

QUIBIOUAS

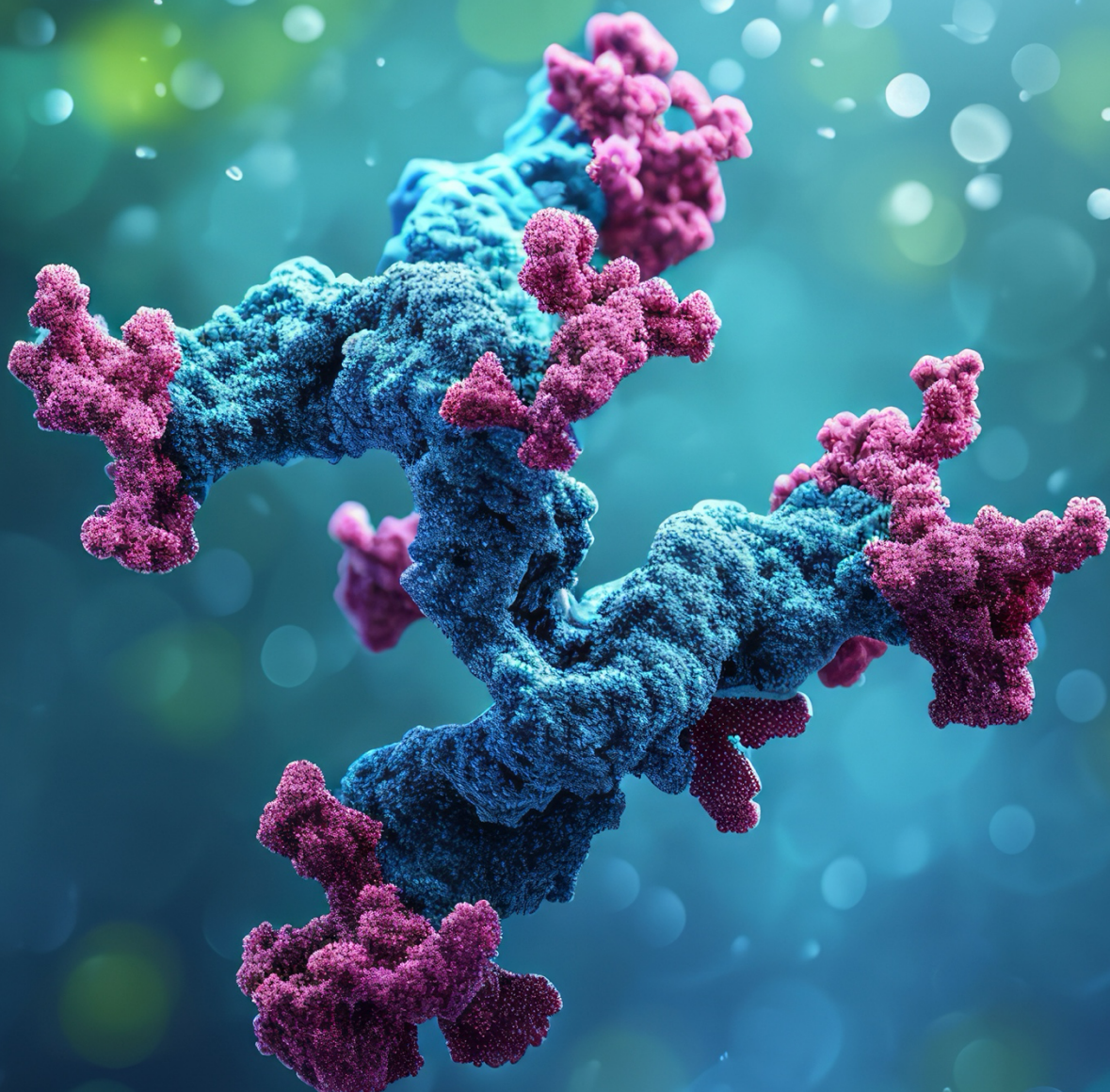
Revista de Ciencias Químico Biológicas

Julio-Diciembre 2024

Núm. 2



U N I V E R S I D A D A U T Ó N O M A D E S I N A L O A



e-ISSN (en trámite)

