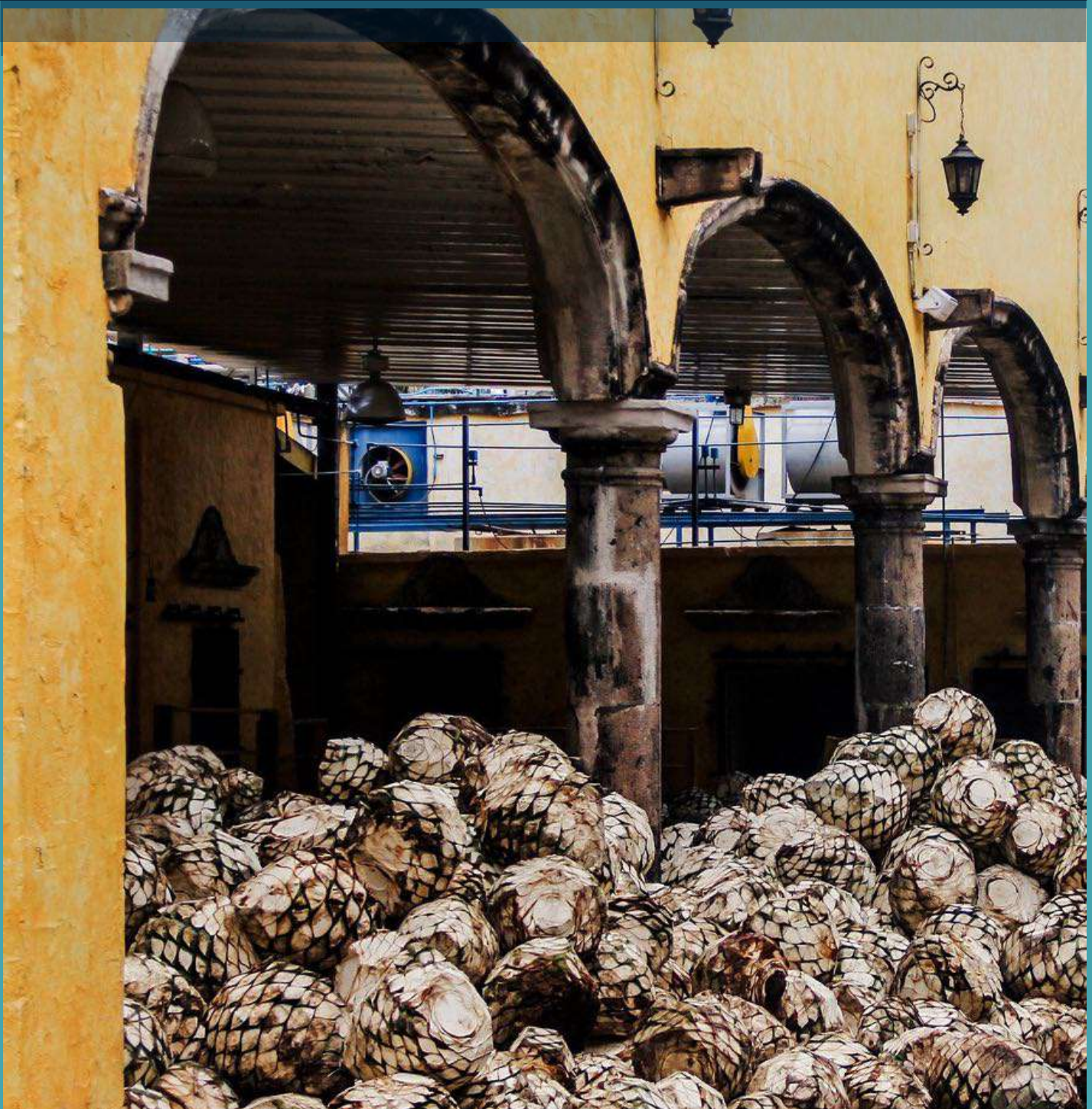




# CIENCIA E INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

VOLUMEN 4, NÚMERO 2, ENERO-JUNIO 2023.



CIENCIA E INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO,  
Volumen 4, Número 2, enero-junio 2023.

Reserva del Derecho al Uso Exclusivo No. 04-2019-070812475100-203, ISSN: 2683-2771



## **C O N T E N I D O**

<b>ARTÍCULO CIENTÍFICO</b>	
<b>OBTENCIÓN DE BIOPÉPTIDOS MEDIANTE FERMENTACIÓN LÁCTICA DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DEL FRIJOL BAYO AZTECA</b> Reyes-Bautista, R.; Hernández-Mendoza, G.; Xoca-Orozco, L.A.; Flores Sierra, J.J.	1-17
<b>AISLAMIENTO Y CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LEVADURAS PRESENTES EN VINAZAS TEQUILERAS</b> Regalado-Aguirre, J.A.; Lona-Elorza, M.; López-Caamal, F.; Cea-Barcia, G.E.	18-35
<b>EFFECTO INFLAMATORIO EN CRÍAS DE HEMBRAS CON DIABETES MELLITUS GESTACIONAL CON CONSUMO ELEVADO DE SACAROSA</b> Aguilar-Rodríguez, E.; Martínez-Carrillo, B.E.; Valdés-Ramos, R.; Reséndiz-Albor, A.A.; Rosales-Gómez C.A.	36-50
<b>IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES ANIMALES PRESENTES EN GELATINAS COMERCIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA PCR.</b> Cedillo-Nieto, J.T.; Montiel-Sosa, J.F.; Sánchez-Mendoza, A.E.; Moreno-Lara, J	51-60
<b>CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIGNOCELULOLÍTICA DE UN HONGO XILÓFAGO NO REPORTADO</b> Juárez-Hernández, E.O.; Molina-Calderón, C.C.	61-81
<b>DETECCIÓN DE MALEZAS POR MEDIO DEL RECONICIMIENTO DE COLOR Y SU INTEGRACIÓN EN UNA APLICACIÓN MÓVIL</b> Duque-Vázquez, E.F.; Rostro-González, H.; Sánchez-Yáñez, R.E.; Saldaña-Robles, N.; Cepeda-Negrete, J.	82-98
<b>ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE FLUORURO EN SUELO VERTISOL CRÓMICO DEL ESTADO DE GUANAJUATO Y SU USO POTENCIAL PARA REMEDIACIÓN DEL AGUA</b> Solis Reyes, K.F.; Saldaña Robles, A.; Zanor, G.A.; García, M.G.; Saldaña Robles, N.	99-106

## Consejo Editorial

Dr. Braulio Edgar Herrera Cabrera  
**Colegio de Postgraduados  
Campus Puebla, México**

Dr. José Luis Trejo Espino  
**CeProBi-IPN, Mexico**

Ph.D. Julio S. Bernal  
**TEXAS A&M, USA**

Ph.D. Sandra Flores García  
**Université Laval, Canadá**

Mtra. Anna Faucher  
**ONG Let's Food, Francia**

Ph.D. Julie V. Stanton  
**Penn State Brandywine**

## Comité Editorial

### Director

Dr. Jesús Hernández Ruíz

### Editor en Jefe

Dra. Ana Isabel Mireles Arriaga

### Editores Asociados

Dr. Jorge Eric Ruiz Nieto  
Dra. Paula C. Isiordia Lachica

### Asistentes

Dr. Alberto Saldaña Robles  
Dr. Ricardo Alberto Rodríguez Carbajal

Contacto de soporte

✉ reiagro@ugto.mx

☎ 01(462) 624 1889 ext 5225, 5221



**CIENCIA E INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA  
DE LA UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**



Campus Irapuato-Salamanca

División de Ciencias  
de la Vida  
Departamento de  
Agronomía



Las opiniones expresadas en este documento son de exclusiva responsabilidad de los autores, y no reflejan necesariamente los puntos de vista de la Universidad de Guanajuato, Consejo Editorial y Comité Editorial de la revista. Es responsabilidad del autor el uso de las ilustraciones, el material gráfico y el contenido creado para esta publicación.

CIENCIA E INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO, Volumen 4, No. 02, enero-junio 2023, es una publicación semestral editada por la Universidad de Guanajuato, Lascaráin de Retana 5, Col. Centro, Guanajuato, Gto, C.P. 36000, Tel (473)730006, a través del Cuerpo académico I+D para el sector agroalimentario de la División de Ciencias de la Vida de la Universidad de Guanajuato del Campus Irapuato-Salamanca [www.reiagro.ugto.mx](http://www.reiagro.ugto.mx), [reiagro@ugto.mx](mailto:reiagro@ugto.mx). Editores responsables: Jesús Hernandez Ruiz y Ana Isabel Mireles Arriaga. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2019-070812475100-203, ISSN: 2683-2771, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este Número, Dirección de Comunicación y Enlace Universidad de Guanajuato, Ing. Vicente Chávez Aguilera.

## OBTENCIÓN DE BIOPÉPTIDOS MEDIANTE FERMENTACIÓN LÁCTICA DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DEL FRIJOL BAYO AZTECA <sup>a</sup>

### OBTAINING BIOPEPTIDES THROUGH LACTIC FERMENTATION OF THE RESERVE PROTEINS OF BAYO AZTECA BEANS

Reyes-Bautista, R.<sup>1\*</sup>; Hernández-Mendoza, G.<sup>1</sup>; Xoca-Orozco, L.A.<sup>1</sup> y Flores-Sierra, J.J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México/ITS Purísima del Rincón. Blvd. del Valle No. 2301, Guardarrayas, C.P. 36425, Purísima del Rincón, Guanajuato, México.

\* E-mail: raul.rb@purisima.tecnm.mx (Autor de correspondencia)

Fecha de envío: 13, enero, 2023

Fecha de publicación: 30, junio, 2023

#### Resumen:

Las enfermedades crónico-degenerativas representan hoy en día un problema de salud pública. Los componentes de los alimentos como lo son las proteínas han demostrado que pueden ejercer un efecto benéfico a la salud cuando se liberan secuencias encriptadas mediante la hidrólisis enzimática o por acción de microorganismos. En el presente estudio se evaluó la capacidad de generar péptidos con actividad antidiabética y antihipertensiva, a través de la inhibición *in vitro* de las enzimas DPP-IV y ECA, respectivamente. La obtención de péptidos se realizó mediante fermentación láctica de la fracción proteínica del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Bayo Azteca y *Lactobacillus sporogenes*. El crecimiento de *L. sporogenes* fue de  $6.30 \times 10^8$  UFC/mL, el máximo grado de inhibición fue de 63.21%, los valores de inhibición de la DPP-IV y la ECA fueron 67.89 y 42.16 %, respectivamente. La purificación mediante Sephadex G-15 mostró cuatro principales fracciones: F-I (26.9 kDa), F-II (16.2 kDa), F-III (2.3 kDa) y F-IV (0.85 kDa), se encontró que las fracciones de menor peso molecular (entre 7-9 aminoácidos) son las que presentaron mayor potencia de inhibición. Para F-IV los valores de IC<sub>50</sub> fueron de  $74.5 \pm 2.81$  y  $101.81 \pm 5.54$  mg/mL, para la inhibición de la DPP-IV y ECA respectivamente. Estos resultados son altamente prometedores para la realización de hidrolizados proteínicos mediante fermentación láctica de fuentes de proteínas subutilizadas como las del frijol.

**Palabras clave:** Biopéptidos, frijol, hidrolizados proteínicos, actividad antidiabética, actividad antihipertensiva

---

<sup>a</sup> El presente estudio fue un proyecto de investigación financiado por el TecNM

## Abstract:

Chronic-degenerative diseases represent today a public health problem. Food components such as proteins have shown that they can have effects that benefit health when encrypted sequences are released through enzymatic hydrolysis or by the action of microorganisms. In this study we will explain the ability to generate peptides with antidiabetic and antihypertensive activity was evaluated through in vitro inhibition of the DPP-IV and ACE enzymes, respectively. Peptides were obtained by lactic fermentation of the protein fraction of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Bayo Azteca and *Lactobacillus sporogenes*. The growth of *L. sporogenes* was  $6.30 \times 10^8$  CFU/mL, the maximum degree of inhibition was 63.21%, and the inhibition values of DPP-IV and ACE were 67.89 and 42.16%, respectively. Purification by Sephadex G-15 showed four main fractions: F-I (26.9 kDa), F-II (16.2 kDa), F-III (2.3 kDa) and F-IV (0.85 kDa). It was found that the fractions with the lowest molecular weight (between 7-9 amino acids) are the ones that presented the greatest potency of inhibition. For F-IV the IC<sub>50</sub> values were  $74.5 \pm 2.81$  and  $101.81 \pm 5.54$  mg/mL, for DPP-IV and ACE inhibition respectively. These results are highly promising for the realization of protein hydrolysates by lactic fermentation of underutilized protein sources such as those beans.

**Keywords:** Biopeptides, beans, protein hydrolysates, antidiabetic activity, antihypertensive activity.

## INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que ocurrieron 41 millones de muertes en 2016 debido a enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), lo que representa el 71% del total mundial de 57 millones de muertes. Las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes son las cuatro enfermedades principales que explican la mayoría de las muertes, con 17.9 millones (44 %), 9.0 millones (22 %), 3.8 millones (9 %) y 1.6 millones (4 %) de muertes, respectivamente (WHO, 2018; de Fátima Garcia et al., 2021).

La diabetes y la hipertensión están altamente asociadas y se consideran problemas de salud pública mundial debido a su alta incidencia. Según la Federación Internacional de Diabetes (IDF, 2021), hay 537 millones de personas con diabetes en todo el mundo. La diabetes gestacional, la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2 (DM2) son los tres tipos principales de esta enfermedad, donde esta última, es la responsable de alrededor del 90% de todos los casos. Además, la diabetes puede provocar enfermedades cardiovasculares, amputaciones, insuficiencia renal y ceguera, debido a los niveles persistentemente altos de glucosa en sangre que provocan un daño vascular generalizado que afecta al corazón, los nervios, los

riñones y los ojos. Con respecto a la hipertensión, la incidencia es aún mayor, al presentarse 1,130 millones en 2015, así mismo la hipertensión también es un factor de riesgo importante para las enfermedades cardiovasculares y la enfermedad renal crónica (WHO, 2018; Sun et al., 2022; Zhou et al., 2017).

En este contexto, cabe mencionar que algunos compuestos vegetales y animales pueden tener una influencia positiva en la salud humana, al actuar en tejidos o células específicas, a estos se les ha denominado compuestos bioactivos (Astley & Finglas, 2016).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) representa uno de los alimentos de mayor importancia en México, ya que junto con el maíz aportan prácticamente la totalidad de las proteínas vegetales que consumen los estratos sociales de bajos ingresos de la ciudad y del campo, los cuáles ocupan un lugar predominante dentro de la dieta. El contenido nutricional de los frijoles hace de ellos uno de los alimentos más importantes para la prevención y/o regulación de muchas enfermedades y padecimientos presentes en el perfil epidemiológico de la población: enfermedades cardiovasculares, diabetes, sobrepeso y obesidad, cáncer de colon, entre otras (Carmona-García et al., 2007).

El frijol es considerado una leguminosa con alto contenido en proteína (14 – 33%), en las últimas décadas, el frijol común ha sido considerado como un alimento nutracéutico por su contenido en compuestos bioactivos como polifenoles, almidón resistente, oligosacáridos, fracción no digerible y péptidos bioactivos (Campos-Vega et al., 2013; Luna Vital et al., 2014). Algunos estudios han demostrado que las secuencias peptídicas encriptadas en sus proteínas poseen capacidad antihipertensiva, antioxidante y anticancerígena (Luna Vital et al., 2014; Valdez-Ortiz et al., 2012).

Varios estudios *in vitro*, *in vivo* y clínicos han revelado que el consumo de frijol común está asociado a una reducción significativa del riesgo y/o incidencia de enfermedades no transmisibles. Por ejemplo, al incluir el frijol como parte de la dieta, es capaz de reducir los niveles de obesidad (Barrett & Udani, 2011), modular los procesos cardiovasculares (Ariza-Ortega et al., 2014), agente quimiopreventivo (Thompson et al., 2012), así como mejorar las complicaciones de la diabetes tipo 2 (Hernández-Saavedra et al., 2013).

Bayo Azteca, es la primera variedad mejorada de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), con resistencia a una plaga insectil (picudo del ejote, *Apion godmani* Wagner); la cuál ha sido obtenida por el programa de frijol del Campo Experimental Valle de México, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por cruza múltiple (Garza-García et al., 2010).

La enzima Dipeptidil Peptidasa - IV (DPP-IV) es una glicoproteína de membrana plasmática de 110 kDa que pertenece a la familia de las prolil oligopeptidasas (Nong & Hsu, 2021). Esta enzima funcional es responsable de la degradación de las hormonas incretinas, el péptido 1 análogo al glucagón (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP); dichas hormonas están relacionadas con la homeostasis de la glucosa en sangre, ya que son liberadas después de la ingesta de alimentos y son responsables de promover la secreción de insulina hasta aproximadamente un 60% de la insulina total de las células  $\beta$  pancreáticas, regulando así la glucosa en sangre posprandial (Andersen et al., 2018; Deacon, 2018; Yan et al., 2019).

La enzima convertidora de angiotensina (ECA), es responsable de la activación de un vasoconstrictor (angiotensina-II decapeptido) y la degradación de un vasodilatador (bradicinina), lo que provoca un aumento de la presión arterial. Por lo tanto, la inhibición de la ECA es uno de los enfoques establecidos en el tratamiento de la hipertensión (Daskaya-Dikmen et al., 2017).

Existen diversos trabajos donde se han utilizado enzimas para hidrolizar fracciones proteínicas *in vitro*, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el proceso de fermentación láctica como un método para producir péptidos inhibidores de la DPP-IV y ECA, derivados de la fracción de proteínas del frijol Bayo Azteca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestra biológica

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Bayo Azteca, fue obtenido del Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), cosechado en el año 2019, en el campo Santa Lucía. Los granos de frijol fueron sometidos a una molienda seca utilizando un molino IKA A-10 Basic, la harina obtenida se pasó a través de un tamiz con un tamaño de malla 60 (250  $\mu$ m).

### **Extracción de la fracción proteínica de las semillas de frijol**

Las proteínas de las semillas del frijol fueron extraídas siguiendo el método descrito por Betancur-Ancona *et al.* (2004) con algunas modificaciones, el procedimiento se basa en la solubilización de la fracción proteínica con una posterior precipitación mediante el punto isoeléctrico. Para ello se utilizó 300 g de harina de frijol, la cual se colocó en solución acuosa en una relación (1:6 p/v), adicionando NaOH (1M), para ajustar el pH a 11, la mezcla se mantuvo en agitación constante (150 rpm), durante 60 min, a continuación, la suspensión se hizo pasar a través de un tamiz de malla 80 para separar los sólidos de fibra de la porción líquida que contendrá proteína y almidón. Se utilizó agua destilada para lavar el sólido residual. La suspensión resultante se pasó de nuevo a través de un tamiz de malla 80. Los sobrenadantes de los dos filtrados se mezclaron y la fibra residual se descartó. Los sobrenadantes se pasaron a través de un tamiz húmedo de malla 150 para eliminar la fibra más fina. Esta suspensión filtrada se dejó sedimentar durante 30 min para recuperar el almidón precipitado, el sobrenadante tendrá la proteína solubilizada. Para las proteínas solubilizadas, el pH se ajustará a 4.5 con HCl 1M y luego se centrifugó (13000 g x 15min a 4°C), se descartó el sobrenadante y se liofilizó el precipitado.

### **Fermentación de las fracciones proteínicas del grano de frijol**

A partir de un cultivo comercial de probióticos, se aisló la bacteria *Lactobacillus sporogenes*, el cual se sembró en medio MRS. El medio de cultivo para la fermentación se realizó según lo reportado por Ayala-Niño *et al.* (2019) con algunas modificaciones, se utilizó glucosa (20 g/L), la concentración de proteína (40 g/L), para cada una de las fracciones seleccionadas, el medio se enriqueció con citrato de amonio (2 g/L), sorbitán monoleato (0.01 g/L), acetato de sodio (5 g/L) y fosfato dipotásico (2 g/L). Durante la cinética de fermentación se monitoreo cada 3 h, durante 15 h, la muestra se centrifugó y el sobrenadante se almacenó (-20 °C) para realizar los análisis de recuento en placa, medición del pH, cuantificación de proteína soluble (Lowry *et al.*, 1951), grado de hidrólisis y bioactividad.





### **Grado de hidrólisis (GH)**

Se analizó GH para grupos amino libres, según el método descrito por Adler-Nissen (1979). Se añadió 1 ml de tampón fosfato 0.5 M, pH 8.2 y 1 ml de solución de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico en agua (1 mg/ml) a 125 µl de proteína hidrolizada entre 3 y 15 h. La mezcla de reacción se incubó durante 1 h a 50 °C en la oscuridad debido a que la luz acelera la reacción. La trinitrofenilación se detuvo mediante la adición de 2 ml de HCl 0.1 N; la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 30 min; la absorbencia se leyó a 340 nm frente al agua. El blanco se preparó de la misma manera. El GH se calculó de mediante la ecuación (1).

$$\% GH = (h/h_{tot}) \times 100 \quad (1)$$

Donde  $h$  es la hidrólisis evaluada por la acción microbiana a través del tiempo y  $h_{tot}$  es la hidrólisis completa de la proteína (evaluada con HCl 6N, 121 °C durante 24 h)

### **Cromatografía de exclusión molecular**

La caracterización del peso molecular de los hidrolizados obtenidos, se llevó a cabo mediante cromatografía de filtración en gel utilizando una columna de exclusión molecular (Tovar-Pérez et al., 2009). Se utilizaron una columna Sephadex G-15 (1.4 x 29 cm; Pharmacia, Uppsala, Suecia) y un sistema Pharmacia LKB FPLC (Uppsala, Suecia). 500 µL de proteínas hidrolizadas (15 mg/mL) se disolvieron en una solución de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 32.5 mM-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.6 mM, pH 7.5, que contenía NaCl 0.4 M y 2-mercaptoetanol 20 mM, se inyectaron y eluyeron con el mismo tampón a 0.3 mL/min. Se midieron las fracciones a 214 nm en un lector de microplacas (Multi Skan SKY, ThermoFisher Scientific), se recolectaron fracciones de 0.5 ml. Se utilizó un marcador de peso molecular de rango ultrabajo (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., EE. UU.), que contenía triosa fosfato isomerasa 26.6 kDa; mioglobina 17 kDa; α-lactoalbúmina 14.2 kDa; aprotinina 6.5 kDa; insulina 3.5 kDa; bradicinina 1.06 kDa. Las fracciones peptídicas recogidas se liofilizaron y almacenaron a -20 °C hasta su análisis.



### Actividad antidiabética

La actividad de la enzima hipoglucemiante (*in vitro*) se realizó mediante la inhibición de la enzima DPP-IV (D4943; Sigma–Aldrich; St. Louis, MO, USA). El ensayo se realizó de acuerdo a Ketnawa *et al.* (2019) con algunas modificaciones. Las muestras se reconstituyeron en tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8.0) a concentraciones de 5, 10 y 20 mg de proteína por mL (0.0125, 0.125 y 1.25 mg mL<sup>-1</sup> como concentración final del ensayo). Cada muestra de ensayo a diferentes concentraciones (25 µL) se preincubó con 25 µL de sustrato Gly-Pro-p-nitroanilida (gly-pro- pNA, 6 mM) en una microplaca de 96 pozos a 37 °C durante 10 min, después de lo cual se añadieron 50 µL de DPP-IV recombinante humana (4.50 unidades·mL<sup>-1</sup>) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 60 min. La reacción enzimática se terminó añadiendo 100 µl de tampón de acetato de sodio 1 M (pH 4.0), y la absorbencia de la p-nitroanilida (PN) liberada se midió a 405 nm utilizando un lector de microplacas (Multi Skan SKY, ThermoFisher Scientific). Cada muestra de ensayo se analizó por triplicado, y los valores de absorbencia se corrigieron para los blancos de la muestra en los que la DPP-IV se sustituyó por el tampón Tris-HCl (100 mM, pH 8.0). El control positivo (actividad de la DPP-IV sin inhibidor) y el control negativo (sin actividad de la DPP-IV) se prepararon utilizando tampón Tris-HCl (100 mM, pH 8.0) en lugar de la muestra y la solución de DPP-IV. El grado de inhibición se determinó mediante la ecuación (2).

$$(\%) \text{ inhibición DPP - IV} = \left\{ \frac{1 - [A_{405}(\text{muestra}) - A_{405}(\text{blanco})]}{[A_{405}(\text{control positivo}) - A_{405}(\text{control negativo})]} \right\} \times 100 \quad (2)$$

Utilizando como control (+) en buffer (DPP-IV sin inhibidor), control (-) (DPP-IV sin actividad). Los ensayos fueron analizados por triplicado.

### Actividad antihipertensiva

La actividad antihipertensiva (*in vitro*) de las fracciones se evaluó por inhibición de la actividad de la ECA-I. Para la inhibición de la ECA, se utilizó Hippuryl-His-Leu (HHL) como sustrato según el método de Ketnawa *et al.* (2019) con ligeras modificaciones. La mezcla de reacción contenía 10 µL de cada muestra de ensayo a diferentes concentraciones de proteína (1.25, 2.5 y 5 mg de proteína por mL)

disuelta en tampón fosfato sódico 100 mM (pH 8.3) que contenía 300 mM de NaCl, 25  $\mu$ L de HHL 5 mM y 80  $\mu$ L (5 mU) de ECA. En la mezcla de reacción de control, se utilizaron 10  $\mu$ L de solución tampón en lugar de la muestra de ensayo. Las muestras de sustrato e hidrolizado se mezclaron y se incubaron a 37 °C durante 5 minutos. La ECA también se mantuvo a 37 °C durante 5 min. Se mezclaron ambas soluciones y se incubaron de nuevo a 37 °C durante 80 minutos en un baño de agua bajo agitación constante (160 oscilaciones por minuto). La reacción enzimática se detuvo añadiendo 50  $\mu$ L de HCl 1 M. El ácido hipúrico (HA) liberado se cuantificó por HPLC utilizando una columna analítica C18 (YMC Pack ODS AM 12505-2546WT, YMC América, Inc., Allentown, PA, USA). El volumen de inyección fue de 50  $\mu$ L y la muestra se eluyó a un flujo de 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. Como fases móviles se utilizaron agua con 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) eluyente A y acetonitrilo con 0.1% (v/v) de TFA (eluyente B). La columna se desarrolló con un 20% de eluyente B durante 5 minutos, seguido de un gradiente lineal de 60% de eluyente B durante los siguientes 15 minutos. La elución se mantuvo de forma isocrática al 60% de eluyente B durante 4 minutos y luego se volvió a la composición inicial del eluyente B al 20% durante 2 minutos, con una duración total de 26 minutos. Los picos de elución de HA y HHL se leyeron a 228 nm. El grado de inhibición se determinó mediante la ecuación (3).

$$(\%) \text{ inhibición ECA} = \left\{ \left( 1 - \frac{A_{\text{inhibidor}}}{A_{\text{control}}} \right) \right\} \times 100 \quad (3)$$

Donde  $A_{\text{inhibidor}}$  y  $A_{\text{control}}$  expresan las áreas relativas (A) del pico de HA de los ensayos realizados con y sin inhibidores de la ECA, respectivamente. Los ensayos fueron analizados por triplicado.

### Determinación del valor IC<sub>50</sub>

Los valores de concentración inhibitoria media-máxima (IC<sub>50</sub>) se calcularon de acuerdo con lo reportado por Tovar-Pérez et al. (2009) representando gráficamente el logaritmo de la concentración de ambas fracciones proteínicas aisladas (mg/mL) frente a la actividad inhibitoria de las enzimas DPP-IV (%) y ECA (%).

## Análisis estadístico

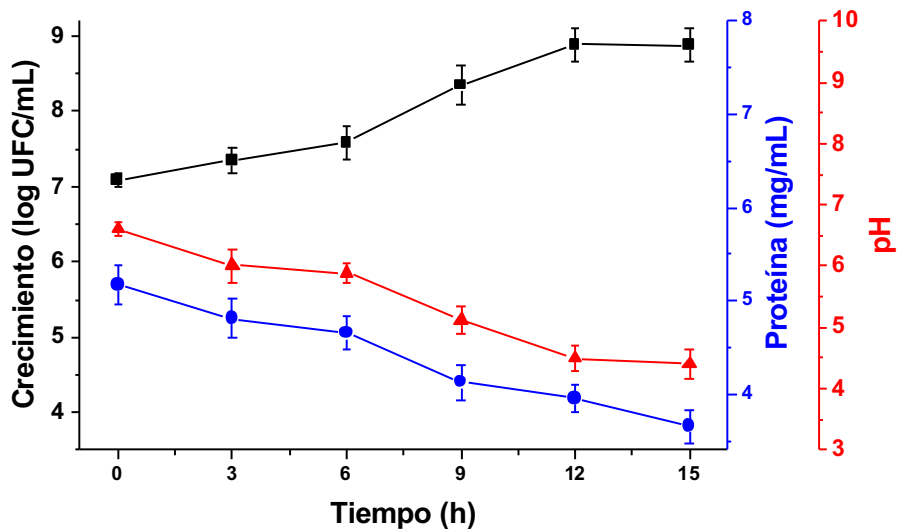
Todos los análisis se realizaron por triplicado y fueron expresados como el valor medio  $\pm$  la desviación estándar. Los datos se analizaron mediante la prueba de ANOVA de una vía para determinar los efectos de los tratamientos y las diferencias entre los valores medios se compararon mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . El programa estadístico empleado fue Minitab 18 (State College, PA 16801, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestra la cinética de fermentación del cultivo de *L. sporegenes*, se puede observar que a partir de las 12 h de fermentación no existieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el conteo viable alcanzándose un valor de  $6.30 \times 10^8$  UFC/mL. EL valor del pH descendió en dos unidades de 6.61 a 4.4 y el contenido de proteína bajo de 5.17 a 3.65 mg/mL derivado del proceso de fermentación láctica, lo cual indica que *L. soporogenes* utilizó la fracción de proteínas del frijol Bayo Azteca como fuente de nitrógeno. Rui *et al.* (2015) realizando un estudio en frijol blanco con cuatro tipos de cepas de genero *Lactobacillus* (*L. bulgaricus*, *L. helveticus* MB2-1, *L. plantarum* B1-6, y *L. plantarum* 70810), encontraron un comportamiento similar en el crecimiento microbiano utilizando la fuente de proteína de las semillas de este tipo de frijol, la tasa de disminución del pH indica el aumento en el crecimiento de las cepas. Algunos estudios previos demostraron que la disminución del pH dependía de la cepa (Zhang et al., 2014). Esto se atribuyó principalmente a las discrepancias en la actividad metabólica y los requisitos de crecimiento de las diferentes cepas (Elfahri et al., 2014).

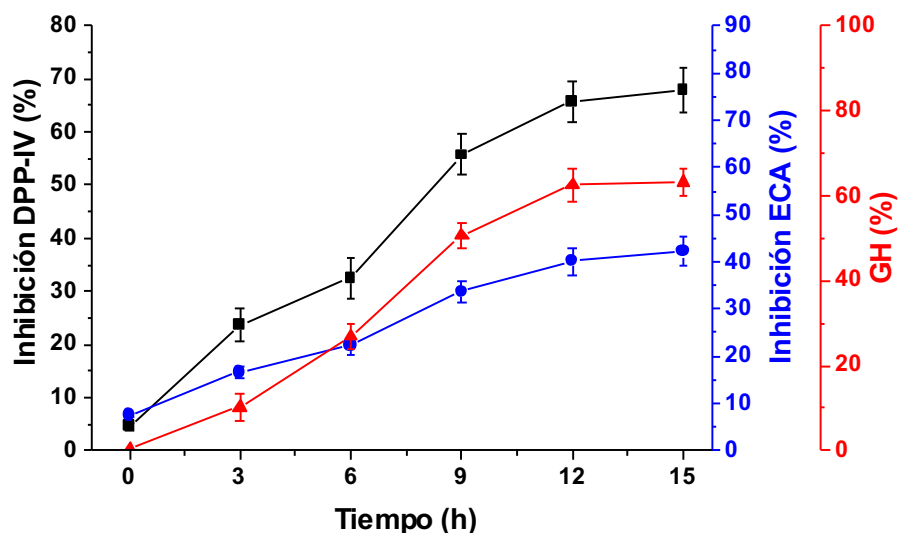
En la Figura 2 se presenta la cinética del grado de hidrólisis, determinado por la exposición de los grupos amino libres, este parámetro fue significativo ( $p \leq 0.05$ ) a lo largo de la hidrólisis con un valor máximo de  $63.21 \pm 3.15$  % (dentro de las primeras 12h de fermentación), sin embargo después de las 12 h de fermentación este parámetro no presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Se encontró a las 15 h de fermentación la inhibición de la DPP-IV de  $67.89 \pm 4.09$  % y la inhibición de la ECA fue de  $42.16 \pm 2.99$  %. Wu *et al.* (2018) realizaron la fermentación en estado sólido de avena integral (*Avena sativa* L.), la cual se inoculó con

*Lactobacillus plantarum* B1-6, *Rhizopus oryzae* y la combinación de ambos, los autores encontraron que el valor máximo del grado de hidrólisis (GH) para la avena co-inoculada fermentada fue 6.06%, mientras que el GH para la avena que se inoculó con *R. oryzae* fue 1.42 veces menor, estos resultados indican que en nuestro caso el grado de hidrólisis alcanzado fue 10 veces mayor en comparación con la avena integral. Ayala-Niño *et al.* (2019) reportaron que la mayor actividad de inhibición de la ECA se obtuvo en hidrolizados de proteína total del amaranto la cual se hidrolizó mediante fermentación ácido-láctica con *Lactobacillus casei* Shirota y *Streptococcus thermophilus* 54102 en monocultivo a las 36 h de fermentación, sus resultados finales revelaron que una mayor concentración de grupos amino se relacionó con una mayor actividad antihipertensiva de  $38.38 \pm 0.98$  (36 h),  $36.14 \pm 1.32$  (32 h),  $45.22 \pm 0.28$  (36 h), para *Lactobacillus casei* Shirota, *Streptococcus thermophilus* 54102 y cultivo combinado, respectivamente.



