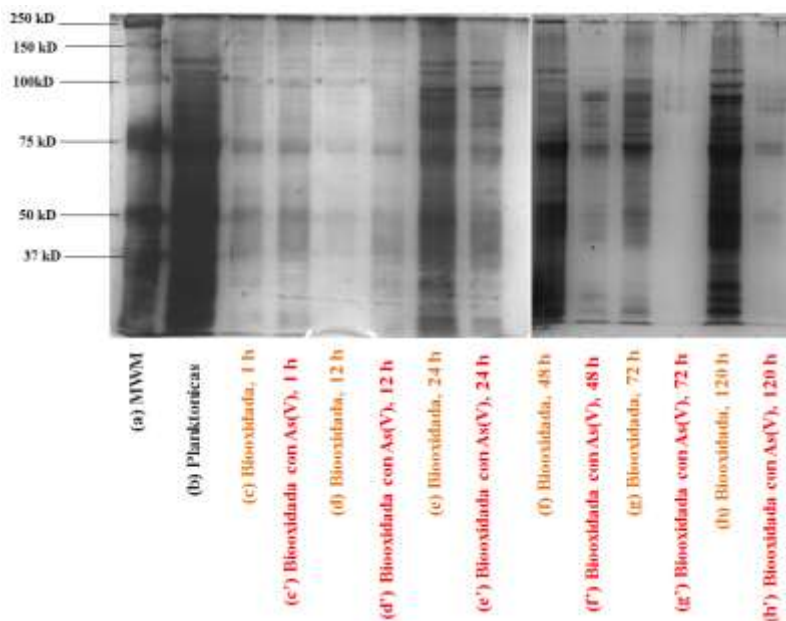


Figure 2. Análisis de la variación de tamaño de las proteínas sintetizadas en EPS mediante SDS-PAGE asociadas a la evolución de la biopelícula de *Acidithiobacillus thiooxidans* en presencia y ausencia de arsénico adicional en el sistema.

Los cambios anteriores explican los cambios en la estructura y composición de la biopelícula de *A. thiooxidans* durante el proceso de biooxidación de arsenopirita. Sin embargo, es necesario introducir una perspectiva nueva a la discusión internacional sobre los procesos y mecanismos de interacción de microorganismos lixiviantes y arsenopirita; esto es, el análisis de los cambios asociados a la superficie-bulk de arsenopirita generados por GDS (Global Discharge Spectroscopy, por sus siglas en inglés). Este tipo de análisis a su vez, permite evaluar cuantitativamente el tipo de degradación y/o biocorrosión asociada a la interacción bacteria-mineral y en un momento dado, definir los parámetros que controlan este mecanismo. La Figura 3 muestra los espectros de GDS (perfiles de Concentración vs. Profundidad) de superficies de arsenopirita sin alterar (Fig. 1a), eEMA (b), control a 12 h (c) y biooxidada a 12 h (c'). Este tiempo fue seleccionado debido a que representa un punto de inflexión en la evolución de la biopelícula, de células dispersas a micro-colonias, de acuerdo a resultados de SEM (datos presentados en otro trabajo en este congreso). De manera general se puede observar que se generan cambios de reactividad de la superficie biooxidada de arsenopirita (p.e. fases secundarias), asociado al cambio cíclico de algunos elementos de interés en el proceso (p.e. S, Fe). Estos cambios difieren de los perfiles identificados en la superficie control a 12 h (Fig. c), la muestra sin alterar (Fig. 1a) y eEMA (Fig. 1c'), sugiriendo un proceso dinámico de interacción bacteria-arsenopirita en función del tiempo, y que define en gran medida la respuesta de las biopelículas de hidrofílico a hidrofóbico (Fig. 1).

"La química nos une"

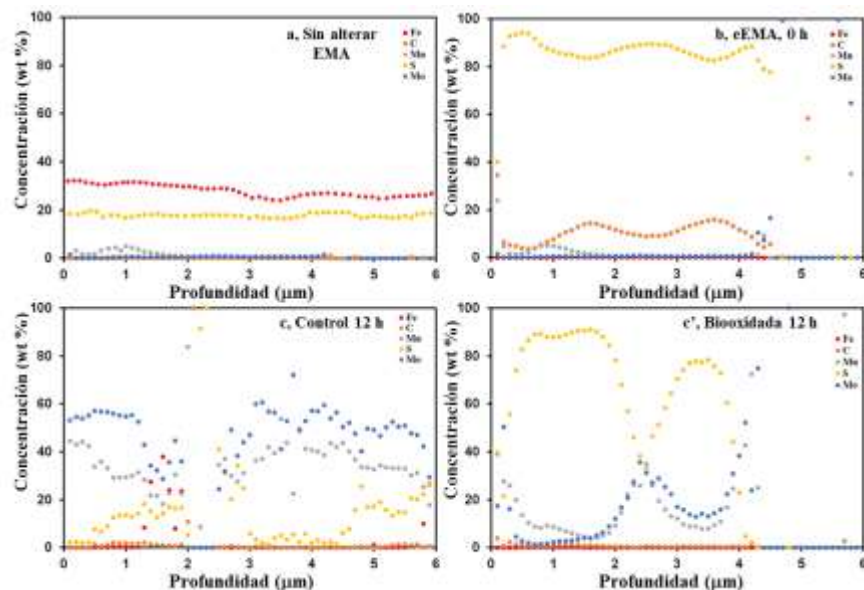


Figure 3. Espectros de GDS (perfiles de profundidad vs concentración) para superficies de arsenopirita sin alterar (a), eEMA (b), control a 12 h (c) y biooxidada a 12 h (c'). En la figura se indica el tipo de elemento analizado.

Conclusiones

Se evaluaron en forma sistemática los cambios temporales que describen la estructura de las biopelículas generadas durante la biooxidación de arsenopirita por *A. thiooxidans*. Se identificaron cambios progresivos de hidropatía que van de un carácter hidrofílico a uno hidrofóbico, y que este proceso involucra la síntesis de diferentes tipos de proteínas de EPS. Así mismo, el análisis por GDS reveló que durante el proceso de biooxidación de arsenopirita ocurren cambios importantes en la estructura-reactividad, caracterizado por variaciones en los perfiles de concentración vs profundidad de elementos de importancia en el sistema definido entre arsenopirita y *A. thiooxidans*.

Referencias

1. Devasia, P., Natarajan, K. A. (2010). Adhesion of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to mineral surfaces. *International Journal of Mineral Processing*, 94(3), 135-139.
2. Rohwerder, T., Sand, W. (2007). Mechanisms and biochemical fundamentals of bacterial metal sulfide oxidation. In *Microbial processing of metal sulfides* (pp. 35-58). Springer Netherlands.
3. Ramírez-Aldaba, H., Valles, O. P., Vazquez-Arenas, J., Rojas-Contreras, J. A., Valdez-Pérez, D., Ruiz-Baca, E., Lara, R. H. (2016). Chemical and surface analysis during evolution of arsenopyrite oxidation by *Acidithiobacillus thiooxidans* in the presence and absence of supplementary arsenic. *Science of The Total Environment*, 566, 1106-1119.
4. García-Meza, J. V., Fernández, J. J., Lara, R. H., González, I. (2013). Changes in biofilm structure during the colonization of chalcopyrite by *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(13), 6065-6075.
5. Takeuchi, T. L., Suzuki, I. (1997). Cell Hydrophobicity and Sulfur Adhesion of *Thiobacillus thiooxidans*. *Applied and environmental microbiology*, 63(5), 2058-2061.