QUIBIOUAS

Revista de Ciencias Químico Biológicas

Número II, 2024. ISSN (en trámite)

<https://revistas.uas.edu.mx/index.php/QBU/index>



DIRECTORIO INSTITUCIONAL

DR. CANDELARIO ORTÍZ BUENO

Encargado de Despacho de Rectoría

DRA. ARMIDA LLAMAS ESTRADA

Secretaria General

DR. ALFONSO MERCADO GÓMEZ

Director General de Servicios Escolares

DR. JORGE MILÁN CARRILLO

Secretario Académico Universitario

DR. MARIO NIEVES SOTO

Director General de Investigación y Posgrado

DR. EUSIEL RUBIO CASTRO

Director de la FCQB

DRA. MARTHA EDITH LÓPEZ LÓPEZ

Editora en Jefe de la Revista

QUIBIOUAS Revista de Ciencias Químico Biológicas

COMITÉ EDITORIAL

DRA. MARTHA EDITH LÓPEZ LÓPEZ

Profesor Investigador FCQB, SNII Nivel 1
Editora en Jefe

DR. CARLOS IVÁN DELGADO NIEBLA

Profesor Investigador FCQB, SNII Nivel 1
Editor de Sección y Soporte Técnico

DRA. MARÍA DE JESÚS NAVARRO ARIAS

Profesor Investigador FCQB, SNII Nivel 1
Editor de Sección

DR. CRISTIAN ALARID GARCÍA

Profesor Investigador FCQB, SNII Nivel 1
Editor de Sección

DRA. LIDIA ELENA AYÓN REYNA

Profesor Investigador FCQB, SNII Nivel 1
Corrector de Estilo

DRA. EVANGELINA GARCÍA ARMENTA

Profesor Investigador FCQB, SNII Nivel 1
Corrector de Estilo

DRA. MARCELA MARTÍNEZ VALENZUELA

Profesor Investigador FCQB, SNII Candidato
Corrector de Estilo

LIC. JUAN ANTONIO ZAMORA LÓPEZ

Diseño Gráfico-Maquetador

LIC. HÉCTOR CARLOS LEAL LÓPEZ

Coordinador de Soporte Técnico

El Comité Editorial de QUIBIOUAS Revista de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, agradece la colaboración realizada como pares evaluadores doble ciego, a los autores, revisores, así como a los correctores de estilo, editores, maquetadores y soporte técnico. Todo el proceso editorial mantuvo siempre la integridad del proceso de evaluación, cuidando la calidad de la revista QUIBIOUAS Revista de Ciencias Químico Biológicas en su Número 2, julio-diciembre 2024. El acceso es abierto por lo que dará acceso a todo aquel que quiera leer cada una de estas publicaciones.

COMITÉ CIENTÍFICO

DR. ROBERTO GUTIERREZ DORADO

Profesor Investigador FCQB, SNI Nivel 1
<https://orcid.org/0000-0002-3192-1588>

DRA. PERLA ROSA FITCH VARGAS

Profesor Investigador Facultad de Ciencias del Mar,
SNII Nivel 1

<https://orcid.org/0000-0003-4097-4726>

DR. JORDI GERARDO LÓPEZ VELÁZQUEZ

Profesor Investigador en Universidad Tecnológica de
Culiacán, SNII Nivel 1

<https://orcid.org/0000-0002-0901-5984>

CINTILLO LEGAL

QUIBIOUAS Revista de Ciencias Químico Biológicas No. 2, julio-diciembre 2024, es una publicación semestral, editada por la Universidad Autónoma de Sinaloa, a través de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas Calzada de las Américas Nte 2771, Cd Universitaria, Burócrata, Culiacán Rosales, Sinaloa. CP. 80013, teléfono 6677520460, página de internet <https://revistas.uas.edu.mx/index.php/QBU/index>, y correo electrónico editor.quibiouas@uas.edu.mx. Editora responsable: Dra. Martha Edith López López, Profesora Investigadora Titular C y SNII Nivel 1. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. (en trámite), ISSN: (en trámite en el Instituto Nacional de Derechos de Autor). Responsable de actualizar la publicación: Dra. Martha Edith López López en julio de 2024. Las opiniones expresadas por los/las/autores/as no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación. Se permite la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación siempre y cuando se cite la fuente original de forma detallada. Cada manuscrito está bajo la licencia Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.