**Figura 1.** Cinética de fermentación de la fracción proteínica del frijol Bayo Azteca inoculado con *L. sporogenes*. Cuadros negros viabilidad microbiana (log UFC/mL), círculos azules proteína (mg/mL) y triángulos rojos valores de pH a lo largo de la fermentación.

**Figure 1.** Fermentation kinetics of the protein fraction of Bayo Azteca beans inoculated with *L. sporogenes*. Black boxes microbial viability (log CFU/mL), blue circles protein (mg/mL) and red triangles pH values throughout the fermentation.

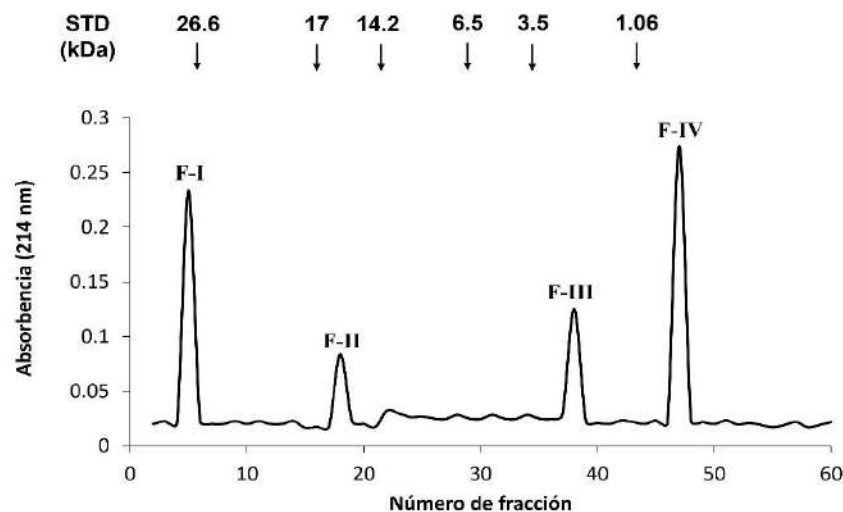


**Figura 2.** Evaluación del grado de hidrólisis (rombos rojos), inhibición de la DPP-IV (cuadros negros) y ECA (círculos azules) a lo largo de la fermentación con *L. sporogenes*, para la fracción proteínica del frijol Bayo Azteca.

**Figure 2.** Evaluation of the degree of hydrolysis (red diamonds), inhibition of DPP-IV (black squares) and ACE (blue circles) throughout the fermentation with *L. sporogenes*, for the protein fraction of Bayo Azteca beans.

La separación cromatográfica (Figura 3) del hidrolizado de 15 h de fermentación reveló cuatro principales fracciones: F-I (26.9 kDa), F-II (16.2 kDa), F-III (2.3 kDa) y F-IV (0.85 kDa). Esto indica que son péptidos entre 7-9 aminoácidos, donde algunos autores han reportado que estas secuencias pueden actuar de diferentes formas: i) causando un impedimento estérico en el sitio activo de la enzima, mediante formación de enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, entre otras, ii) podrían competir por el sitio activo de la enzima y causar inhibición del tipo competitiva, etc. (Nong & Hsu, 2021; Vilcacundo et al., 2017).





**Figura 3.** Perfil de elución por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-15 del hidrolizado de 15h de la fracción proteínica del frijol Bayo Azteca. STD, estándar de proteínas; kDa, peso molecular del estándar de proteínas.

**Figure 3.** Elution profile by size exclusion chromatography on Sephadex G-15 of the 15h hydrolyzate of the protein fraction of Bayo Azteca bean. STD, protein standard; kDa, molecular weight of the protein standard.

Los valores de  $IC_{50}$ , que es la concentración de proteína/péptido que causa el 50% de inhibición enzimática, para las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular donde se encontró que el hidrolizado completo H-15h presentó un valor de  $IC_{50}$  de  $74.5 \pm 2.81$  y  $101.81 \pm 5.54$  mg/mL, para la inhibición de la DPP-IV y ECA, respectivamente, no se encontró efecto de inhibición de las fracciones F-I y F-II, para ninguna de las enzimas analizadas. Las fracciones de bajo peso molecular mostraron una mayor capacidad de inhibición, F-IV (0.85 kDa) de  $0.32 \pm 0.01$  y  $1.41 \pm 0.15$  mg/mL para la inhibición de la DPP-IV y ECA, respectivamente. La fracción F-IV presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), para los valores de  $IC_{50}$  para las enzimas DPP-IV y ECA. Las diferencias encontradas entre los valores de  $IC_{50}$  encontradas en este estudio se encuentran directamente relacionadas con el peso molecular, diversos autores han encontrado que los inhibidores de las enzimas DPP-IV y ECA son de tipo competitivo y que péptidos de menor peso molecular ( $< 1$  kDa) son los péptidos que presentan mayor grado de inhibición debido a que causan interferencia en el sitio catalítico de las enzimas estudiadas (Soriano-Santos et al., 2015).

**Cuadro 1.** Valores de IC<sub>50</sub> de las fracciones proteínicas/peptídicas obtenidas por cromatografía de exclusión molecular en Saphadex G-15 sobre la inhibición de las enzimas DPP-IV y ECA.

**Table 1.** IC<sub>50</sub> values of the protein/peptide fractions obtained by size exclusion chromatography on Saphadex G-15 on the inhibition of DPP-IV and ACE enzymes.

Fracción proteínica/ peptídica	IC <sub>50</sub> * (mg/mL)	
	DPP-IV	ECA
H-15h	74.5 ± 2.81 <sup>*a</sup>	101.81 ± 5.54 <sup>a</sup>
F-I	ND*	ND
F-II	ND	ND
F-III	13.09 ± 1.84 <sup>b</sup>	27.84 ± 1.98 <sup>b</sup>
F-IV	0.32 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.41 ± 0.15 <sup>c</sup>

\*El valor de IC<sub>50</sub> fue determinado por análisis de regresión lineal del % inhibición vs. log de la concentración de péptido (mg/mL).

\*No detectado bajo las condiciones del ensayo.

\*Los datos representan la media ± la desviación estándar de las determinaciones realizadas por triplicado.

Letras diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas (p<0.05).

## CONCLUSIÓN

El frijol al ser una fuente económica y de fácil acceso para la población de bajos recursos económicos, podría ser una alternativa dirigida, para ser utilizado durante la prevención y/o regulación de muchas enfermedades crónico-degenerativas. El buscar alternativas para poder coadyuvar el control de glucosa en sangre en personas con diabetes mellitus tipo 2 así como la reducción en la presión arterial en personas con hipertensión, permitiría tener un mejor control de estas enfermedades, que actualmente se encuentran fuera de control y que son problema de salud pública. En este estudio se encontró que la variedad de frijol Bayo Azteca presenta grandes cualidades, entre las que se encuentran la capacidad para inhibir la DPP-IV y ECA (de forma *in vitro*), mediante tecnología de fermentación láctica de las proteínas de reserva de esta variedad, por lo que se podrían utilizar este tipo de hidrolizados para el control de la diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión, de manera complementaria al tratamiento farmacológico y la dieta.



## LITERATURA CITADA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- Andersen, E. S., Deacon, C. F., & Holst, J. J. (2018). Do we know the true mechanism of action of the DPP-4 inhibitors? *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 20(1), 34–41. <https://doi.org/10.1111/dom.13018>
- Ariza-Ortega, T. de J., Zenón-Briones, E. Y., Castrejón-Flores, J. L., Yáñez-Fernández, J., Gómez-Gómez, Y. de las M., & Oliver-Salvador, M. del C. (2014). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory, antimicrobial, and antioxidant effect of bioactive peptides obtained from different varieties of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with in vivo antihypertensive activity in spontaneously hypertensive rats. *European Food Research and Technology*, 239(5), 785–794. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2271-3>
- Astley, S., & Finglas, P. (2016). Nutrition and Health. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03425-9>
- Ayala-Niño, A., Rodríguez-Serrano, G. M., Jiménez-Alvarado, R., Bautista-Avila, M., Sánchez-Franco, J. A., González-Olivares, L. G., & Cepeda-Saez, A. (2019). Bioactivity of Peptides Released During Lactic Fermentation of Amaranth Proteins with Potential Cardiovascular Protective Effect: An In Vitro Study. *Journal of Medicinal Food*, 22(10), 976–981. <https://doi.org/10.1089/jmf.2019.0039>
- Barrett, M. L., & Udani, J. K. (2011). A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutrition Journal*, 10(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-24>
- Betancur-Ancona, D., Gallegos-Tintoré, S., & Chel-Guerrero, L. (2004). Wet-fractionation of *Phaseolus lunatus* seeds: partial characterization of starch and protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10), 1193–1201. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1804>
- Campos-Vega, R., Oomah, B., Loarca-Piña, G., & Vergara-Castañeda, H. (2013). Common Beans and Their Non-Digestible Fraction: Cancer Inhibitory Activity—An Overview. *Foods*, 2(3), 374–392. <https://doi.org/10.3390/foods2030374>
- Carmona-García, R., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Tovar, J., & Bello-Pérez, L. A. (2007). Composition and effect of soaking on starch digestibility of *Phaseolus vulgaris* (L.) cv. 'Mayocoba.' *International Journal of Food Science & Technology*, 42(3), 296–302. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01218.x>

- Daskaya-Dikmen, C., Yucetepe, A., Karbancioglu-Guler, F., Daskaya, H., & Ozcelik, B. (2017). Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Peptides from Plants. *Nutrients*, *9*(4), 316. <https://doi.org/10.3390/nu9040316>
- Deacon, C. F. (2018). Peptide degradation and the role of DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Peptides*, *100*, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.10.011>
- de Fátima Garcia, B., de Barros, M., & de Souza Rocha, T. (2021). Bioactive peptides from beans with the potential to decrease the risk of developing noncommunicable chronic diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *61*(12), 2003–2021. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768047>
- Elfahri, K. R., Donkor, O. N., & Vasiljevic, T. (2014). Potential of novel *Lactobacillus helveticus* strains and their cell wall bound proteases to release physiologically active peptides from milk proteins. *International Dairy Journal*, *38*(1), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.03.010>
- Garza-García, R., Jacinto-Hernández, C., & Garza-García, D. (2010). Bayo Azteca, primera variedad mejorada de frijol con resistencia a *Apion godmani* Wagner. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, *1*(5), 651–656. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342010000500001&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342010000500001&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Hernández-Saavedra, D., Mendoza-Sánchez, M., Hernández-Montiel, H. L., Guzmán-Maldonado, H. S., Loarca-Piña, G. F., Salgado, L. M., & Reynoso-Camacho, R. (2013). Cooked Common Beans (*Phaseolus vulgaris*) Protect Against  $\beta$ -cell Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*, *68*(2), 207–212. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0353-1>
- Ketnawa, S., Suwal, S., Huang, J., & Liceaga, A. M. (2019). Selective separation and characterisation of dual ACE and DPP - IV inhibitory peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) protein hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(4), 1062–1073. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13939>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265–275. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
- Luna Vital, D. A., González de Mejía, E., Dia, V. P., & Loarca-Piña, G. (2014). Peptides in common bean fractions inhibit human colorectal cancer cells. *Food Chemistry*, *157*, 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.050>
- Nong, N. T. P., & Hsu, J.-L. (2021). Characteristics of Food Protein-Derived Antidiabetic Bioactive Peptides: A Literature Update. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17), 9508. <https://doi.org/10.3390/ijms22179508>

- Rui, X., Wen, D., Li, W., Chen, X., Jiang, M., & Dong, M. (2015). Enrichment of ACE inhibitory peptides in navy bean (*Phaseolus vulgaris*) using lactic acid bacteria. *Food & Function*, 6(2), 622–629. <https://doi.org/10.1039/C4FO00730A>
- Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., Stein, C., Basit, A., Chan, J. C. N., Mbanya, J. C., Pavkov, M. E., Ramachandaran, A., Wild, S. H., James, S., Herman, W. H., Zhang, P., Bommer, C., Kuo, S., Boyko, E. J., & Magliano, D. J. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 183, 109119. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>
- Thompson, M. D., Mensack, M. M., Jiang, W., Zhu, Z., Lewis, M. R., McGinley, J. N., Brick, M. A., & Thompson, H. J. (2012). Cell signaling pathways are associated with reducing mammary cancer burden by dietary common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Carcinogenesis*, 33(1), 226–232. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr247>
- Valdez-Ortiz, A., Fuentes-Gutiérrez, C. I., Germán-Báez, L. J., Gutiérrez-Dorado, R., & Medina-Godoy, S. (2012). Protein hydrolysates obtained from Azufrado (sulphur yellow) beans (*Phaseolus vulgaris*): Nutritional, ACE-inhibitory and antioxidative characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.021>
- Vilcacundo, R., Martínez-Villaluenga, C., & Hernández-Ledesma, B. (2017). Release of dipeptidyl peptidase IV,  $\alpha$ -amylase, and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 35, 531–539. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.024>
- World Health Organization. (2018). World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. World Health Organization.
- Wu, H., Rui, X., Li, W., Xiao, Y., Zhou, J., & Dong, M. (2018). Whole-grain oats (*Avena sativa* L.) as a carrier of lactic acid bacteria and a supplement rich in angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides through solid-state fermentation. *Food & Function*, 9(4), 2270–2281. <https://doi.org/10.1039/C7FO01578J>
- Yan, J., Zhao, J., Yang, R., & Zhao, W. (2019). Bioactive peptides with antidiabetic properties: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(6), 1909–1919. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14090>
- Zhang, S., Shi, Y., Zhang, S., Shang, W., Gao, X., & Wang, H. (2014). Whole soybean as probiotic lactic acid bacteria carrier food in solid-state fermentation. *Food Control*, 41, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.026>

Zhou, B., Bentham, J., di Cesare, M., Bixby, H., Danaei, G., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Singh, G., Hajifathalian, K., Bennett, J. E., Taddei, C., Bilano, V., Carrillo-Larco, R. M., Djalalinia, S., Khatibzadeh, S., Lugero, C., Peykari, N., Zhang, W. Z., Lu, Y., ... Zuñiga Cisneros, J. (2017). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. *The Lancet*, 389(10064), 37–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31919-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31919-5)



AISLAMIENTO Y CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LEVADURAS PRESENTES  
EN VINAZAS TEQUILERAS<sup>a</sup>ISOLATION AND GROWTH KINETIC OF YEAST PRESENT IN TEQUILA  
VINASSESRegalado-Aguirre, J.A.<sup>1</sup>; Lona-Elorza, M<sup>3</sup>.; López-Caamal, F.<sup>2</sup>; Cea-Barcia, G.  
E.<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida. Universidad de Guanajuato. Ex Hacienda El Copal S/N, El Copal, Irapuato, Guanajuato, México.

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria alta s/n, Guanajuato, Guanajuato, México. Tel. 473-732-00-06 ext. 1455

<sup>3</sup>Departamento de Ciencias Ambientales, División de Ciencias de la Vida. Universidad de Guanajuato. Ex Hacienda El Copal S/N, El Copal, Irapuato, Guanajuato, México. Tel. 462-624-18-89 ext.5226 \*E-mail: glendacea@ugto.mx (autor por correspondencia)

Fecha de envío: 05, enero, 2023

Fecha de publicación: 30, junio, 2023

**Resumen:**

Durante la elaboración del tequila, obtenido de la fermentación de jugo de agave, se generan aguas residuales conocidas como vinazas, las cuales contienen elevada carga orgánica, pH ácido, fenoles, furfurales y otros compuestos que en conjunto dificultan su tratamiento y elevan los costos del proceso de producción. Ante esto, la economía circular, funge como una alternativa para la reutilización de las vinazas como materia prima para la producción de etanol por medio de levaduras. Sin embargo, las vinazas contienen compuestos inhibitorios del crecimiento levaduriforme, por lo cual, resulta necesario utilizar levaduras mejor adecuadas a estas condiciones. Debido a esto, la propuesta del presente trabajo consiste en el aislamiento de una levadura presente en vinazas tequileras y determinar su cinética de crecimiento con el fin de evaluar su uso posterior en una biorrefinería para la producción de etanol a partir de vinazas. Las levaduras se aislaron por el método de diluciones seriadas en medio sólido Agar dextrosa Sabouraud (SDA). Posteriormente, el crecimiento celular fue evaluado en un caldo Yeast-extract Peptone Dextrose (YPD) a tres concentraciones de glucosa, 10, 60 y 90 g/L y se determinó el rendimiento de sustrato en masa ( $Y_x/s$ ) y la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ). La velocidad específica de crecimiento fue similar,  $\approx 0.2 \text{ h}^{-1}$ , para las concentraciones de glucosa evaluadas. El mayor valor en rendimiento  $Y_x/s$  fue de  $0.140 \pm 0.025 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{glucosa}}$  a 10 g/L y el mayor porcentaje de remoción de sustrato fue alcanzado a 90 g/L ( $99.79 \pm 0.03\%$ ). Dada la gran capacidad de la levadura para metabolizar el sustrato y convertirlo rápidamente a biomasa resulta ser una levadura apta para su uso en fermentación alcohólica con la proyección a su uso en economía circular de residuos tequileros.

**Palabras clave:** fermentación alcohólica, vinazas tequileras, valorización de residuos, economía circular, levaduras.

<sup>a</sup> Material base de proyecto de tesis de maestría con enfoque en “Economía circular de vinazas tequileras”.

## Abstract:

During the production of tequila, obtained from the fermentation of agave juice, wastewater known as vinasse is generated, which contains a high organic load, acid pH, phenols, furfural and other compounds that together hinder the treatment of the wastewaters and increase the production cost. In view of this, the circular economy, is an alternative for the reuse of vinasses as a raw material for ethanol production by means of yeasts. However, stillage contains compounds that inhibit yeast growth, so it is necessary to use yeasts that are better suited to these conditions. Therefore, the proposal of the present work consists of isolating a yeast present in tequila vinasses and determining its growth kinetics in order to evaluate its subsequent use in a biorefinery for the production of ethanol from vinasses. Yeasts were isolated by the method of serial dilutions in solid Sabouraud dextrose agar (SDA) medium. Subsequently, cell growth was evaluated in Yeast-extract Peptone Dextrose (YPD) broth at three glucose concentrations, 10, 60 and 90 g/L and the mass substrate yield ( $Y_{x/s}$ ) and specific growth rate ( $\mu$ ) were determined. The specific growth rate was similar,  $\approx 0.2 \text{ h}^{-1}$  for the glucose concentrations evaluated. The highest value in  $Y_{x/s}$  yield was  $0.140 \pm 0.025 \text{ g}_{\text{biomass}}/\text{g}_{\text{glucose}}$  at 10 g/L and the highest percentage of substrate removal was achieved at 90 g/L ( $99.79 \pm 0.03\%$ ). Due to the high capacity of the yeast to metabolize the substrate and quickly convert it into biomass it is a yeast suitable for use in alcoholic fermentation with the projection of its use in the circular economy of tequila residues.

**Keywords:** alcoholic fermentation, tequila vinasses, waste valuation, circular economy, yeasts.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad la producción de tequila en México se ha elevado drásticamente por una alta demanda en el mercado nacional e internacional (Alcazar-Valle et al., 2019; CRT, 2019). Sin embargo, durante su producción, se obtienen aguas residuales conocidas como vinazas tequileras, las cuales presentan alto contenido de materia orgánica, pH ácido, compuestos orgánicos recalcitrantes y compuestos como fenoles y furfurales que actúan como inhibidores del crecimiento celular de bacterias y levaduras (Dos Reis et al., 2018; Sánchez et al., 2019; Rodríguez-Romero et al., 2020). Además, se ha visto que las vinazas son altamente contaminantes en efluentes acuáticos y en suelos cuando se desechan sin control alguno (Moran-Salazar et al., 2016; Sousa et al., 2019; Martínez-Orozco et al., 2020; Díaz-Vázquez et al., 2022).

No obstante, la mayor parte de los estudios sobre vinazas que se han desarrollado a la fecha presentan una tendencia mayormente limitada a procesos de tratamiento y remediación. Debido a esto, es necesario un abordaje en términos de economía circular para reutilizar estas aguas residuales y obtener otros productos de valor

agregado utilizando levaduras en sistemas conocidos como biorrefinerías, mencionando también una posible disminución del impacto ambiental generado por estos residuos (Alemán-Nava et al., 2017; Cabañas et al., 2019; Sánchez et al., 2019; Rodríguez-Romero et al. 2020; Tsegaye et al., 2020).

Las levaduras son organismos eucariotas unicelulares pertenecientes al filo Ascomycetos, del orden de los *Saccharomycetales* del cual, el género *Saccharomyces* ha resultado de vital importancia desde tiempos remotos (Suh et al., 2006) y en la actualidad son la base de una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas e industriales (Suárez-Machín et al., 2016; Parapouli et al., 2020). En la actualidad, *Saccharomyces cerevisiae* se ha definido como el principal modelo de estudio eucariota por su genoma de menor tamaño y baja cantidad génica (Parapouli et al., 2020) y ha sido comúnmente utilizado en la industria alimenticia como levadura para la panificación (Chiva et al., 2020) o en la producción de bebidas (Suh et al., 2006; Parapouli et al., 2020). Por otro lado, se ha diversificado su uso para producción de vitaminas (Perli et al., 2020), producción de moléculas proteínicas con fines nutrimentales (Díaz-Vázquez et al., 2022) o lípidos para producción de biocombustibles (Hoarau et al., 2018; Abeln y Chuck, 2021) y la producción de bioetanol (Basso et al., 2008; Jansen et al., 2017; da Silva Fernandes et al., 2022) entre los más destacados.

Recientemente se han desarrollado diversos procesos de revalorización de residuos por levaduras, dando especial importancia a levaduras silvestres, las cuales se encuentran adecuadas a las condiciones estresantes propias de la naturaleza y además presentan un gran potencial para la conversión de residuos que por su composición compleja resultan difícil de tratar por métodos de tratamiento convencionales. Bajo el mismo tenor, es importante destacar que dependiendo la complejidad de los residuos generados, generalmente se deben utilizar métodos combinados de tratamiento que a su vez encarecen los costos totales del proceso previo a su desecho (Cabañas et al., 2019; Alcazar-Valle et al., 2018).

A pesar de que las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* presentan características favorables para su uso en general como una alta capacidad para soportar concentraciones elevadas de etanol, altas temperaturas, en algunos casos altas concentraciones de azúcares o niveles de pH ácidos (Favaro et al., 2019; Prado et al., 2020; da Silva Fernandes et al., 2022); constantemente se han aislado

cepas silvestres con características fisiológicas similares e incluso superiores a lo observado en levaduras comerciales de uso común. Como menciona Parapouli (2020), el estudio de levaduras silvestres brinda más información acerca de los mecanismos de supervivencia y conductuales que se ponen en funcionamiento bajo las distintas condiciones ambientales presentes en la naturaleza, que las levaduras crecidas en laboratorio bajo condiciones ambientales controladas las cuales a nivel industrial generalmente presentan grandes diferencias respecto a levaduras silvestres (Favaro et al., 2019; da Silva Fernandes et al., 2022).

En este sentido, y con la finalidad de desarrollar un proceso de economía circular como alternativa a los procesos de tratamiento costosos y lentos, el propósito del presente trabajo consiste en el aislamiento de levaduras presentes en vinazas tequileras y la evaluación de su crecimiento en un medio de cultivo estándar mediante la determinación de su tasa de crecimiento y la tendencia en el consumo de sustrato que permitan además, proyectar su uso en biorrefinerías para producción de etanol utilizando vinazas tequileras como medio de cultivo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Vinazas tequileras**

Las levaduras utilizadas en este trabajo se aislaron de una muestra simple de vinazas colectada en un tanque de decantación de una destiladora tequilera ubicada en Atotonilco el Alto, Jalisco, México.

Las levaduras aisladas fueron caracterizadas macroscópicamente y microscópicamente y se expresaron como morfología colonial y celular respectivamente. Además, la vinaza utilizada se caracterizó fisicoquímicamente determinando pH, azúcares reductores residuales, fenoles y furfurales totales, sólidos suspendidos totales (SST) y volátiles (SSV) y la demanda química de oxígeno (DQO).

### **Aislamiento y propagación de microorganismos**

Para el aislamiento de las levaduras se utilizó medio sólido agar dextrosa sabouraud (MCD Lab, Méx.).

Para la propagación se utilizó caldo de cultivo YEPD Yeast-extract peptone dextrose (BD Bioxon, Méx.).



Para la evaluación de las cinéticas de crecimiento levaduriforme se utilizó caldo de cultivo YEPD Yeast-extract peptone dextrose enriquecido con dextrosa al 1%, 6% y 9% (BD Bioxon, Méx.).

El aislamiento se inició partiendo de 1 ml de vinaza y llevado a 5 diluciones seriadas 1/10 inoculando en nuevas placas de medio sólido SDA, e incubando a 30 °C, durante 48 h. Las sucesivas resiembras en medio sólido SDA se resembraron con un asa metálica por el método de agotamiento de inóculo a 30 °C cada siete días. Para la propagación, se empleó medio de cultivo líquido YPD, en 100 mL se inoculó una colonia de levadura de una placa de medio SDA, se incubó a 30 °C con agitación a 0.7267 g (100 rpm) por 48 h, similar a lo realizado por Hemansi et al. (2022) con algunas modificaciones. Este fue el medio inicial de propagación. Para continuar con la propagación, nuevo medio líquido YPD fue inoculado al 10 % v/v con medio inicial de propagación bajo las mismas condiciones de crecimiento. Este medio sirvió a su vez como inóculo para nuevo medio líquido YPD y de manera similar se desarrollaron las sucesivas resiembras en medio de propagación.

### **Caracterización macroscópica y microscópica**

De una placa con medio SDA, correspondiente a resiembra de la segunda generación de crecimiento, se tomó una colonia y se realizó un frotis fijado con calor y teñido con azul de lactofenol. Se determinó el tamaño celular aproximado mediante el Software libre Zeiss Zen3.4 Blue edition (Zeiss Microscopy, Ger). Asimismo se observó la morfología macroscópica colonial en estereoscopio para la descripción de tamaño, forma, márgenes, propiedades ópticas y elevación.

### **Monitoreo de las cinéticas de crecimiento**

En matraces con caldo YDP (300 mL) con concentración de dextrosa de 10, 60 o 90 g/L se inocularon al 10% w/v con una concentración celular en etapa exponencial (24 h) de  $25 \times 10^6$  células/mL (conteo en Cámara de Neubauer), a 30 °C, con agitación a 0.7267 g, por 30 h similar a lo desarrollado por Arrizon y Gschaedler (2006). Se tomaron muestreos de 3 mL para medición de etanol, azúcares reductores y biomasa cada 2 h durante las primeras 12 h de fermentación, posteriormente se tomaron muestreos a las 24, 30 y 36 h.

El crecimiento celular inicial y final se determinó por recuento directo en cámara Neubauer. La tasa específica de crecimiento se calculó con la linealización por logaritmo natural de la ecuación de crecimiento exponencial (Ec. 1) ajustada al modelo de Monod tomando el valor de la pendiente de la ecuación de la recta como el valor para  $\mu$ -velocidad específica de crecimiento (Ec. 2), el porcentaje de sustrato consumido (Ec. 3) y el rendimiento en masa  $Y_{x/s}$  (Ec. 4), calculados mediante las siguientes ecuaciones:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu t \quad (2)$$

$$\% \text{ Consumo de sustrato} = \frac{(S_i - S_f)}{S_i} * 100 \quad (3)$$

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (4)$$

Donde  $X$  es la concentración de biomasa,  $X_0$  es la concentración inicial de biomasa,  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento y  $t$ , el tiempo final que delimita la fase exponencial.  $X_i$  y  $X_f$  corresponden a la concentración inicial y final de biomasa en peso seco mientras tanto  $S_i$  y  $S_f$  son la concentración de sustrato inicial y final.

Los azúcares se determinaron por el método DNS (reacción azúcar-ácido 3,5-dinitrosalicílico) efectuándose en tubos con 0.5 mL de muestra y 0.5 mL de solución DNS, incubándose a 100 °C durante 5 minutos, enfriando en agua fría por 5 minutos, agregando 4 mL de agua y midiendo absorbancia a 540 nm (Miller, 1959) y se determinó la concentración con una curva de calibración con dextrosa como estándar. El peso seco se determinó acorde a la norma mexicana NMX-034-SCFI-2015 con algunas modificaciones. En tubos eppendorf previamente secados a  $105 \pm 5$  °C y pesados ( $P_0$ ), se colocaron 2 mL de muestra y se llevaron a centrifugación (1118 g, 10 min). El sobrenadante se retiró y almacenó a -20 °C hasta su uso para determinación de etanol y consumo de sustrato y el pellet celular se lavó en dos ocasiones con solución salina llevándose a incubación a  $105 \pm 5$  °C, 24 h.

Una vez registrado el peso seco del tubo más la muestra ( $P_1$ ) y el peso seco del tubo ( $P_0$ ) se determinó el peso seco de la muestra (Ec. 5).

$$\text{Peso seco (105 }^{\circ}\text{C)} = P_1 - P_0 \quad (5)$$

Donde  $P_1$  es el peso del tubo con la muestra después de la deshidratación y  $P_0$  es el peso del tubo después de la deshidratación.

### **Técnicas analíticas**

El pH se determinó con un potenciómetro Hanna HI2020 acorde a las indicaciones del fabricante (Hanna Instruments Inc. ) y la demanda química de oxígeno mediante un kit Hach 8000 (COD, Hach Company). Los compuestos fenólicos totales se determinaron por el método Folin-Ciocalteu (Ruíz-Nieto, comunicación personal) en tubos con 187  $\mu\text{L}$  de muestra mezclados con 1406  $\mu\text{L}$  de reactivo Folin-Ciocalteu (10% volumen/volumen) dejándose en reposo por 5 min. Pasado este tiempo se agregaron 1406  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio (20% peso/volumen) dejándose en reposo a temperatura ambiente durante 1 h. Pasado el tiempo se midió absorbancia a 750 nm y se determinó la concentración con una curva de calibración con ácido gálico como estándar. La concentración de sólidos suspendidos totales y volátiles se determinó acorde a los métodos establecidos en la norma mexicana NMX-034-SCFI-2015, y los furfurales se determinaron conforme a lo establecido en la norma mexicana NMX-V-004-NORMEX-2013.

### **Análisis estadístico**

Se realizó un Diseño Completo al Azar variando la concentración de sustrato en 10, 60 y 90 g/L con la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), rendimiento en masa  $Y_x/s$  (g/g) y el consumo de sustrato (%) como variables de respuesta. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se realizó la prueba Shapiro-Wilks para comprobar la normalidad de los datos, y se realizó un ANOVA y la prueba de Tukey para la Comparación múltiple de medias mediante la herramienta Excel (Office 365, Microsoft, US).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización fisicoquímica de la vinaza

Para tener conocimiento de las características químicas de las vinazas tequileras se procedió a la cuantificación de los componentes mencionados en la sección “Materiales y métodos”.

**Cuadro 1.** Caracterización fisicoquímica de las vinazas utilizada.

**Table 1.** Physicochemical characterization of vinasses used.

Parámetro	Valor <sup>c</sup>
pH	3.97 ± 0.02
Azúcares reductores residuales (g/L)	4.99 ± 0.65
Fenoles totales (mg/L) <sup>a</sup>	606 ± 15.89
Furfurales (mg/L) <sup>b</sup>	11.08 ± 0.31
DQO (g/L)	32.70 ± 0.28
SST (g/L)	0.49 ± 0.02
SSV (g/L)	≈ 0.49 ± 0.01

<sup>a</sup>Expresado como mg de ácido gálico

<sup>b</sup>Expresado como mg de furfural

<sup>c</sup>Valores muestran la media y la desviación estándar de tres réplicas

Las concentraciones observadas de azúcares reductores, pH, demanda química de oxígeno y sólidos suspendidos, son acordes a lo reportado en la literatura (López-López et al., 2010; Moran-Salazar et al., 2016; Martínez-Orozco et al., 2020; Rodríguez-Romero et al., 2020; Jorge et al., 2021; Díaz-Vázquez et al., 2022). De manera similar, las concentraciones de fenol (606 mg/L) y furfural (11 mg/L), compuestos de interés por su efecto inhibitorio del crecimiento, se encontraron dentro del rango reportado en otros trabajos (García-Becerra et al., 2019; Rodríguez-Romero et al., 2020; Jorge et al., 2021) con un valor máximo de fenoles totales reportado para vinazas tequileras de 900 mg/L (García-Becerra et al., 2019) y de furfurales, 285.83 mg/L (Rodríguez-Romero et al., 2020) (Cuadro1).

Con los datos observados, se deduce que el origen de las vinazas tequileras influye en su composición ya que las diferencias en los procesos de producción de tequila causan la generación de vinazas tequileras con una composición química específica.

