

VIII Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y el VI Simposio Nacional de Microbiología Aplicada 2022, edición híbrida

Trabajos libres orales y cartel áreas de Microbiología Aplicada

| TITULO DEL TRABAJO | PAGINA |
|---|---------------|
| Aislamiento de bacterias con actividad ureasa de muestras de suelo | 2 |
| Evaluación de residuos agroindustriales en la producción de hidrolasas por <i>Penicillium crustosum</i> en fermentación sumergida | 3 |
| Revalorización de residuos agroindustriales en la producción de pectininasas y xilanasas en fermentación sumergida con <i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275 | 4 |
| Producción de biosurfactantes de bacterias con potencial para degradar hidrocarburos | 5 |
| Evaluación de producción de ácido láctico por lactobacilos aislados de exudados vaginales de mujeres mexicanas embarazadas. | 6 |
| Producción de Celulasas a partir de <i>Penicillium crustosum</i> | 7 |
| Inmovilización covalente de lacasas en nanopartículas de ZnO, TiO ₂ y CuO para diferentes aplicaciones biotecnológicas | 8 |
| Producción de nanocelulosa mediante la utilización de biorreactores de bajo costo para <i>Chlorella sorokiniana</i> | 9 |
| Aislamiento de nanocelulosa a partir de <i>Sargassum</i> spp. de la costa caribeña | 10 |
| Desarrollo y evaluación de un Inmunosensor Electroquímico para la detección de Flavivirus | 11 |
| Cutinasas Producidas por Hongos Fitopatógenos Aislados De Agave Salmiana | 12 |

Aislamiento de bacterias con actividad ureasa de muestras de suelo

Rosabel Pérez-Fernández^{a*}, Alberto Gómez-Treviño^a, María Elena Cantú Cárdenas^a, Julio Silva-Mendoza^a, Edgar Allan Blanco Gámez^a y Ulrico López-Chuken^a

^aFacultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Universidad s/n, Ciudad Universitaria, C.P. 66455, Sn. Nicolás de los Garza, N.L. México.

*rosabel.perezfr@uanl.edu.mx.

Palabras clave: urea residual, urea, ureasa.

Introducción

La actividad ureasa se encuentra ampliamente distribuida en el suelo como consecuencia de la gran variedad de microorganismos que la poseen, extendiéndose en su colaboración algunas plantas, hongos y algas. El interés de su estudio se extiende a las áreas clínicas porque en los microorganismos aislados de pacientes afectados se relaciona este aspecto con factores de virulencia de especies patógenas. También se aprovecha esta actividad microbiana en la construcción de bio-sensores catalíticos para cuantificar urea en sistemas de flujo. Además, es bien conocida la incorporación de urea como fertilizante de suelos, confiando en los procesos ureolíticos de las microbiotas del suelo, para lograr el incremento de su contenido nitrogenado. Más allá del interés clínico y las aplicaciones establecidas, en las últimas décadas se ha enfocado su aplicación en áreas disímiles como la geología, con el propósito de aumentar la aparición de calcitas para la industria cementera, o bien, la biotecnológica con muy diversos enfoques que van desde la eliminación de la urea, hasta su aprovechamiento en la obtención de compuestos nitrogenados muy variados de aprovechamiento industrial^{1,2,3}. El propósito de este trabajo de investigación es el aislamiento de cepas bacterianas para su aplicación en la eliminación de urea. Los aislamientos se llevaron a cabo a partir de muestras de suelos con activa descomposición de materia orgánica y de recintos de animales carnívoros en cautiverio. Se realizaron diluciones y siembras en placa por extensión en agar de Christensen. Se obtuvieron cultivos puros de cada una de las cepas aisladas y se realizaron pruebas bioquímicas. Se revela el aislamiento de bacterias con actividad ureasa.

Metodología

Se llevaron a cabo recolecciones de muestras de suelo impregnados de orina de recintos de animales carnívoros mantenidos en cautiverio sin ningún tratamiento farmacológico específicamente con antibióticos. Las muestras pertenecen a recintos de *Panthera onca* (Jaguar), *Panthera tigris* (Tigre) y *Panthera leo* (León). Un segundo grupo de muestras se obtuvieron de suelos con materia vegetal en descomposición e impregnada de orina de *Equus quagga* (Cebra común). El producto de compostaje de residuos orgánicos domésticos en

granjas de *Eisenia foetida* (Lombriz de California) constituyeron el tercer grupo de muestras. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 con buffer salino de fosfatos (pH 7.5) de 10 gramos de cada una de las muestras y se inocularon 0.1 ml en placas de agar de Christensen, extendiendo con varilla de vidrio hasta distribución uniforme del volumen en la superficie de las placas de agar. Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24-48 horas.

Resultados y discusión

Las colonias con un halo rosado por vire del indicador rojo fenol, que indica generación de amoníaco por degradación de urea fueron seleccionadas. Esta primera etapa de aislamientos generó 16 cepas de bacilos Gram negativos todos con actividad ureasa confirmada. Las pruebas bioquímicas indican la presencia de los géneros Hafnia, Klebsiella y Escherichia. Aunque se trata de los primeros resultados de este proyecto, la identidad de cada uno de estos y futuros aislamientos se confirmará mediante la secuenciación del RNA Ribosomal 16S (DNA 16S).

Conclusiones

Se aislaron bacterias Gram negativas pertenecientes a los géneros Hafnia, Klebsiella y Escherichia.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo de la UANL por el apoyo al proyecto 303-CN-2022 en el programa PAICyT. Agradecemos A MVZ. José L. Perales Pérez por la recolección de las muestras de felinos en cautiverio.

Participación de los autores

Autores 1, 2 y 3: Diseño y ejecución de experimentos. Análisis de resultados.

Autores 4, 5 y 6: Asesoría y tutoría del proyecto.

Referencias

1. Mekonnen, E.; Kebede, A.; Asefa, N.; Kebede, G. y Tafesse, M. International Journal of Microbiology. **2021**, 202, 1-11.
2. Agbenyeku, E. E.; Muzenda, E. y Msibi, I. M. Proceedings of the W. C. Engineering. **2016**, 1, 1-5.
3. Do-Won Jeong, B.; Hyundong, L.; Keuncheol, J.; Mihyun, J. y Jong-Hoon, L. J. Microbiol. Biotechnol. **2018**, 28, 1992-1998.

Evaluación de residuos agroindustriales en la producción de hidrolasas por *Penicillium crustosum* en fermentación sumergida

Arely Núñez-Serrano, Bernardo García-Reyes, Alcione García-González *

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Universitaria S/N Ciudad Universitaria, 66455, San Nicolás de los Garza, N.L., México.

*alcione.garciagn@uanl.edu.mx

Palabras clave: Hidrolasas, pectinasas, xilanasas, *Penicillium crustosum*, agro residuos

Introducción

El uso de residuos agroindustriales para la producción de metabolitos por diversos microorganismos ha sido de reciente interés debido a la efectividad y el bajo costo, además la revalorización de estos residuos permite reducir el impacto ambiental y generar procesos verdes [1]. Las enzimas hidrolíticas son metabolitos demandados por la industria por su capacidad biocatalizadora y aplicación en procesos de biotransformación. Los hongos filamentosos son excelentes productores de un amplio espectro de enzimas hidrolíticas extracelulares, destacando a *Penicillium crustosum* como un potencial productor de pectinasas [2] y xilanasas [3]. Las enzimas pectinolíticas son utilizadas en el proceso de degradación de la pectina, debido a que hidrolizan los enlaces α -1,4- ácido galacturónico de esta macromolécula, siendo eficaces en la extracción y clarificación de zumos en el sector alimenticio [2]. Por otro lado, las xilanasas rompen los enlaces β -1,4 glicosídicos del xilano, polisacárido complejo encontrado en el material lignocelulósico. Estas enzimas son aplicadas en el sector textil, de alimentos y en la obtención de biocombustibles [3]. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de residuos agroindustriales en la producción de enzimas pectinasas y xilanasas a partir de la fermentación sumergida (FS) de *P. crustosum*.