CONTENIDO

EDITORIAL

Carta de la Editora en Jefe
Dra. Martha Edith López López

AVANCES DE INVESTIGACIÓN

Clonación y expresión recombinante de los dominios variables tipo- Inmunoglobulina de los inmunorreceptores PD-1 y PD-L1 humanos

Cloning and recombinant expression of the Immunoglobulin-like variable domains of humans PD-1 and PD-L1 immunoreceptors **1-10**

González, P.¹, Beltrán-López, E.¹, López-Moreno, H.S.^{1*}

Frecuencia y distribución de genotipos del virus del papiloma humano en mujeres atendidas en hospitales públicos de Culiacán, Sinaloa

Frequency and distribution of human papillomavirus genotypes in women treated in public hospitals in Culiacan, Sinaloa. **11-21**

Osuna-Espinoza, G.E.^{1‡}, Méndez-Martínez, R.S.^{2‡}, Durán-Pérez, S.A.¹, Báez-Flores, M.E.¹, Vázquez-Vega, S.³, Osuna-Ramírez, I.¹ y Rendón-Maldonado, J.G.^{1*}

Biorrefinería energética a partir de semilla residual de aguacate (*Persea americana* cv. "Hass")

Energetic biorefinery from waste avocado seed (*Persea americana* cv. 'Hass') **22-33**

Peraza-Regalado, K.A.^{1‡}, Valdez-Ontiveros, J.E.^{1 ‡}, Juárez-Cota, M.F.², Ambriz-Pérez, D.L.^{1,2,3}, Santos-Ballardo, D.U.^{2,4*}

***Enterococcus faecium* aisladas del contenido intestinal de *Penaeus vannamei*: propiedades de seguridad, tecnológicas y probióticas**

Enterococcus faecium isolated from the intestinal contents of *Penaeus vannamei*: safety, technological, and probiotic properties **33-45**

Castañeda-Ruelas, G.M.¹, Gámez-Bayardo, S.¹, Domínguez-Lagunes, S.¹, Fierros-Pérez, C.E.², Durán-Pérez, S.¹, Hernández-Díaz, L.J.¹, Jiménez-Edeza, M.^{1*}

Desarrollo y optimización de películas comestibles de almidón de maíz incorporando aceite esencial de citronela y nanopartículas de calcio

Development and optimization of edible corn starch films incorporating citronella essential oil and calcium nanoparticles **46-56**

Calderón-Castro, A.^{1*}, Ahumada-Meza, J.A.¹, Limón-Valenzuela, V.¹, Aguilar-Palazuelos, E.¹, Fitch-Vargas, P.R.², Delgado-Nieblas, C.I.¹, López-Díaz, A.¹, Camacho-Hernández, I.L.¹, Ruiz-Armenta, X.A.¹, Jacobo-Valenzuela, N.¹

CARTA DEL EDITOR

Estimada comunidad de la Química

Me complace presentarles la segunda edición de QUIBIOUAS Revista de Ciencias Químico Biológicas, dedicada a la publicación de artículos científicos originales e innovadores en el área de la Química aplicada a la Salud, Ingeniería y Biotecnología.

En este número, encontrarán una selección de trabajos de investigación de alto nivel, realizados por destacados investigadores del área química tanto de nuestra institución como de otras universidades nacionales. Estos artículos abarcan temas de gran relevancia y actualidad.