### Aislamiento y caracterización morfológica de la levadura

Las vinazas tequileras presentan diversidad microbiana, tal como detalla Aldrete-Tapia et al. (2020). En este trabajo se observó una gran cantidad de colonias microbianas en una muestra de vinaza cruda (Figura 1a), posiblemente como resultado de las condiciones naturales no estériles de las vinazas y de la zona donde se colectan las mismas (Cabañas et al., 2019) incluso, no se descarta que durante la fermentación del mosto estén involucrados consorcios bacteria-levadura (Aldrete-Tapia et al., 2020).

Asimismo, dentro de las diversas colonias crecidas en el medio de cultivo sólido destacaron dos cepas levaduriformes (Figura 1b), con distinta morfología como se muestra en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Características microscópicas y macroscópicas de las levaduras observadas en vinaza tequileras.

**Table 2.** Microscopic and macroscopic characteristics of yeast observed in tequila vinasses.

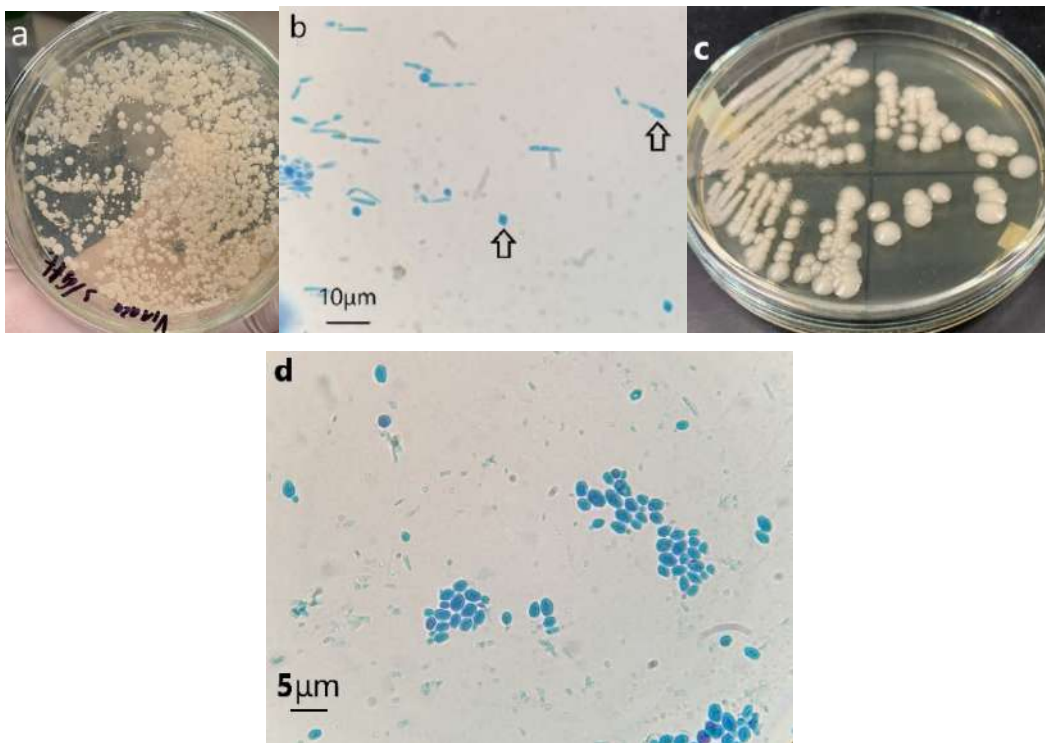
		<b>Cepa 1</b>	<b>Cepa 2</b>
<b>Morfología microscópica<sup>a</sup></b>	<b>Forma</b>	<b>Ovalada alargada</b>	<b>Circular ovalada</b>
	<b>Tamaño</b>	<b>1-2 <math>\mu\text{m}</math></b>	<b>2-3 <math>\mu\text{m}</math></b>
<b>Morfología macroscópica<sup>b</sup></b>	Borde	Irregular	Liso
	Textura	Cremosa	Cremosa
	Elevación	Plano	Con elevación
	Color	Blanco opaco	Blanco opaco
	Forma	Ondulada	Circular

<sup>a</sup>Visualización al microscopio con aumento de 40x.

<sup>b</sup>Visualización al estereoscopio con aumento 8x en medio sólido SDA.

La cepa 2 mostró mayor similitud a las características reportadas para levaduras *Saccharomyces* (Figura 1d) reportada en un estudio (Suh et al., 2006) donde se

analizó filogenéticamente la relación entre diversas levaduras y observando las similitudes morfológicas entre *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras muy relacionadas entre sí, proponiéndose como característica morfológica primordial la división por gemación y la no formación de ascosporas. Ante esto, y al haber observado la división por gemación en la cepa 2 se procedió con su aislamiento, obteniéndose de la siembra por estría de la dilución 1/10000 donde se observó una concentración de  $6 \pm 1.41 (x 10^5)$  UFC/mL, mientras tanto, las resiembras subsecuentes para purificación del cultivo se realizaron mediante siembra por estría en medio sólido SDA (Figura 1c).



**Figura 1.** Diversidad microbiana de las vinazas. a) Medio SDA con colonias bacterianas y levaduriformes, b) Morfologías levaduriformes observadas, c) Morfología macroscópica y d) morfología microscópica de la levadura aislada.

**Figure 1.** Microbial diversity of vinasses. a) SDA medium with bacterial and yeast colonies. b) Observed yeast morphologies, c) Macroscopic and d) microscopic morphology of the isolated yeast.

Con el fin de encontrar cepas de levadura con características de importancia, López-Álvarez et al. (2012) aislaron diversas levaduras y bacterias de bagazo de *Agave tequilana* webber y mosto residual de la destilación observando mayor

osmotolerancia (a 160 y 200 g/L de dextrosa) que levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de panadería. Adicional a este trabajo, Šuranská et al. (2016) analizaron distintos mostos de uva y encontraron la presencia de gran cantidad de levaduras del género *Saccharomyces* evaluando además su capacidad de tolerancia al etanol, actividad enzimática y osmotolerancia (a 200 y 400 g/L de dextrosa). En contraste, en este trabajo sólo se evaluó la osmotolerancia a un rango máximo de 90 g/L de dextrosa.

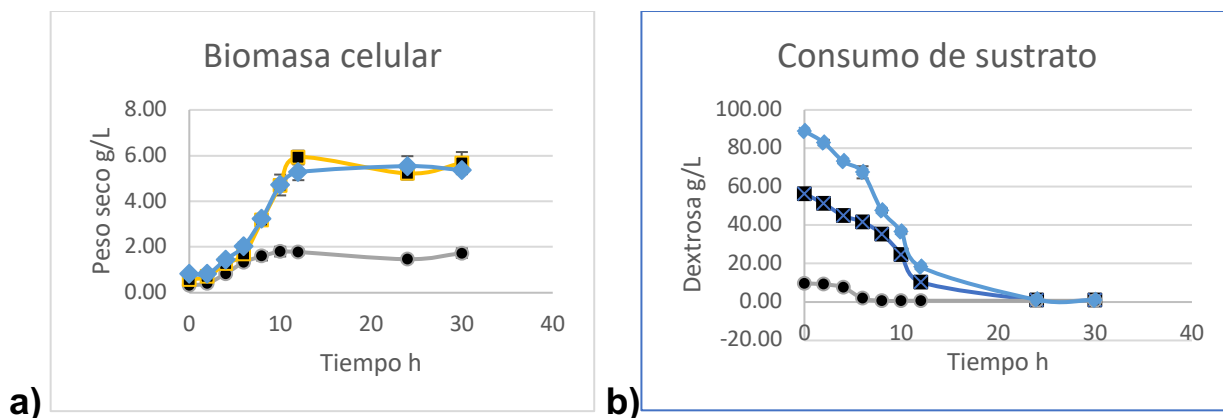
En un trabajo reciente, Chiva et al. (2020) evaluaron masas madre para panificación y lograron aislar levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* evaluando además su actividad enzimática y la capacidad de producción de CO<sub>2</sub>. Por otro lado Cabañas et al. (2019) aislaron diversas levaduras de melazas de caña de azúcar con capacidad de crecer en las vinazas obtenidas durante la producción de azúcar de caña y Prado et al. (2020) por su parte, pudieron aislar dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* termotolerantes de tanques de fermentación de melazas de caña de azúcar observando además su capacidad para crecer y fermentar en presencia de condiciones inhibitoras de crecimiento (furfurales y ácidos orgánicos). Análogamente Hemansi et al. (2022) analizaron muestras de suelo, bagazo de caña de azúcar así como muestras de frutas y aislaron diversas levaduras y observaron capacidad termotolerante (42 °C) en algunas cepas.

### **Cinética de crecimiento levaduriforme**

La levadura mostró tendencia similar en el crecimiento celular a 90 y 60 g/L alcanzando 700 millones células/mL a las 12 h, periodo que limitó la fase de crecimiento exponencial, y a 10 g/L el crecimiento máximo llegó a 400 millones células/mL (datos no mostrados). Tendencia similar se observó en la producción de biomasa alcanzando 6 g/L de biomasa celular a las 12 h en el tratamiento a 60 g/L de dextrosa (Figura 2a). Respecto al consumo de sustrato a 10 g/L de dextrosa se observó que a las 6 h la levadura consumió más del 90% del sustrato mientras que a las concentraciones de 60 y 90 g/L un consumo similar se obtuvo hasta las 24 h (Figura 2b).

Esto concuerda con lo observado por Cagnin et al. (2021) quienes usaron concentración de 92 g/L de dextrosa en un medio YNB bajo condiciones similares de crecimiento y observaron un consumo de sustrato por una cepa silvestre

*Saccharomyces cerevisiae* casi en su totalidad a las 24 h. De manera similar, Prado et al., (2020) evaluaron el crecimiento de una levadura *S. cerevisiae* en un medio YPD enriquecido a 80 g/L de dextrosa y observaron que hasta las 8 h hubo un consumo de sustrato del 62%, por el contrario, en este trabajo se observó un consumo del 52% a las 8h, a una concentración de 90 g/L.



**Figura 2.** Cinética de crecimiento. Biomasa por peso seco (a) y consumo de sustrato (b) bajo las concentraciones de 10 (●), 60 (■) y 90 g/L (◆) de dextrosa. Las barras verticales indican las desviaciones estándar de la media de las réplicas.

**Figure 2.** Growth kinetics. Biomass by dry weight (a) and substrate consumption (b) under the concentrations of 10 (●), 60 (■) and 90 g/L (◆) dextrose. Vertical bars indicate standard deviations from the mean of the replicates.

El hecho de que la levadura haya consumido casi la totalidad del sustrato del medio (Cuadro 3) representa un indicativo de robustez metabólica lo que permitió un crecimiento acelerado de la levadura. Por otro lado, es importante mencionar que no se determinó producción de etanol, sin embargo, se observó generación de espuma (datos no mostrados), lo que sugiere que hay formación de CO<sub>2</sub> lo que a su vez se relaciona estequiométricamente con la producción de etanol.

Los datos de la velocidad de crecimiento de la levadura aislada mostraron valores similares entre las tres concentraciones de sustrato evaluadas sin observarse diferencias significativas (Cuadro 3) aunque a 60 g/L la velocidad de crecimiento fue ligeramente mayor. Por lo tanto, los datos proveen la suficiente información para considerar el uso de concentraciones de sustrato de 60 a 90 g/L en futuros ensayos fermentativos sin observar cambios drásticos en el crecimiento.



**Cuadro 3.** Comparativa de los parámetros cinéticos  $\mu$ -velocidad específica de crecimiento, consumo de sustrato-%, y rendimiento en masa- $Y_{x/s}$ .

**Table 3.** Comparison of kinetic parameters  $\mu$ -specific growth rate, substrate consumption-%, and mass yield- $Y_{x/s}$ .

Glucosa g/L	$Y_{x/s}$ (g/g)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	Consumo S (%)
10	$0.140 \pm 0.025^A$	$0.223 \pm 0.014^b$	$93.310 \pm 0.170^C$
60	$0.052 \pm 0.003^a$	$0.238 \pm 0.011^b$	$98.381 \pm 0.031^c$
90	$0.053 \pm 0.001^a$	$0.220 \pm 0.022^b$	$99.799 \pm 0.003^c$

Los valores se presentan como media  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas. Superíndices en mayúscula dentro de la misma columna indican diferencias significativas (Tukey  $p < 0.05$ ).

Cabañas et al. (2019) en un estudio reciente, encontraron valores de la tasa de crecimiento entre 0.09 y 0.24  $h^{-1}$  en diversas cepas de levadura tanto *Saccharomyces* como no-*Saccharomyces* aisladas de mostos de caña de azúcar. Por otro lado, Field et al. (2015) evaluaron una cepa *Saccharomyces cerevisiae* con alta tolerancia al etanol en un medio YNB con condiciones de crecimiento similares a los presentados en este trabajo y observaron un valor de tasa de crecimiento de 0.135  $h^{-1}$ .

Referente al rendimiento en masa  $Y_{x/s}$  a la concentración de 10 g/L se obtuvo el mayor rendimiento ( $0.144_{g/g}$ ) y a las concentraciones de 60 y 90 g/L los rendimientos fueron muy similares (Cuadro 2). Esto podría deberse al hecho que a concentraciones bajas de sustrato, la levadura tiende a metabolizarlo para su crecimiento y mantenimiento celular, caso contrario ocurre a concentraciones más altas, donde la levadura ya no sólo utiliza el sustrato para su metabolismo vital sino que redirige el metabolismo del sustrato a otras rutas metabólicas para producción de metabolitos secundarios. Los datos presentan relación a lo observado en otros trabajos que reportaron rendimientos en masa de 0.38  $g/g$  (Cabañas et al., 2019), 0.15 – 0.56  $g/g$  (Rodríguez-Romero et al., 2020) y 0.11  $g/g$  (Prado et al., 2020).

## CONCLUSIÓN

Las vinazas utilizadas contienen fenoles, furfurales y pH ácido que en conjunto producen efectos ambientales negativos. Además, los datos observados durante la

caracterización morfológica sugieren que la levadura aislada se asemeja a levaduras del género *Saccharomyces*, sin embargo, resulta necesario llevar a cabo la caracterización e identificación genética de la cepa para corroborar que efectivamente corresponde a una levadura *Saccharomyces*.

Por otro lado, la levadura mostró ser una cepa robusta en cuanto al consumo de sustrato ya que consumió más del 98% del sustrato a concentraciones de sustrato elevadas lo cual la llevó a un mayor crecimiento en un tiempo corto. Si bien, está claro que la levadura debe someterse a nuevos ensayos para determinación de rendimientos fermentativos y producción etanólica, por la rapidez observada en su crecimiento resulta ser una levadura altamente viable para su uso a futuro en otros procesos fermentativos y/o en la fermentación de las mismas vinazas tequileras para la obtención de etanol, biomasa o diversos compuestos de interés económico.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación y Apoyo al Posgrado-DAIP de la Universidad de Guanajuato por el financiamiento del proyecto y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-CONACYT por la beca de Maestría otorgada al Biol. Juan Alberto Regalado-Aguirre.

## LITERATURA CITADA

Abeln, F., & Chuck, C. J. (2021). The history, state of the art and future prospects for oleaginous yeast research. *Microbial cell factories*, 20(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01712-1>

Alcazar-Valle, M., Gschaedler, A., Gutierrez-Pulido, H., Arana-Sanchez, A. & Arellano-Plaza, M. (2018). Fermentative capabilities of native yeast strains grown on juices from different Agave species used for tequila and mezcal production. *Brazilian Journal of Microbiology* 50:379–388. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00049-7>.

Aldrete-Tapia, J. A., Escalante-Minakata, P., Martínez-Peniche, R. A., Tamplin, M. L., & Hernández-Iturriaga, M. (2020). Yeast and bacterial diversity, dynamics and fermentative kinetics during small-scale tequila spontaneous fermentation. *Food microbiology*, 86, 103339. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103339>

- Alemán-Nava, G. S., Gatti, I. A., Parra-Saldivar, R., Dallemand, J. F., Ritmann, B., & Hafiz M.N. Iqbal. (2017) Biotechnological revalorization of Tequila waste and by-product streams for cleaner production – A review from bio-refinery perspective, Journal of Cleaner Production, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.07.134>
- Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2006). Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. Journal of Applied Microbiology, 0(0), 061120055200079–??? doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03142.x
- Basso, L. C., de Amorim, H. V., de Oliveira, A. J., & Lopes, M. L. (2008). Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. FEMS yeast research, 8(7), 1155–1163. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>
- Cabañas, K. T., Peña-Moreno, I. C., Parente, D. C., García, A. B., Gutiérrez, R. G., & de Moraes Jr, M. A. (2019). Selection of *Saccharomyces cerevisiae* isolates for ethanol production in the presence of inhibitors. 3 Biotech, 9(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1541-3>
- Cagnin, L., Gronchi, N., Basaglia, M., Favaro, L., & Casella, S. (2021). Selection of Superior Yeast Strains for the Fermentation of Lignocellulosic Steam-Exploded Residues. Frontiers in microbiology, 12, 756032. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.756032>
- Chiva, R., Celador-Lera, L., Uña, J. A., Jiménez-López, A., Espinosa-Alcantud, M., Mateos-Horganero, E., Vega, S., Santos, M. Á., Velázquez, E., & Tamame, M. (2020). Yeast Biodiversity in Fermented Doughs and Raw Cereal Matrices and the Study of Technological Traits of Selected Strains Isolated in Spain. Microorganisms, 9(1), 47. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010047>
- Consejo Regulador del Tequila (CRT). (2019). Análisis estadísticos. Recuperado de: [www.crt.org.mx](http://www.crt.org.mx).
- da Silva Fernandes, F., de Souza, É. S., Carneiro, L. M., Alves Silva, J. P., de Souza, J. V. B., & da Silva Batista, J. (2022). Current Ethanol Production Requirements for the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. International journal of microbiology, 2022, 7878830. <https://doi.org/10.1155/2022/7878830>
- Díaz-Vázquez, Diego & Orozco-Nunnely, Danielle & Yebra-Montes, Carlos & Senés-Guerrero, Carolina & Gradilla-Hernández, Misael. (2022). Using yeast cultures to valorize tequila vinasse waste: An example of a circular bioeconomy approach in the agro-industrial sector. Biomass and Bioenergy. 161. 106471. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106471>
- Dos Reis, K. C., Arrizon, J., Amaya-Delgado, L., Gschaedler, A., Schwan, R. F., & Silva, C. F. (2018). Volatile compounds flavoring obtained from Brazilian and

- Mexican spirit wastes by yeasts. *World journal of microbiology & biotechnology*, 34(10), 152. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2535-3>
- Favaro, L., Jansen, T., & van Zyl, W. H. (2019). Exploring industrial and natural *Saccharomyces cerevisiae* strains for the bio-based economy from biomass: the case of bioethanol. *Critical reviews in biotechnology*, 39(6), 800–816. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1619157>
- Field, S. J., Ryden, P., Wilson, D., James, S. A., Roberts, I. N., Richardson, D. J., Waldron, K. W., & Clarke, T. A. (2015). Identification of furfural resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* from a collection of environmental and industrial isolates. *Biotechnology for biofuels*, 8, 33. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0217-z>
- García-Becerra, M., Macías-Muro, M., Arellano-García, L., & Aguilar-Juárez, O. (2019). Bio-hydrogen production from tequila vinasses: Effect of detoxification with activated charcoal on dark fermentation performance. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.10.059>
- Hemansi, Himanshu, Patel, A. K., Saini, J. K., & Singhanian, R. R. (2022). Development of multiple inhibitor tolerant yeast via adaptive laboratory evolution for sustainable bioethanol production. *Bioresource technology*, 344(Pt B), 126247. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126247>
- Hoarau, J.; Grondin, I.; Caro, Y.; Petit, T (2018). Sugarcane Distillery Spent Wash, a New Resource for Third-Generation Biodiesel Production. *Water*, 10, 1623. <https://doi.org/10.3390/w10111623>
- Jansen, M. L. A., Bracher, J. M., Papapetridis, I., Verhoeven, M. D., de Bruijn, H., de Waal, P. P., van Maris, A. J. A., Klaassen, P., & Pronk, J. T. (2017). *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. *FEMS yeast research*, 17(5), fox044. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox044>
- Jorge, N., Teixeira, A. R., Matos, C. C., Lucas, M. S., & Peres, J. A. (2021). Combination of Coagulation-Flocculation-Decantation and Ozonation Processes for Winery Wastewater Treatment. *International journal of environmental research and public health*, 18(16), 8882. <https://doi.org/10.3390/ijerph18168882>
- López-Alvarez, A., Díaz-Pérez, A. L., Sosa-Aguirre, C., Macías-Rodríguez, L., & Campos-García, J. (2012). Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *Journal of bioscience and bioengineering*, 113(5), 614–618. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.12.015>



- López-López, A., Davila-Vazquez, G., León-Becerril, E., Villegas-García, E., & Gallardo-Valdez, J. (2010). Tequila vinasses: generation and full scale treatment processes. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 9(2), 109–116. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9204-9>
- Martinez-Orozco, E., Gortares-Moroyoqui, P., Santiago-Olivares, N., Napoles-Armenta, J., Ulloa-Mercado, R. G., De la Mora-Orozco, C., Leyva-Soto, L. A., Alvarez-Valencia, L. H., & Meza-Escalante, E. R. (2020). Tequila Still Distillation Fractioned Residual Streams for Use in Biorefinery. *Energies*, 13(23), 6222. <https://doi.org/10.3390/en13236222>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. doi:10.1021/ac60147a030
- Moran-Salazar, R. G., Sanchez-Lizarraga, A. L., Rodriguez-Campos, J., Davila-Vazquez, G., Marino-Marmolejo, E. N., Dendooven, L., & Contreras-Ramos, S. M. (2016). Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2410-3>
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1–31. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>
- Perli, T., Wronska, A. K., Ortiz-Merino, R. A., Pronk, J. T., & Daran, J. M. (2020). Vitamin requirements and biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 37(4), 283–304. <https://doi.org/10.1002/yea.3461>
- Prado, C. D., Mandrujano, G. P. L., Souza, J. P., Sgobbi, F. B., Novaes, H. R., da Silva, J. P. M. O., Alves, M. H. R., Eliodório, K. P., Cunha, G. C. G., Giudici, R., Procópio, D. P., Basso, T. O., Malavazi, I., & Cunha, A. F. (2020). Physiological characterization of a new thermotolerant yeast strain isolated during Brazilian ethanol production, and its application in high-temperature fermentation. *Biotechnology for biofuels*, 13, 178. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01817-6>
- Rodríguez-Romero, J. J., Aceves-Lara, C. A., Silva, C. F., Gschaedler, A., Amaya-Delgado, L., & Arrizon, J. (2020). 2-Phenylethanol and 2-phenylethylacetate production by nonconventional yeasts using tequila vinasses as a substrate. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, 25, e00420. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00420>
- Sánchez, A., Sanchez, S., Dueñas, P., Hernandez-Sanchez, P., & Guadalajara, Y. (2019). The Role of Sustainability Analysis in the Revalorization of Tequila Residues and Wastes Using Biorefineries. *Waste and Biomass Valorization*.

Waste Biomass Valor 11, 701–713. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00756-0>

- Sousa, R. M. O. F., Amaral, C., Fernandes, J. M. C., Fraga, I., Semitela, S., Braga, F., Coimbra, A. M., Dias, A. A., Bezerra, R. M., & Sampaio, A. (2019). Hazardous impact of vinasse from distilled winemaking by-products in terrestrial plants and aquatic organisms. *Ecotoxicology and environmental safety*, 183, 109493. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109493>
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1), 20–28. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>
- Suh, S. O., Blackwell, M., Kurtzman, C. P., & Lachance, M. A. (2006). Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. *Mycologia*, 98(6), 1006–1017. <https://doi.org/10.3852/mycologia.98.6.1006>
- Šuranská, H., Vránová, D., & Omelková, J. (2016). Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 47(1), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.010>
- Tsegaye, B., Jaiswal, S., & Jaiswal, A. K. (2021). Food Waste Biorefinery: Pathway towards Circular Bioeconomy. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(6), 1174. <https://doi.org/10.3390/foods10061174>



## EFFECTO INFLAMATORIO EN CRÍAS DE HEMBRAS CON DIABETES MELLITUS GESTACIONAL CON CONSUMO ELEVADO DE SACAROSA

### INFLAMMATORY EFFECT IN NEWBORN OF FEMALE MICE WITH GESTATIONAL DIABETES WITH HIGH SUCROSE INTAKE

Aguilar-Rodríguez E.<sup>1</sup>, Martínez-Carrillo B.E.<sup>1\*</sup>, Valdés-Ramos R.<sup>1</sup>, Reséndiz-Albor A.A.<sup>2</sup>, Rosales-Gómez C.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina, Paseo Tollocan esquina Jesús Carranza s/n. C.P.50180, Colonia Moderna de la Cruz, Toluca de Lerdo, Estado de México, México.

<sup>2</sup> Instituto Politécnico Nacional. Salvador Díaz Mirón esq. Plan de San Luis S/N, Miguel Hidalgo, Casco de Santo Tomas, 11340 Ciudad de México, CDMX

\* Autor de Correspondencia: martinez\_elina9@hotmail.com

Fecha de envío: 05, enero, 2023

Fecha de publicación: 30, junio, 2023

#### Resumen:

La diabetes *mellitus* gestacional (DMG) es una enfermedad que se presenta por causas multifactoriales. La alimentación saludable en este periodo es fundamental para conducirlo a un buen desarrollo y conclusión de este, motivo por el cual se debe cuidar la cantidad y calidad de nutrimentos que se consumen. La sacarosa se consume de forma habitual y en ocasiones con exceso. Se ha estudiado su efecto en diversas circunstancias, pero no su efecto en los marcadores inflamatorios de los hijos de madres con este padecimiento. Por lo tanto, el objetivo de este estudio experimental fue evaluar el efecto inflamatorio en las crías de ratonas con DMG con consumo elevado de sacarosa. Se utilizaron 24 ratones hembra de la cepa CD1, divididas en 4 tratamientos (n = 6 por tratamiento): A. Sin DMG, sin sacarosa, B. Sin DMG, con sacarosa, C. Con DMG, sin sacarosa y D. Con DMG, con sacarosa. La inducción de DMG se hizo al sexto día post-apareo, la suplementación con sacarosa se inició al día 12 post-apareo y duró hasta el final de la gestación. Las crías del tratamiento A presentaron un peso corporal mayor (1.74 g) que los otros tres tratamientos. Las crías del grupo D presentaron los valores más elevados de glucosa (106 mg/dL) en comparación con los otros tres tratamientos. En la mayoría de los casos, las crías de los tratamientos con suplementación de sacarosa (B y D) mostraron mayor concentración de citocinas proinflamatorias que su contraparte sin sacarosa. Se demuestra que la presencia de diabetes *mellitus* gestacional aunado con el consumo excesivo de sacarosa, son factores de riesgo que instauran un estado inflamatorio en el recién nacido.

**Palabras clave:** hiperglicemia en el embarazo, ingestión de azúcar, citocinas proinflamatorias

### **Abstract:**

Gestational diabetes mellitus (GDM) is a disease that occurs due to multifactorial causes. Healthy eating in this period is essential to lead to a good development and conclusion of this, which is why the quantity and quality of nutrients that are consumed must be taken care of. Sucrose is consumed regularly and sometimes in excess. Its effect has been studied in various circumstances, but not its effect on the inflammatory markers of the children of mothers with this condition. Therefore, the objective of this experimental study was to evaluate the inflammatory effect in the offspring of GDM mice with high sucrose intake. Twenty-four female mice of the CD1 strain were used, divided into 4 treatments (n = 6 per treatment): A. Without DMG, without sucrose, B. Without DMG, with sucrose, C. With DMG, without sucrose, and D. With DMG, with sucrose. GDM induction was done on the sixth day post-mating, sucrose supplementation began on day 12 post-mating and lasted until the end of gestation. The offspring from treatment A had a higher body weight (1.74 g) than the other three treatments. The offspring of group D presented the highest glucose values (106 mg/dL) compared to the other three treatments. In most cases, the newborns from sucrose supplementation treatments (B and D) showed higher concentrations of proinflammatory cytokines than their counterparts without sucrose. It is shown that the presence of gestational diabetes mellitus together with the excessive consumption of sucrose are risk factors that establish an inflammatory state in the newborn.

**Keywords:** hyperglycemia in pregnancy, sugar ingestion, proinflammatory cytokines

### **INTRODUCCIÓN**

En humanos, la diabetes *mellitus* gestacional (DMG), es una condición patológica que sucede durante el embarazo, caracterizada por presencia de hiperglicemia constante, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en la madre (Vigil de Gracia y Olmedo, 2017). Se considera un problema de salud pública, puesto que, se calcula que aproximadamente el 30% de los embarazos en el mundo presentan esta condición (OPS, 2016), mientras que en México cerca del 18% de las embarazadas sufren este padecimiento (IMSS, 2016).

Uno de los factores de riesgo que predisponen al desarrollo de DMG es la alimentación inadecuada antes y durante el embarazo (Plows et al., 2018), por lo que el consumo de nutrimentos como los hidratos de carbono debe tener un control adecuado (Mustad et al., 2020). La recomendación actual de consumo de hidratos de carbono durante la gestación es de 175 gramos al día (ADA, 2019; Feig et al., 2018; Hod et al., 2015); sin embargo, no existe una recomendación de consumo ideal de azúcares simples como la sacarosa. La mayoría de las embarazadas exceden la recomendación de 175 g/día, lo que podría ser un factor asociado en el desarrollo de la DMG.



La DMG y el consumo excesivo de sacarosa tienen efectos adversos para la salud de la madre y el hijo. Por su parte, la DMG afecta al hijo ocasionando hiperglicemias durante su etapa intrauterina, así como hiperinsulinemia e hipoglicemia al nacimiento (Lorenzo-Almorós et al., 2019; Szmuilowicz et al., 2019;), alteración en el metabolismo de lípidos, aminoácidos y purinas (Chen et al., 2018), predisposición al aumento del tamaño del tejido adiposo (Logan et al., 2017), ocasionando secreción de citocinas proinflamatorias, obesidad (Szmuilowicz et al., 2019) y síndrome metabólico (Mustad et al., 2020; Kereliuk et al., 2017; López Morales et al., 2016). Se ha documentado la expresión y efectos de citocinas proinflamatorias en la DMG como: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) (Vigil de Gracia y Olmedo, 2017), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Mustad et al., 2020) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Vuong et al., 2017).

El consumo de sacarosa también ocasiona procesos inflamatorios crónicos con incremento en la producción de marcadores como: proteína C reactiva (Della Corte et al., 2018), TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, TLR-4, NF- $\kappa$  $\beta$  (Rosas-Villegas et al., 2017), IL-10, IL-18 (Collins et al., 2018), situación que favorece la presentación de procesos oxidativos. En conjunto, se desencadena un proceso proinflamatorio de inflamación-oxidación potenciado por las condiciones fisiológicas del embarazo (González y Padrón, 2018). En ambos casos, se compromete la salud e integridad del feto, tanto al nacimiento como a mediano plazo posterior al nacimiento. La información que relaciona el consumo de sacarosa con la aparición de la DMG y sus efectos inflamatorios en el hijo ha sido poco estudiado.

Es necesario obtener información que permita emitir y desarrollar estrategias y recomendaciones en embarazadas en relación con el consumo de sacarosa. Por lo tanto, el objetivo del estudio es analizar el efecto inflamatorio en crías de ratones hembra con DMG y consumo elevado de sacarosa, evaluado mediante la cuantificación de citocinas proinflamatorias.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se trata de un estudio experimental, transversal y descriptivo realizado en 2021. Se utilizaron las crías nacidas de 24 ratonas de la cepa CD1 libres de patógenos, de 10 semanas de edad del bioterio del Laboratorio de Investigación en Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México. El cuidado

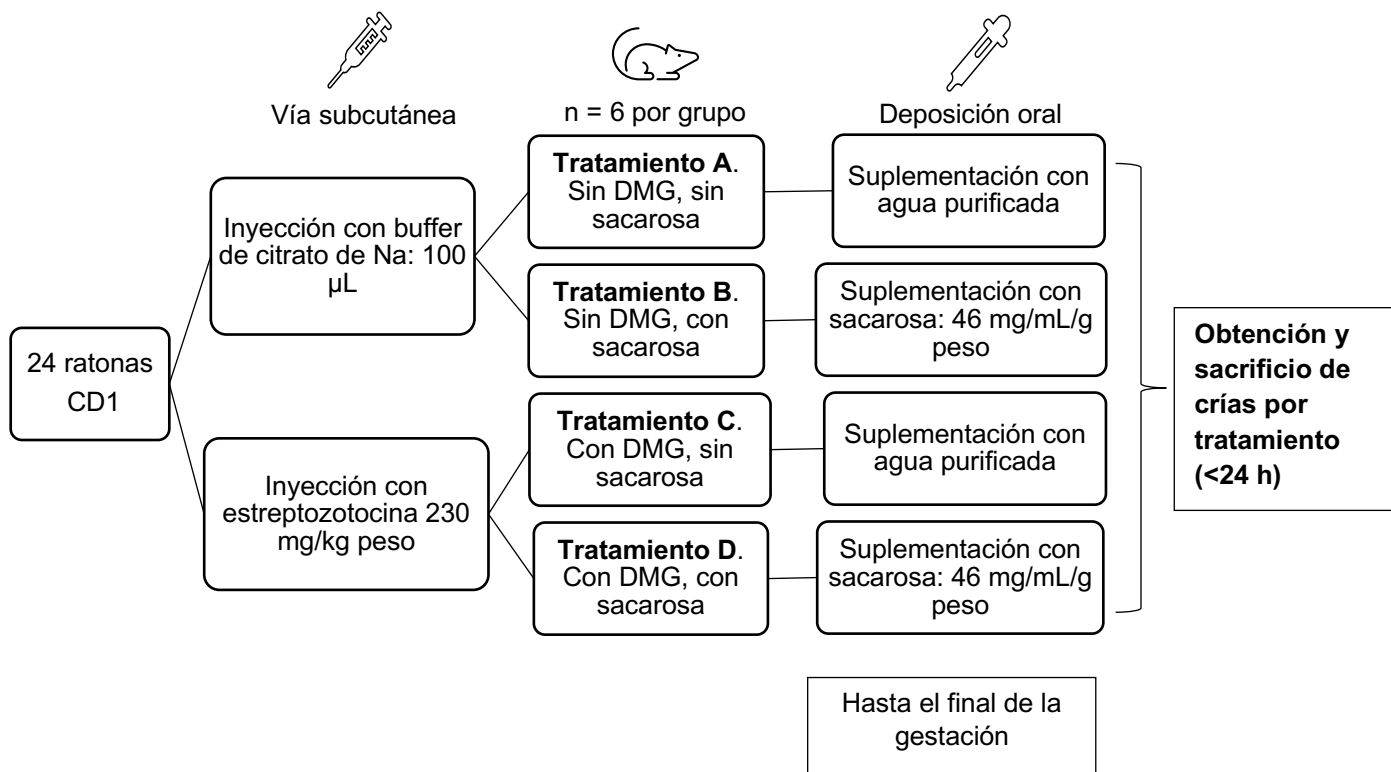
y mantenimiento de los roedores se realizó con base en lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Las ratonas se mantuvieron en alojamiento conjunto con sus crías, una por caja. Fueron alimentadas con dieta normal estándar Rodent Laboratory Chow 5001 (3.02 Kcal/g), así como agua a libre demanda; con ciclos de luz-oscuridad de 12/12 h.