Metodología

Los residuos agroindustriales (cáscara de limón y salvado de trigo) fueron secados, molidos y tamizados previo a su uso como cosustrato. La extracción de pectina de los cosustratos fue llevada a cabo mediante hidrólisis ácida. La propagación del hongo en condiciones de fermentación (35°C, pH 6.0, 120 rpm, 5 días) se realizó inoculando 1.6×10^6 esporas/mL en medio PDB (100 mL). La producción enzimática se llevó a cabo en fermentación sumergida, utilizando medio PDB 1% y variando los cosustratos (2% p/v) inoculando con 1 mL del pre-inóculo. La actividad enzimática se determinó mediante el método de DNS, una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis (liberación) de 1 μ mol de azúcares reductores por minuto [4]. La cuantificación de proteína extracelular se realizó por el método de Bradford. Se realizó un análisis estadístico (ANOVA) de un factor (el cosustrato), así como la prueba de Tukey, usando un nivel de confianza del 95%, para evaluar el efecto de los cosustratos en la actividad enzimática producida (respuesta).

Resultados y discusión

Penicillium crustosum demostró ser un potencial productor de pectinasas, alcanzando la máxima actividad (980.12 U/mL) a las

96 h utilizando cáscara de limón. Este resultado es 8 veces mayor a la obtenida con salvado de trigo (122.01 U/mL). De acuerdo con el análisis estadístico, existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en la producción enzimática variando los cosustratos, siendo el limón el mejor cosustrato. Comparando con trabajos previos, la actividad pectinolítica producida en este trabajo fue 1.78 veces mayor (*P. crustosum*, 548.93 U/mL, cáscara de limón + medio mineral [2]). Se observó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en la producción de xilanasas variando los cosustratos, con una máxima producción enzimática (236.39 U/mL) a las 144 h utilizando salvado de trigo. Se ha reportado la producción de xilanasas (40 U/mL) a partir de *P. crustosum* FP 11 [3], destacando la capacidad del hongo en generar enzimas hidrolasas.

Conclusiones

El uso de agro residuos como fuente de carbono incrementó la producción de hidrolasas debido a un efecto inductor, permitiendo una reducción de costos en la producción de enzimas industriales. Siendo la cáscara de limón el mejor cosustrato para producción de pectinasas (980.12 U/mL) y salvado de trigo para xilanasas (236.39 U/mL).

P. crustosum resultó ser un potencial productor de pectinasas y xilanasas, con actividades mayores a las reportadas en la literatura.

Agradecimientos

Al CONACyT por la beca de doctorado otorgada, así como al proyecto CB-285642, por el financiamiento en la realización de este proyecto. A la Facultad de Ciencias Químicas, UANL y al laboratorio de Físicoquímicas de Interfaces por el apoyo en el uso de las instalaciones.

Referencias

- [1] Ferreira, J. A., Agnihotri, S., & Taherzadeh, M. J. (2019). Waste biorefinery. In *Sustainable Resource Recovery and Zero Waste Approaches* (pp. 35–52). Elsevier.
- [2] Núñez-Serrano A.S, García-González Alcione, García-Reyes Refugio B, & Solís-Pereira Sara E. (2021). Producción de pectinasas con un hongo filamentosos e inmovilización en nanoestructuras core-shell de $Fe_3O_4@SiO_2$ para la clarificación de jugos.
- [3] Lunkes, J. C., Arfelli, V. C., Bittencourt, J. W. F., Menolli, R. A., Maller, A., Silva, J. L. da C., Simão, R. de C. G., & Kadowaki, M. K. (2019). Purification of a xylanase from *Penicillium crustosum* and its potential use in clarifying fruit juice. In *Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 3* (pp. 91–100). Atena Editora.
- [4] Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.

Revalorización de residuos agroindustriales en la producción de pectininas y xilanasas en fermentación sumergida con *Aspergillus niger* ATCC 6275

Keyvan Hernández-Tirado, María Eugenia Peña-González, Bernardo-García Reyes, Adriana Liñán-Montes, Alcione García-González*
Laboratorio de Físicoquímica de Interfaces y Biomateriales, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av
Universidad S/N Ciudad Universitaria, 66455, San Nicolás de los Garza, N L México

*alcione.garciagn@uanl.edu.mx

Palabras clave: Pectinasas, xilanasas, *Aspergillus niger*, agro residuos

Introducción

El manejo y eliminación de los residuos agroindustriales es muy importante ya que representa una grave amenaza para el medio ambiente. Anualmente en México se producen más de 500,000 toneladas de residuos, lo que representa un problema asociado a la disposición de estos residuos sólidos y líquidos¹. La gestión de los agroindustriales se está convirtiendo en uno de los problemas más graves en la actualidad. Por esta razón, se ha promovido la revalorización de estos residuos para la producción de compuestos de valor agregado, como productos químicos, biocombustibles, alimentos para animales y en la producción de enzimas de interés comercial².

A nivel industrial, los hongos filamentosos son los más utilizados en la producción de enzimas, siendo el género *Aspergillus* y *Penicillium* los más destacados³. Durante la última década, el interés mundial por las enzimas pécticas y xilanólíticas de microorganismos han atraído más atención debido a su potencial uso en las industrias de alimentos, vínica, ganadera y papelera⁴. Estas enzimas proveen una alternativa biotecnológica para la hidrólisis de diversos biopolímeros, lo que vuelve a estos procesos más verdes y sustentables, al sustituir productos químicos por enzimáticos.

Metodología

Determinación de la actividad cualitativa de hidrolasas

Se realizaron cultivos en PDA adicionados al 1% con xilano o pectina donde se dejaron incubando durante 72 h y se añadió una solución de rojo Congo al 0.5 % para determinar si presenta un halo de hidrólisis.

Producción de pectinasas y xilanasas en fermentación sumergida

Las cáscaras fueron secadas, molidas y tamizadas antes de meterlas a la fermentación.

Se empleó una fermentación sumergida en medio mineral con glucosa 1% y se añadieron cáscara de limón o naranja al 2%, se inoculó con una suspensión de esporas de 1.8×10^6 esporas/mL. Las condiciones de producción fueron 35°C a pH 5 en 120 rpm. La actividad enzimática se determinó por el método DNS, a 570 nm. Una unidad (U/mL) se tomó como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol equivalente ácido galacturónico o xilosa, respectivamente, por minuto, por mililitro.

Análisis estadístico

Los análisis se hicieron por triplicado y se realizó una prueba ANOVA de un factor donde las diferencias se indicaron como estadísticamente significativas al nivel de $p < 0.05$.

Resultados y discusión

La actividad enzimática cualitativa en placa mostró los halos hidrólisis tanto para xilanasas como pectinasas. En la fermentación sumergida se logró alcanzar una actividad máxima a las 72 horas usando cáscara de naranja como cosustrato para ambas enzimas. La actividad máxima para pectinasas alcanzada fue de 28.53 U/mL con la cáscara de naranja, mientras que para limón fue de

18.45 U/mL, y para las xilanasas la actividad máxima alcanzada fue de 8.42 U/mL con naranja, mientras que para limón fue de 7.13 U/mL. De acuerdo con el análisis estadístico, existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en el uso de cosustrato para la producción enzimática siendo la naranja el mejor cosustrato tanto para la producción de xilanasas como para pectinasas. Esto también indica que ambas enzimas son inducibles y que la cáscara de naranja es mejor para este microorganismo.

En otros estudios usando la misma cepa se logró una actividad máxima de xilanasas de 97 U/mL a las 72 horas usando residuos de palma⁵, para el caso de las pectinasas la actividad máxima reportada a las 72 horas es de 41.6 U/mL³. Sin embargo, los resultados antes mencionados fueron en condiciones óptimas de producción analizadas en el mismo estudio siendo 30°C y con 5% de concentración de residuo, en este estudio se busca encontrar el mejor agro residuo para posteriormente hacer la optimización.