Quiero agradecer a todos los autores que confiaron en nuestra revista para dar a conocer sus valiosos aportes al conocimiento científico. Asimismo, extendiendo un sincero reconocimiento a nuestro comité editorial, conformado por un sólido equipo de Profesores Investigadores del Sistema Nacional de Investigadores, quienes con su dedicación y experticia han hecho posible la publicación de este número.

Invitamos a toda la comunidad académica y científica interesada en el área de la Química a que nos envíen sus manuscritos para ser considerados en futuras ediciones de QUIBIOUAS. Recuerden que la revista tiene un carácter semestral y de acceso abierto, lo que permite una amplia difusión de los trabajos publicados.

Finalmente, esperamos que disfruten de la lectura de estos artículos y que los contenidos aquí presentados sean de utilidad para su labor docente, de investigación o profesional. Juntos, seguiremos contribuyendo al avance de la Química en beneficio de la sociedad.

Atentamente

Dra. Martha Edith López López

Editora en Jefe

QUIBIOUAS Revista de Ciencias Químico Biológicas

Clonación y expresión recombinante de los dominios variables tipo-Inmunoglobulina de los inmunorreceptores PD-1 y PD-L1 humanos

Cloning and recombinant expression of the Immunoglobulin-like variable domains of humans PD-1 and PD-L1 immunoreceptors

González, P.¹, Beltrán-López, E.¹, López-Moreno, H.S.^{1*}

¹Laboratorio de Biomedicina Molecular, CAC Biotecnología Biomédica UAS-264, Posgrado en Ciencias Biomédicas y Posgrado en Biotecnología, énfasis en Salud, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. Las Américas S/N, Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa, México. CP. 80010.

RESUMEN

En la inmunoterapia contra el cáncer el uso de anticuerpos monoclonales (MAb) que bloquean la interacción de los inmunorreceptores PD-1/PD-L1 mejora el tratamiento de los pacientes. Para producción de un MAb, la disponibilidad del antígeno proteico es un aspecto crítico. En este escenario la biotecnología biomédica permite la producción de cantidades virtualmente inagotables de las versiones recombinantes de esas proteínas. En este contexto, nuestro objetivo fue clonar y expresar los dominios variables tipo inmunoglobulinas (IgV) de PD-1 y PD-L1, debido a que la interacción entre ellas se produce entre sus dominios extracelulares IgV, se diseñaron iniciadores específicos para clonarlos. Una vez clonados, individualmente se ligaron a pcDNA6 y se introdujeron en *Escherichia coli*, y las transformantes positivas se definieron mediante PCR y secuenciación. Con las respectivas transformantes, se realizaron expresiones piloto inducidas con IPTG 1 mM, y la hora óptima de expresión se definió mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 %. Los resultados de la clonación fueron productos de 375 pb para PD-1 y 357 pb para PD-L1, cuyas secuencias mostraron un 99 % de identidad para PD-1 (GenBank OM363223) y un 100% para PD-L1 (GenBank OM363224). Ambas proteínas mostraron un tiempo óptimo de expresión de 4 h post-inducción y ~14 kDa consistentes con lo estimado. En conclusión, se logró la clonación y expresión recombinante de los dominios IgV de PD-1 y PD-L1, lo que permitirá la producción de un MAb u otra herramienta inmunoterapéutica contra el cáncer, algo que aún no se ha logrado en México.