Las crías se obtuvieron a partir del apareamiento de las hembras, 2 hembras con 1 macho por jaula por un periodo de 5 días. Se verificó el estado gestacional mediante citología vaginal y presencia de tapón vaginal, para confirmar que las hembras estuvieran preñadas (Byers et al., 2012).

Se realizó una distribución aleatoria de las 24 ratonas para los 4 tratamientos de asignación con una n=6 para cada grupo: A. ratonas sin DMG, sin suplementación de sacarosa; B. ratonas sin DMG, con suplementación de sacarosa; C. ratonas con DMG, sin suplementación de sacarosa y D. ratonas con DMG, con suplementación de sacarosa.

La DMG se indujo farmacológicamente con la administración de Estreptozotocina (no. catálogo 18883-66-4) con una dosis única a una concentración de 230 mg / kg de peso, que se diluyó en una solución con Buffer de Citrato (0.1M a pH 4.5) y se administró por vía subcutánea. Se monitoreó y registró durante 5 días consecutivo la glicemia matutina de las hembras. Se confirmó la DMG cuando presentó un valor de glicemia > 200 mg/dL, de acuerdo con los criterios establecidos por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Organización Mundial de la Salud (OMS; OPS, 2016). La glicemia se cuantificó con un glucómetro portátil ONETOUCH Select Plus Flex.

Para la suplementación con sacarosa de los tratamientos B y D se preparó una solución con agua purificada estéril y azúcar de mesa, a una concentración de 41.66 mg / mL, considerando las recomendaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011 Productos y servicios. Bebidas saborizadas no alcohólicas, sus congelados, productos concentrados para prepararlas y bebidas adicionadas con cafeína. Especificaciones y disposiciones sanitarias. Se administró un volumen de 500 µL de la solución de sacarosa por deposición oral diariamente a cada ratona, en un horario de 8 am durante todo el periodo de gestación a partir de la confirmación de DMG (Figura 1).



**Figura 1.** Procedimiento de obtención de muestras de crías nacidas de madres con DMG

**Figure 1.** Procedure for obtaining samples from offspring born to mothers with DMG.

Una vez concluida la gestación, se retiraron las crías y fueron sacrificadas de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-199, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, dentro de las primeras 24 h de vida. Se pesó a cada cría previo al sacrificio en báscula para ratones (Triple Beam 700/800 series). El método de sacrificio para las crías fue a través de cámara de gas con éter y la obtención de sangre fue por decapitación. Se cuantificó la concentración de glucosa en sangre posterior al sacrificio con glucómetro portátil.

La sangre fresca total de las crías sacrificadas se utilizó para las pruebas de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) mediante la técnica de citometría de flujo en el Laboratorio de Inmunología de Mucosas del Instituto Politécnico Nacional. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: PerCP anti-ratón CD4 (no. catálogo: 100538), FITC Anticuerpo anti-Mil-1 $\beta$ -IL-1F2 (no. catálogo IC4013F), PE Anticuerpo anti-ratón IL-6 (no. catálogo: 561367), PE Anticuerpo anti-ratón TNF- $\alpha$  y FITC Anticuerpo anti-ratón IFN- $\gamma$ .

Las citocinas se cuantificaron por *pool* de tres crías por muestra de sangre por cada grupo para obtener muestra suficiente, esto debido a que el volumen de sangre de la cría recién nacida es insuficiente.

Los datos obtenidos en cada medición se registraron y procesaron mediante el software estadístico SPSS versión 25 para Windows. Se obtuvo media y desviación estándar para cada variable: peso corporal, glicemia, interleucina 1- $\beta$ , interleucina 6, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  e interferón  $\gamma$  y se realizó la prueba de ANOVA de una vía, así como la prueba *post hoc* HSD Tukey para determinar entre qué tratamientos existieron diferencias. Se consideró significativamente estadístico el valor de  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

Como se observa en la tabla 1, el peso de las crías de hembras que no recibieron suplementación con sacarosa (tratamientos A y C) fue mayor que los de su contraparte con sacarosa (tratamientos B y D). El tratamiento que presentó el mayor peso corporal en promedio fue el tratamiento A. El peso corporal muestra diferencias significativas entre los 4 tratamientos ( $P = 0.001^*$ ). La diferencia fue significativa comparando los tratamientos B y D, que disminuyeron el peso corporal ( $P = 0.001^*$ ) en relación con el tratamiento A y al tratamiento C ( $P = 0.001^*$ ) (Cuadro 1). El tratamiento B tiene diferencias significativas con el tratamiento C, mas no con el D ( $P = 0.276$ ). No hay diferencias significativas cuando se comparan el tratamiento C y D ( $P = 0.187$ ).

La prueba *post hoc* mostró diferencias significativas del tratamiento A con el tratamiento B ( $P = 0.011^*$ ) y D ( $P = < 0.001^*$ ). El tratamiento B además mostró diferencias significativas con el tratamiento D ( $P = 0.015^*$ ), así como el tratamiento C mostró diferencias con el tratamiento D ( $P = 0.004^*$ ).

La glicemia presentó mayores variaciones entre los tratamientos que el peso corporal, siendo el tratamiento D quienes presentan mayor glicemia en promedio (106.0 mg/dL). No se observó que la suplementación con sacarosa sea un determinante para el valor de ésta en las crías, pero sí la presencia de la DMG, ya que en los tratamientos C y D fue mayor que en los tratamientos A y B.

La media de la glicemia es más del doble en el tratamiento C y 2.5 veces más alta en el tratamiento D, en comparación con el tratamiento B, que presenta el menor valor de glicemia en promedio. Las diferencias fueron significativas entre el tratamiento A y B ( $P = 0.012^*$ ), y A con el tratamiento C ( $P = <0.001^*$ ) y con el tratamiento D ( $P = <0.001^*$ ).

**Cuadro 1.** Características (Media  $\pm$  DE) de peso corporal y glicemia en crías de ratonas con y sin DMG por grupo de estudio.

**Table 1.** Characteristics (Mean  $\pm$  SD) of body weight and glycemias in female mouse pups with and without GDM by study group.

	Tratamiento A (n = 8)	Tratamiento B (n = 8)	Tratamiento C (n = 8)	Tratamiento D (n = 8)	Valor P*
<b>Peso corporal (g)</b>	1.74 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	1.64 $\pm$ 0.18 <sup>e</sup>	1.67 $\pm$ 0.20 <sup>f</sup>	1.54 $\pm$ 0.18	0.001*
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	73.6 $\pm$ 26.3 <sup>a, b, c</sup>	54.4 $\pm$ 30 <sup>d, e</sup>	100.6 $\pm$ 46.6	106 $\pm$ 47.2	0.001*

DE: Desviación Estándar. **Tratamiento A**= Sin DMG, **Tratamiento B**= Sin DMG + sacarosa, **Tratamiento C**= Con DMG, **Tratamiento D**= Con DMG + sacarosa. <sup>a</sup> Hay diferencia entre Tratamiento A y B, <sup>b</sup> Hay diferencia entre Tratamiento A y C, <sup>c</sup> Hay diferencia entre Tratamiento A y D, <sup>d</sup> Hay diferencia entre Tratamiento B y C, <sup>e</sup> Hay diferencia entre Tratamiento B y D, <sup>f</sup> Hay diferencia entre Tratamiento C y D.

En cuanto a la determinación de la concentración de citocinas, la IL-6 presentó el porcentaje de concentración más alto de todas las citocinas, siendo el tratamiento B con esta característica; en contraste, el IFN- $\gamma$ , tuvo el porcentaje más bajo, particularmente en el grupo B (Cuadro 2).

Por su parte, para la IL-1 $\beta$  se observa que el consumo de sacarosa no influye en los resultados pues el porcentaje del tratamiento B fue mayor que el del A, mientras que el valor del tratamiento D fue menor que el tratamiento C (Cuadro 2). De igual forma, la presencia de DMG, no es una determinante ya que los tratamientos C y D muestran menores valores que el tratamiento B. Se muestran diferencias significativas en los tratamientos ( $P= 0.001^*$ ). Al realizar la estadística *post hoc* se encuentra que hay diferencias estadísticamente significativas al comparar unos con otros, es decir el A difiere significativamente del B, C y D ( $P= 0.001^*$ ), el B difiere del C y D ( $P= 0.001^*$ ), y el C difiere del D ( $P= 0.001^*$ ).

**Cuadro 2.** Concentración (Media  $\pm$  DE) de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en linfocitos de crías de ratonas con y sin DMG por tratamiento de estudio.

**Table 2.** Concentration (Mean  $\pm$  SD) of cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in lymphocytes of mouse pups with and without GDM by study treatment.

	Tratamiento <b>A</b> (%) (n = 8)	Tratamiento <b>B</b> (%) (n = 8)	Tratamiento <b>C</b> (%) (n = 8)	Tratamiento <b>D</b> (%) (n = 8)	Valor <b>P*</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	0.39 $\pm$ 0.04 <sup>a, b, c</sup>	6.02 $\pm$ 0.79 <sup>d, e</sup>	5.00 $\pm$ 0.02 <sup>f</sup>	2.89 $\pm$ 0.20	<0.001*
<b>IL-6</b>	0.90 $\pm$ 0.15 <sup>a, b, c</sup>	11.43 $\pm$ 1.90 <sup>d, e</sup>	5.70 $\pm$ 0.05 <sup>f</sup>	7.15 $\pm$ 0.77	<0.001*
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	0.31 $\pm$ 0.09 <sup>a, b, c</sup>	2.87 $\pm$ 0.560 <sup>d, e</sup>	5.61 $\pm$ 0.02 <sup>f</sup>	7.36 $\pm$ 1.08	<0.001*
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	0.56 $\pm$ 0.08 <sup>a, b, c</sup>	3.85 $\pm$ 0.310 <sup>d, e</sup>	2.87 $\pm$ 0.87 <sup>f</sup>	10.56 $\pm$ 0.20	<0.001*

DE: Desviación Estándar. Tratamiento A= Sin DMG, sin sacarosa; Tratamiento B= Sin DMG, con sacarosa; Tratamiento C= Con DMG, sin sacarosa; Tratamiento D= Con DMG, con sacarosa. Interleucina 1 *beta* (IL-1 $\beta$ ), Interleucina 6 (IL-6), Interferón *gamma* (IFN- $\gamma$ ) y Factor de Necrosis Tumoral *alfa* (TNF- $\alpha$ ). <sup>a</sup> Hay diferencia entre Tratamiento A y B, <sup>b</sup> Hay diferencia entre Tratamiento A y C, <sup>c</sup> Hay diferencia entre Tratamiento A y D, <sup>d</sup> Hay diferencia entre Tratamiento B y C, <sup>e</sup> Hay diferencia entre Tratamiento B y D, <sup>f</sup> Hay diferencia entre Tratamiento C y D.

En los resultados de la IL-6 se observa que el consumo de sacarosa por parte de las ratonas hembras influye en los valores, ya que los tratamientos B y D muestran mayores porcentajes que su contraparte de tratamiento sin consumo de sacarosa. Además, se observa que, entre los tratamientos con sacarosa, el tratamiento B tiene mayor porcentaje del tratamiento D, aun cuando en el B no se indujo la DMG (Tabla 2). La IL-6 muestra diferencias ( $P= 0.001^*$ ) y de igual forma, existen diferencias significativas cuando se compara un grupo con los otros tres tratamientos al realizar la prueba *post hoc* ( $P= 0.001^*$ ).

Los resultados del IFN- $\gamma$  muestran un crecimiento lineal de esta citocina conforme se agregan variables como la suplementación y la DMG en el tratamientos, situación que no se replica en las otras tres citocinas. Es importante resaltar que la expresión de esta citocina en el tratamiento D es 24 veces más grande que el tratamiento A, 2.8 veces más grande que el tratamiento B y 1.3 veces más grande que el tratamiento A (Tabla 2). Los resultados del análisis estadístico muestran que existen diferencias significativas en los tratamientos ( $P= 0.001^*$ ), así mismo, las diferencias son significativas al comparar un tratamiento contra los otros tres tratamientos ( $P= 0.001^*$ , entre todos los tratamientos).

Respecto a los resultados del TNF- $\alpha$  se observa, así como sucede en la IL-6, que los mayores porcentajes corresponden a los tratamientos B y D, es decir, crías cuyas madres consumieron sacarosa durante la gestación (Tabla 2). En este caso, la estadística muestra que hay diferencias en los tratamientos ( $P= 0.001^*$ ) y que esas diferencias son significativas cuando se comparan los tratamientos entre ellos ( $P= 0.001^*$  en todos los tratamientos).

## DISCUSIÓN

Los hijos de madres que presentaron DMG presentan un peso corporal mayor al nacimiento que los hijos de madres con un embarazo normal (Szmuiłowicz et al., 2019; Vigil y Olmedo., 2017).

Sin embargo, Tsai (2020) en un modelo murino con embriones de ratón, detectó que la presencia de diabetes en las hembras podría ser un factor para un crecimiento lento intrauterino y bajo peso al nacer de los fetos, en comparación con los fetos de las ratonas que no tenían diabetes, por lo que esto es una posible explicación para el fenómeno de bajo peso al nacer de las crías del presente estudio.

Yamamoto (2018), observó pesos bajos o menores al nacimiento en hijos de madres con DMG que fueron sometidas a modificaciones dietéticas durante la gestación; no obstante, en el presente estudio, las ratonas hembras no tuvieron cambios en la dieta, por lo que se puede descartar que el peso bajo presentado por las crías de los tratamientos C y D fueron causados por cambios en la alimentación de la madre. En ocasiones, el peso bajo al nacimiento de las crías se debe a un parto prematuro, ya que, al no concluir a término la gestación el crecimiento fetal no se da adecuadamente como se vio en un estudio (Kc et al., 2015). Lo anterior mencionado no sucedió en la presente investigación, pues incluso existieron casos en los que las crías de ratonas hembras con DMG nacieron después que las crías de ratonas sin DMG, aun cuando se aparearon al mismo tiempo las madres. en los resultados del peso de las crías, en este estudio, el consumo de sacarosa influyó negativamente en éste, pues si se comparan los pesos de las crías de los tratamientos B y D, éstos fueron menores que los pesos que presentaron las crías de los tratamientos A y C, respectivamente.

En un estudio de cohorte prospectivo de Zhu et al. (2017), quienes analizaron el efecto al nacimiento y a los 7 años de vida del consumo de bebidas endulzadas con azúcar durante el embarazo sobre los hijos, se observaron que no había diferencias en el peso al nacer de los hijos entre los grupos control y aquellas mujeres que consumían menos de 1 vez a la semana, 1 a 6 veces a la semana o más de 1 vez al día estas bebidas. En contraste, en la presente investigación se observó que el peso de las crías al nacimiento de madres que consumieron sacarosa fue menor que el peso de las crías de madres que no consumieron sacarosa.

En términos del efecto de la DMG sobre la glicemia de los recién nacidos en humanos, se ha visto que éstos en ocasiones presentan una condición denominada hipoglicemia neonatal, que consiste en la disminución de la glucosa en sangre derivada de la hiperinsulinemia constante que presenta el feto aún después del parto, proveniente de la sobrecarga de glucosa que tuvo durante su etapa gestacional por las modificaciones metabólicas en el embarazo (Szmuiłowicz et al., 2019). En la presente investigación se observó lo contrario, ya que las crías de las ratonas de los grupos con DMG, con y sin suplementación de sacarosa, mostraron mayores niveles de glucosa que aquellas crías de los grupos sin DMG. Por lo anterior, es aún más importante el hecho de que se lleve a cabo un control y seguimiento a la glicemia de los hijos a corto, mediano y largo plazo, puesto que, el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 en los primeros 10 años de vida del menor aumenta conforme hubo presencia de DMG durante su gestación, además de la susceptibilidad genética y ambientes que propicien dicha enfermedad (Nijs y Benhalima, 2020).

Es poca la información que se tiene respecto a los efectos de la DMG y el consumo de sacarosa durante la gestación sobre marcadores de la inflamación como ciertas citocinas proinflamatorias. Li et al. (2016) en un estudio hecho en ratas encontraron que en las crías de las ratas con DMG y una dieta baja en grasas, los niveles de IL-1 $\beta$  se encontraban aumentados y más aumentados en aquellas crías de ratas de madres con DMG y una dieta alta en grasas y sacarosa comparados con los controles. Además, en pruebas celulares que se hicieron para evaluar la expresión de esta citocina, se encontró que las células de bazo producían 9 veces más la IL-1 $\beta$  que las crías del tratamiento testigo, incluso



después de 72 h. En esta investigación se encontró que las crías de ratonas inducidas con DMG, pero sin suplementación de sacarosa tuvieron un mayor porcentaje de IL-1 $\beta$  por millón de células en comparación con aquellas crías de ratonas con DMG y con suplementación de sacarosa.

En ese mismo estudio (Li et al., 2016) se midió y comparó la producción de TNF- $\alpha$  entre crías de ratas con DMG y el tratamiento testigo sin considerar la dieta que había recibido la hembra, encontrando que las crías del tratamiento testigo producían mayor cantidad de TNF- $\alpha$  que las crías del tratamiento con DMG; situación que en este estudio resultó ser al contrario, ya que las crías del tratamiento de ratonas sin DMG presentaron un menor porcentaje por millón de células en comparación con las crías de ratonas con DMG.

Por lo anterior, es importante considerar que en esta investigación al encontrarse valores aumentados en los tratamientos de crías de hembras con DMG y consumo de sacarosa con respecto a los tratamientos que se considerarían testigos, es decir sin DMG y sin suplementación de sacarosa, en los humanos cabe la posibilidad de que este comportamiento se replique; por lo que el seguimiento y control metabólico, nutricional y de inflamación en los recién nacidos durante las primeras etapas de la vida se debe realizar de manera puntual, principalmente por los riesgos de enfermedades como la diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, afecciones neurológicas, síndrome metabólico, entre otros (Szmuiłowicz, Josefson & Metzger, 2019; Plows et al., 2018; Vigil & Olmedo, 2017) que se mencionaron con anterioridad.

Por lo tanto, se sugiere realizar estudios postparto en los hijos de madres con estas condiciones (DMG y consumo de sacarosa) relacionándolo con patrones alimentarios de la familia y de la madre, además de un estudio prospectivo para observar los efectos de la alimentación del hijo en procesos inflamatorios con el antecedente de la DMG y el consumo de sacarosa de la madre.

## CONCLUSIÓN

La presencia de DMG aunado al consumo elevado de sacarosa durante la gestación, ocasionan en el neonato, un estado inflamatorio, que afecta de forma temprana su estado metabólico y que influirá en aumentar el riesgo de enfermedades no transmisibles como la obesidad y la diabetes mellitus.

## **Agradecimientos**

Esta investigación fue apoyada por el Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología, así como por el Laboratorio de Inmunología de Mucosas del Instituto Politécnico Nacional.

## **LITERATURA CITADA**

- American Diabetes Association. (2019). Management of diabetes in pregnancy: Standards of Medical Care in diabetes-2019. *Diabetes Care*, 42(Suppl 1), S165–S172. <https://doi.org/10.2337/dc19-S014>.
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS One*, 7(4), e35538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>
- Chen, Q., Francis, E., Hu, G., & Chen, L. (2018). Metabolomic profiling of women with gestational diabetes mellitus and their offspring: Review of metabolomics studies. *Journal of diabetes and its complications*, 32(5), 512–523. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2018.01.007>.
- Collins, K. H., Hart, D. A., Seerattan, R. A., Reimer, R. A., & Herzog, W. (2018). High-fat/high-sucrose diet-induced obesity results in joint-specific development of osteoarthritis-like degeneration in a rat model. *Bone & Joint Research*, 7(4), 274–281. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.74.BJR-2017-0201.R2>.
- Della Corte, K. W., Perrar, I., Penczynski, K. J., Schwingshackl, L., Herder, C., & Buyken, A. E. (2018). Effect of dietary sugar intake on biomarkers of subclinical inflammation: A systematic review and meta-analysis of intervention studies. *Nutrients*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/nu10050606>.
- Feig D.S., Berger H. Donovan L., Godbout A., Kader T., Keely E., & Sanghera R. (2018). Diabetes and Pregnancy. Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada: Pharmacologic Glycemic Management of Type 2 Diabetes in Adults. *Canadian Journal of Diabetes*, 42(Suppl 1), S255-S282.
- González-Costa M. & Padrón-González A.A. (2018). La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(1), 30-40.
- Hod, M., Kapur, A., Sacks, D. A., Hadar, E., Agarwal, M., Di Renzo, G. C., Cabero Roura, L., McIntyre, H. D., Morris, J. L., & Divakar, H. (2015). The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) Initiative on gestational diabetes mellitus: A pragmatic guide for diagnosis, management, and care. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official*

Organ of the International Federation of *Gynaecology and Obstetrics*, 131 Suppl 3, S173-211. [https://doi.org/10.1016/S0020-7292\(15\)30033-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7292(15)30033-3).

- Instituto Mexicano del Seguro Social. (2016). Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico y tratamiento de la diabetes en el embarazo. IMSS-320-10, 68 p. Disponible en: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/contenidos/gpc/catalogoMaestroGPC.html>.
- Kc, K., Shakya, S., & Zhang, H. (2015). Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 66 Suppl 2(Suppl. 2), 14–20. <https://doi.org/10.1159/000371628>.
- Kereliuk, S., Brawerman, G., & Dolinsky, V. (2017). Maternal macronutrient consumption and the developmental origins of metabolic disease in the offspring. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1451. <https://doi.org/10.3390/ijms18071451>.
- Li, Q., Pereira, T. J., Moyce, B. L., Mahood, T. H., Doucette, C. A., Rempel, J., & Dolinsky, V. W. (2016). In utero exposure to gestational diabetes mellitus conditions TLR4 and TLR2 activated IL-1beta responses in spleen cells from rat offspring. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1862(11), 2137–2146. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.08.004>
- Logan, K. M., Gale, C., Hyde, M. J., Santhakumaran, S., & Modi, N. (2017). Diabetes in pregnancy and infant adiposity: systematic review and meta-analysis. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 102(1), F65–F72. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2015-309750>.
- López Morales, C. M., Brito Zurita, O. R., González Heredia, R., Cruz López, M., Méndez Padrón, A., & Matute Briseño, J. A. (2016). Aterosclerosis placentaria y marcadores de disfunción endotelial en neonatos hijos de madres con diabetes gestacional. *Medicina clínica*, 147(3), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.03.031>.
- Lorenzo-Almorós, A., Hang, T., Peiró, C., Soriano-Guillén, L., Egido, J., Tuñón, J., & Lorenzo, Ó. (2019). Predictive and diagnostic biomarkers for gestational diabetes and its associated metabolic and cardiovascular diseases. *Cardiovascular Diabetology*, 18(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0935-9>.
- Mustad, V. A., Huynh, D. T. T., López-Pedrosa, J. M., Campoy, C., & Rueda, R. (2020). The role of dietary carbohydrates in gestational diabetes. *Nutrients*, 12(2), 385. <https://doi.org/10.3390/nu12020385>.
- Nijs, H., & Benhalima, K. (2020). Gestational diabetes mellitus and the long-term risk for glucose intolerance and overweight in the offspring: A narrative

review. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 599. <https://doi.org/10.3390/jcm9020599>.

- Organización Panamericana de la Salud (2016). Hiperglucemia y embarazo en las Américas. Informe final de la Conferencia Panamericana sobre Diabetes y Embarazo, 76 p. Recuperado de: <http://iris.paho.org/handle/10665.2/28207>.
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3342. <https://doi.org/10.3390/ijms19113342>.
- Rosas-Villegas, A., Sánchez-Tapia, M., Avila-Nava, A., Ramírez, V., Tovar, A. R., & Torres, N. (2017). Differential effect of sucrose and fructose in combination with a high fat diet on intestinal Microbiota and kidney oxidative stress. *Nutrients*, 9(4), 393. <https://doi.org/10.3390/nu9040393>.
- Szmuilowicz, E. D., Josefson, J. L., & Metzger, B. E. (2019). Gestational diabetes mellitus. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 48(3), 479–493.
- Tsai, P.-J. S., Yamauchi, Y., Riel, J. M., & Ward, M. A. (2020). Pregnancy environment, and not preconception, leads to fetal growth restriction and congenital abnormalities associated with diabetes. *Scientific Reports*, 10(1), 12254. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69247-w>
- Vigil-De Gracia P & Olmedo J. (2017). Diabetes gestacional: conceptos actuales. *Ginecología y Obstetricia de México*, 85(6), 380-390.
- Vuong, B., Odero, G., Rozbacher, S., Stevenson, M., Kereliuk, S. M., Pereira, T. J., Dolinsky, V. W., & Kauppinen, T. M. (2017). Exposure to gestational diabetes mellitus induces neuroinflammation, derangement of hippocampal neurons, and cognitive changes in rat offspring. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1).
- Yamamoto, J. M., Kellett, J. E., Balsells, M., García-Patterson, A., Hadar, E., Solà, I., Gich, I., van der Beek, E. M., Castañeda-Gutiérrez, E., Heinonen, S., Hod, M., Laitinen, K., Olsen, S. F., Poston, L., Rueda, R., Rust, P., van Lieshout, L., Schelke, B., Murphy, H. R., & Corcoy, R. (2018). Gestational diabetes mellitus and diet: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials examining the impact of modified dietary interventions on maternal glucose control and neonatal birth weight. *Diabetes Care*, 41(7), 1346–1361. <https://doi.org/10.2337/dc18-0102>.
- Yamauchi, Y., Riel, J. M., & Ward, M. A. (2020). Pregnancy environment, and not preconception, leads to fetal growth restriction and congenital abnormalities associated with diabetes. *Scientific Reports*, 10(1), 12254. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69247-w>.

Zhu, Y., Olsen, S. F., Mendola, P., Halldorsson, T. I., Rawal, S., Hinkle, S. N., Yeung, E. H., Chavarro, J. E., Grunnet, L. G., Granström, C., Bjerregaard, A. A., Hu, F. B., & Zhang, C. (2017). Maternal consumption of artificially sweetened beverages during pregnancy, and offspring growth through 7 years of age: a prospective cohort study. *International Journal of Epidemiology*, 46(5), 1499–1508. <https://doi.org/10.1093/ije/dyx095>



## IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES ANIMALES PRESENTES EN GELATINAS COMERCIALES, MEDIANTE LA TÉCNICA PCR.<sup>a</sup>

### IDENTIFICATION OF ANIMAL SPECIES PRESENT IN COMMERCIAL GELATINS, BY MEANS OF THE PCR TECHNIQUE

Cedillo-Nieto, J.T.<sup>1</sup>; Montiel-Sosa, J. F.<sup>1</sup>; Sánchez-Mendoza, A.E.<sup>1</sup>; Moreno-Lara, J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, UNAM. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, C.P. 54740. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

\* E-mail: [jesusmate4euclides@gmail.com](mailto:jesusmate4euclides@gmail.com)

Fecha de envío: 05, enero, 2023

Fecha de publicación: 30, junio, 2023

#### Resumen:

El objetivo de esta investigación fue identificar la presencia de especies de las materias empleadas para la elaboración de grenetinas y gelatinas comerciales, mediante pruebas de PCR (Reacción en cadena de polimerasa), para identificar las especies constituyentes del producto y así poder garantizar al consumidor la información necesaria para que su adquisición y consumo sean seguros y confiables. Se utilizaron 16 marcas de gelatinas y 5 grenetinas diferentes, que se encuentran presentes en el mercado, a las cuales se les extrajo ADN para su posterior análisis por PCR punto final empleando primers específicos. En las muestras analizadas fue identificada la presencia de la especie con la que fue elaborada la muestra, siendo estos importantes porque se comprobó que algunas de ellas contienen una o más especies diferentes, es importante conocer la especie o especies que contienen las gelatinas, debido a que el consumidor puede ser alérgico a alguna de ellas.

**Palabras clave:** grenetina, PCR, autenticación, alergia, etiquetado.

#### Abstract:

The objective of this investigation was to identify the presence of species of the materials used for the elaboration of commercial gelatins and gelatins, through PCR (Polymerase Chain Reaction) tests, to identify the constituent species of the product and thus be able to guarantee the consumer the information necessary for your purchase and consumption to be safe and reliable. 16 brands of gelatins and 5 different gelatins were used, which are on the market, from which DNA was extracted for subsequent analysis by end-point PCR using specific primers. In the samples analyzed, the presence of the species with which the sample was made was identified, these being important because it was verified that some of them contain one or more different species, it is important to know the species or species that the jellies contain, because the consumer may be allergic to any of them.

**Keywords:** grenetin, PCR, authentication, allergy, labelled.

---

<sup>a</sup> Cedillo Nieto, J. T. (2022) Identificación de ADN de especies de bovino, porcino, pollo y pescado en gelatinas comerciales, mediante la técnica Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). Tesis para obtener el título de Ingeniero en alimentos, Cuautitlán Izcalli: Universidad Nacional Autónoma de México.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los productos más importantes proveniente de ganado bovino, porcino y hasta de pollo es la gnetina. Químicamente, la gelatina es una mezcla de polipéptidos compuesto por hidrólisis parcial del colágeno de las pieles y cueros de especies bovina y porcina (Karim & Bhat, 2018). Tiene múltiples usos como gelatinas, dulces, gomitas de frutas, caramelos, yogurt, postre espumado de leche, malvaviscos, carne, salchichas y en la industria farmacéutica se utiliza en la elaboración de capsulas (Schrieber & Gareis, 2007).

Los materiales originales y el proceso utilizado para la gelatina deben estar aprobados o certificados (Shabani, 2015). Es importante mencionar que el impacto que se tiene en la República mexicana, en particular el Estado de México es enorme debido al alto porcentaje de consumo de gelatina por los habitantes de esta región, además, algunos consumidores son alérgicos a los alimentos que contienen gelatina de mamíferos, aves o pescado (Kuehn, 2009). En la actualidad, hay muchas restricciones a productos de esta índole, por cuestiones de ideología, creencias religiosas hasta por salud (Sultana, 2020). Derivado de esto es crucial conocer el origen y procedencia de la gnetina utilizada en la elaboración de estos productos, para brindar la confianza y certeza al cliente al adquirir y consumir el producto.

Haciendo una revisión bibliográfica de trabajos de autenticación por técnicas de biología molecular en diferentes herramientas de búsqueda, se apreció que no hay publicados estudios de esta naturaleza y sobre todo de gelatina y gnetina en el país.

Es fundamental que se coloque en la etiqueta el origen de las materias primas que conforman el producto según la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 (Secretaría de Economía, 2010). para dar a conocer al cliente lo que consume y tenga la confianza de que no infringe alguna norma socio-cultural o religiosa, o que no afectará su salud, en el caso de las personas alérgicas. En Europa el Reglamento (UE) No 1169/2011 (Diario oficial de la Unión Europea, 2018) pide especificar la presencia de sustancias o productos con un efecto alérgico o de intolerancia científicamente probado para que los consumidores.

Este estudio se enfocó a determinar el ADN de la especie presente en gretinas y gelatinas comercializadas en México, como por ejemplo ADN de ganado porcino (*Sus scrofa domesticus*), ganado bovino (*Bos taurus*), pescado (*Oreochromis niloticus*) y pollo (*Gallus gallus domesticus*) mediante técnicas de biología molecular como PCR para identificar las especies constituyentes del producto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación cualitativa se llevó a cabo en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), en laboratorio número 18. Durante un periodo comprendido entre el 18 de noviembre del 2021 y el 28 de julio. Las muestras totales utilizadas fueron 25; cuatro muestras de tejido de las especies de interés (tres réplicas para cada una), las cuales fungieron como muestras control, 16 gelatinas (Cuadro 1) y 5 gretinas de diferentes marcas comerciales.