Conclusiones

Se demostró que existe diferencia significativa entre el uso de residuos agroindustriales, presentando una mejora en la actividad enzimática usando cáscara de naranja y mostrando un efecto inductor de los residuos en la producción enzimática, siendo mejor inductor la cáscara de naranja. Sin embargo, es necesario aplicar una optimización para alcanzar la máxima producción enzimática del *A. niger* ATCC 6275.

Agradecimientos

A CONACyT por la beca de maestría otorgada, así como al proyecto CB-285642, por el financiamiento en la realización de este proyecto. A la Facultad de Ciencias Químicas, UANL y al laboratorio de Físicoquímicas de Interfaces por el apoyo en el uso de las instalaciones.

Referencias

1. Weber B, Stadlbauer EA Sustainable paths for managing solid and liquid waste from distilleries and breweries. J Clean Prod. 2017;149,38–48
2. Bajar S, Singh A, Bishnoi NR. Exploration of low-cost agro-industrial waste substrate for cellulase and xylanase production using *Aspergillus heteromorphus*. Appl Water Sci. 2020, 8,6-10.
3. Ahmed I, Zia MA, Hussain MA, Akram Z, Naveed MT, Nowrouzi A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. J Radiat Res Appl Sci. 2016, 9, 148–54.
4. Uday USP, Majumdar R, Tiwari ON, Mishra U, Mondal A, Bandyopadhyay TK, et al. Isolation, screening and characterization of a novel extracellular xylanase from *Aspergillus niger* (KP874102.1) and its application in orange peel hydrolysis. Int J Biol Macromol. 2017, 105,401-409.
5. Prasertsan, P., et al. "Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATCC 6275 in palm oil mill wastes and its application." World J. M. B. 1997, 555-559.

Producción de biosurfactantes de bacterias con potencial para degradar hidrocarburos

Diana V. Navarrete Carriola^a, Gildardo Rivera^a, Domingo Mendez-Alvarez^a, Eyra L. Ortiz-Perez^a, Alma D. Paz-Gonzalez^{a*}

^aLaboratorio de Biotecnología Farmacéutica, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Reynosa 88710, México.
apazg@ipn.mx

Palabras clave: Biosurfactantes, Bacteria, Biorremediación, Hidrocarburos.

Introducción

Los biosurfactantes son moléculas producidas por microorganismos, entre ellos las bacterias, los cuales tienen aplicaciones en la biorremediación de suelos contaminados por petróleo, derrames de aceites, plaguicidas, entre otros [1]. Debido al crecimiento poblacional en los últimos años, las actividades antropogénicas han impactado directamente al medio ambiente y la salud humana, en particular los hidrocarburos (HC) por su uso en actividades industriales [2]. Los HC son compuestos orgánicos con más de dos anillos bencénicos fusionados. Además, se ha demostrado que son sustancias nocivas para los organismos vivos por sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas. Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue identificar cepas bacterianas con capacidad de producir biosurfactantes para degradar HC. Inicialmente se llevó a cabo el aislamiento de bacterias tolerantes a HC provenientes de suelo. Posteriormente, se realizaron pruebas de tolerancia a naftaleno (NAF), fenantreno (FEN), antraquinona (ANT) y aceite de motor (AM) y finalmente, se determinó la producción de biosurfactantes.

Metodología

Identificación de bacterias. Las muestras de suelo fueron colectadas en la laguna “La escondida” de Reynosa, Tamaulipas. Se tomaron 100 g por muestra. Un gramo fue inoculado en Medio Mínimo Salino (MMS) y se incubó a 37 °C por 24 h a 150 rpm. Se obtuvieron cultivos puros en Agar nutritivo (AN). La identificación de aislados fue macroscópica y microscópicamente mediante tinción de Gram. A nivel molecular se realizó la amplificación del ADN_r 16S por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [3].

Tolerancia y degradación de HC por cepas bacterianas. Las cepas bacterianas se probaron individualmente en AN adicionando 1 y 2.5 % FEN, NAF, ANT y AM. Las cepas más tolerantes se sometieron a otra prueba, en medio mínimo Goldman (MMG) teniendo como única fuente de carbono cada HC. La detección de surfactantes se hizo mediante colapso de gota y desplazamiento de aceite, usando como control negativo agua ultrapura y control positivo Tween 80 y SDS (10 %) [4]. Adicionalmente la prueba de hemólisis se realizó en agar sangre a 37 °C por 48 h. Para la producción y extracción de biosurfactantes se siguió la metodología reportada por [5]. La caracterización se realizó por espectroscopia de infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC-MS).

Resultados y discusión

Se obtuvieron 30 aislados bacterianos, de los cuales se seleccionaron 5 por tener los mejores resultados en las diferentes pruebas y una mayor tolerancia a concentraciones de 1 y 2.5 % de

FEN, NAF, ANT y AM. Las cepas identificadas fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*. En la prueba de agar sangre todas las cepas causaron hemólisis. Cabe resaltar que la cepa *Bacillus subtilis* produjo una mayor cantidad de biosurfactantes en presencia de NAF, por lo cual fue utilizada para evaluar su potencial de degradación de NAF. Los resultados muestran que la producción de biosurfactantes por las bacterias está significativamente influenciada por el tipo de sustrato, así como el tipo de cepas microbianas [6]. Los biosurfactantes presuntivos obtenidos de la degradación de NAF fueron evaluados por FTIR al cabo de seis días de ensayo. El espectro obtenido presenta bandas características de grupos químicos funcionales como dos enlaces C=O a 1644 y 1703 cm⁻¹. Las vibraciones de los enlaces C-H del anillo aromático se presentaron en la región de 3100-3000 cm⁻¹. Una comparación del espectro obtenido experimentalmente con una base de datos, indica que el compuesto puede corresponder al ácido *orto*-ftálico.

Conclusiones

El aislamiento, identificación y análisis de la capacidad de tolerancia de HC permitió obtener distintas cepas con una capacidad potencial de producir biosurfactantes, destacando *Bacillus subtilis* por una mayor producción.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la secretaria de Investigación y Posgrado-IPN SIP-20221078 por brindar el apoyo financiero para el estudio.

Referencias

1. Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401.
2. Tiwari, B., Manickam, N., Kumari, S., & Tiwari, A. (2016). Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas* sp. *Bioresource technology*, 216, 1102-1105.
3. Alquati, C., Papacchini, M., Riccardi, C., Spicaglia, S., & Bestetti, G. (2005). Diversity of naphthalene-degrading bacteria from a petroleum contaminated soil. *Annals of microbiology*, 55(4), 237.
4. Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 56(3), 339-347.
5. Joy, S., Rahman, P. K., & Sharma, S. (2017). Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal*, 317, 232-241.
6. Adetunji, A. I., & Olaniran, A. O. (2021). Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 669-679.

Evaluación de producción de ácido láctico por lactobacilos aislados de exudados vaginales de mujeres mexicanas embarazadas.

Daniel Omar Espinosa-Lerma^a, Pilar del Carmen Morales-san-Claudio^{a*}, Néstor Guadalupe Casillas-Vega^b, Salomón Álvarez-Cuevas^b, Hugo Sánchez-Alanís^b, Gemma Guadalupe Estrada-Ramírez^b, Yulissa Aracely Garibay-Reyna^a.

^a Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Biotecnología, Ave. Universidad S/N, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza N.L. México, C.P. 66455.

^b Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Av. Dr. José Eleuterio González 235, Mitras Centro, Monterrey, N.L, México, C.P. 64460

* pilar.moralessnc@uanl.edu.mx

Palabras clave: Microbiota vaginal, lactobacilos, infecciones vaginales, probióticos, ácido láctico.