PALABRAS CLAVE: Clonación; Proteína recombinante; PD-1; PD-L1; Inmunorreceptor

ABSTRACT

In cancer immunotherapy, the use of monoclonal antibodies (MAbs) that block the interaction of PD-1/PD-L1 immunoreceptors improves patient treatment. For MAb production, the availability of the protein antigen is a critical aspect. In this scenario, biomedical biotechnology allows the production of almost inexhaustible quantities of recombinant versions of these proteins. In this context, our objective was to clone and express the immunoglobulin-like variable domains (IgV) of PD-1 and PD-L1, because the interaction between them occurs among their IgV extracellular domains, specific primers were designed to clone them. Once cloned, they were individually ligated to pcDNA6 and introduced into *Escherichia coli*, and positive transformants were defined by PCR and sequencing. With the respective transformants, pilot expressions induced by 1 mM IPTG were performed, and the optimal time of expression was defined by electrophoresis in 15 % polyacrylamide gels. The cloning results were products of 375 bp for PD-1 and 357 bp for PD-L1, whose sequences showed 99% identity for PD-1 (GenBank OM363223) and 100% for PD-L1 (GenBank OM363224). Both proteins showed an optimal expression time of 4 h post-induction and ~14 kDa consistent with estimates. In conclusion, the cloning and recombinant expression of the IgV extracellular domains of PD-1 and PD-L1 was achieved, which will allow the production of a MAb or other immunotherapeutic tool against cancer, something that has not yet been achieved in Mexico.

KEYWORDS: Cloning; Recombinant protein; PD-1; PD-L1; Immunoreceptor

*Autor de correspondencia: Héctor Samuel López Moreno

Email: hslmoreno@ms.uas.edu.mx

ORCID ID: [0000-0001-7391-205X](https://orcid.org/0000-0001-7391-205X)

Registro ORCID Autores: PG: [0000-0003-3956-7752](https://orcid.org/0000-0003-3956-7752); EBL: [000-0002-8604-2847](https://orcid.org/000-0002-8604-2847)

Revista online: <https://revistas.uas.edu.mx/index.php/QBU/index>

INTRODUCCIÓN

Las células tumorales se caracterizan por su habilidad de manipular el microambiente y evadir los mecanismos de transducción de señales que evocan la muerte celular para continuar su proceso de proliferación descontrolada (Hanahan & Weinberg, 2011; Pecorino, 2012; Zhang & Zhang, 2020). Uno de los mecanismos primordiales para la sobrevivencia de estas células es la inhibición de las respuestas adaptativas celulares del sistema inmunitario, específicamente a los linfocitos T, tanto CD4⁺ y CD8⁺, infiltrantes de tumor (TIL) (Wellenstein & de Visser, 2018). Diversos autores han demostrado que algunas de las moléculas implicadas en este proceso de inhibición son los puntos de control inmunológicos (Pecorino, 2012; Wellenstein & de Visser, 2018).

Los puntos de control inmunológicos mejor caracterizados hasta el momento, son mediados por el Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico (CTLA-4 o CD152), y la proteína de Muerte celular Programada-1 (PD-1 o CD279), y su ligando PD-L1 (CD274) (Iwai *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2013).

PD-1 fue descrita por primera vez por Honjo y colaboradores (1992) en la Universidad de Kyoto (Hamanishi *et al.*, 2016). Esta proteína es codificada por el gen *Pdcd1* ubicado en el brazo largo del cromosoma 2, se encuentra conformado por cinco exones que codifican para una proteína transmembranal que consta de 288 residuos y un peso molecular de 31 kDa, perteneciente a la superfamilia de las Inmunoglobulinas (Ig) (Iwai *et al.*, 2017; Odales *et al.*, 2020). Por otro lado, PD-L1 y PD-L2 fueron identificados en 2000 y 2001 respectivamente (Iwai *et al.*, 2017). PD-L1 se ha reportado como indicativo de un mal pronóstico en pacientes con diversos tipos de cáncer (Chen *et al.*, 2016; Hamanishi *et al.*, 2016; Iwai *et al.*, 2017; Muenst *et al.*, 2015) y aunque PD-L2 logra unirse a PD-1 con afinidad comparable, poco ha sido descrito sobre su participación en procesos tumorales, por lo que se considera a PD-L1 como el ligando principal (Yang *et al.*, 2019), argumento que sustenta nuestra elección de PD-L1 en el presente trabajo. PD-L1 pertenece a la familia coestimuladores B7(CD80) /CD28 y el gen codificante *Pdl1* está constituido por siete exones y se encuentra en el brazo corto del cromosoma 9 en el ser humano, como proteína está conformada por 290 residuos y un peso molecular de 34 kDa (Chen *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2013; Zak *et al.*, 2015).