**Cuadro 1.** Codificación, declaración nutrimental y numero de lote de las 16 gelatinas utilizadas.

**Table 1.** Coding, nutritional declaration and batch number of the 16 gelatines used.

No de muestra	Código	Declaración nutrimental por envase	Lote
1	GG1	Proteínas 1.7g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 8.7g, Fibra dietética 0g, sodio 12mg. Contenido energético por envase 465.9 kcal (1980.2 kJ).	L2443
2	GMK1	Proteínas 2.3g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 1.4g, Fibra dietética 0g, sodio 10mg. Vitamina A, B1, B6, D, Hierro, Zinc, 5% VNR (Valor nutrimental de referencia de acuerdo a la NOM-051- SCFI) Contenido energético por envase 14.8 cal (62.9 kJ).	LOT M9080
3	GJo1	Proteínas 1.6g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 0.2g, Fibra dietética 0g, sodio 53mg. Vitamina C, 6mg = 10% VNR (Valor nutrimental de referencia de acuerdo a la NOM-051- SCFI) Contenido energético por envase 73.8 kcal (313.5 kJ).	8 19:11
4	GA1	Proteínas 1.8g, Grasas 0.5g, Hidratos de carbono disponibles 8.4g, Fibra dietética 0.7g, sodio 7 mg. Contenido energético por envase 463.90 kcal (62.9 kJ).	LOT 257A



Continuacion cuadro 1

5	GPO1	Proteínas 2g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 6g, Fibra dietética 0g, sodio 80mg. Vitamina C, 15% VNR (Valor nutrimental de referencia de acuerdo a la NOM-051- SCFI) Contenido energético por envase 32 kcal (136 kJ).	LT: 21H31
6	GB1	Proteínas 1.45g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 13.02g, Fibra dietética 0g, sodio 4.85mg. Contenido energético por envase 578.80 kcal (2459.90 kJ).	LOT 263A
7	GSP1	Proteínas 1.45g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 8.86g, Fibra dietética 0g, sodio 30mg. Contenido energético por envase 412.4 kcal (1752.7 kJ).	LOT 279A
8	GPR1	Proteínas 2g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 10g, Fibra dietética 0g, sodio 4mg. Contenido energético por envase 500 kcal (200 kJ).	LOT 2081
9	GM1	Proteínas 2g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 10g, Fibra dietética 0g, sodio 4mg. Vitamina C, 10% VNR (Valor nutrimental de referencia de acuerdo a la NOM-051- SCFI) Contenido energético por envase 480 kcal (2040 kJ).	LOT 2082
10	GD1	Proteínas 2g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 10g, Fibra dietética 0g, sodio 65mg. Contiene Fenilalanina, Tartrazina, TBHQ y sulfitos, Contenido energético por envase 500 kcal (2040 kJ).	Sin Lote
11	GFr1	Proteínas 1.94g, Grasas 0g, Hidratos de carbono disponibles 0.15g, Fibra dietética 0g, sodio 2mg. Contenido energético por envase 9 kcal (35 kJ).	L160T1
12	GCo1	Proteínas 2g, Grasas totales 0g, Grasas saturadas 0g, Grasas Trans 0g, Hidratos de Carbono Disponibles 15.62g, Azúcares 15.62g, Azúcares añadidos 15.62g, Fibra dietética 0g, Sodio 6mg. Contenido energético por envase 624 kcal (261 kJ).	250
13	GSa1	Proteínas 2g, Grasas totales 0g, Grasas saturadas 0g, Grasas Trans 0 mg, Hidratos de Carbono disponibles 9g, Azúcares 7g, Azúcares añadidos 4.22g, Fibra dietética 0g, Sodio 10 mg. Contenido energético por envase 440 kcal (1870 kJ).	LC270522
14	GCH1	Proteínas 1.7g, Grasas totales 0g, Grasas saturadas 0g, Grasas trans 0mg, Grasas monoinsaturadas 0g, Grasas poliinsaturadas 0g, Colesterol 0mg, Hidratos de carbono disponibles 9.5 g, Azúcares 9.5g, Azúcares añadidos 9.5g, Fibra dietética 0g, Sodio 17.8mg. Contenido energético por envase 492.8 kcal (2094.4 kJ).	LOT03
15	GJa1	Proteínas 1.85g, Grasas Totales 0g, Grasas Saturadas 0g, Grasas Trans 0mg, Hidratos de carbono disponibles 9.7g, Azucares 9.7g, Azucares añadidos 9.7g, Fibra dietética 0g, Sodio 10 mg. Contenido energético por bolsa de 140g 375 kcal (1595 kJ).	1312D 200403
16	GCay1	Proteína 8.4g, Grasas Totales 0g, Grasas Saturadas 0g, Grasas Trans 0mg, Hidratos de carbono 87.8g, Azúcares 83.6g, Azúcares añadidos 83.6g, Fibra dietética 0.0 mg, Sodio 21mg, contenido energético por envase de 100g 385 kcal (1635 kJ).	Sin Lote

El diseño de primers se realizó con el programa Primer Quest Tool el cual permitió obtener los siguientes pares de primers (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Primers empleados durante la investigación para la identificación de especies.

**Table 2.** Primers used during the research for species identification.

Especie	Primer	Secuencia	Tamaño del amplificado
Bovino <sup>2</sup>	Frontal	CGCCGGACTCTATTTCTATTC	461 pb
	Reverso	TAACGAGTGCTATGTGGCTTAC	
Porcino <sup>3</sup>	Frontal	GCCTAAATCTCCCCTCAA	210 pb
	Reverso	GAAAGAGGCAAATAGATTT	
Pescado	Frontal	TCTCGGAGACGACCAAATCTA	209 pb
	Reverso	CAGATGAGGCGAGAAGAAGAAG	
Pollo <sup>3</sup>	Frontal	GGAGCTAACCACAGCTACATAC	235pb
	Reverso	GGTTGGATAAGCAGAGAGAAG	

### Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras control se realizó por medio del método de sambrook (2001), el cual se basa en desintegrar el producto o tejido con 1250 µL de solución de lisis y 7 µL de proteinasa k, seguido de la extracción de proteínas y polisacáridos con 250 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y finalmente la precipitación de ADN con 1000 µL de etanol frío (Sánchez Mendoza, 2021).

Para extraer el ADN de las muestras de gelatina, se procedió a centrifugar las muestras tres veces, la primera se centrifugo a 12,000 rpm durante 5 min, la segunda a 14,000 rpm durante 5 min y la tercera a 14,000 rpm durante 5 min, después de esto se retiró la fase acuosa de cada uno y se agregaron 1500 µL de agua libre de nucleasas y se sometieron a temperatura constante de 40°C por un tiempo de 5 min y por último se centrifugaron tres veces, a las mismas condiciones de revoluciones y tiempo anteriormente mencionadas, se retiró la fase acuosa y se añadieron 30 µL de agua libre de nucleasas.

<sup>2</sup> Cesar Ponce J.H. (2017). Detección de especies animales no reportadas en la etiqueta de salchichas comerciales por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Tesis para obtener el título de ingeniero en alimentos, Cuautitlán Izcalli: Universidad Nacional Autónoma de México.

<sup>3</sup> Roblero Domínguez A. (2019). Determinación de aculturación con especies *Gallus gallus domesticus*, *Sus scrofa domesticus* y *Bos taurus* en embutidos de pavo mediante PCR. Tesis para obtener el título de ingeniero en alimentos, Cuautitlán Izcalli: Universidad Nacional Autónoma de México.

## **Cuantificación de ADN**

Se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop se colocó 2µL de la muestra a cuantificar, esto se repitió con cada una de las muestras posteriormente se registraron los valores, en la bitácora, de: Relación 260/280, y ng/µL. Esto se realizó para saber la calidad y cantidad de ADN contenido en las muestras, con la finalidad de usarlas posteriormente en la PCR.

## **PCR**

La técnica de PCR para las muestras control se llevó a cabo con la ayuda de un kit DNeasy Blood & Tissue para PCR compuesta por: Taq ADN polimerasa, dNTP's y MgCl<sub>2</sub>. Para la reacción se ocuparon las siguientes cantidades Master Mix 12.5 µL, Primer Frontal 0.5 µL, Primer Reverso 0.5 µL, Agua libre de nucleasas 10.5 µL, ADN 1 µL.

Para el caso de las muestras de gelatina y grenetina respectivamente la técnica de PCR DIRECTA se realizó con la ayuda del kit Phire Animal Tissue Direct para PCR compuesta por: ADN polimerasa Phire Hot Start II, dNTP's y MgCl<sub>2</sub>. Para la reacción se ocuparon las siguientes cantidades Buffer 2x Phire 5 µL, Enzima Polimerasa 0.2 µL, Primer Frontal 0.25 µL, Primer Reverso 0.25 µL, Agua libre de nucleasas 3.3 µL, ADN 1 µL.

## **Electroforesis en muestras y visualización de ADN**

Para analizar los resultados se llevó a cabo una electroforesis horizontal con geles de agarosa al 1.5% y 3%. Una vez realizado lo anterior se procedió a cargar 10-12 µL de las muestras en el gel y el marcador de peso molecular. Para poder visualizar el ADN se colocó el gel dentro del transiluminador, centrado y encendió el transiluminador al mismo tiempo que la cámara y se fotografió el gel.



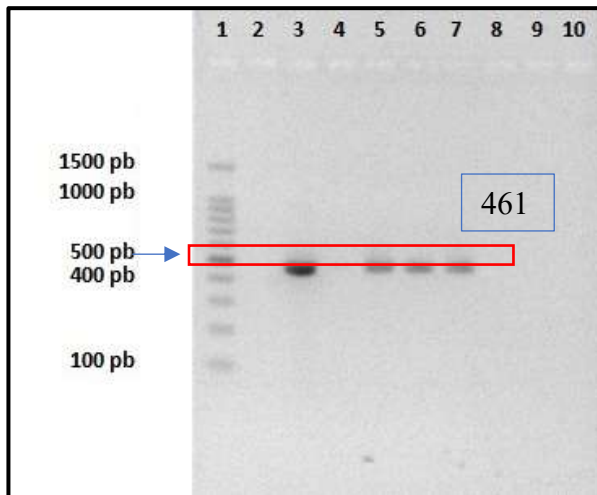
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para poder desarrollar la PCR se extrajo el ADN por el método de sambrook (2001), donde se obtuvieron valores de relación 260/280 y concentración de ADN, para la relación 260/280 el rango de los valores osciló entre 1.45 y 1.6. Para la concentración el rango de valores oscilo entre 54.2 y 106.8.

Después de corroborar que la especificidad de los primers diseñados y que las muestras cumplían con las características necesarias para su uso, se inició la búsqueda de las especies *Bos taurus* (Figura 1), *Sus scrofa domesticus* (Figura 2), *Gallus gallus domesticus* (Figura 3) y *Oreochromis niloticus* (Figura 4) para lo cual se realizaron pruebas de PCR punto final o directas a cada una de las 16 muestras de ADN diluidas pertenecientes a gelatinas comerciales.

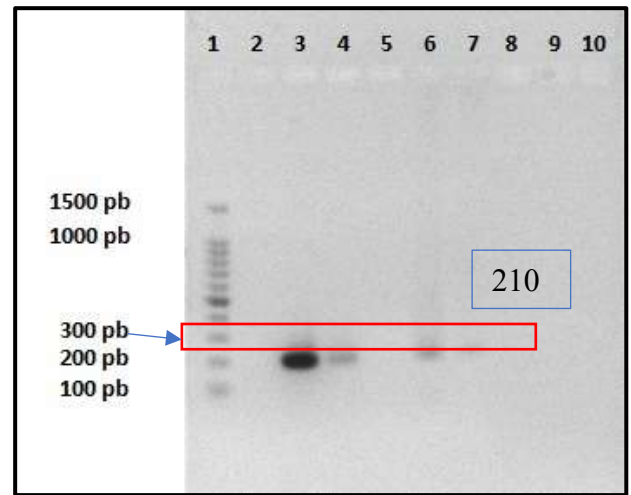
De las 16 muestras analizadas se identificó presencia de grenetina de ganado bovino en 7 de ellas, de ganado porcino en 5, de pescado en 2 y de pollo no se detectó presencia en ninguna, de ninguna de las especies esto puede explicarse porque durante el proceso de elaboración de la gelatina y grenetina, las pieles o huesos de los diferentes mamíferos de los cuales se elaboran se someten a diferentes tratamientos ácidos, muchas veces esos tratamientos ocasionan la desnaturalización del ADN, debido a que esta puede ocurrir por exposición de los ácidos nucleicos a agentes químicos o físicos, cambios de pH y enzimas (Salazar Montes, 2013). También es importante resaltar que en algunas muestras se registró la presencia de dos o más especies.





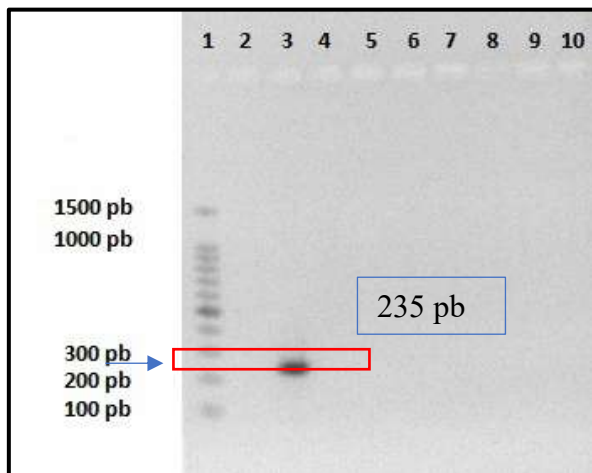
**Figura 1.** Gel de agarosa al 1.5%, para identificar *B. taurus* en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *B. taurus*, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1.

**Figure 1.** 1.5% agarose gel, to identify the *B. taurus* in different commercial gelatins 1) Molecular weight marker, 2) Blank, 3) *B. taurus*, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1.



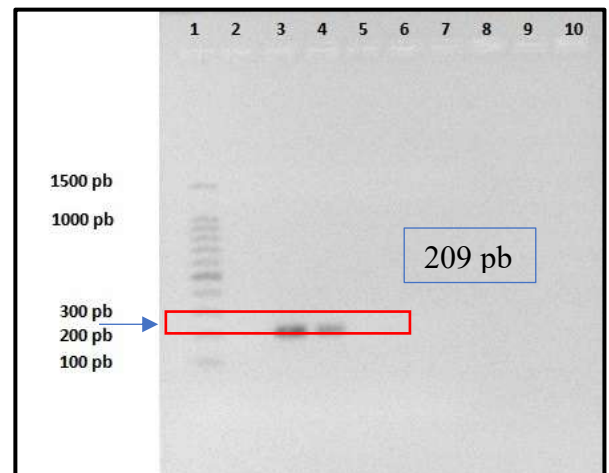
**Figura 2.** Gel de agarosa al 1.5%, para identificar *S. scrofa domestica* en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *S. scrofa domestica*, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1.

**Figure 2.** 1.5% agarose gel, to identify the *S. scrofa domestica* in different commercial gelatins 1) Molecular weight marker, 2) Blank, 3) *S. scrofa domestica*, 4) GPo1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1.



**Figura 3.** Gel de agarosa al 1.5%, para la identificación de *G. gallus domestica* en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *G. gallus domestica*, 4) GPO1, 5) GJo1, 6) GB1 y 7) GA1.

**Figure 2.** 1.5% agarose gel, for identification of the *G. gallus domestica* species in different commercial gelatins 1) Molecular weight marker, 2) Blank, 3) *G. gallus domestica*, 4) GPO1, 5) GJo1, 6) GB1 and 7) GA1.



**Figura 4.** Gel de agarosa al 1.5%, para la identificación de *O. niloticus* en diferentes gelatinas comerciales 1) Marcador de peso Molecular, 2) Blanco, 3) *O. niloticus*, 4) GPO1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) GA1.

**Figure 3.** 1.5% agarose gel, for the identification of the *O. niloticus* species in different commercial gelatins 1) Molecular weight marker, 2) Blank, 3) *O. niloticus*, 4) GPO1, 5) GJo1, 6) GB1, 7) AG1.

Una de las normas que puede ser aplicada es la Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010. La cual contiene las especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados- Información comercial y sanitaria. Esta norma nos indica que la información contenida en las etiquetas de los alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados debe ser veraz y describirse y presentarse de forma tal que no induzca a error al consumidor con respecto a la naturaleza y características del producto. Y al analizar las etiquetas de cada una de las muestras no se encontró que se infringiera alguna ley o norma debido a que siguen al pie de la letra la norma al solo mencionar “grenetina” y no especificar el tipo, aunque también esto puede traer consigo algunas complicaciones a la hora de que el consumidor elija el producto debido a que el origen del producto puede generar problemas de índole de salud (alergias) o socioculturales (Religión).

Las Normas Mexicanas: NMX-F-041-1983 y NMX-F-043- 1970 que hacen referencia a los postres de gelatina y a la grenetina pura respectivamente no incluyen alguna indicación o nota sobre el origen de la especie que se debe usar como ingrediente, pero son específicas al detallar de donde se puede obtener, de huesos y pieles, lo que define un marco de uso de proteína animal y no vegetal.

## CONCLUSIÓN

En este estudio, se identificó una o más de una especie (*Sus scrofa domesticus*, *Bos taurus* y *Oreochromis niloticus*), lo más interesante es que algunas contienen ADN de la especie *Oreochromis niloticus* y es importante decir que la obtención de esta grenetina suele ser más costosa en comparación de las otras especies además de que la incorporación de esta puede identificarse como innovación tecnológica introducida recientemente al mercado. La especie *Bos taurus* predomina en la mayoría de las muestras analizadas. Solo en cuatro muestras no fue posible la identificación de alguna especie debido a que durante el proceso de elaboración de gelatinas las moléculas de ADN pudieron degradarse. No se detectó la presencia de la especie *Gallus gallus domesticus* en las muestras analizadas.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) en el laboratorio 18, de la FES-Cuautitlán bajo la supervisión del Dr. José Francisco Montiel Sosa y la Dra. Ana Elvia Sánchez Mendoza.

## LITERATURA CITADA

- Benjakul, S. (2019). *Enciclopedia de química alimentaria*. Hat Yai: Elsevier.
- Diario oficial de la Unión Europea. (2018). Reglamento (UE) No 1169/2011 del parlamento europeo y del consejo sobre el suministro de información alimentaria a los consumidores. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones de la Unión Europea.
- Hassan, N., Ahmad, T., & Zain, h. M. (2018). Métodos químicos y quimiométricos para la autenticación halal de gelatina: una descripción general. *Journal of Food Science*, 2903 - 2911.
- Karim, A., & Bhat, R. (2018). Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 644–656.
- Kuehn, A. (2009). Anaphylaxis provoked by ingestion of marshmallows containing fish gelatin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 708-709.
- Salazar Montes, A. (2013). *Biología Molecular*. México D.F: Mc Graw Hill education.
- Sánchez Mendoza, A. E. (2021). *Estudio de la influencia de polimorfismos sobre fenotipos asociados a la ternera de carne en las subespecies Bos taurus, Bos indicus Y Bos taurus x Bos indicus*. CUAUTITLÁN IZCALLI: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schrieber, R., & Gareis, H. (2007). *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Secretaría de Economía. (2010). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-051-SCFI/SSA1-2010, especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-información comercial y sanitaria*. México: Dirección General de Normas.
- Shabani, H. (2015). Halal authenticity of gelatin using species-specific PCR. *Food Chemistry*, 203-206.
- Sultana, S. (2020). TaqMan probe based multiplex quantitative PCR assay for determination of bovine, porcine and fish DNA in gelatin admixture, food products and dietary supplements. *Food chemistry*, 1-7.

## CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIGNOCELULOLÍTICA DE UN HONGO XILÓFAGO NO REPORTADO<sup>1</sup>

### MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE LIGNOCELLULOLYTIC ACTIVITY OF AN UNREPORTED XYLOPHAGUS FUNGUS

Juárez-Hernández, E.O.; Molina-Calderón, C.C.

*Instituto Politécnico Nacional. Instituto Politécnico Nacional (IPN), Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, campus Guanajuato (UPIIG), Av. Mineral de Valenciana 200-Interior, Col. Fraccionamiento Industrial Puerto, 36275 Silao de la Victoria, México.*

\* E-mail: [cielocmc@hotmail.com](mailto:cielocmc@hotmail.com)

Fecha de envío: 14, abril, 2023

Fecha de publicación: 30, junio, 2023

#### Resumen:

La actividad enzimática de hongos xilófagos cambia las propiedades fisicoquímicas de la madera, dañando y fracturando así su estructura. Sin embargo, debido a su inespecificidad, presentan una gran variedad de aplicaciones biotecnológicas en la industria. Se realizó la caracterización de un hongo no reportado, considerado plaga en la sierra de Santa Rosa, Guanajuato; durante un año en las instalaciones de UPIIG se realizó el análisis de su morfología para proponer su identificación a nivel especie, así como se evaluó su capacidad para degradar madera y actividad lignocelulolítica. Se cultivó el hongo por triplicado en medio PDA por seis semanas a 26°C, obteniendo un crecimiento lento de acuerdo a la bibliografía. Se evaluó su capacidad para degradar madera creciendo el hongo en medio PDA con 0, 0.8, 2.8 y 4% m/v de aserrín de pino bajo las mismas condiciones, disminuyendo así el diámetro de crecimiento en los mismos según aumentaba dicho porcentaje en comparación al control sin aserrín e identificando diferencias significativas entre los crecimientos en medios con y sin este compuesto mediante un análisis ANOVA y de Tukey. De igual manera, se evaluó su actividad ligninolítica, con resultados negativos en cuanto a su degradación. La actividad celulolítica se evaluó creciéndolo en medio sólido de celulosa por 21 días a 24°C; se obtuvo una velocidad de aparición del halo de degradación de celulosa de 5.33 y 33.02 mm/día para un periodo de cero a tres y de tres a veintiún días, respectivamente, describiendo así un organismo celulolítico de alta o rápida capacidad según la bibliografía, lo anterior tras un periodo de latencia de aproximadamente tres días. Los resultados obtenidos en la caracterización de su morfología permitieron proponer la identificación del hongo como *Verticillium dahliae*, especie que infecta diversas especies de arces y demás huéspedes forestales.

**Palabras clave:** identificación, celulosa, aserrín, plaga, *Verticillium*.

---

<sup>1</sup> Proyecto de investigación.



### **Abstract:**

The enzymatic activity of xylophagous fungi changes the physicochemical properties of wood, thus damaging and fracturing its structure. However, due to their non-specificity, they present a great variety of biotechnological applications in the industry. The characterization of an unreported fungus, considered a pest in the Sierra de Santa Rosa, Guanajuato, was carried out; During a year at the UPIIG facilities, an analysis of its morphology was carried out to propose an identification at the species level, as well as its capacity to degrade wood and lignocellulolytic activity. The fungus was cultivated in triplicate in PDA medium for six weeks at 26°C, obtaining slow growth according to the literature. Its ability to degrade wood was evaluated by growing the fungus in PDA medium with 0, 0.8, 2.8 and 4% m/v of pine sawdust under the same conditions, thus decreasing the growth diameter in them as this percentage increased compared to the control without sawdust and identifying significant differences between the growths in media with and without this compound by means of an ANOVA and Tukey analysis. Similarly, its ligninolytic activity was evaluated, with negative results in terms of its degradation. The cellulolytic activity was evaluated by growing it in solid cellulose medium for 21 days at 24°C; a speed of appearance of the cellulose degradation halo of 5.33 and 33.02 mm/day was obtained for a period of zero to three and three to twenty-one days, respectively, thus describing it as a cellulolytic organism of high or rapid capacity according to the bibliography, the above after a latency period of approximately three days. The results obtained in the characterization of its morphology allowed to propose the identification of the fungus as *Verticillium dahliae*, a species that infects various species of maples and other forest hosts.

**Keywords:** identification, cellulose, sawdust, plague, *Verticillium*.

## **INTRODUCCIÓN**

Los hongos xilófagos son aquellos que se alimentan de los componentes que contiene la madera, provocando en ella severos daños (Sanite, 2022). La pudrición que este tipo de organismos causa en la madera de los árboles es una de las enfermedades más comunes que pueden sufrir, debilitándola hasta llegar a fracturarlos; este fenómeno puede afectar diferentes partes de los árboles, desde las ramas, hasta las raíces Passer (2022).

Dichos componentes, refiriéndose a la pared celular de la madera, son principalmente hemicelulosa, celulosa y lignina; el rango común es de 38 a 50% de celulosa, de 23 a 32% de hemicelulosa y de lignina de un 15 a un 25% (Chávez & Domine, 2013).



De acuerdo a lo anterior, la molécula orgánica de la celulosa es la que más abunda y se encuentra disponible en la naturaleza para así ser sintetizada y degradada por una gran variedad de microorganismos. Los que son capaces de lograrlo son particularmente los hongos y las bacterias. Estos son reconocidos ya que permiten reciclar el material orgánico de nuevo al suelo (Guzmán *et al.*, 2014). Según Giraldo & Villa (2016), específicamente, los hongos xilófagos de tipo podredumbre parda son aquellos que solamente degradan la celulosa y hemicelulosa, dejando lignina como residuo.

Por otro lado, un reducido grupo de hongos filamentosos cuenta con la capacidad de descomponer la lignina, siendo este el componente de las paredes celulares de las plantas más recalcitrante. Estos, en comparación a los de podredumbre parda, son los de podredumbre o pudrición blanca, y poseen un valioso papel en el ciclo del carbono (Muñoz, 2012).

Para lograr identificar y caracterizar este tipo de microorganismos, se realizan pruebas de naturaleza microbiológica; el análisis microbiológico es el uso de métodos biológicos, bioquímicos, moleculares o químicos para la detección, identificación o enumeración de microorganismos en un material. A menudo se aplica a los microorganismos responsables de enfermedades y del deterioro de alimentos o compuestos, ya que ayuda a mantener bajo control la proliferación de virus, bacterias y microorganismos que pueden causar contaminación, intoxicación y enfermedades (Elga Veolia, 2021). En el caso de los hongos, además nos permite indagar en sus aplicaciones potenciales en la industria. Los principales métodos de identificación de hongos filamentosos se han basado en el examen macroscópico de la colonia y en sus características microscópicas (Solé *et al.*, 1998).

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó la caracterización microbiológica y evaluación de la actividad lignocelulolítica de un hongo considerado plaga en la sierra de Santa Rosa, México, ya que causa una degradación en la corteza de los árboles que se encuentran en la sierra, se suma, que no existe un reporte o estudio realizado sobre esta situación.



La caracterización de su morfología y evaluación de su posible actividad lignocelulolítica guiada a la propuesta de una identificación a nivel de especie permitiría su uso en futuros estudios de biorremediación y degradación de polímeros como la celulosa, así como podría contribuir al control de la considerada plaga en la sierra. Para cumplir estos objetivos, se contó con todos los equipos, reactivos y materiales necesarios para la realización del presente proyecto, además de la asesoría y condiciones adecuadas, esto en las instalaciones de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, Campus Guanajuato (IPN).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de la muestra

Se proporcionó un pedazo de tronco con muestra previamente tomado de un árbol infectado, colocado dentro de una bolsa de plástico y ésta siendo posteriormente sellada (figura 1). Dicha muestra fue aislada de la sierra de Santa Rosa, Guanajuato.



**Figura 1.** Muestra de tronco infectado con hongo xilófago filamentoso aislado de la Sierra de Santa Rosa, Guanajuato.

**Figure 1.** Sample of trunk infected with filamentous xylophagous fungus isolated from the Sierra de Santa Rosa, Guanajuato.

Se aislaron las células de dicho hongo a través de la toma de muestra en zonas infectadas del mismo (Figura 1) y posterior crecimiento en medio de cultivo PDA a 27°C por un periodo de tres semanas por triplicado.

### **Caracterización macroscópica**

Se elaboraron por triplicado cultivos del hongo en medio PDA en cajas Petri (Pucci & Baztan, 2017). Asimismo, se realizó una segunda prueba elaborando por triplicado medios PDA con 0, 0.8, 2.8 y 4% m/v de aserrín proveniente de pino cada uno. Los medios de ambas pruebas fueron incubados a 26°C por un periodo de seis semanas; se registró la morfología, así como se midieron los diámetros de crecimiento para cada medio con el fin de realizar las cinéticas de crecimiento para cada tipo de prueba, de manera diaria para la primera y de manera semanal para la segunda.

### **Caracterización microscópica**

La identificación de los hongos requiere de la obtención de datos morfológicos mediante la observación microscópica de los aislamientos, mucho más minuciosa en el caso de los hongos filamentosos (Gadea *et al.*, 2007).

*Técnica de microcultivo.* Se basó en la metodología enunciada por García (2004); se elaboró por triplicado dicho protocolo. Se añadió agua con 30% de glicerol estéril al papel filtro en el fondo para producir una cámara de humedad y se incubaron los microcultivos a 26°C durante tres semanas. Finalmente, se observaron al microscopio óptico bajo objetivo 40X las muestras obtenidas con azul de lactofenol y se registraron las estructuras del hongo para su identificación.

### **Evaluación de la actividad ligninolítica**

Esta prueba se realizó de acuerdo al estudio realizado por Muñoz (2012) en medio agar lignina en cajas Petri, junto a un control sin lignina y otro sin muestra (con lignina), todos por triplicado, incubándose durante tres semanas a 24°C. La actividad ligninolítica positiva se observaría en los medios por el vire a una coloración rojiza por la oxidación del guayacol. A lo largo del periodo de la prueba, se mediría diariamente el diámetro del halo de oxidación en milímetros y el de crecimiento generado en la misma unidad, para así obtener la velocidad de degradación de lignina por el hongo en milímetros por día además de dos cinéticas, una para cada uno de los controles.



### **Evaluación de la actividad celulolítica**

La evaluación de la actividad celulolítica se realizó en medio sólido de celulosa (Galván, 2018). Se incubó el hongo durante tres semanas a 24°C en medio de celulosa y en un control de medio celulosa sin celulosa, además de otro control sin muestra en medio de celulosa, todos por triplicado. Durante este tiempo, se evaluaron diariamente los respectivos diámetros de crecimiento y de halo de degradación generado en milímetros, con el fin de elaborar sus respectivas cinéticas; dicha medición diaria de halos de degradación se realizó a través de su observación a simple vista en condiciones de contraluz, esto gracias a la posible apreciación del consumo de celulosa por el hongo de esta manera, ya que dicho compuesto fue posible diferenciarlo del resto en el medio de cultivo, pues éste no se homogenizó con el resto de componentes (la celulosa se observó como pequeñas acumulaciones blancas de dicho compuesto en forma circular), sin embargo, estas mediciones representaron una mera aproximación. Se reveló el medio con solución rojo congo al 0.1% (m/v) una vez pasadas las tres semanas, y se dejó actuar el colorante durante 15 minutos. Después, se lavó con una solución de cloruro de sodio 1 M. Se determinó la actividad celulolítica por la presencia de zonas claras (halos) manifestadas por la hidrólisis de la celulosa, las cuales fueron de igual manera medidas en milímetros.

### **Análisis estadístico**

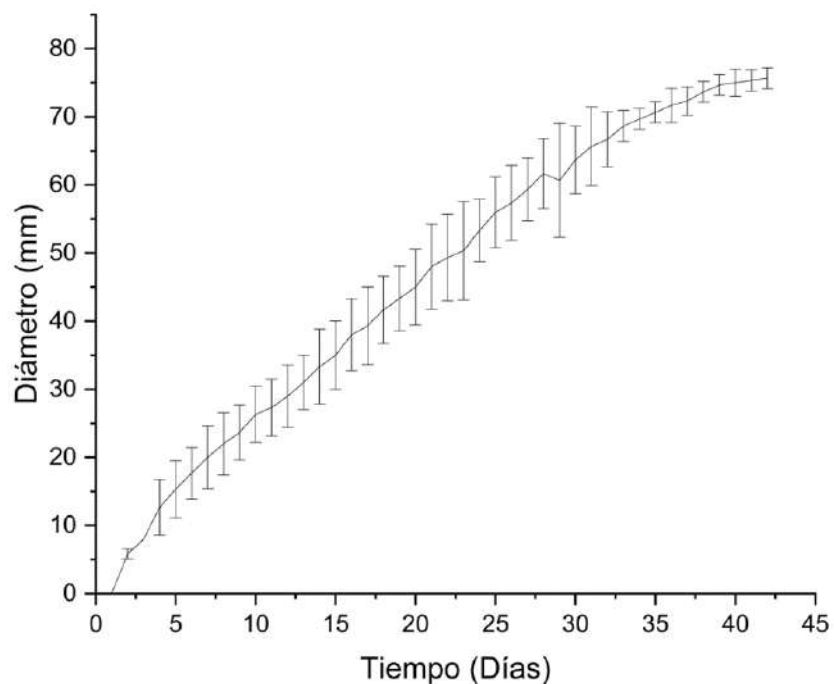
Todos los análisis de datos se trataron de acuerdo a las medias y desviaciones estándar de cada prueba utilizando el software estadístico SAS, para finalmente ser representados gráficamente mediante el programa Origin 2023. Además, para el caso de la prueba de degradación de aserrín, las mediciones de los diámetros de crecimiento obtenidos en dicha prueba también fueron procesados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de factor único en SAS, así como se evaluaron las diferencias significativas entre las medias de los aislados en cada porcentaje de aserrín por semana mediante comparaciones múltiples de medias usando la prueba de Tukey,  $P < 0.05$  (Galván, 2018).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización microbiológica

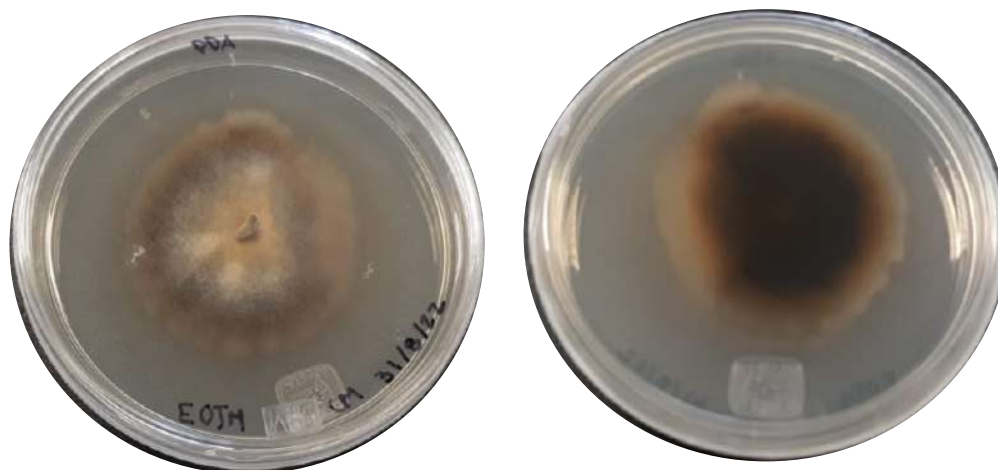
Se obtuvo una curva representativa al ser promediadas las tres réplicas evaluadas en medio PDA sin modificaciones, observando un crecimiento total al cabo de dichas seis semanas (Figura 2). Pucci & Baztan (2017) mencionan que de acuerdo a la velocidad de crecimiento del hongo en caja Petri estos se pueden clasificar como de crecimiento rápido (entre una y dos semanas), moderado (entre dos y tres semanas) y lento (entre tres y cuatro semanas) al abarcar tres cuartas partes del espacio de la misma, por lo que, de acuerdo a los resultados obtenidos en el crecimiento del hongo en medio PDA donde se abarcó un crecimiento en la caja de tres cuartos del espacio (aproximadamente 60 mm de diámetro) en un periodo de entre tres a cuatro semanas (Figura 2), este hongo se puede clasificar como uno de crecimiento lento.