Introducción

La microbiota vaginal está compuesta por *Lactobacillus spp.*, que producen ácido láctico y peróxido de hidrógeno, manteniendo el pH vaginal ≤ 4.5 . Diversos factores pueden causar disminución de poblaciones de lactobacilos, facilitando el establecimiento de bacterias y levaduras patógenas provocando infecciones vaginales¹. Los tratamientos fallidos y recurrencias de las infecciones llevaron a considerar a los probióticos como una alternativa para el tratamiento de dichas afecciones.²

Metodología

A partir de exudados vaginales de mujeres embarazadas de 12 a 40 semanas de gestación entre 18 a 42 años de edad; que no presentaran sangrado vaginal activo ni hayan tenido tratamiento con antibiótico u óvulos dos semanas antes de la toma de muestra. Se aislaron los lactobacilos, inoculando los exudados en agar sangre. Se observó la morfología de colonias y se les realizó tinción de Gram. Se sembraron en agar sangre y luego se subcultivaron en caldo Brucella con glicerol y almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se identificaron a nivel de género y especie mediante PCR³⁻⁴ y se les realizó una prueba de producción de ácido láctico cualitativa inoculando los lactobacilos en agar MRS modificado con púrpura de bromocresol⁵.

Resultados y discusión

En 33 aislados se observaron colonias, pequeñas, opacas y gama hemolíticas en agar sangre (figura 1A), así como bacilos Gram positivos (figura 1B) en una tinción Gram, por lo que se identificaron preliminarmente como lactobacilos.

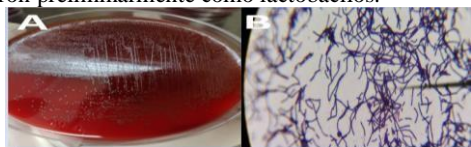


Figura 1

Se realizó la PCR para identificar a los aislados a nivel de género basándose en el análisis del gen de ARNr 16S con los primers específicos F-LBF y R-LBF. Obteniendo un producto esperado entre 150-180 pb en todas las muestras (figura 2), lo que confirma que pertenecen al género *Lactobacillus spp.*

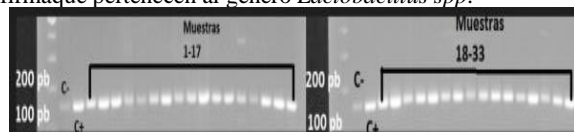


Figura 2

En la identificación por especie, se encontraron las especies *L. inners*, *L. jensenii* y *L. crispatus*.

En la identificación de la producción de ácido láctico, 17 muestras presentaron un crecimiento en el que se observó un cambio de coloración en el medio debido a la reducción de pH, tornándolo amarillo, y se considera la prueba positiva (Figura 3A), Mientras que 16 muestras no presentaron un cambio de coloración en el medio, por lo que se consideraron negativas. (figura 3B).

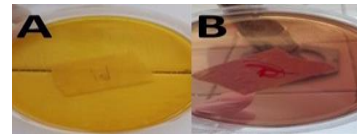


Figura 3

Conclusiones

Se logró aislar lactobacilos de exudados vaginales, además se logró determinar que de los aislados obtenidos, hay lactobacilos capaces de producir ácido láctico, por lo que la microbiota vaginal es fuente de dichos microorganismos. Sin embargo, también existieron aislados que dieron resultado negativo, por lo que no todo lactobacilo aislado de la flora vaginal es productor de ácido láctico.

Agradecimientos

- A CONACYT por beca otorgada.
- Al laboratorio de Biotecnología de la Fac. de Ciencias Químicas, al Laboratorio de Patología Clínica del Hospital Universitario y al Laboratorio de Andrología de la Fac. de Medicina por permitir trabajar en sus instalaciones.

Participación de los autores

Autor 1: Escritura, análisis de datos, realización de experimentos; Autor 2: Asesor, Revisión, proveer materiales, reactivos, equipo e instalaciones y contactar con los autores 3 y 4; Autor 3: Proveer los aislados, así como material, equipo e instalaciones para su reactivación; Autor 4: Proveer equipo, material e instalaciones para PCR; Autores 5-7: Apoyo en la realización de los experimentos.

Referencias

1. Mora, S. A. RMS. **2018**, 4, 3-13.
2. Ang, X. Y *et al.* Microorganism, **2022**, 10, 1-113.
3. Pino, A. *et al.* Sci. Rep. **2019**, 9, 1-10.
4. Collins, S. L. *et al.* Appl Environ. Microbiol. **2017**, 84, 1-155.
5. Pramanick, R. *et al.* JIDC. **2018**, 12, 1096-1104

PRODUCCIÓN DE CELULASAS A PARTIR DE *Penicillium crustosum*

Melissa Martínez-Garay ^a, Arely Núñez-Serrano ^a, Refugio Bernardo García-Reyes ^a, Alcione García-González ^{a*}

^a Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Universidad S/N Ciudad Universitaria, 66455, San Nicolás de los Garza, N.L., México.

*alcione.garciaqn@uanl.edu.mx

Palabras clave: celulastas, celulosa, *Penicillium crustosum*, agro residuos, fermentación sumergida

Introducción

Las celulastas son enzimas que hidrolizan a la celulosa, principal polisacárido de las células vegetales. Estas enzimas son de amplia aplicación en la industria alimentaria como la extracción y clarificación de zumos vegetales, también como biocombustible (bioetanol y biobutanol), en la industria textil con el procesamiento del algodón, en la industria del papel con el reciclaje de este. Se ha reportado la producción de celulastas a partir de microorganismos como bacterias y hongos; sin embargo, los hongos filamentosos son de mayor interés para la producción de enzimas, debido al alto nivel de rendimiento¹. Además, se ha reportado el uso de residuos agroindustriales como una estrategia sustentable para la producción de enzimas de interés industrial¹. Este trabajo tiene como objetivo la producción de celulastas a partir de *Penicillium crustosum* evaluando el uso de agroresiduos (salvado de trigo y cáscara de limón) como cosustratos mediante fermentación sumergida.

Metodología

La propagación del hongo *P. crustosum* se llevó a cabo en medio PDA a 30°C / 3 días. La producción enzimática se llevó a cabo mediante una fermentación sumergida a 35°C/144h inoculando una concentración conocida de esporas en 100 mL de medio mineral utilizado como control, y variando los cosustratos, 2 g de salvado de trigo y 2 g de cáscara de limón previamente secados, molidos y tamizados. La actividad enzimática se determinó por DNS leyendo en UV-VIS a 545 nm². Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 µmol de glucosa por minuto. Se determinó el contenido de proteína extracelular mediante el método de Bradford leyendo a 595 nm. Y la actividad específica se definió como la actividad enzimática entre mg de proteína. Un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba Tukey fueron utilizados para evaluar los resultados obtenidos, con una probabilidad menor a 0.05.

Resultados y discusión

La máxima producción enzimática se registró en las 144h de

fermentación en ambos cosustratos. Se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la producción enzimática obtenida con respecto a los cosustratos utilizados. De acuerdo con el estadístico Tukey, ($p < 0.05$), se determinó que el mejor agro residuo fue la cáscara de limón con una actividad de 235 U/mL, comparando con el salvado de trigo (93.83 U/mL); esta diferencia se puede deber a la composición química del agro residuo y a las condiciones de producción, debido a que *P. crustosum* tiene una mayor afinidad por compuestos ácidos¹. De acuerdo con el alto valor de la actividad específica, se observó que existe una importante producción de enzimas celulastas en cáscara de limón por mg de proteína (153.41 U/mg) comparado con el salvado de trigo (72.96 U/mg). Además, la actividad enzimática producida en este trabajo fue mayor comparando con la literatura (*P. crustosum*, 5.56 U/mL³) utilizando bagazo de remolacha azucarera.

Conclusión

Penicillium crustosum es un potencial productor de enzimas celulastas, alcanzando una actividad de 40 veces con cáscara de limón y aproximadamente 20 veces mayor con salvado de trigo, comparando con la literatura. El uso de agro residuos tuvo un efecto significativo en la producción enzimática, la cáscara de limón fue el mejor cosustrato debido a que el hongo tiene una predisposición por las condiciones ácidas.