**Figura 2.** Cinética de medias con desviación estándar del crecimiento del hongo por triplicado en medio PDA a 26°C durante seis semanas.

**Figure 2.** Kinetics of means with standard deviation of the growth of the fungus in triplicate in PDA medium at 26°C for six weeks.

En dicha prueba, las colonias presentaron una forma filamentosa, elevación plana, borde filamentoso y superficie lisa; se observó una textura de micelio algodonosa con esporas de color negro, con micelio vegetativo y reproductivo, siendo el primero de un color blancuzco crema oscureciéndose a café gradualmente en el centro debido a pigmentación, así como un crecimiento invasivo (Figura 3).

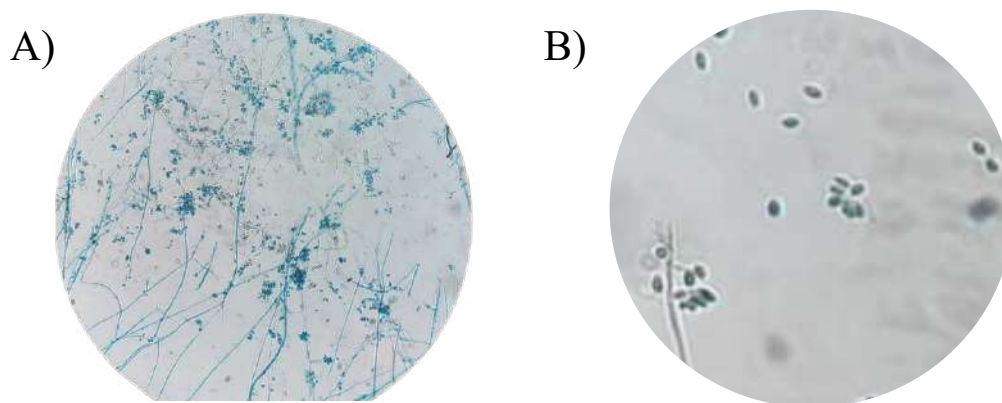


**Figura 3.** Crecimiento del hongo en medio PDA después de tres semanas de incubación a 26°C (anverso, izquierda; reverso, derecha).

**Figure 3.** Growth of the fungus in PDA medium after three weeks of incubation at 26°C (front, left; back, right).

Por otro lado, de acuerdo a la prueba de microscopía (Figura 4), se identificaron hifas de modalidad rizoide, hialinas y septadas, con microconidias de conidióforos verticilados, además de largas fiálides. Asimismo, se apreciaron abundantes microesclerocios y conidios de tipo fialospora, esféricos u ovoides, hialinos y unicelulares; así como reproducción asexual por fragmentación.





**Figura 4.** Observación del hongo a través de la técnica de microcultivo tras tres semanas de incubación a 26°C en medio PDA al microscopio óptico bajo objetivo 40X. A) Visualización de hifas; B) Visualización de conidios.

**Figure 4.** Observation of the fungus through the microculture technique after three weeks of incubation at 26°C in PDA medium under an optical microscope under a 40X objective. A) Visualization of hyphae; B) Visualization of conidia.

Las características morfológicas fueron comparadas de forma macroscópicas observadas a 26°C en medio PDA tras tres semanas de incubación del hongo estudiado y las reportadas por la bibliografía en cuanto al género *Verticillium* (Cuadro 1), así como las características morfológicas a objetivo 40X del hongo, tras incubación de tres semanas a 26°C en microcultivo y las reportadas por la bibliografía en cuanto al género *Verticillium* (Cuadro 2). Cabe mencionar que se menciona a este género como uno de organismos fitopatógenos no específicos (Koppert, 2022), lo cual concuerda con la degradación de corteza y ahuecamiento que genera el hongo estudiado en los árboles. Además, Xiaorong (2018) reporta el crecimiento de una especie de este género (*Verticillium longisporum*) en medio PDA durante 24 días en oscuridad a aproximadamente 20°C, obteniendo un diámetro de 42 mm tras 14 días de incubación, mientras que la muestra analizada en este trabajo adquirió uno en promedio de 34 mm en este mismo tiempo (figura 2). Como se observa, ambos crecimientos son parecidos. Debido a lo anterior y a lo mostrado en los cuadros 1 y 2, el género de *Verticillium* concuerda con las características tanto morfológicas como las concernientes al ritmo de crecimiento identificadas en el organismo analizado, por lo que se propone el mismo para su identificación.



**Cuadro 1.** Comparativa de las características morfológicas macroscópicas del hongo estudiado y las reportadas por la bibliografía en cuanto al género *Verticillium*.

**Table 1.** Comparison of the macroscopic morphological characteristics of the fungus studied and those reported in the literature for the genus *Verticillium*.

Hongo de análisis (Figura 3)	<i>Verticillium longisporum</i> (Xiaorong, 2018)	<i>Verticillium dahliae</i> (Yu, Cafarov & Badadoost, 2016)
Forma filamentosa. Elevación plana, borde filamentoso, superficie lisa. Micelio algodonoso. Colonia blancuzca crema oscureciéndose a café gradualmente en el centro.	Morfología macroscópica plana. Borde filamentoso. Pigmentación al centro color café. Micelio algodonoso.	Colonia blanca al crecer en medio PDA inicialmente. Micelio algodonoso. Gradualmente se torna oscuro en el centro. Conidios esféricos

Nota. Las características reportadas por Xiaorong (2018) fueron resultado del estudio del microorganismo mencionado en cultivo en medio PDA durante 24 días en oscuridad a 20°C.

**Cuadro 2.** Comparativa de las características morfológicas a objetivo 40X del hongo de estudio y las reportadas por la bibliografía para el género *Verticillium*.

**Table 2.** Comparison of the morphological characteristics at 40X objective of the fungus under study and those reported in the literature for the genus *Verticillium*.

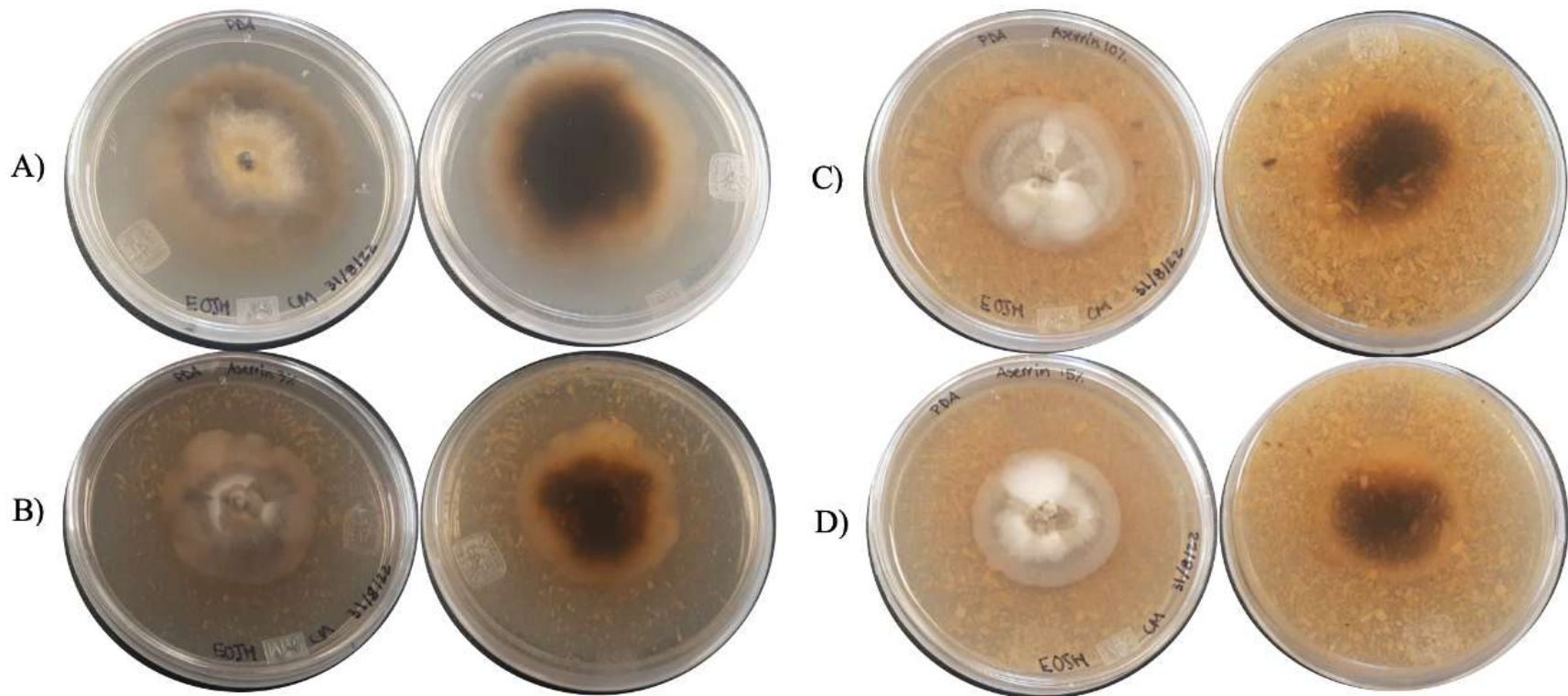
Hongo de análisis (figura 4)	<i>Verticillium sp.</i> (Larone, 1995)	<i>Verticillium</i> (Sociedad Microbiológica Española, 2021)
Hifas rizoides, hialinas y septadas. Presencia de verticilos. Largas fiálides. Conidios esféricos u ovoides, hialinos y unicelulares. Presencia de microesclerocios.	Conidióforos hialinos, simples o ramificados. Verticilos de esbeltas fiálidas divergentes en forma de punzón. Hifas hialinas y septadas. Conidios hialinos o de colores brillantes, en su mayoría unicelulares.	Fiálides largas. Conidióforos ramificados en verticilos. Conidias hialinas y de forma generalmente ovalada.



Sin embargo, para lograr una propuesta más completa, se tomó como referencia el estudio realizado por Yu, Cafarov & Badadoost (2016), quienes mencionan que para diferenciar entre las dos especies mencionadas previamente para el género propuesto (*V. dahliae* y *V. longisporum*), las cuales han sido las más coincidentes en cuanto a morfología descrita por la bibliografía, es importante la forma de los conidios, ya que *V. dahliae* produce unos relativamente esféricos, mientras que *V. longisporum* produce unos elongados. Además, los mismos autores caracterizan a *V. dahliae* como un organismo de colonia blanca y micelio algodonoso abundante al crecer en medio PDA inicialmente, para gradualmente volverse de un tono oscuro, produciendo abundantes conidias hialinas y de forma generalmente ovalada. Debido a lo anterior, se propone la identificación del hongo analizado como *V. dahliae*, presentando este las características atribuidas a dicha especie, diferenciándose de *V. longisporum* al observarse la mencionada diferencia morfológica en los conidios.

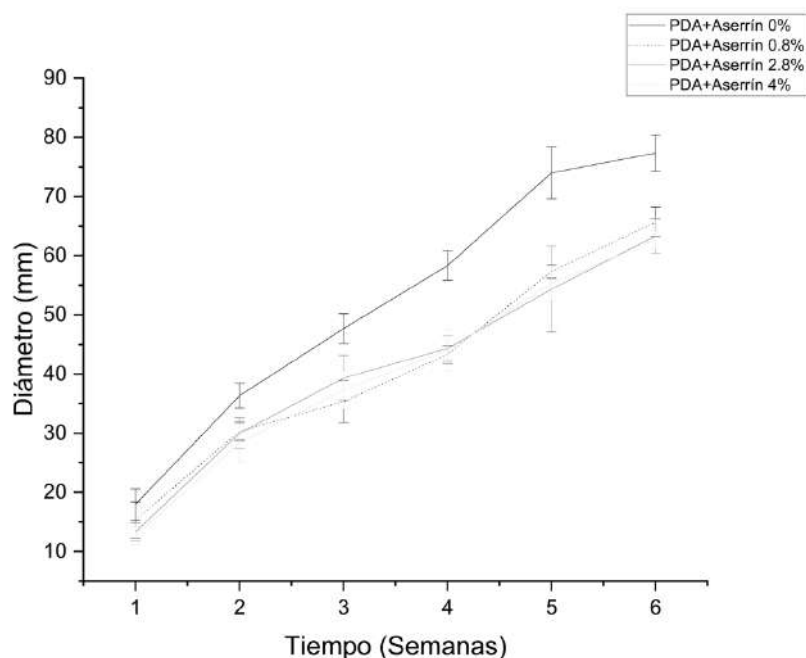
Para la evaluación de degradación de aserrín, se observó en los diferentes medios el micelio vegetativo de color más oscuro justo por debajo del micelio reproductivo (figura 5), esto de manera similar a lo observado en la caracterización macroscópica sin aserrín (Figura 3). Al finalizar la prueba, se observó que el diámetro de crecimiento en los medios tendía a disminuir a medida que aumentaba el porcentaje de aserrín en los mismos. Dicho crecimiento se ve ilustrado en la figura 5.





**Figura 5.** Crecimiento del hongo en medios PDA con diferentes porcentajes m/v de aserrín de pino tras cuatro semanas de incubación a 26°C (anverso, izquierda; reverso, derecha). A) Control medio PDA sin aserrín; B) Medio PDA+Aserrín 0.8%; C) Medio PDA+Aserrín 2.8%; D) Medio PDA+Aserrín 4%.

**Figure 5.** Growth of the fungus in PDA media with different m/v percentages of pine sawdust after four weeks of incubation at 26°C (front, left; back, right). A) PDA medium control without sawdust; B) Medium PDA+Sawdust 0.8%; C) Medium PDA+Sawdust 2.8%; D) Medium PDA+Sawdust 4%.



**Figura 6.** Cinéticas de las medias con desviación estándar del crecimiento del hongo en medios PDA con diferentes porcentajes m/v.

**Figure 6.** Kinetics of the means with standard deviation of the growth of the fungus in PDA media with different percentages m/v.

En cuanto al análisis ANOVA, se obtuvo un valor P para cada semana cuadro 3, columna 6), además de la identificación de las diferencias significativas entre las medias por porcentaje de aserrín de manera semanal (Cuadro 3, columnas 2-5).

De acuerdo a los resultados, en cuanto al valor P semanal, se tienen diferencias significativas entre las semanas a excepción de la primera al haber obtenido valores inferiores a 0.05, por lo que para los últimos tres casos se rechaza la hipótesis nula de que las medias poblacionales son iguales. Sin embargo, según los resultados obtenidos en la prueba de Tukey, se observan diferencias estadísticamente significativas únicamente en el caso del control dentro de cada semana (cuadro 3, columna 2) al ser comparadas las respectivas medias de este tipo con las medias obtenidas en los casos de medios PDA con aserrín (Cuadro 3, columnas 3-5). Cabe mencionar que dichas diferencias se identificaron de manera gradual a medida que se

avanzaba en el número de semanas, ya que en la primera no se determinaron diferencias significativas de esta clase.

Por lo tanto, se observó la capacidad de degradación de madera del hongo al identificarse una disminución estadísticamente significativa en los diámetros de crecimiento con porcentajes (m/v) de aserrín respecto a los obtenidos sin este compuesto con el pasar de las semanas (Cuadro 3), demostrando un retardo en el crecimiento del hongo analizado posiblemente debido a dicho proceso de degradación.

**Cuadro 3.** Resultados obtenidos tras el análisis ANOVA usando la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ) para los diámetros obtenidos de crecimiento en milímetros en la prueba de degradación de aserrín.

**Table 3.** Results obtained after the ANOVA analysis using the Tukey test ( $P < 0.05$ ) for the diameters obtained from growth in millimeters in the sawdust degradation test.

Semana	Control medio PDA	Medio PDA+Aserrín 0.8%	Medio PDA+Aserrín 2.8%	Medio PDA+Aserrín 4%	Valor P semanal
1	18 abcd	15.33 abcd	13.33 abcd	12.67 abcd	0.0795
2	36.33 abc	30.33 abcd	30 abcd	28.33 bcd	0.0181
3	47.67 ac	35.33 cdb	39.33 acdb	37.33 cdb	0.0082
4	58.33 a	43.33 cdb	44.33 cdb	44 cdb	0.0002
5	74 a	57.33 bdc	54.33 bdc	55.33 bdc	0.0021
6	77.33 a	65.67 bcd	63.33 bcd	62.67 bcd	0.0004

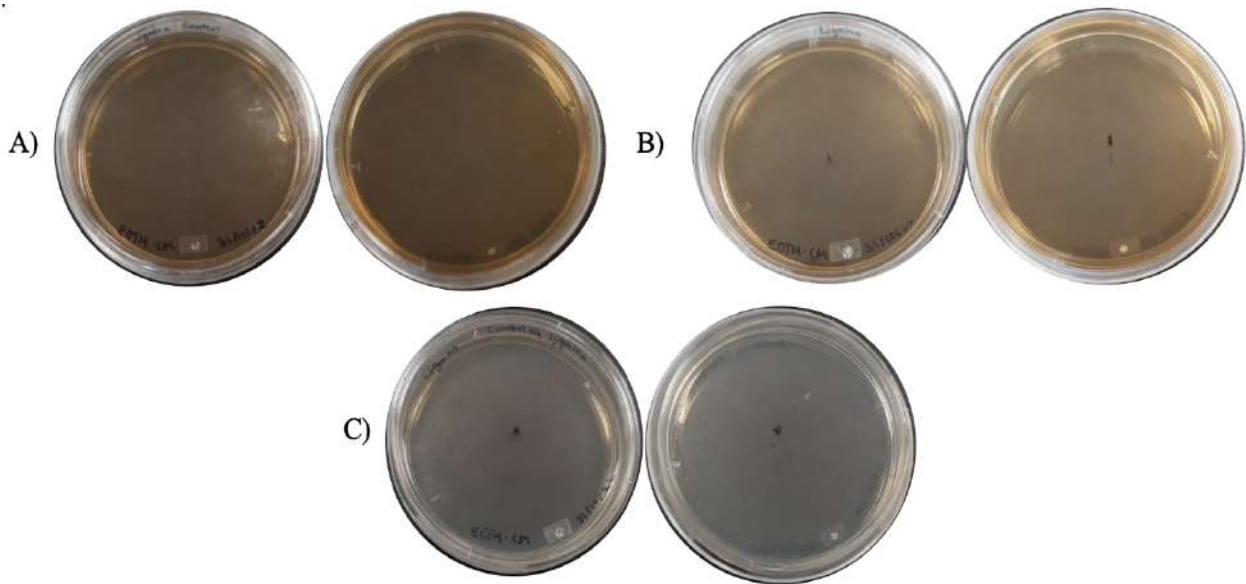
Nota. Los datos corresponden a la media de tres réplicas realizadas en cada caso. Para la prueba de Tukey, las letras representan la diferencia significativa existente entre dicho número de repeticiones, en donde las medias en la misma fila (ya que se realizó el análisis de manera semanal) y con la misma letra no se determinaron como estadísticamente diferentes. La última columna corresponde al valor P obtenido tras la realización del análisis ANOVA, esto realizado de igual forma semanalmente.



## Evaluación de la actividad ligninolítica

Se pretendió medir el diámetro de crecimiento y halo de degradación de lignina de manera diaria para así calcular sus respectivas velocidades, sin embargo, dicho crecimiento y halo no fue observado a lo largo y una vez concluido el periodo de análisis en ningún tipo de medio (Figura 7), por lo que se concluye que este hongo no es productor de enzimas ligninolíticas.

De acuerdo con Muñoz (2012), la actividad ligninolítica debería ser evidenciada por un proceso oxidativo debido al guayacol en el agar lignina; Laura & Castellanos (2009) mencionan que el compuesto de lignina presenta un color café por los grupos cromóforos unidos a esta molécula, y, para que se reduzca este color el oxígeno y peróxido de hidrógeno actúan como cofactores, ocasionando así una ruptura en los enlaces carbono-carbono destruyendo algunos de estos grupos, por lo que el añadido del factor de aeración a la prueba podría llegar a complementar dicha catálisis.

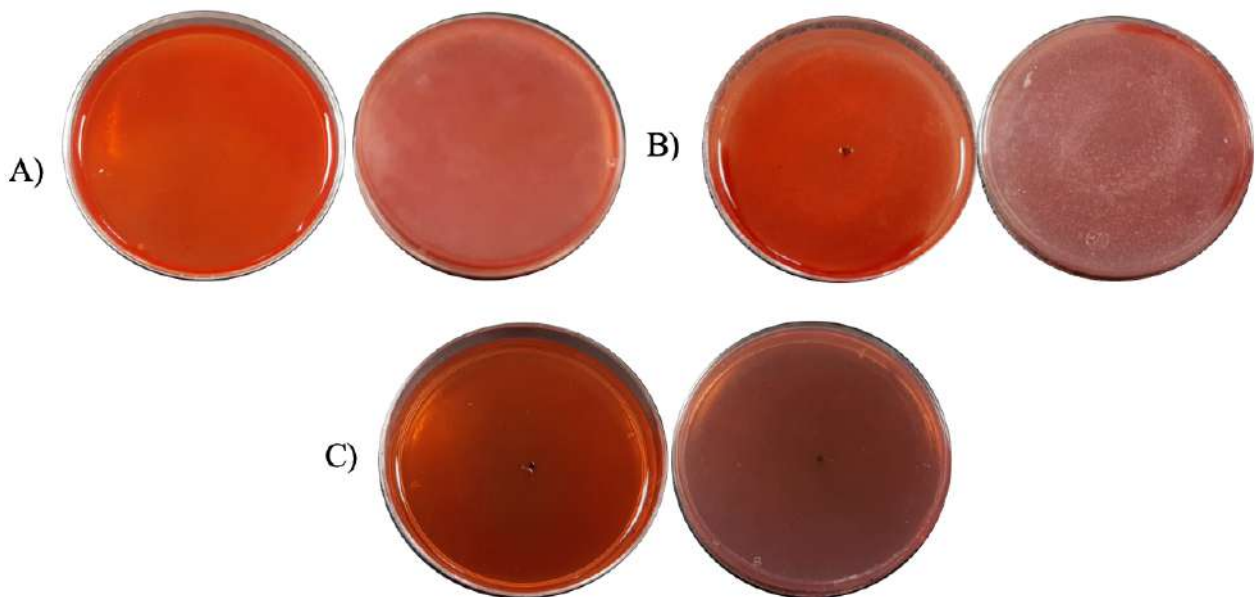


**Figura 7.** Cultivos de lignina en medio sólido del hongo tras tres semanas de incubación a 24°C (anverso, izquierda; reverso, derecha). A) Control medio sólido de lignina sin muestra; B) Medio sólido de lignina con muestra; C) Control medio sólido de lignina sin lignina y con muestra.

**Figure 7.** Lignin cultures in solid medium of the fungus after three weeks of incubation at 24°C (front, left; back, right). A) Lignin solid medium control without sample; B) Solid lignin medium with sample; C) Medium solid lignin control without lignin and with sample.

### Evaluación de la actividad celulolítica

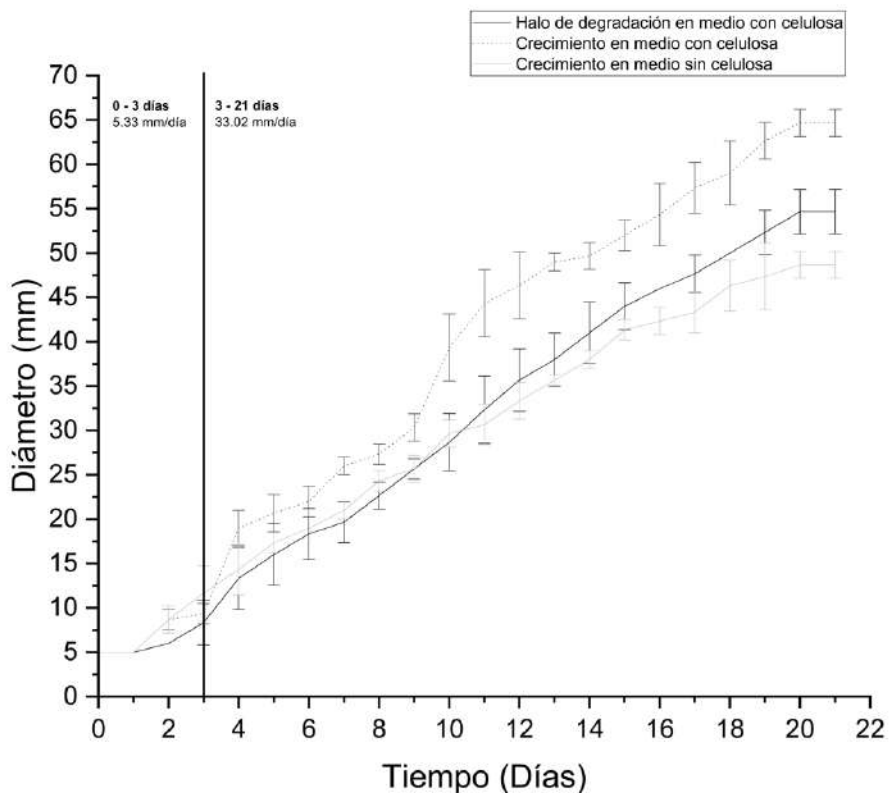
Se evaluó la velocidad de aparición del halo de degradación de celulosa y el crecimiento del hongo cada 24 horas, midiendo los diámetros generados en milímetros, para finalmente ser revelados los halos de los medios con rojo congo 0.1% (m/v). En la figura 8 se presentan los resultados de dicha revelación, donde se ve confirmada esta degradación de acuerdo a la comparación del anverso y reverso de los medios evaluados respecto a los controles realizados. En dicha figura, se observa un fondo rojo en la caja Petri debido a la adición de solución de rojo congo al 0.1% (m/v), con zonas claras alrededor del crecimiento de la muestra, siendo esto los ya mencionados halos de degradación de celulosa.



**Figura 8.** Cultivos en medio sólido de celulosa revelados con rojo congo 0.1% (m/v) tras incubación de tres semanas a 24°C (anverso, izquierda; reverso, derecha). A) Control medio celulosa sin muestra; B) Medio celulosa con muestra; C) Control medio celulosa sin celulosa.

**Figure 8.** Cultures in solid cellulose medium developed with Congo red 0.1% (m/v) after three weeks incubation at 24°C (front, left; back, right). A) Cellulose medium control without sample; B) Cellulose medium with sample; C) Control medium cellulose without cellulose.

Se elaboró la cinética de crecimiento del hongo en en medio de celulosa por tres semanas de incubación a 24°C junto con las respectivas velocidades de degradación de celulosa por periodo definido, además de la cinética de crecimiento del control sin celulosa bajo las mismas condiciones (Figura 9), observando un crecimiento ligeramente mayor que al representado en el cultivo en medio PDA para el periodo comprendido hasta 21 días.



**Figura 9.** Cinéticas de la actividad celulolítica y de crecimiento del hongo en medio de celulosa por tres semanas de incubación a 24°C.

**Figure 9.** Kinetics of the cellulolytic activity and growth of the fungus evaluated in cellulose medium for three weeks of incubation at 24°C

Respecto a lo mostrado en la cinética de crecimiento para el control del cultivo del hongo en medio sólido de celulosa sin celulosa (medio en el cual no hubo aparición de halo de degradación de este compuesto) se tiene un crecimiento menor al del caso con celulosa, y, sin embargo, presente (Figura 9).



La posible presencia de una fuente alternativa de carbono presente en el componente de agar del medio de cultivo, específicamente Agar bacteriológico BIOXON 215000, pues BD BIOXON™ (2011) reporta que este es un agente solidificante, un agar purificado en el cual se han reducido mínimamente los cuerpos extraños, sales y también las porciones pigmentadas, no obstante, no se hace mención de una composición exenta de dicho elemento. Sin embargo, se observa un crecimiento mayor en el medio con celulosa que el control sin ella (Figura 9), por lo que se le adjudica este comportamiento a la degradación de este compuesto, supuesto que ya se ha visto comprobado mediante la aparición del halo correspondiente.

Igualmente, se evaluó la velocidad de degradación de celulosa a lo largo del periodo de evaluación (Figura 9); se dividió en dos partes esta cinética de acuerdo a la visible diferencia en el comportamiento presentado, la primera abarcando desde el momento de la inoculación hasta el tercer día de incubación, y la segunda parte desde el tercer día post inoculación hasta el vigésimo primero. Así, se obtuvieron dos medias de velocidades de degradación al ser promediadas las comprendidas por periodo de tiempo, una correspondiente a cada parte: de 5.33 y 33.02 mm/día respectivamente, apreciando así una mayor velocidad para el segundo periodo determinado.

De acuerdo con Galván (2018), quien evaluó de manera similar la degradación de celulosa en diferentes hongos xilófagos, obtuvo las máximas velocidades de 18.816 mm/día (correspondiente a *Aspergillus fumigatus*) y 9.432 mm/día (para *Aspergillus flavus*) para cada periodo de tiempo evaluado, en dicho estudio siendo estos de cero a cuatro y de cuatro a seis días, bajo las mismas condiciones de incubación. Al comparar estas velocidades con las obtenidas, se observa una notable diferencia, ya que, para el primer periodo de tiempo, se obtuvo una velocidad más baja, y, en contraste, para el segundo, se obtuvo una mayor, sin embargo, para este último caso se tiene un periodo de tiempo más largo. De esta manera, en comparación, la capacidad de degradación del hongo estudiado podría entenderse como alta o rápida tras un periodo de latencia de aproximadamente tres días.

Habiendo comprobado su capacidad de degradación de celulosa como se mencionó, se tienen aplicaciones en distintas áreas de la industria, entre ellas, la industria extractiva (extracción de aceites esenciales, pigmentos, saborizantes y aromas, así como la producción de jugos), actividad que se ha visto limitada debido a la naturaleza

química compleja de los comúnmente utilizados vegetales (Chacón & Waliszewski, 2005). Por lo que se tiene el potencial de este hongo al respecto en cuanto a su naturaleza de hongo filamentoso, ya que estos microorganismos sobresalen al caracterizarse por formar hifas capaces de colonizar matrices sólidas (tecnología más sencilla y con menor costo para su producción) y así ser más eficaces y competitivos debido a su tolerancia a baja actividad del agua y su resistencia a condiciones de alta presión osmótica (Escudero et al., 2013).

## CONCLUSIÓN

Se realizó la caracterización de un hongo no reportado, considerado plaga en la sierra de Santa Rosa, Guanajuato, esto a través de la realización de pruebas microbiológicas con el fin de observar su morfología, identificando características del género *Verticillium dahliae* y determinando un crecimiento lento del mismo al cultivarlo en medio PDA de acuerdo a la bibliografía. Asimismo, se realizó la evaluación de su actividad enzimática en cuanto a su capacidad para degradar madera y actividad lignocelulolítica. Para el primer caso, al evaluar su crecimiento en medios PDA con porcentajes ascendentes de aserrín (0.8, 2.8 y 4% m/v), se obtuvo una disminución del diámetro en los mismos a medida que aumentaba este porcentaje respecto al control sin aserrín. Para el segundo caso, la prueba de degradación de lignina mostró una carente capacidad para degradar dicho compuesto. Y para el tercer caso, se obtuvo una velocidad de aparición del halo de degradación de celulosa de 5.33 mm/día y 33.02 mm/día para un periodo de cero a tres y de cuatro a veintiún días, respectivamente, características que describen a este hongo como uno celulolítico con una capacidad alta o rápida según la bibliografía, esto tras un periodo de latencia de aproximadamente tres días.

## Agradecimientos

Esta investigación fue apoyada por la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Ingeniería, campus Guanajuato, Instituto Politécnico Nacional. Así como por la Dra. Karla Lizbeth Macías Sánchez, la Dra. Mariana Macías Alonso, la Ing. Ariadna Denisse Andrade Alvarado y la Ing. Claudia Paola Lozano Escalante.

## LITERATURA CITADA

- BD BIOXON™ (2011). Catálogo de medios de cultivo deshidratados. Becton Dickinson and Company.
- Cañedo, V. & Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa.
- Chacón, O. & Waliszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y ciencia*, 21(42), 111-120.
- Chávez, M. & Domine, M. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46
- Elga Veolia (2021). Análisis microbiológico. Recuperado de: <https://es.elgalabwater.com/microbiological-analysis>
- Escudero, J., Daza, Z., Gil, N. & Mora, O. (2013). Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 108-117.
- Estrada, G. & Ramírez, M. (2019). Micología general. Universidad Católica de Manizales. Recuperado de: [https://www.ucm.edu.co/wp-content/uploads/2021/03/Micologia\\_general.pdf](https://www.ucm.edu.co/wp-content/uploads/2021/03/Micologia_general.pdf)
- Gadea, I., Cuencua, M., Martín, E., Pemán, J., Pontón, J. & Rodríguez, J. (2007). Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(5), 336-340.
- Galván, B. (2018). *Aislamiento, purificación y caracterización de actividad celulolítica de hongos de corteza de Pinus hartwegii*. (Grade dissertation, Universidad Autónoma del Estado de México).
- García, M. (2004). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos tolerantes a metales pesados en el proceso de lodos activados en una planta de tratamientos de agua residual*. (Grade dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Giraldo, S. & Villa, A. (2016). Caracterización morfológica y metabólica de los hongos filamentosos asociados a la rizosfera de plantas arvenses en la zona cafetera.
- Guzmán, M., Zambrano, A., Efrén, D., Rondón, A., Silva, L., Pérez, M., Quintana, M., Aguilar, L. & Rivera R. (2014). Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de muestras de suelo en Manabí-Ecuador. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 46(2), 177-189.

- Koppert (2022). Verticilosis. Recuperado de: <https://www.koppert.mx/retos/control-de-enfermedades/verticilosis/>
- Laura, J. & Castellanos, P. (2009). Hongos filamentosos con actividades ligninolíticas aislados de *Calamagrostis nitidula* Pilg. *Rev. peru. biol.*, 16(1), 125- 128.
- Larone, D. (1995). *Medically Important Fungi - A Guide to Identification*. 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Muñoz, L. (2012). *Evaluación de enzimas degradadoras de lignina producidas por aislamientos fúngicos de cultivos de arroz*. (Grade dissertation, Pontificia Universidad Javeriana).
- Pucci, G. & Baztan, M. (2017). *Micología Ambiental*. Recuperado de: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microambiental/wp-content/uploads/2016/08/TP-8-Micolog%C3%ADa.pdf>
- Sanite (2022). Guía de hongos xilófagos. Sitio Web: <https://diagnosisdelamadera.com/diagnosis-de-la-madera-guia-de-hongos-xilofagos/>
- Sociedad Microbiológica Española (2021). Clave dicotómica para la identificación de hongos aislados sistemáticamente en ambientes mediterráneos: Especial hongos filamentosos y levaduras. Recuperado de: [https://www.semicrobiologia.org/wp-content/uploads/2021/04/30\\_Clave.pdf](https://www.semicrobiologia.org/wp-content/uploads/2021/04/30_Clave.pdf)
- Solé, M., Espadalé, R. & Aubert, A. (1998). *NTP 488: Calidad de aire interior: identificación de hongos*. Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo.
- Universidad Católica de Manizales. Caracterización morfológica y metabólica de los hongos filamentosos asociados a la rizosfera de plantas arvenses en la zona cafetera. Recuperado de: <https://repositorio.ucm.edu.co/bitstream/10839/1320/1/Sara%20Jein%20Giraldo%20Naranjo.pdf>
- Universitat de Valencia (2019). Estudio morfológico y fisiológico (hongos filamentosos). Universitat de Valencia. Recuperado de: <https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/servicios/identificacion-caracterizacion/caracterizacion-eucariotas/estudio-morfologico-fisiologico-hongos-filamentosos-1285978915995.html>
- Xiaorong, Z. (2018). *Verticillium longisporum* on Oilseed Rape (*Brassica napus* L.): Differential Roles of Salicylic Acid, Seed Transmission and Plant Colonization in Greenhouse and Field Conditions. (Grade dissertation, Universidad Göttingen).
- Yu, J., Cafarov, I. & Badadoost, M. (2016). Morphology, Molecular Identity, and Pathogenicity of *Verticillium dahliae* and *V. longisporum*. Associated with Internally Discolored Horseradish Roots. *Plant Dis.* 100, 749-757.

## DETECCIÓN DE MALEZAS POR MEDIO DEL RECONOCIMIENTO DE COLOR Y SU INTEGRACIÓN EN UNA APLICACIÓN MÓVIL

### WEED DETECTION THROUGH COLOR RECOGNITION AND ITS INTEGRATION INTO A MOBILE APP

Duque-Vazquez, E.F.<sup>1</sup>; Rostro-Gonzalez, H.<sup>2</sup>; Sánchez-Yáñez, R.E.<sup>2</sup>; Saldaña-Robles, N.<sup>1</sup>; Cepeda-Negrete, J.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*División de Ciencias de la vida Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Ex Hacienda El Copal k.m. 9; carretera Irapuato-Silao; A.P. 311; C.P. 36500; Irapuato,*

<sup>2</sup>*División de Ingenierías Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Carretera Salamanca - Valle de Santiago Km. 3.5 + 1.8; Comunidad de Palo Blanco; Salamanca, Gto.*

\* *E-mail: j.cepeda@ugto.mx (autor por correspondencia)*

Fecha de envío: 05, enero, 2023

Fecha de publicación: 30, junio, 2023

#### Resumen:

Las malezas son uno de los mayores problemas en la agricultura a nivel mundial, ya que compiten por luz, nutrientes del suelo y otros componentes esenciales para el correcto crecimiento de los cultivos. Las técnicas utilizadas para garantizar el apropiado desarrollo de los cultivos han generado consecuencias negativas para el medio ambiente y la salud, debido al uso excesivo de fertilizantes. Por esta razón, la agricultura moderna ha implementado procesos tecnificados que permiten mejorar la productividad y competitividad del cultivo. La inteligencia artificial ha surgido como una alternativa para solucionar problemas en diferentes sectores industriales, pero su uso en la agricultura es limitado. Por lo tanto, la implementación y desarrollo de una aplicación para dispositivos móviles que permita la detección de malezas en terrenos listos para cultivar representa un gran aporte para el sector agrícola. En la metodología propuesta, se muestra un análisis por color en el espacio CIELAB de un conjunto de imágenes de malezas verdes. Se graficaron todas las tonalidades de la maleza analizada y se clasificaron a través de paralelepípedos rectangulares. Posteriormente, se describe el desarrollo de una aplicación móvil para Android, la cual cuenta con tres funciones: detección de maleza mediante una imagen, video en tiempo real, o selección desde la galería de imágenes. El rendimiento del algoritmo desarrollado se evaluó con tres algoritmos de segmentación Mean Shift, Fuzzy C-Means, K-Means y Otsu, usando la métrica NPR. Los resultados obtenidos indican que el algoritmo desarrollado es el mejor en comparación con los algoritmos de referencia. Además, se presentan capturas de pantalla de la interfaz de usuario de la aplicación. La aplicación desarrollada tiene la intención de ser útil para personas involucradas en el área agrícola que buscan detectar automáticamente malezas en sus terrenos, lo que simplifica su trabajo. Con este aporte, el trabajo en la agricultura se vuelve más eficiente y menos complicado.

**Palabras clave:** maleza, CIELAB, paralelepípedos, aplicación móvil, segmentación

### **Abstract:**

Weeds are one of the biggest problems in agriculture worldwide, as they compete for light, soil nutrients, and other essential components for the proper growth of crops. Techniques used to ensure appropriate crop development have generated negative consequences for the environment and health due to excessive use of fertilizers. For this reason, modern agriculture has implemented technified processes that allow for improved productivity and competitiveness of crops. Artificial intelligence has emerged as an alternative to solving problems in various industrial sectors, but its use in agriculture is limited. Therefore, the implementation and development of a mobile application that allows for the detection of weeds in ready-to-cultivate lands represents a significant contribution to the agricultural sector. The proposed methodology shows a color analysis in the CIELAB space of a set of green weed images. All shades of the analyzed weeds were plotted and classified through rectangular parallelepipeds. Subsequently, the development of a mobile application for Android is described, which includes three functions: weed detection through an image, real-time video, or selection from the image gallery. The performance of the developed algorithm was evaluated with three segmentation algorithms: Mean Shift, Fuzzy C-Means, K-Means, and Otsu, using the NPR metric. Results indicate that the developed algorithm is the best in comparison to reference algorithms. Additionally, user interface screenshots of the application are presented. The developed application is intended to be useful for people involved in agriculture who seek to automatically detect weeds in their fields, which simplifies their work. With this contribution, work in agriculture becomes more efficient and less complicated.

**Keywords:** weed, CIELab, parallelepipeds, mobile app, segmentation.

### **INTRODUCCIÓN**

Una gran problemática en los cultivos y suelos mexicanos e internacionales, son las malezas (Osorio-Burgos, 2021). La maleza es un tipo de planta que crece en el suelo junto con las plantas de cultivo, estas plantas no deseadas agotan los nutrientes, agua y espacio asignado para el cultivo previsto (Amaya, 2018). Finalmente, causa una gran reducción en el rendimiento del cultivo, interfiere con las operaciones agrícolas, deteriora la calidad y actúa como anfitrión alternativo para varias plagas y enfermedades de insectos. También, algunas malezas liberan sustancias tóxicas que afectan el crecimiento del cultivo (Karam y Brighenti, 2022).

Las técnicas utilizadas para garantizar el apropiado crecimiento de los cultivos han desencadenado consecuencias tanto al medio ambiente como a la salud, debido al uso excesivo de fertilizantes (Gómez-Ramos, 2020). Así mismo, afectan al laboreo constante del suelo con maquinaria (Pannacci y Tei, 2014; Annett et al., 2013).



Esto conlleva a implementar en la agricultura moderna, procesos tecnificados que permitan mejorar la productividad y competitividad del cultivo. Para lograrlo se integran tecnologías como el aprendizaje de máquina (Wang, 2019), sistemas de posicionamiento global (GPS) (Asha, 2022), sensores (Rosle, 2021) y sistemas de información.

El control mecánico presenta una gran demanda a nivel mundial, debido a las restricciones aplicadas por los gobiernos y a la necesidad de aportar una solución más eficiente para el control de maleza (Melander et al., 2015). Dichas soluciones se presentan en el uso de máquinas de labranza que afectan de diferente forma el desarrollo de la maleza, puesto que usualmente las herramientas efectúan un desraizado, corte y posterior reincorporación de los desechos al suelo, perturbando la supervivencia y competitividad de esta frente al cultivo. Del mismo modo, la intervención mecánica en el suelo promueve la germinación de especies, ya que modifica y moldea la estructura del terreno, permitiendo la circulación del aire y agua, las cuales favorecen al desarrollo del cultivo (Lundkvist y Verwijst, 2011).

La implementación de visión computacional en la agricultura permite trabajar en tiempo real otorgando al mecanismo la capacidad de identificar y clasificar las especies de maleza que se encuentran en el cultivo (Slaughter et al., 2008). El departamento de biología e ingeniería agrícola de la Universidad de California llevó a cabo en el 2012 una investigación del uso de imágenes hiperespectrales para la identificación de dos especies de maleza predominantes en un cultivo de tomate (Zhang et al., 2012). Este sistema fue acoplado a un actuador de propulsión a chorro el cual a través de microdosificación aplicaba aceite orgánico a alta temperatura, logrando con exactitud el control del 90% de las especies de maleza. Otros aspectos importantes que la visión computacional puede cubrir para la mejor producción de artículos agrícolas son:

- Control de calidad en la producción de alimentos,
- Automatización de cosechadoras y sembradoras,
- Medición automática del área foliar en diversas plantas para predecir su rendimiento,
- Medición de color no destructivo en productos agrícolas para su correlación con sus propiedades fisicoquímicas y su deterioro.



Desafortunadamente, la detección de malezas no ha sido ampliamente abordado mediante la visión computacional. Esto se debe principalmente, al temor en la manipulación de nuevas tecnologías por parte del personal agrícola tradicional. Aunque se ha observado, que actualmente es más sencillo para las personas manipular un dispositivo móvil debido a su fácil acceso por la reducción en los costos.

De acuerdo a lo mencionado, en este trabajo se propone una metodología para la detección automática de malezas verdes de forma computacional y mediante un algoritmo simple y rápido. Además, se desarrolla una aplicación para dispositivos móviles como una herramienta fácil de usar a los agricultores o personas en general que estén interesados en el tema.

En el resto del artículo se describirá el algoritmo desarrollado para la detección de malezas verdes. También se analizan los resultados cuantitativos de nuestra propuesta comparados con metodologías existentes. Por último, se discutirán los resultados cualitativos de la aplicación desarrollada para dispositivos móviles.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El proceso llevado a cabo en este trabajo consta de dos fases, desarrollo de un algoritmo para la segmentación por el color de una maleza y desarrollo de una aplicación móvil en el entorno Android, los cuales son descritos en esta sección.

### **Desarrollo del algoritmo de segmentación**

La primera etapa consta del desarrollo de un algoritmo de segmentación por color para el cual se usó el espacio de color CIELAB. Normalmente las imágenes que son capturadas desde un dispositivo fotográfico se obtienen en un formato RGB, en este trabajo se hace una transformación a CIELAB por la facilidad que este espacio de color ofrece para analizar los colores presentes en la imagen con características de luminosidad diferentes.





## Espacio CIELAB

El espacio de color CIE 1976 ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) es un espacio de color perceptualmente uniforme y fue propuesto por la CIE en 1976 (Schanda, 2007). Para la conversión de RGB a CIELAB, los datos primero son transformados al espacio CIEXYZ. Para transformar una imagen de RGB a CIEXYZ, el espacio RGB usado necesita establecerse. Aquí, sRGB es usado porque se basa en un espacio calibrado en colorimetría RGB (Stokes et al, 1996). Se aplica (1) donde  $\{R, G, B\} \in [0,1]$  son las componentes de color normalizadas. Los números de la matriz de conversión a continuación son exactos, con el número de dígitos especificado en los estándares CIE (Fairman, 1997).

$$\begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.412 & 0.357 & 0.180 \\ 0.212 & 0.715 & 0.072 \\ 0.019 & 0.119 & 0.950 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix} \quad (1)$$

El espacio de color CIELAB es calculado desde CIEXYZ usando (2)-(5), para obtener cada una de las componentes.

$$L^* = 116f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) - 16, \quad (2)$$

$$a^* = 500 \left[ f\left(\frac{X}{X_n}\right) - f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) \right], \quad (3)$$

$$b^* = 200 \left[ f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) - f\left(\frac{Z}{Z_n}\right) \right], \quad (4)$$

$$f(t) = \begin{cases} t^{\frac{1}{3}} & \text{si } t > \sigma^3 \\ \frac{t}{3\sigma^2} + \frac{16}{116} & \text{si } t \leq \sigma^3 \end{cases} \quad (5)$$

## Etapas de entrenamiento

Se creó una base de datos de malezas de tal manera que obtuvieran las diferentes tonalidades en verde que comúnmente suele tomar (Figura 1).





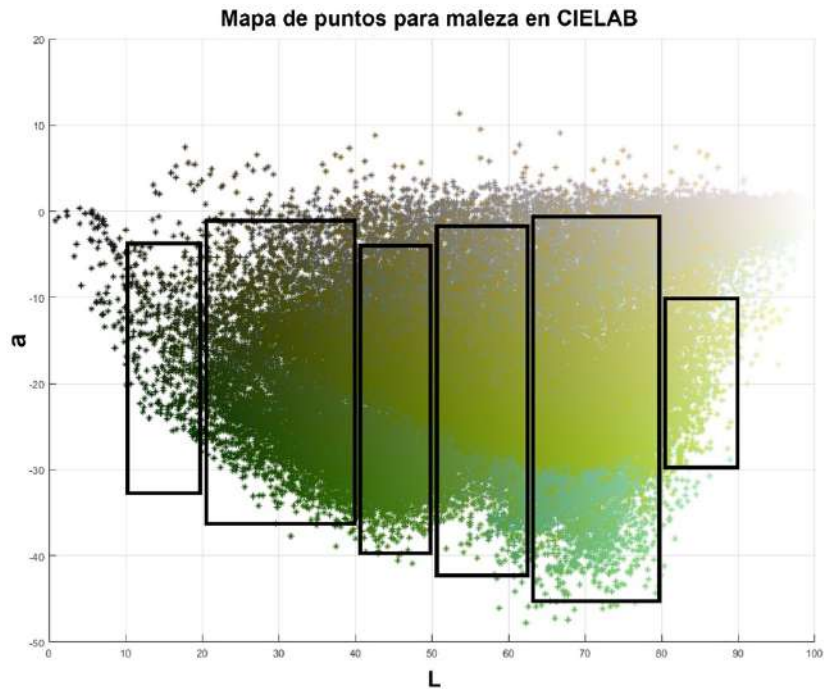
**Figura 1.** Imágenes de las malezas que fueron usadas en el entrenamiento.

**Figure 1.** Images of the weeds that were used in the training.

Paso siguiente, se construyó un mapa de puntos usando las intensidades de cada píxel a fin de observar los distintos tipos de luminosidad del color verde, con esto se procedió a la creación de varios paralelepípedos mediante experimentación por prueba y error con la componente  $L$  para encontrar los valores aproximados en los canales  $a$  y  $b$ . Las Figuras 2 y 3, muestran los seis paralelepípedos creados usando como referencia la componente  $a$  (Figura 2) y  $b$  (Figura 3), que encierran las diferentes tonalidades que la maleza puede tomar en color verde. En el eje  $L$ , en cada gráfica, los valores van desde 10 (tonalidades de verde oscuras), hasta 90 (tonalidades de verde claros).

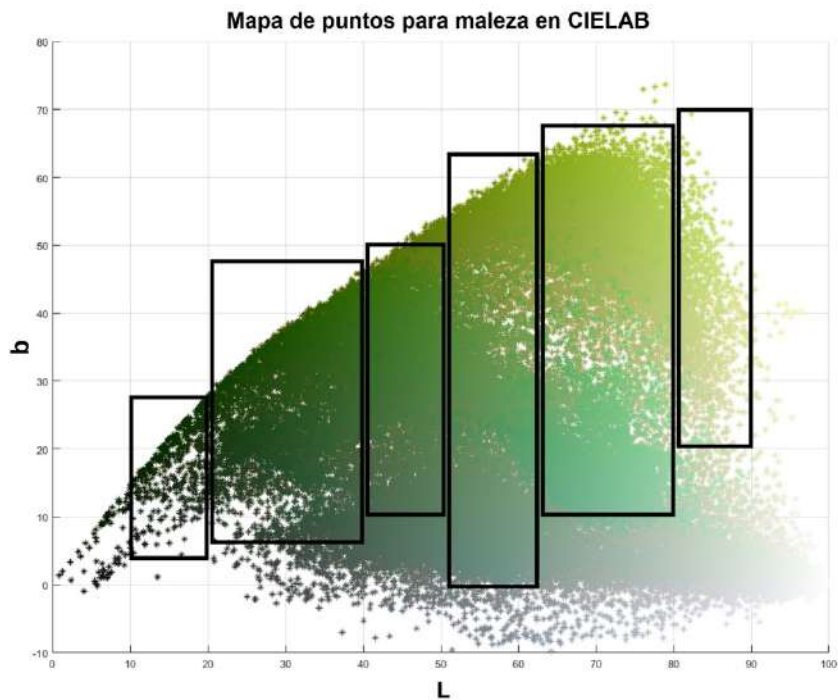
Al localizar los rangos de la componente en  $L$ , se creó una máscara (imagen en blanco y negro), en donde si el valor de los canales ( $L$ ,  $a$ ,  $b$ ) del píxel en la imagen a analizar está entre los rangos de algún paralelepípedo, el píxel toma un valor de 1, de otra forma toma un valor de 0. A este proceso lo podemos considerar como nuestra binarización o etiquetado de la imagen, recordando que negro (cero) no corresponde a maleza, y blanco (uno) sí corresponde a la misma.





**Figura 2.** Gráfica del mapeo de datos dividida en intervalos entre las componentes  $L$  y  $a$ .

**Figure 2.** A graph of the data mapping divided into intervals between the  $L$  and  $a$  components.



**Figura 3.** Gráfica del mapeo de datos dividida en intervalos entre las componentes  $L$  y  $b$ .

**Figure 3.** A graph of the data mapping divided into intervals between the  $L$  and  $b$  components.



## Metodología de la aplicación móvil

Habiendo desarrollado el algoritmo que detecta las malezas por color, se procedió a la implementación del algoritmo de la aplicación móvil, tomando en cuenta el siguiente orden:

1. Conversión de la imagen capturada por el dispositivo del formato *uint8* a *double* y normalización.
2. Conversión de *RGB* a *CIELab*.
3. Segmentación de la imagen por el algoritmo desarrollado.
4. Uso de operaciones morfológicas para mejorar la segmentación.
5. Sobre posición de la imagen original sobre la imagen obtenida del algoritmo de segmentación.

Finalmente, en la Figura 4 se muestra un diagrama de bloques con el proceso completo llevado a cabo.

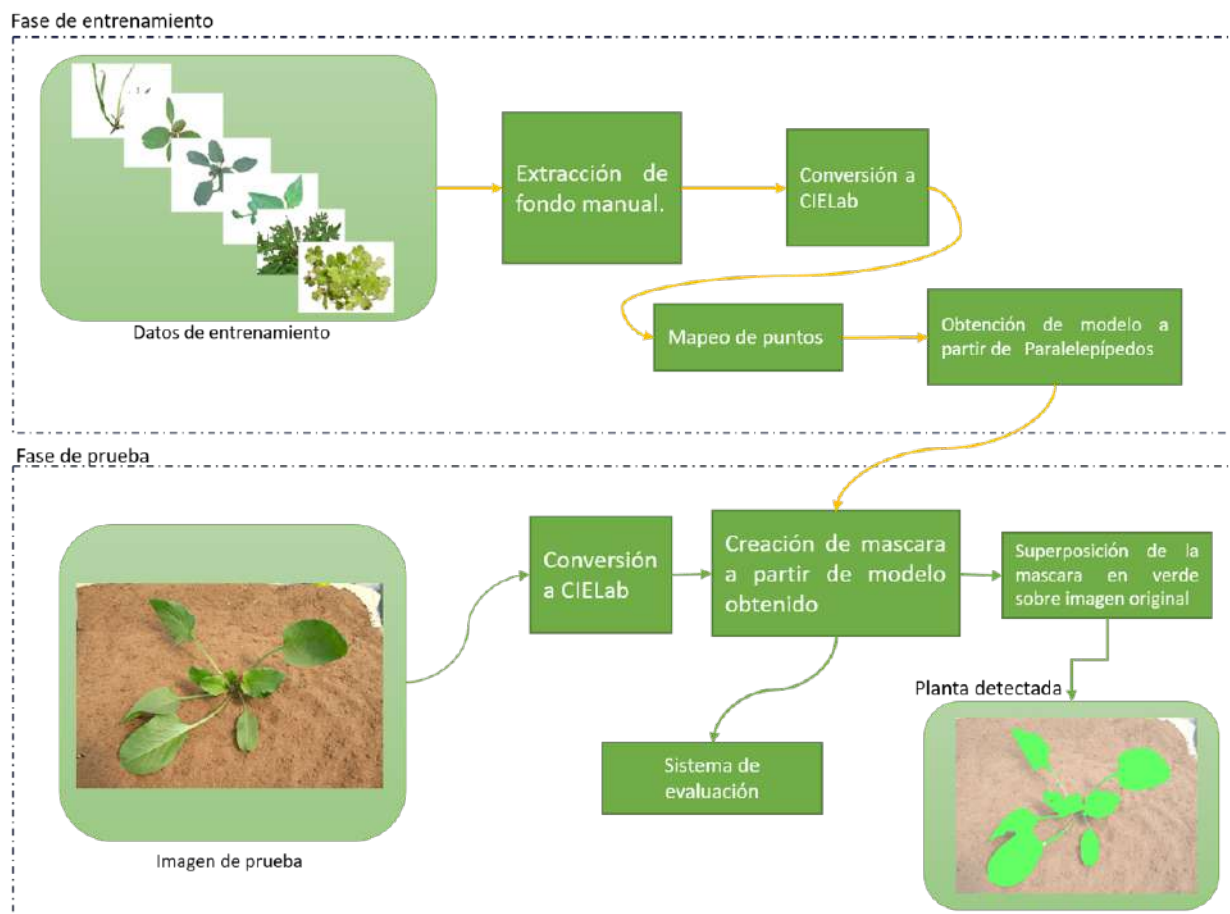


Figura 4. Diagrama de bloques de la aplicación desarrollada.

Figure 4. Block diagram of the developed application.

El desarrollo de la aplicación móvil fue llevado a cabo mediante los siguientes softwares: Android Studio, OpenCV y OpenCV Manager.

La interfaz de la aplicación móvil se añadió el logo de la aplicación y en la parte inferior de la interfaz se agregaron cuatro botones:

- Botón Capturar: Botón parte superior izquierda, su función principal es capturar una imagen para después ser procesada por el algoritmo ya creado.
- Botón Examinar: Botón parte superior derecha, su función principal es examinar en la galería la imagen deseada para posteriormente el usuario la seleccione y pueda ser procesada por el algoritmo ya creado.
- Botón Tiempo Real: Botón inferior izquierda, su función principal es procesar por el algoritmo ya creado la imagen captada por la cámara en tiempo real.
- Botón Info: Botón inferior derecha, su función es proporcionar información sobre la aplicación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evaluación del algoritmo propuesto

Para evaluar el rendimiento del algoritmo desarrollado, se utilizaron 100 imágenes distintas a las empleadas durante la etapa de entrenamiento descrita en la metodología. Para cada una de estas 100 imágenes, se elaboró una "verdad de referencia" mediante la eliminación manual del fondo, lo que permitió obtener una imagen que mostraba únicamente la maleza de interés. Posteriormente, se aplicó un proceso de umbralización para obtener una imagen binaria con dos colores: blanco para la maleza de interés y negro para el fondo. Se puede observar un ejemplo de esta imagen binaria en la Figura 5.



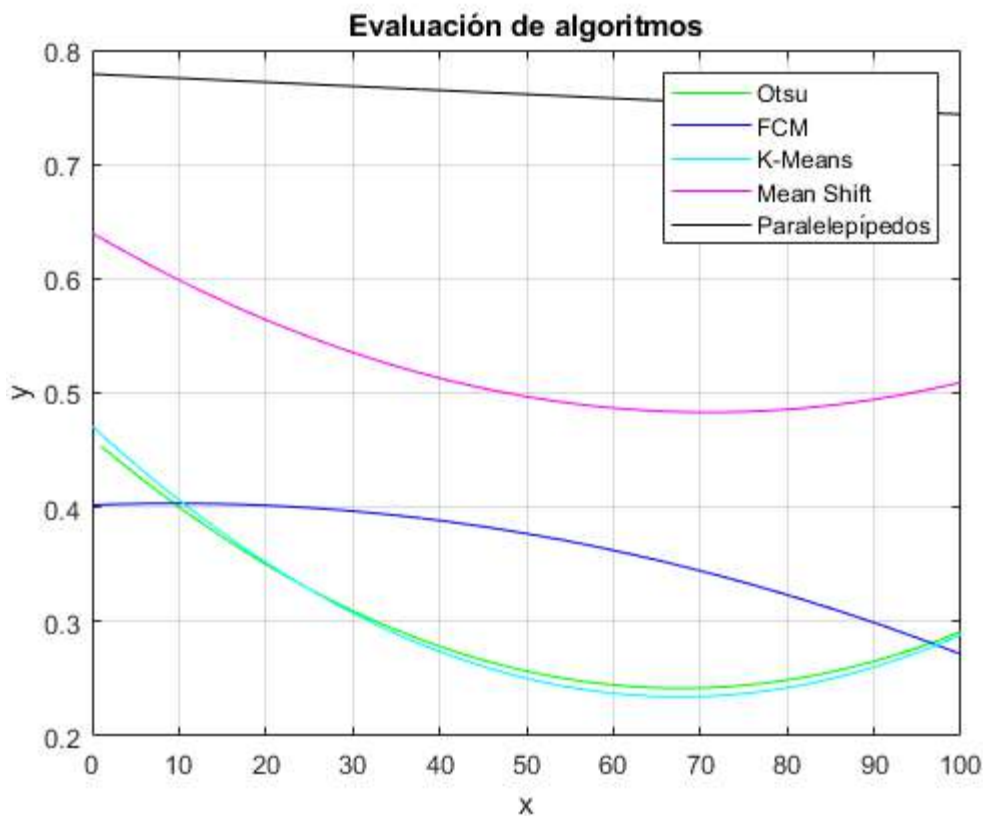


**Figura 5.** Ejemplo de seis imágenes usadas en la evaluación. a) Imágenes con el fondo extraído manualmente, b) binarización de a).

**Figure 5.** Example of six images used in the evaluation. a) Images with manually extracted background, b) Binarization of a)

Se consideraron cuatro algoritmos de segmentación en la evaluación: Mean Shift (Ball & Hall, 1967), K-Means (MacQueen, 1967), Fuzzy C-Means (Cannon, 1986) y la umbralización de Otsu (Otsu, 1979). Para ello, se segmentaron las 100 imágenes de malezas utilizando cada uno de los algoritmos mencionados, así como el algoritmo propuesto en este trabajo. Posteriormente, se compararon las imágenes resultantes de cada segmentación con la "verdad de referencia" mediante el uso de la métrica NPR. Cabe señalar que si los valores obtenidos de la métrica eran cercanos a 1, esto indicaba una alta similitud entre la imagen segmentada y la referencia. En caso contrario, si los resultados de la métrica eran cercanos a 0, la similitud entre ambas era nula.

Para observar el comportamiento de los resultados obtenidos mediante la métrica NPR, se utilizó una gráfica de tendencia en la que se empleó un polinomio de segundo grado (véase Figura 6). El objetivo de esta gráfica fue simplificar la visualización de los valores obtenidos de la métrica NPR para cada uno de los algoritmos evaluados. En ella, se puede apreciar una menor precisión en la tendencia de los algoritmos propuestos para la evaluación, en comparación con el algoritmo desarrollado. Esta diferencia en precisión se debe a que el algoritmo propuesto fue diseñado específicamente para detectar un objeto en particular, mientras que los demás algoritmos utilizan una metodología más "genérica" para detectar objetos.



**Figura 6.** Gráfica da ajuste polinomial de grado 2 de los resultados entre los algoritmos tradicionales de segmentación y el algoritmo propuesto contra las imágenes de referencia.

**Figure 6.** Graph showing the second-degree polynomial fit of the results between traditional segmentation algorithms and the proposed algorithm against the reference images.

Con el objetivo de resumir los valores obtenidos en las comparaciones, se emplearon cuatro medidas estadísticas: promedio, mediana, trimedia y desviación estándar, las cuales se presentan en la Tabla 1. Se observa que el algoritmo propuesto supera de manera contundente a los algoritmos tomados como referencia en cada una de estas medidas. En segundo lugar, se encuentra el algoritmo Mean Shift, el cual, en promedio, presenta mejores resultados en contraste con los demás algoritmos de segmentación evaluados. Es importante destacar que no todos los algoritmos son perfectos, algunos suelen ser más efectivos para cierto tipo de imágenes. En este caso, el algoritmo propuesto demuestra ser efectivo para la mayoría de las imágenes evaluadas.

**Tabla 1.** Resultados estadísticos de la comparación de cada uno de los algoritmos contra las imágenes de referencia usando la métrica NPR.