Referencias

1. Mrudula, S.; Murugammal, R. *Braz J Microbiol.* 2011, 42, 1119-1127
2. Mahmood, R. T.; Asad, M. J.; Mehboob, N.; Mushtaq, M.; Gulfraz, M.; Asgher, M.; Minhas, N. M.; Hadri, S. H. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013, 170, 895-908.
3. Mushimiyimana, I.; Tallapragada, P. *RJPBCS.* 2015, 6, 1144-1151
4. Vaishnav, N.; Singh, A.; Adsul, M.; Dixit, P.; Sandhu, S. K.; Mathur, A.; Puri, S. K.; Singhanian, R. *R. Bioresour Technol Rep.* 2018, 2, 131-1

Inmovilización covalente de lacasas en nanopartículas de ZnO, TiO₂ y CuO para diferentes aplicaciones biotecnológicas

Iris Arvizu de León^{2a}, Bernardo García-Reyes^{2a}, Alcione García-González *

^aFacultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Universidad S/N Ciudad Universitaria, 66455, San Nicolás de los Garza, N.L., México.

*alcione.garciagn@uanl.edu.mx

Palabras clave: Lacasas, óxido metálicos, inmovilización

Introducción

Las lacasas son enzimas que pertenecen a la familia de las oxidasas multicobre (1), catalizan la oxidación de un amplio rango de compuestos lo cual las convierte en un tipo de enzimas con gran interés de estudio tanto en degradación/oxidación de sustancias, así como en procesos catalíticos (2). Sin embargo, su baja estabilidad ante condiciones adversas y su alto costo de producción limitan su empleo. La inmovilización de las lacasas puede superar alguna de las limitaciones anteriormente expuestas, mejorando significativamente sus propiedades enzimáticas en cuanto a estabilidad en un rango más amplio de pH, temperatura y la recuperación de la enzima del efluente de origen (3) siendo así más atractivas para usarse a nivel industrial. Algunas de las aplicaciones más importantes de las lacasas son la deslignificación de la pulpa en el procesamiento del papel, en la hidrólisis de residuos lignocelulósicos para la generación de biocombustibles y detección de compuestos fenólicos durante el procesamiento de bebidas, el tratamiento de aguas contaminadas con colorantes sintéticos, fármacos, hormonas esteroideas, pesticidas y herbicidas clorados, entre otras.(4) el objetivo de este proyecto fue inmovilizar lacasas en tres óxidos metálicos (ZnO, TiO₂ y CuO) se evaluar el efecto de la inmovilización en la estabilidad.

Metodología

Las nanopartículas de óxido metálico (ZnO, TiO₂ y CuO) se modificaron químicamente con 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) y posteriormente se pusieron en contacto con glutaraldehído como agente de enlace para la inmovilización de lacasa. Se probaron cinco diferentes concentraciones (0.3, 0.6, 1, 1.3 y 1.6 mg/g de material) de lacasa de *Trametes versicolor* para realizar la inmovilización y se realizaron pruebas de estabilidad de los materiales con enzima inmovilizada a diferentes temperaturas (25°C, 35°C, 45°C, 55°C y 65°C) y pH (3, 4, 5, 7 y 8). La actividad enzimática se determinó por el método de ABTS y la proteína con Bradford. Los materiales fueron caracterizados mediante espectroscopia infrarroja (FTIR-ATR), mediciones de potencial zeta, difracción de rayos X (XRD) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

Resultados y discusión

Las nanopartículas de ZnO presentaron la mayor capacidad de inmovilización de lacasa con un 98% de retención de enzima, seguido por el CuO que presentó un 78% y finalmente el TiO₂ con 69.30% de enzima retenida. El máximo porcentaje de inmovilización coincide con la máxima modificación química alcanzada, ya que el ZnO obtuvo el potencial Z más positivo posterior a su modificación química superficial. El biomaterial (óxido metálico-lacasa) que obtuvo mejor estabilidad a cambios de temperatura y pH fue el TiO₂, ya que su mejor actividad fue a 55 °C y un pH de 3, seguido por el ZnO a 45 °C y un pH de 4,

finalmente para el CuO la mejor actividad fue a 35 °C y a un pH de 5 como lo reportan Khakshoor *et.al* 2021 después de llevar a cabo la inmovilización. Estos porcentajes fueron los obtenidos con las mayores concentraciones de inmovilización de 1.6 mg/g de material. En el caso de las caracterizaciones a los materiales por FTIR-ATR se reveló que los grupos funcionales de amina se unieron a las nanopartículas presentando picos a 1600 cm⁻¹ y 1200 cm⁻¹ que están asociados a vibraciones N-H y C-N característicos de una amina secundaria Li *et.al* 2017. Los patrones de XRD confirman que la fase cristalina se mantuvo igual después de la inmovilización y en SEM se aprecia que el tamaño de las partículas aumentó después de la modificación química.

Conclusiones

El ZnO fue el material en el que se logró inmovilizar mayor porcentaje de lacasa un 98% seguido de CuO con 78%, TiO₂ con 69.30%. Sin embargo, el TiO₂ mostró mejor estabilidad a cambios de temperatura y pH.

El ZnO fue el material que logró una mayor incorporación de grupos funcionales según el valor obtenido en el potencial ζ, y coincidió que es el que obtuvo una mayor retención de la actividad enzimática de lacasas, lo que demostró que la enzima se une químicamente al material.

La modificación química realizada a las nanopartículas no modificó su estructura cristalina según DRX y en FTIR-ATR se aprecia la aparición de grupos -OH & -NH y CH, provenientes de la modificación química durante las etapas de la modificación química superficial.

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca de doctorado otorgada, así como al proyecto CB-285642, por el financiamiento en la realización de este proyecto. A la Facultad de Ciencias Químicas, UANL, al laboratorio de Físicoquímicas de Interfaces y al Laboratorio de Tratamiento de Aguas II por el apoyo en el uso de las instalaciones.

Referencias

- [1] (1) Gu, Y., Yuan, L., Jia, L., Xue, P., & Yao, H. (2021). Recent developments of a co-immobilized laccase-mediator system: a review. *RSC advances*, 11(47), 29498-29506.
- (2) Primožič, M., Kravanja, G., Knez, Z., Crnjac, A., & Leitgeb, M. (2020). Immobilized laccase in the form of (magnetic) cross-linked enzyme aggregates for sustainable diclofenac (bio) degradation. *Journal of Cleaner Production*, 275, 124121.
- (3) Patel, S. K., Kalia, V. C., Choi, J. H., Haw, J. R., Kim, I. W., & Lee, J. K. (2014). Immobilization of laccase on SiO₂ nanocarriers improves its stability and reusability. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), 639-647.
- (4) Imran, M., Asad, M. J., Hadri, S. H., & Mehmood, S. (2012). Production and industrial applications of laccase enzyme. *Journal of cell and molecular biology*, 10(1), 1.
- (5) Khakshoor, M., Makhdomi, A., Asoodeh, A., & Hosseindokht, M. R. (2021). Co-immobilized spore laccase/TiO₂ nanoparticles in the alginate beads enhance dye removal by two-step decolorization. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(5), 6099-6110.
- (6) Li, G., Nandgaonkar, A. G., Wang, Q., Zhang, J., Krause, W. E., Wei, Q., & Lucia, L. A. (2017). Laccase-immobilized bacterial cellulose/TiO₂ functionalized composite membranes: Evaluation for photo-and bio-catalytic dye degradation. *Journal of membrane science*, 525, 89-98.

Producción de nanocelulosa mediante la utilización de biorreactores de bajo costo para *Chlorella sorokiniana*.

Mael Sebastian Cantu-Martínez^{a*}, Julio Cesar Beltran-Rocha^b, Julio Silva-Mendoza^a, Raul Reyna-Martínez^a

^a Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Química, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolas de los Garza, México.

^b Laboratorio de Suelos, Plantas y Aguas, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, Gral. Escobedo, México.