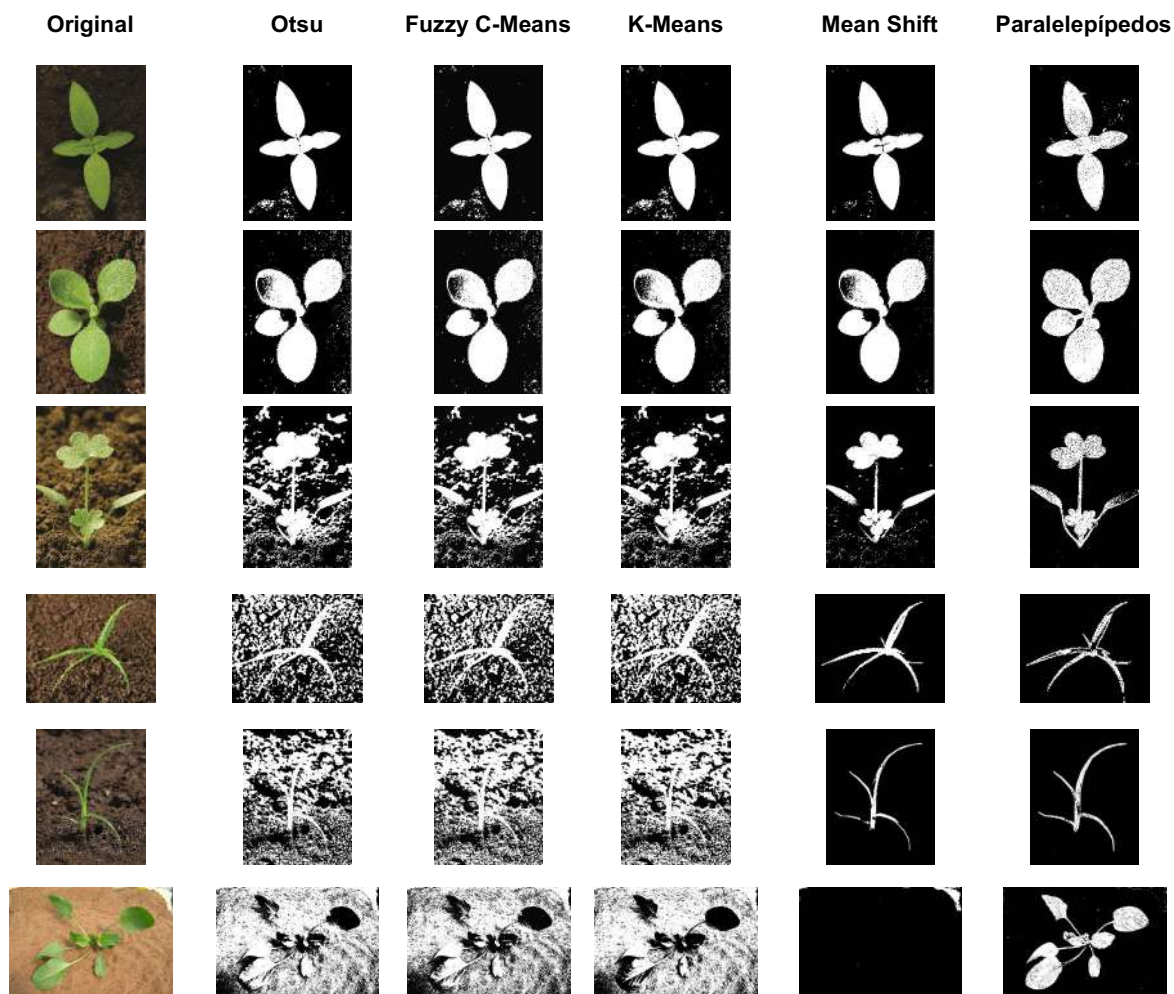
**Table 1.** Comparison of statistical results of traditional algorithms and our proposed algorithm against reference images using the NPR metric.

<b>Algoritmo</b>	<b>Promedio</b>	<b>Mediana</b>	<b>Trimedia</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>Otsu</b>	0.2955	0.1872	0.2106	0.2935
<b>Fuzzy C-Means</b>	0.3629	0.3403	0.3435	0.2446
<b>K-Means</b>	0.2926	0.1840	0.2068	0.2935
<b>Mean Shift</b>	0.5221	0.6157	0.5644	0.3496
<b>Paralelepípedos</b>	<b>0.7610</b>	<b>0.8146</b>	<b>0.8052</b>	<b>0.1780</b>

A continuación, se muestra una galería de seis imágenes pertenecientes al conjunto usado en la evaluación del algoritmo, donde se pueden observar los resultados obtenidos por cada método (Figura 7). Cada columna representa: la imagen original, los resultados de la metodología Otsu, los resultados del algoritmo Fuzzy C-Means, los resultados del algoritmo K-Means, los resultados del algoritmo Mean Shift y los resultados del algoritmo propuesto. Es importante destacar que cuando el color de la maleza resalta en comparación con el fondo, cualquier algoritmo puede detectarla correctamente. El problema surge cuando el color de fondo es más contrastante que el de la maleza, momento en que los algoritmos Otsu, Fuzzy C-Means y K-Means suelen fallar, mientras que el algoritmo propuesto se destaca.





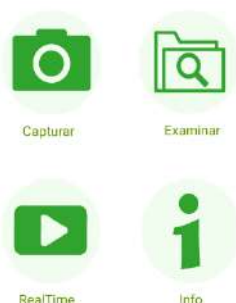
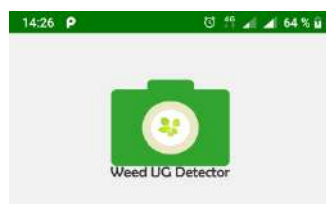


**Figura 7.** Galería de seis imágenes con sus respectivos resultados.

**Figure 7.** Gallery of six images with their respective results.

### Resultados de la aplicación

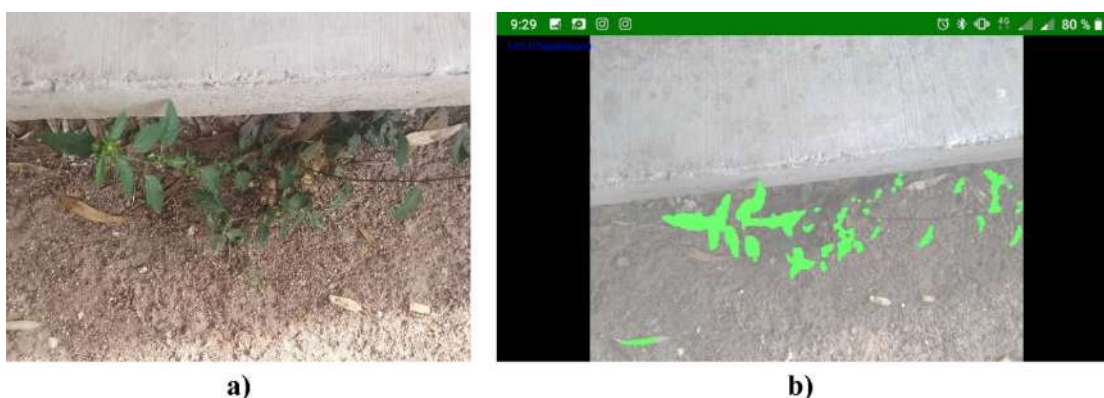
La Figura 8, muestran la interfaz de la aplicación desarrollada. La aplicación desarrollada se probó en las versiones Android 6 Marshmallow (Android Studio, 2019a), Android 8.0 Oreo (Android Studio, 2019b) y Android 9 Pie (Android Studio, 2019c), en las cuales funcionó de forma correcta. Para un funcionamiento adecuado de la aplicación, se debe instalar una aplicación llamada openCVManager. Cuando se inicia la aplicación móvil por primera vez, se comprueba si se ha instalado la aplicación mencionada. Si no es el caso, la aplicación redirigirá a una página web donde el usuario podrá descargar e instalar la versión correspondiente de la aplicación a su dispositivo.



**Figura 8.** Interfaz de usuario de la aplicación móvil desarrollada.

**Figure 8.** User interface of the developed mobile application.

A continuación, se describe el funcionamiento de cada uno de los elementos dentro de la interfaz de usuario de la aplicación desarrollada. Cuando el usuario presionó el botón capturar, la aplicación mostrará la cámara del dispositivo, con la cual, se podrá tomar una fotografía de la maleza de interés. La aplicación mostrará la galería cuando el botón examinar sea pulsado, desde ahí se podrá elegir una imagen de interés a analizar. Si la elección es el botón RealTime, se podrá detectar la maleza en tiempo real (video). La Figura 9, muestra una captura de pantalla del funcionamiento de la función RealTime.



**Figura 9.** Captura de pantalla del funcionamiento de la función RealTime. a) Escena antes del procesamiento, b) Procesamiento de la escena en tiempo real.

**Figure 9.** Screenshot of the RealTime function in action. a) Scene before processing, b) Real-time processing of the scene.

Por último, se tomó como referencia la imagen binarizada del algoritmo propuesto para desplegar la imagen resultado en la aplicación. Se comprobó píxel a píxel si existía el valor 1 (color blanco). Si el valor 1 existía, el píxel tomaba un color verde sobre la imagen original, mostrando la maleza detectada, en caso contrario, se tomaban los valores de la imagen original (Figura 10).



**Figura 10.** Algoritmo de segmentación por paralelepípedos. a) Maleza, b) maleza procesada por el algoritmo propuesto resaltado con un color verde.

**Figure 10.** Parallelepiped segmentation algorithm. a) Weeds, b) Weeds processed by the proposed algorithm highlighted in green.

## CONCLUSIÓN

En conclusión, el algoritmo desarrollado en este trabajo ha demostrado ser una herramienta efectiva para detectar malezas en imágenes agrícolas. La elección del espacio de color CIELAB resultó esencial para abordar el desafío de la variabilidad de la iluminación en las imágenes. Además, la visualización de los datos a través de gráficas y la creación de paralelepípedos permitieron una mejor comprensión y clasificación de las malezas. La aplicación desarrollada tiene como objetivo ser útil para agricultores y profesionales del sector, permitiéndoles detectar de manera automática las malezas en sus terrenos y mejorar su trabajo de forma sencilla y eficiente. La posibilidad de utilizar algoritmos más complejos como las redes neuronales convolucionales o cualquier otro método basado en el aprendizaje ofrece la oportunidad de mejorar aún más la capacidad de detección de la aplicación. En resumen, este trabajo proporciona una base sólida para futuras investigaciones en la detección automática de malezas en imágenes agrícolas.

## **Agradecimientos**

Edgar Francisco Duque Vazquez agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por el apoyo proporcionado por medio de la beca escolar (CVU 1081409).

## **LITERATURA CITADA**

- Amaya, A., Santos, M., Morán, I., Vargas, P., Comboza, W., & Lara, E. (2018). Malezas presentes en cultivos del cantón Naranjal, Provincia Guayas, Ecuador. *Investigatio*, (11), 1-16.
- Asha, K. R., Mahore, A., Malkani, P., Gaddikeri, V., Rathod, S. K., Satpute, A. N., & Stanly, N. M. (2022). An overview of Automation, Robotics, and Sensor-based Approaches in Weed Detection and Control. *Indian Journal of Ecology*, 49(6), 2140-2148.
- Android Studio, (2019). Marshmallow. Recuperado de: <https://www.android.com/versions/marshmallow-6-0/>.
- Android Studio Studio., (2019) 8.0 oreo. Recuperado de: <https://www.android.com/versions/oreo-8-0/>,
- Android Studio Studio., (2019) 9 pie. Recuperado de: <https://www.android.com/versions/pie-9-0/>.
- Annett, R., Habibi, H.R. & Hontela, A. (2014), Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, 34: 458-479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>.
- Ball, G. H., & Hall, D. J. (1967). A clustering technique for summarizing multivariate data. *Behavioral science*, 12(2), 153-155.
- Cannon, R. L., Dave, J. V., & Bezdek, J. C. (1986). Efficient implementation of the fuzzy c-means clustering algorithms. *IEEE transactions on pattern analysis and machine intelligence*, (2), 248-255.
- Fairman, H. S., Brill, M. H., & Hemmendinger, H. (1997). How the CIE 1931 color-matching functions were derived from Wright-Guild data. *Color Research & Application: Endorsed by Inter-Society Color Council, The Colour Group (Great Britain), Canadian Society for Color, Color Science Association of Japan, Dutch Society for the Study of Color, The Swedish Colour Centre Foundation, Colour Society of Australia, Centre Français de la Couleur*, 22(1), 11-23.
- Gómez-Ramos, M. Y., Ruiz-Castilla, J. S., & Garcia-Lamont, F. (2020). Clasificación de plantas de maíz y maleza: Hacia la mejora de la fertilización en México.
- Karam, D., & Brighenti, A. (2022). Identificación y control de malezas. Ministerio de agricultura, Pecuaria y Abastecimiento (MAPA), 97 – 103.
- Lundkvist, A., & Verwijst, T. (2011). Weed biology and weed management in organic farming. *Research in Organic Farming*, 10-41.

- MacQueen, J. (1967, June). Classification and analysis of multivariate observations. In 5th Berkeley Symp. Math. Statist. Probability (pp. 281-297). Los Angeles LA USA: University of California.
- Melander, B., Lattanzi, B., & Pannacci, E. (2015). Intelligent versus non-intelligent mechanical intra row weed control in transplanted onion and cabbage. *Crop Protection*, 72, 1-8.
- Osorio-Burgos, O., Salazar-Pinilla, L. C., & Cornejo-López, S. (2021). Identificación de malezas en el cultivo de ñame (*Dioscorea alata* L.). *Ciencia Agropecuaria*, (32), 51-70.
- Otsu, N. (1979). A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE transactions on systems, man, and cybernetics*, 9(1), 62-66.
- Pannacci, E., & Tei, F. (2014). Effects of mechanical and chemical methods on weed control, weed seed rain and crop yield in maize, sunflower and soyabean. *Crop protection*, 64, 51-59. doi: 10.1016/j.cropro.2014.06.001.
- Rosle, R., Che'Ya, N. N., Ang, Y., Rahmat, F., Wayayok, A., Berahim, Z., ... & Omar, M. H. (2021). Weed detection in rice fields using remote sensing technique: A review. *Applied Sciences*, 11(22), 10701.
- Schanda, J. (Ed.). (2007). *Colorimetry: understanding the CIE system*. John Wiley & Sons.
- Singh, R., Srivastava, P., Singh P., Upadhyay, S., & Raghubanshi, A. (2019). Human overpopulation and food security: Challenges for the agricultura sustainability. In *urban agriculture and food systems: Breakthroughs in research and practice*. IGI Global, 439-467.
- Slaughter, D. C., Giles, D. K., & Downey, D. (2008). Autonomous robotic weed control systems: A review. *Computers and electronics in agriculture*, 61(1), 63-78.
- Stokes, M. A. (1996). *An introduction to tree-ring dating*. University of Arizona Press.
- Unnikrishnan, R., & Hebert, M. (2005). Measures of similarity. In 2005 Seventh IEEE Workshops on Applications of Computer Vision (WACV/MOTION'05)-Volume 1 (Vol. 1, pp. 394-394). IEEE.
- Wang, A., Zhang, W., & Wei, X. (2019). A review on weed detection using ground-based machine vision and image processing techniques. *Computers and electronics in agriculture*, 158, 226-240.
- Zhang, Y., Staab, E. S., Slaughter, D. C., Giles, D. K., & Downey, D. (2012). Automated weed control in organic row crops using hyperspectral species identification and thermal micro-dosing. *Crop Protection*, 41, 96-105.



## ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE FLUORURO EN SUELO VERTISOL CRÓMICO DEL ESTADO DE GUANAJUATO Y SU USO POTENCIAL PARA REMEDIACIÓN DEL AGUA <sup>a</sup>

### ANALYSIS OF FLUORIDE ADSORPTION CAPACITY IN CHROMIC VERTISOL SOIL FROM THE STATE OF GUANAJUATO AND ITS POTENTIAL USE FOR WATER REMEDIATION

Solis Reyes, K.F.<sup>1</sup>; Saldaña Robles, A.<sup>1,2, \*</sup>; Zanor, G.A.<sup>1,3</sup>; García, M.G.<sup>4</sup>; Saldaña Robles, N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Carretera Irapuato Silao Km 9, Irapuato 36500, Guanajuato, México.

<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Agrícola, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Carretera Irapuato Silao Km 9, Irapuato 36500, Guanajuato, México.

<sup>3</sup>Departamento de Ciencias Ambientales, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Carretera Irapuato Silao Km 9, Irapuato 36500, Guanajuato, México.

<sup>4</sup>Centro de Investigaciones en Ciencias de la Tierra (CICTERRA) CONICET -UNC, Argentina; Universidad Nacional de Córdoba. Av. Vélez Sarsfield 1611, X5016CGA, Córdoba, Argentina.

\* E-mail: [adriana.saldana@ugto.mx](mailto:adriana.saldana@ugto.mx) (autor de correspondencia)

Fecha de envío: 15, octubre, 2022

Fecha de publicación: 20, junio, 2023

#### Resumen:

La concentración de Fluoruro (F<sup>-</sup>) en el agua subterránea del estado de Guanajuato excede el límite permisible para consumo humano señalado por la normatividad nacional (1.5 mg/L). Desafortunadamente, la principal fuente de agua en Guanajuato proviene de los mantos acuíferos, por lo tanto, la población se encuentra expuesta a enfermedades asociadas al F<sup>-</sup>. Este estudio tuvo como objetivo analizar la capacidad de adsorción del F<sup>-</sup> en solución acuosa sobre suelo tipo Vertisol crómico y evaluar su uso potencial para la remediación del agua. Se determinaron las principales características fisicoquímicas del suelo y los datos experimentales del equilibrio de adsorción de F<sup>-</sup> fueron evaluados aplicando las isothermas de Langmuir y Freundlich. Los resultados demostraron que la concentración de F<sup>-</sup> fue eficazmente adsorbido por el suelo Vertisol crómico y se puede relacionar con el alto contenido de arcilla, materia orgánica (MO) y minerales de Hierro (Fe). Además, se comprobó que los datos experimentales de adsorción se ajustaron al modelo de Langmuir y se determinó una máxima capacidad de adsorción ( $q_m$ ) de 214.13 mg/kg en condiciones básicas. Estos resultados evidencian que el suelo Vertisol crómico posee características que permiten una alta capacidad de adsorción de F<sup>-</sup>, por lo cual su uso como material adsorbente es viable.

**Palabras clave:** geomaterial adsorbente, contaminación del agua, flúorfluoruro, isoterma.

---

<sup>a</sup> Tesis

**Abstract:**

The concentration of fluoride ( $F^-$ ) in groundwater in the state of Guanajuato exceeds the permissible limit for human consumption established by national regulations (1.5 mg/L). Unfortunately, the main source of water in Guanajuato comes from aquifers; therefore, the population is exposed to diseases associated with  $F^-$ . This study aimed to analyze the adsorption capacity of  $F^-$  in aqueous solution on Chromic Vertisol soil and to evaluate its potential use for water remediation. The characteristics of the studied soil were determined and the experimental data of the  $F^-$  adsorption equilibrium were evaluated by applying the Langmuir and Freundlich isotherms. The results showed that the  $F^-$  concentration was effectively adsorbed by the chromic Vertisol soil and can be related to the high content of clay, organic matter (MO) and iron (Fe) minerals. In addition, the experimental adsorption data were found to fit the Langmuir model and a maximum adsorption capacity ( $q_m$ ) of 214.13 mg/kg was determined under basic conditions. These results show that the chromic Vertisol soil has characteristics that allow a high adsorption capacity of  $F^-$ , therefore it is viable for use as an adsorbent material.

**Keywords:** adsorbent geomaterial, water contamination, fluor, isotherm.

**INTRODUCCIÓN**

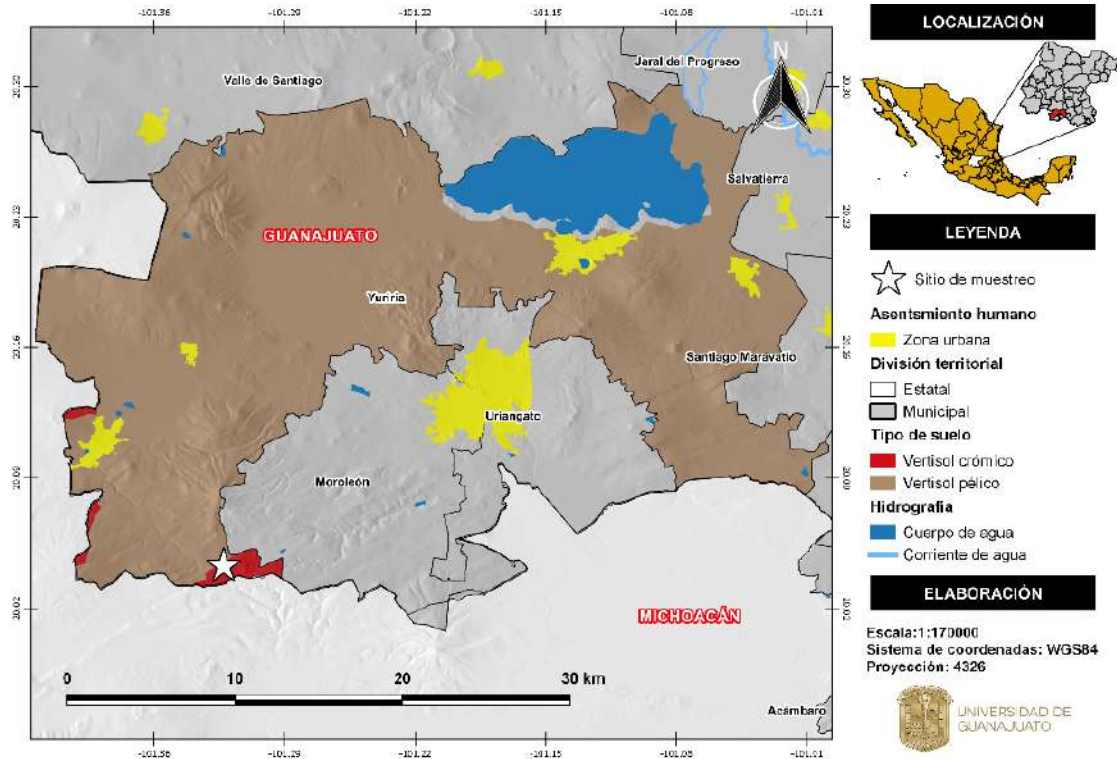
La población de Guanajuato se encuentra expuesta a problemas de salud asociados al consumo de  $F^-$ , tales como la fluorosis dental y esquelética, debido a que la principal fuente de agua proviene de mantos acuíferos con concentraciones de  $F^-$  que superan el límite establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 de 1.5 mg/L. De acuerdo con Morales-Arredondo et al. (2018), la contaminación por  $F^-$  en aguas subterráneas se asocia a causas naturales (geología local y manifestaciones geotermales).

Diversos estudios, tales como Wambu et al. (2016) y Pillai et al. (2021), indicaron que la implementación del suelo como adsorbente destaca por tener una elevada área superficial, estar fácilmente disponible en abundancia y por su naturaleza no tóxica. Además, según Pickering (1985) el uso del suelo como material adsorbente en la remoción de  $F^-$  del agua es eficiente, puesto que, uno o más componentes del suelo, principalmente MO, arcilla y oxi-hidróxidos de Aluminio (Al) y Fe, presentan afinidad por el  $F^-$ . En particular, los suelos Vertisoles contienen 30% o más de arcilla y predominan en el estado de Guanajuato (INEGI, 2005; USDA-NRCS, 1999).

Para analizar la capacidad de adsorción del elemento estudiado en solución acuosa sobre el material adsorbente y bajo diferentes concentraciones del contaminante se utilizan técnicas como las isothermas de adsorción (Plazinski y Plazinska, 2012). Por lo anterior, la presente investigación tiene como objetivo analizar la capacidad de adsorción del  $F^-$  en solución acuosa utilizando suelo tipo Vertisol crómico y evaluar su uso potencial para la remediación de aguas contaminadas con  $F^-$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectó una muestra simple de suelo superficial (0-20 cm de profundidad) de tipo Vertisol crómico y sin impacto antropogénico en el municipio de Yuriria del estado de Guanajuato (Figura 1). Asimismo, se identificó el color *in situ* mediante la Tabla Munsell. Para efectuar el muestreo del suelo en el área de estudio, la preparación de la muestra y las determinaciones de propiedades físicas y químicas como conductividad eléctrica (CE), textura, contenido de MO y pH, se siguieron los protocolos de la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Además, todas las determinaciones y experimentos se realizaron por triplicado para lograr exactitud experimental y estadística.



**Figura 1.** Caracterización edafológica del municipio de Yuriria, Guanajuato. Se muestra el sitio de muestreo. Fuente: INEGI (2005).

**Figure 1.** Edaphological characterization in the municipality of Yuriria, Guanajuato. The sampling site is shown. Source: INEGI (2005).



## Experimento de adsorción

Se realizaron experimentos de adsorción en reactores por lotes a pH 6 y concentraciones de  $F^-$  en solución en un rango de 0-10 ppm (con intervalos de 1 ppm). Las soluciones de  $F^-$  se prepararon a partir de la dilución de fluoruro de sodio (NaF) en agua destilada. Se utilizó una relación adsorbente-solución 1:20, la suspensión se mantuvo a 25 °C y 120 rpm en un agitador orbital (modelo IKA KS4000) hasta alcanzar condiciones de equilibrio. El pH de la mezcla al inicio y durante el experimento fue constantemente verificado y se ajustó mediante la adición de 0.1 M de hidróxido de sodio (NaOH). En condiciones de equilibrio, la suspensión se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min y se filtró con una membrana de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ . El contenido de  $F^-$  en la solución se midió con un electrodo de ion combinado para  $F^-$  (Modelo Orion<sup>tm</sup> 9609BNWP). Antes de la medición se utilizó una solución amortiguadora de fuerza iónica total (TISAB, por sus siglas en inglés) II, para ajustar el pH y evitar la interferencia con Silicio (IV), Fe (III) y Aluminio (III). La cantidad de  $F^-$  adsorbido ( $q_e$ ) fue calculada mediante la ecuación (1).

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) V}{M} \quad (1)$$

En donde  $C_0$  es la concentración inicial de  $F^-$  en la solución;  $C_e$  es la concentración de  $F^-$  en la solución en equilibrio;  $M$  es la masa del suelo; y  $V$  es el volumen de la solución.

## Modelos de Isotermas

En condiciones de equilibrio, se utilizaron los modelos de isotermas de Langmuir y Freundlich para describir los datos experimentales utilizando las ecuaciones (2) y (3) de los modelos, respectivamente.

$$q_e = q_m \frac{K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (2)$$

$$q_e = K_f + C_e^{\frac{1}{n}} \quad (3)$$

En donde,  $K_L$  es la constante de Langmuir y se relaciona con la energía de adsorción;  $K_f$  es el factor de capacidad de Freundlich;  $n$  es el parámetro de intensidad de Freundlich y refleja la favorabilidad de la adsorción. Los datos experimentales de adsorción fueron ajustados a estos los modelos de isotermas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización del suelo

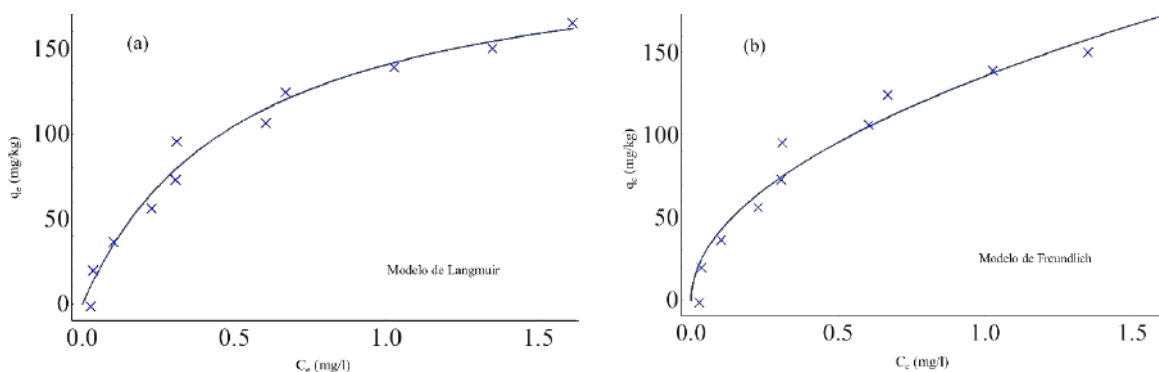
El color del suelo se identificó como marrón rojizo oscuro, correspondiente al código 2.5YR 3/4 de la Tabla Munsell, debido a la presencia de óxidos de Fe (Tiwari, 2004). El suelo mostró una CE menor a 1 dS/m, lo que indicó que el suelo no presentó salinidad, lo cual es una característica positiva ya que la disponibilidad de sodio aumenta la velocidad de dilución de  $F^-$  (Chowdhury et al., 2019). La clase textural resultó arcillosa, esto es un factor importante para la capacidad de adsorción de  $F^-$ , debido a que el  $F^-$  se enlaza en los minerales arcillosos al desplazar el hidróxido ( $OH^-$ ) de la superficie de la arcilla (Liu et al., 2014). El contenido de MO resultó con un valor de 11.84% (clase alta), lo cual es favorable puesto que la escasa materia orgánica promueve la desorción y la movilidad del  $F^-$  (D'Alessandro et al., 2012). Finalmente, el pH fue de 5.69, por lo tanto, el suelo se clasificó como medianamente ácido.

### Estudio de adsorción

Las isotermas de adsorción de  $F^-$  a pH 6 se muestran en la Figura 2 y los parámetros calculados de cada modelo se presentan en la Tabla 1. De acuerdo con el  $R^2$ , el modelo de Langmuir (1916) describió mejor los datos experimentales, sugiriendo que la capacidad de adsorción de  $F^-$  del suelo incrementa con el aumento de la concentración de  $F^-$  en solución, la adsorción se limita a una monocapa, la energía de adsorción es constante y no existe transmigración de adsorbato en la superficie del suelo (Langmuir, 1916). Los resultados muestran que a pH 6 se presentó una  $q_m$  de 214.13 mg/kg.

Algunos estudios como los presentados por Bjorvatn et al. (2003) y Gomoro et al. (2012), reportaron una  $q_m$  de 100 y 2.47 mg/kg respectivamente, en suelos lateríticos provenientes de Etiopía, en comparación, el suelo Vertisol estudiado en este trabajo tiene mayor afinidad por el  $F^-$ , en consecuencia, la capacidad de adsorción fue mayor, lo cual puede atribuirse al efecto de la textura y la mineralogía del suelo.





**Figure 2.** Ajuste de los datos experimentales de la adsorción de  $F^-$  en suelo Vertisol crómico a los modelos de (a) Langmuir y (b) Freundlich bajo condiciones de pH 6.

**Figure 2.** Fitting of experimental data of  $F^-$  adsorption on chromic Vertisol soil to the (a) Langmuir and (b) Freundlich models under pH 6 conditions.

**Table 1.** Parámetros precedidos de Freundlich y Langmuir mediante el ajuste de los datos experimentales de adsorción en pH 6.

**Table 1.** The predicted parameters of Freundlich and Langmuir by fitting to adsorption data at pH 6.

Modelo de Langmuir			Modelo de Freundlich		
$q_m$ (mg/kg)	$K_L$ (l/mg)	$R^2$	$n$	$K_f$ (l/mg)	$R^2$
214.13	1.91	0.99	0.50	135.74	0.98

## CONCLUSIÓN

El suelo Vertisol crómico con un contenido alto de MO, arcilla y minerales de Fe presentó una alta capacidad de adsorción a pH 6, por lo cual puede utilizarse para eliminar el exceso de  $F^-$  del agua potable. Los resultados son útiles para desarrollar tecnologías de bajo costo en la remoción del  $F^-$  en el agua y que puedan ser adaptadas a zonas rurales remotas, ofreciendo una estrategia sustentable para resolver un problema de prioridad nacional.

## LITERATURA CITADA

- Bjorvatn, K., Reimann, C., Ostvold, S. H., Tekle-Haimanot, R., Melaku, Z., & Siewers, U. (2003). A health problem in the Ethiopian Rift Valley 1. Assessment of lateritic soils as defluoridating agents. *Oral health & preventive dentistry*, 1(2), 141–148.
- Chowdhury, A., Adak, M. K., Mukherjee, A., Dhak, P., Khatun, J., & Dhak, D. (2019). A critical review on geochemical and geological aspects of fluoride belts, fluorosis and natural materials and other sources for alternatives to fluoride exposure. *Journal of Hydrology*, 574, 333–359. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2019.04.033>
- D'Alessandro, W., Bellomo, S., & Parello, F. (2012). Fluorine adsorption by volcanic soils at Mt. Etna, Italy. *Applied Geochemistry*, 27(6), 1179–1188. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2012.02.028>
- Gomoro, K., Zewge, F., Hundhammer, B., & Megersa, N. (2012). Fluoride removal by adsorption on thermally treated lateritic soils. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 26(3), 361–372. <https://doi.org/10.4314/bcse.v26i3.5>
- INEGI. (2005). Conjunto de datos edafológicos. Escala 1:1 000 000. Serie I. En *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*.
- Langmuir, I. (1916). The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. *Journal of the American Chemical Society*, 38(11), 2221–2295. <https://doi.org/10.1021/ja02268a002>
- Liu, X., Wang, B., & Zheng, B. (2014). Geochemical process of fluorine in soil. *Chinese Journal of Geochemistry*, 33(3), 277–279. <https://doi.org/10.1007/s11631-014-0688-9>
- Morales-Arredondo, J. I., Armienta, M. A., & Rodríguez, R. (2018). Estimación de la exposición a elevados contenidos de fluoruro en agua potable en distintas comunidades de Guanajuato, México. *Tecnología y ciencias del agua*, 09(3), 156–179. <https://doi.org/10.24850/j-tyca-2018-03-07>
- Norma Oficial Mexicana. (1996, enero 18). NOM-127-SSA1-1994 Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. *Diario Oficial de la Federación*.
- Pickering, W. F. (1985). The mobility of soluble fluoride in soils. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, 9(4), 281–308. [https://doi.org/10.1016/0143-148X\(85\)90004-7](https://doi.org/10.1016/0143-148X(85)90004-7)
- Pillai, P., Dharaskar, S., Pandian, S., & Panchal, H. (2021). Overview of fluoride removal from water using separation techniques. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101246. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101246>

Plazinski, W., & Plazinska, A. (2012). Equilibrium and Kinetic Modeling of Adsorption at Solid/Solution Interfaces. En A. Bhatnagar (Ed.), *Application of Adsorbents for Water Pollution Control* (pp. 31–80). Bentham science publishers. <https://doi.org/10.2174/97816080526911120101>

Tiwari, S. C. (2004). *Soil*. AuthorHouse.

USDA-NRCS. (1999). *Soil Taxonomy. A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys* (United States Department of Agriculture & Natural Resources Conservation Service, Eds.; 2a ed., Vol. 436).

Wambu, E. W., Ambusso, W. O., Onindo, C., & Muthakia, G. K. (2016). Review of fluoride removal from water by adsorption using soil adsorbents – an evaluation of the status. *Journal of Water Reuse and Desalination*, 6(1), 1–29. <https://doi.org/10.2166/wrd.2015.073>