*maelscantu@gmail.com

Palabras clave: microalgas, nanocelulosa, biorreactor, biomasa, bajo costo.

Introducción

Las microalgas son organismos microscópicos que en los últimos años han empezado a recibir cierta atención debido a sus múltiples usos en las áreas bioenergéticas, biotecnológicas, cosméticas y piscicultura. Debido a su naturaleza estas utilizan el CO₂ presente en el ambiente para producir carbohidratos, oxígeno y otros compuestos de alto valor [1]. Las *Chlorella* son uno de los géneros más estudiados debido a su versatilidad y su amplia cobertura en el medio ambiente. Debido a la conformación de su pared celular es posible extraer y convertir la celulosa a nanocelulosa [2]. Esta misma tiene distintos usos como la fabricación de piezas de computadoras, automotriz, papel y filtros. Su mayor ventaja es la rápida y económica propagación en medios líquidos, sin tener que competir por tierra con otras plantas y esta puede ser tanto a nivel matraz o en un reactor de bajo costo [3]. El siguiente trabajo tiene como objetivo producir, extraer y aislar nanocelulosa mediante el uso de reactivos y métodos de bajo costo, así como de bajo impacto ambiental.

Metodología

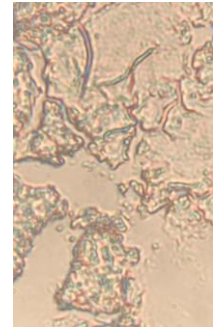
Se utilizó *Chlorella sorokiniana* previamente aislada de un cuerpo de agua en el estado de Nuevo León. En donde tomamos una colonia de una placa con medio LC-Y +1.5% de agar bacteriológico [4]. Este es transferido a un matraz con 100mL de el mismo medio donde las condiciones de crecimiento son 24h de luz blanca a 9500 lux, agitación a 150rpm y una temperatura de 30 grados Celsius [5]. Posterior a los 14 días se transfirió el cultivo a reactores de bajo costo de 1L para maximizar producción. Con condiciones de 0.1-0.5 vvm aire ambiental, 4500lux, ciclos de luz 16:8 y 27 grados Celsius. Se cosechó la biomasa al día 35 mediante centrifugación a 4,000rpm x 10 minutos. Se hizo un lavado y se repitió hasta obtener solamente un pellet. Después se llevó a congelación para su posterior liofilización. Para la extracción de celulosa se realizó una hidrólisis química utilizando H₂O₂ y HSO₄. De la biomasa liofilizada se tomaron 0.1g y se le agregaron 2mL de H₂O₂. Se calentó a 90 grados Celsius durante 1h y con agitación. Siguiendo a la adición de 1mL de H₂O₂ y 0.1mL HSO₄ bajo las mismas condiciones. Finalmente se tomó la mezcla y se microcentrifugó a 14,000rpm x 15min con lavados entre cada ciclo hasta alcanzar un pH de 5 [6]. Se observó la nanocelulosa mediante un microscopio óptico y SEM para la verificación del producto final.



Resultados y discusión

Se realizó una cinética de *C. sorokiniana* donde se observó que su fase exponencial se alcanzaba a los 14 días (1.48 x 10⁸) a nivel matraz. El cual se tomó como cultivo inicial para asegurar crecimiento y evitar contaminación por competencia. Se obtuvo en promedio 1.235g/L de peso seco de biomasa. Otros autores como Kumar y colaboradores obtuvieron 1.18g/L de peso seco del alga [7], así como Do y colaboradores reportaron 0.992 g/L para la misma especie. Mediante la extracción propuesta por Chavez-Guerrero y colaboradores, se

logró extraer y aislar nanocelulosa en forma de plaquetas. Estas están conformadas por conjuntos de nano-fibras que fueron apreciadas mediante SEM y llegan a medir entre 8 a 20nm. Al observar las plaquetas de nanocelulosa en microscopio óptico es posible apreciar algunos colores debido a la difracción de luz.



Conclusiones

Las microalgas como *C. sorokiniana* en este caso, son capaces de producir nanocelulosa debido a la composición de la pared celular. En esta se encuentra celulosa, la cual es posible convertir en nanocelulosa a través de una hidrólisis química. La morfología de las plaquetas de nanocelulosa consisten en bordes irregulares que aparecen en ocasiones con coloración debido a la difracción de luz dependiendo del grosor. Existe campo para la optimización de esta sin embargo parece ser una buena alternativa a la utilización de plantas leñosas debido al tiempo y espacio que requieren. Así como sustituto para plásticos y vidrio.

Agradecimientos

Se le agradece al CONACyT por el apoyo económico, así como a la Facultad de Ciencias Química por el uso de las instalaciones del CELAES.

Referencias

- [1] Beltran-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Rodríguez-Fuentes, H., Reyna-Martínez, G. R., Osornio-Berthet, L., García-Martínez, M., Dagmar-Barceló, I., López-Chuken, U. (2021). Some implications of natural increase of pH in microalgae cultivation and harvest by auto flocculation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(5), 836–842. <https://doi.org/10.3856/vol49-issue5-fulltext-2691>
- [2] Zanchetta, E., Damergi, E., Patel, B., Borgmeyer, T., Pick, H., Pulgarin, A., & Ludwig, C. (2021). Algal cellulose, production and potential use in plastics: Challenges and opportunities. *Algal Research*, 56, 102288. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102288>
- [3] Coelho, D., Lopes, P. A., Cardoso, V., Ponte, P., Brás, J., Madeira, M. S., Alfaia, C. M., Bandarra, N. M., Gerken, H. G., Fontes, C. M., & Prates, J. A. (2019). Novel combination of feed enzymes to improve the degradation of chlorella vulgaris recalcitrant cell wall. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41775-0>
- [4] Reyna-Martínez, G. R. *Aislamiento De Microalgas Del Estado De Nuevo León Con Actividad Antitumoral Contra El Linfoma Murino L5178Y-R*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León, NL, marzo de 2017.
- [5] Johar Gunawan, T., Ikhwan, Y., Restuhadi, F., & Pato, U. (2018). Effect of light intensity and photoperiod on growth of *Chlorella pyrenoidosa* and CO₂ Biofixation. *E3S Web of Conferences*, 31, 03003. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20183103003>
- [6] Chávez-Guerrero, L., Toxqui-Terán, A. & Pérez-Camacho, O. One-pot isolation of nanocellulose using pelagic *Sargassum* spp. from the Caribbean coastline. *J Appl Phycol* 34, 637–645 (2022). <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02643-5>
- [7] Kumar, K., Dasgupta, C. N., & Das, D. (2014). Cell growth kinetics of chlorella sorokiniana and nutritional values of its biomass. *Bioresource Technology*, 167, 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.118>
- [8] Do, T. C., Tran, D. T., Le, T. G., & Nguyen, Q. T. (2020). Characterization of endogenous auxins and gibberellins produced by *Chlorella sorokiniana* TH01 under Phototrophic and Mixotrophic cultivation modes toward applications in Microalgal Biorefinery and crop research. *Journal of Chemistry*, 2020, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/4910621>

Aislamiento de nanocelulosa a partir de *Sargassum spp.* de la costa caribeña

Julio Silva-Mendoza^a, Alberto Toxqui-Terán^b, Odilia Pérez-Camacho^c, Leonardo Chávez-Guerrero^{a*}

^aUANL, Av. Universidad s/n Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, México

^bCIMAV, Av. Alianza Norte 202, Parque PIIT, Apodaca, México

^cCIQA, Blvd. Enrique Reyna Herosillo 140, Saltillo, México.

*E-mail de autor responsable: leonardo.chavezgr@uanl.edu.mx

Palabras clave: alga parda; nanocelulosa; sargazo; gestión de residuos.

Introducción

Los biopolímeros se están convirtiendo en una alternativa para sustituir a los polímeros sintéticos en la fabricación de empaques, aparatos electrónicos, aditivos alimentarios, entre otros, gracias a sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad¹. Dentro de los biopolímeros más utilizados se encuentra la nanocelulosa, la cual es obtenida a partir de distintas fuentes como residuos lignocelulósicos, bacterias y algas². En este trabajo se obtuvo nanocelulosa a partir de la pared celular del alga parda *Sargassum spp.*; la cual hoy en día representa una problemática debido a su llegada masiva a las costas mexicanas, afectando el turismo y la salud de los mexicanos³. Para la obtención de la nanocelulosa se utilizó un método novedoso basado en el “uso de un solo recipiente” donde se llevan a cabo las reacciones de degradación de componentes no celulósicos y la hidrólisis de celulosa, evitando los lavados y neutralizaciones entre pasos, lo que reduce el uso de reactivos. Con este proceso se logró obtener la nanocelulosa con un rendimiento del 14.9% y se pudieron generar films transparentes de nanocelulosa con una transmitancia del 81%.

Metodología

El sargazo se recolectó de la costa de Puerto Morelos en Quintana Roo. El sargazo se lavó con agua a 60 °C para eliminar contaminantes, posteriormente se filtró, secó, molió y tamizó (malla 50) para obtener una muestra homogénea. Para el aislamiento de la nanocelulosa, se añadieron 5 gramos de polvo de sargazo en un frasco con 100 mL de H₂O₂ (30%) calentado a 70 °C, manteniendo la temperatura una hora, posteriormente se añadió una mezcla previamente preparada de 47 mL de H₂O₂ y 3 mL de H₂SO₄ concentrado y se continuó por una hora más a la misma temperatura. El frasco se autoclavó a 110 °C, 0.5 Psi por 60 minutos. El sólido remanente se filtró a vacío y se resuspendió en agua y NaOH para neutralizar el pH. Finalmente, el sólido se filtró una vez más y el gel obtenido fue depositado en un recipiente para obtener un film delgado por el método de secado por evaporación. La nanocelulosa obtenida fue analizada por espectrofotometría UV-Vis y microscopía electrónica (SEM).

Resultados y discusión

La transmitancia determinada por espectrofotometría UV-Vis fue de alrededor del 81% en el rango del visible (fig. 1), lo que puede considerarse altamente transparente. Esta propiedad puede ser una ventaja si el biopolímero se utiliza como aditivo en la producción de bolsas de plástico transparentes o plástico de empaque². El análisis por SEM mostró que la nanocelulosa en forma de láminas (Fig. 2a) está conformada por nanofibras de celulosa entrelazadas con un diámetro promedio de 15 nm (Fig. 2b y c). La nanolámina de la figura 2a presenta una longitud de 66 µm y un grosor de 0.1 µm dando una relación de aspecto

(longitud/grosor) de 660. Nanoláminas con características similares se han obtenido previamente del *Agave salmiana*⁴.

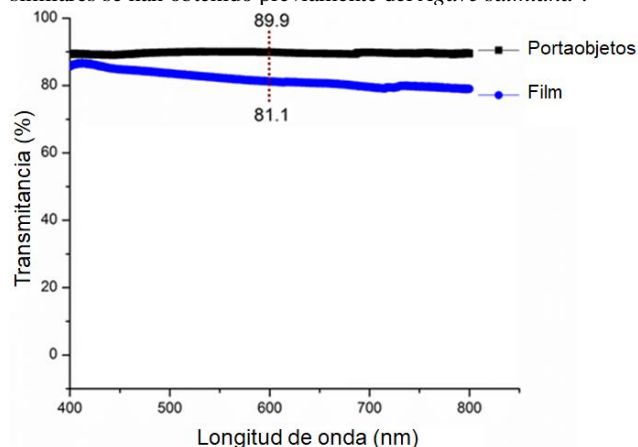


Figura 1. Transmitancia del film de nanocelulosa aislada de *Sargassum spp.* comparada con la de un portaobjetos.

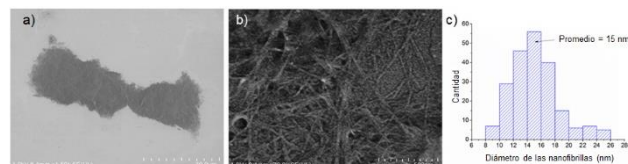


Figura 2. Micrografías obtenidas por SEM de una nanolámina de celulosa a diferentes aumentos (a y b). Diámetro promedio de las nanofibrillas entrelazadas (c).

Conclusiones

En este trabajo se lograron aislar nanoláminas de celulosa a partir de la pared celular del sargazo, utilizando un método donde se ahorran reactivos y pasos consecutivos. Esta técnica podría emplearse para tratar de solucionar la problemática que representa el sargazo para México, y al mismo tiempo obteniendo un producto de alto valor.

Agradecimientos

A S. Vázquez-Rodríguez por el análisis UV-Vis. También al apoyo del programa PAICYT a través de la beca IT1054-19 de la UANL.

Referencias

- 1.- Madadi, R.; Maljaee, H.; Serafilm, L. et al. Mar. Drugs. **2021**, 16, 466.
- 2.- Huo, Y.; Liu, Y.; Xia, M, et al. Polymers, **2022**, 14(13), 2648.
- 3.- Hervé, V.; Lambourdière, J.; Rene-Trouillefou, M. et al. Front. Microbiol. **2021**, 12, 701155.
- 4.- Chávez-Guerrero, L.; Silva-Mendoza, J.; Toxqui-Terán A. et al. Carbohydr. Polym. **2021**, 254, 117463.

Desarrollo y evaluación de un Inmunosensor Electroquímico para la detección de Flavivirus

Lisdalys Barbera-Borroto^a, Pilar Morales-San Claudio^{a*}, Daniel Arellano-Soto^b, Juan Hernández-López^a, Ana M. Rivas-Estilla^b.

^a Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Biotecnología, Ave. Universidad S/N, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza N.L. México, C.P. 66455.

^b Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Av. Dr. José Eleuterio González 235, Mitras Centro, Monterrey, N.L. México, C.P. 64460

*E-mail pilar.moralessnc@uanl.edu.mx.

Palabras clave: Flavivirus, inmunosensor, voltamperometría, detección de antígeno, diagnóstico.

Introducción

En las últimas décadas las enfermedades causadas por Flavivirus, principalmente dengue y zika han ido en aumento, convirtiéndose en un problema de salud mundial¹. Para poder combatir estas enfermedades de una manera eficiente y brindar al paciente la mejor atención se hace necesario desarrollar métodos de diagnóstico económicos que puedan llegar a todos y al mismo tiempo rápidos y confiables. Una alternativa que está cobrando mucha fuerza son los sensores para la detección de agentes infecciosos. Por estas razones nuestro trabajo se centra en desarrollar un inmunosensor voltamperométrico para detectar la proteína E de Flavivirus^{2,3}.

Metodología

Se trabajo con electrodos con un diseño clásico de tres electrodos: un electrodo de trabajo de oro, un electrodo de referencia de plata y un contraelectrodo de oro. El electrodo de trabajo se trató con ácido 11-mercaptoundecanoico (11-MUA), a continuación, se trabajó con 1-etil-3-(3-diaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) y finalmente se inmovilizó el anticuerpo monoclonal anti-flavivirus 4G2. Se evaluó el electrodo funcionalizado frente a sueros de individuos sanos, sobrenadante de cultivos celulares infectados con el virus del Dengue y de Chikungunya. Las mediciones electroquímicas de voltamperometría cíclica se realizaron en un potenciostato-galvanostato a temperatura ambiente, aplicando voltaje 100mV/s, potencial $-0.5-0.6V$ y se realizaron 3 ciclos consecutivos.

Resultados y discusión

Los voltamperogramas cíclicos mostraron una disminución en las corrientes anódicas y catódicas en cada una de las mediciones llevadas a cabo, en cada etapa de la funcionalización del electrodo (figura 1), a partir de ahí se evaluaron las reacciones antígeno-anticuerpo y se observó cambios en el flujo de electrones por la detección de la proteína E de DENV 1,2 y 3, en diluciones de 1:5, 1:10 y 1:50, así como DENV 1 y 2 aislados de pacientes de Nuevo León, mostrando picos disminuidos con respecto al electrodo sin modificar (figura 2). También se presentaron cambios en los ciclos voltamperométricos entre muestras que tienen dengue y las con el otro agente viral (virus de Chikungunya como control) donde no hubo disminución de la corriente y se puede decir que no se unió. Otro control fue el suero de personas sanas, en este caso tampoco se registraron cambios en el electrodo lo que nos indica que no se dieron reconocimientos inespecíficos (datos no mostrados en el resumen).

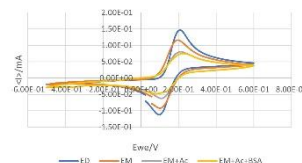


Figura 1. Voltamperogramas cíclicos de cada paso de la modificación o funcionalización de la superficie del electrodo.

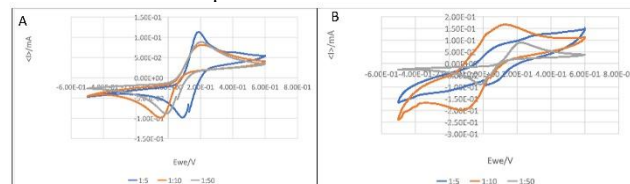


Figura 2. Voltamperograma cíclico de la reacción antígeno-anticuerpo de diluciones 1:5, 1:10 y 1:50 de DENV1 (A) diluciones 1:5, 1:10 y 1:50 de DENV2 (B).

Conclusiones

Se logró la modificación y funcionalización del electrodo de oro para poder ser empleado como un inmunosensor evaluando por voltamperometrías cíclicas, como herramienta de detección y diagnóstico. Además, si se podría de manera cualitativa discriminar entre los agentes virales que se evaluaron y que son transmitidos por artrópodos y cuya sintomatología son similares.

Agradecimientos

- A CONACYT por beca otorgada.
- Al laboratorio de Biotecnología, al Laboratorio de tratamientos superficiales y fotocatalisis de la Fac. de Ciencias Químicas, al departamento de Bioquímica y biología molecular de la Fac. de Medicina por permitirme trabajar en sus instalaciones.

Referencias

1. Arredondo JL, Aguilar CG, Aguilar JJ, Osnaya N, Pérez G, Medina H. Panorama epidemiológico de dengue en México 2000-2019. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*. 2020;33(2):78–83.
2. Yung C-F, Lee K-S, Thein T-L, Tan L-K, Gan VC, Wong JGX, *et al*. Dengue Serotype-Specific Differences in Clinical Manifestation, Laboratory Parameters and Risk of Severe Disease in Adults, Singapore. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [Internet]. 2015 May 6;92(5):999–1005.
3. Hassanpour *et al* “Recent trends in rapid detection of influenza infections by bio and nanobiosensor” *Trends in Analytical Chemistry* 98 (2018) 201-215

CUTINASAS PRODUCIDAS POR HONGOS FITOPATÓGENOS AISLADOS DE AGAVE SALMIANA

Edwin Alexis Puente-Ríos¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 66455, edwinpuenterios1998@gmail.com, María Elena Cantú-Cárdenas² Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 66455, Julio Silva-Mendoza³ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, 66455

Palabras clave: cutinasas, hongos, *Agave salmiana*.

Introducción

Las cutinasas pertenecen a las hidrolasas, siendo esterasas cuya función consiste en degradar la cutina de las plantas, por lo cual son producidas por microorganismos como hongos fitopatógenos, aunque actualmente ya se ha descubierto que pueden provenir de otras fuentes. Una ventaja es su amplio margen de usos, debido a sus características.¹⁻³. Debido a la amplia distribución del agave en el país, y como el *Agave salmiana* es una planta extendida por la región, se espera aprovechar las hojas para producir las cutinasas.

El estudio se enfoca en usar las hojas del agave para aislar y seleccionar hongos productores de cutinasas, para caracterizarlas y aplicarlas en biorremediación.

Metodología

Se realizó la técnica de dilución y siembra en placa para el aislamiento de los hongos, a pencas de agave deterioradas. Para esto se realizó un medio mínimo modificado (KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y CaCl_2), utilizando rojo de fenol como indicador a un pH de 8.3, y 1% p/v de aceite de oliva, esto con el fin de revelar la producción de esterasas, como un halo color amarillo⁴. De los hongos que se llevaron a incubación a 28°C por 5 días, se seleccionó aquellos con el mayor valor de índice de potencia, que es la relación entre el halo de hidrólisis y de crecimiento. Posteriormente se realizaron un examen macroscópico y microscópico a cada hongo para identificarlos. Para determinar si las esterasas producidas son cutinasas, se realizó una prueba con los hongos, cultivándolos en matraces con un contenido de 25 mL de medio mínimo modificado, cutina al 1% p/v extraída de cutícula del agave, a pH de 4.9, incubadas a 130 rpm, a 28°C por 5 días, y como control se dejó un matraz sin inóculo. Una vez observado crecimiento dichos matraces, se procedió a realizar otra prueba para determinar cuál producía mayor biomasa, agregando 3 aceites más (girasol, soya y canola), y se pesó la biomasa obtenida en cada uno en papel filtro, previamente secado a 60°C, y se conservó el sobrenadante para uso futuro. Para determinar que sí se produjeron enzimas, se realizó una prueba rápida a diario en la que se colocó sobrenadante tanto del medio acuoso como del aceitoso en un tubo que contenía reactivo de Bradford y otro con rojo de fenol y se esperó hasta ver si había un cambio de color en dichos tubos.

Resultados y discusión

Se obtuvieron 52 aislados, de los cuáles 9 mostraron mayor actividad enzimática esterasa, y solo 3 obtuvieron el mayor

índice de potencia (1.48 en A8, 1.5 en T2 7-12 y 1.52 en T3 7-12). De acuerdo con los exámenes macroscópicos y microscópicos, en base a lo observado y comparando con la literatura, se determinó que los hongos correspondían a los géneros *Aspergillus* y *Alternaria* (Fig. 1).

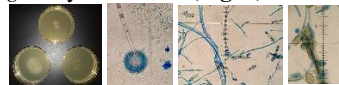


Fig. 1. Examen macroscópico y microscópico a los hongos.

En cuanto al crecimiento de los hongos en los matraces, sí hubo crecimiento en aquél con cutina, por lo que indica que sí producen cutinasas (Fig. 2).



Fig. 2. Crecimiento de hongos en medio mínimo con cutina.

En la prueba en la que se usaron distintas fuentes de carbono, el aceite de soya mostró la mayor biomasa producida respecto a los demás en 2 de los 3 hongos (0.0188 g en A8 *Aspergillus*, y 0.0144 g en T3 7-12 *Alternaria*). En cuanto a la prueba con el reactivo de Bradford y el rojo de fenol, solamente A8 mostró un cambio de color en ambos tubos (Fig. 3).

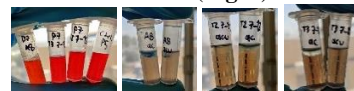


Fig. 3. Pruebas con reactivo de Bradford y rojo de fenol.

Conclusiones

Se aislaron hongos productores de cutinasas a partir de *Agave salmiana*, A8 mostró ser quien produjo enzimas respecto a los demás hongos.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Químicas por el uso de sus instalaciones y a Conacyt por la beca otorgada.

Referencias

1. Fortuna, S.; Cespugli, M.; Todea, A.; Pellis, A.; & Gardossi, L. (2021). *Catalysts*, 11(7), 1–16.
2. Castro-Ochoa, D.; Peña-Montes, C.; & Farrés, A. (2010). *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 13(1), 16–25.
3. Xu, Z. (2020). *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 450(1).
4. Rueda-Rueda, H.; Prieto-Correa, E.; & Jiménez-Junca, C. (2020). *Dyna*, 87(214), 183-190.