Tanto PD-1 como PD-L1 contienen un dominio extracelular variable tipo inmunoglobulina (IgV) y es mediante estos dominios que se efectúan las interacciones entre ambas moléculas (Borst *et al.*, 2021; Fantacuzzi *et*

al., 2024; Shi *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2016; Zak *et al.*, 2015) cuya interacción inhibe la proliferación de los linfocitos T, mediada por la fosforilación de secuencias aminoacídicas intracitoplasmáticas conservadas, denominadas como Motivos Inhibitorios de Inmunoceptores asociados a Tirosinas (o ITIM por sus siglas en inglés) de PD-1 (Borst *et al.*, 2021; Fantacuzzi *et al.*, 2024), a este ITIM fosforilado se reclutan las fosfatasa de fosfotirosinas (SHP) 1 y 2, que desfosforilan a las proteínas tirosina-cinasas ZAP70 y PKC θ (del inglés *Protein Kinase C*) y a la cadena CD3 ζ del receptor del linfocito T (TCR), afectando río abajo la cascada de señalización de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/Proteína Cinasa B (PKB o AKT, del inglés *Protein Kinase B*) e inhibiendo la proliferación, producción de citocinas como interferón-gamma (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), promoviendo la apoptosis mediante la inhibición del factor de sobrevivencia Bcl-XL (Muenst *et al.*, 2015). Todo este escenario contribuye al “agotamiento” de los TIL, afectando sus funciones efectoras pudiendo evocar la apoptosis o la anergia de estas importantes células inmunitarias contra los tumores (Borst *et al.*, 2021; Muenst *et al.*, 2015).

Se ha determinado que dentro del microambiente tumoral de diversos tipos de cáncer existe una sobreexpresión de PD-L1, misma que ha sido asociada a una mala respuesta al tratamiento y por lo tanto a un mal pronóstico de la salud de los pacientes (Chan *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2016). Es por ello, que se han desarrollado inmunoterapéuticos y otros fármacos, para restringir la interacción entre PD-1 y PD-L1 obteniendo mejores resultados terapéuticos tanto *in vitro* como *in vivo* (Brahmer *et al.*, 2012; Hirano *et al.*, 2005). Sin embargo, estos plausibles esfuerzos se han realizado en el extranjero, por lo que la disponibilidad de estos inmunoterapéuticos se encuentra limitada para muchos de los pacientes con cáncer en México. Para el desarrollo de inmunoterapéuticos, como los anticuerpos monoclonales (MAb) donde la disponibilidad del antígeno es limitada, la biotecnología biomédica permite la producción virtualmente inagotable de proteínas antigénicas recombinantes. En este contexto, en el presente proyecto se clonaron las regiones codificantes de los dominios extracelulares IgV de PD-1 y PD-L1, y se lograron expresar los fragmentos polipeptídicos recombinantes empleando un sistema de expresión procarionte, como abordaje inicial para la producción local de variantes de inmunoterapéuticos como MAb anti (α)-PD-1/aPD-L1, accesibles para la población general, especialmente para los pacientes con cáncer en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DE INICIADORES Y ANÁLISIS *IN SILICO*

A partir de las secuencias de los genes *Pdcd1* y *Pdl1* disponibles en el GenBank, con los números de acceso NC_000002.12:241858908-241849881 y NC_000009.12:5450503-5470567 respectivamente seleccionaron a la secuencia del exón 2 de *Pdcd1* y a la secuencia del exón 3 de *Pdl1*. Debido a que estos exones codifican para los dominios extracelulares IgV con las que interactúan estas proteínas (Zak *et al.*, 2015). Los iniciadores se diseñaron *in silico* con la secuencia de cada gen de interés empleando los programas bioinformáticos Primer Blast, Primer 3, Oligo Analyzer, Serial Cloner y CLC Sequence Viewer, siguiendo la estrategia descrita previamente en nuestro grupo de investigación (López-López *et al.*, 2018). A cada uno de los iniciadores sentido se les adicionó la secuencia diana para la enzima de restricción BamHI al igual que un codón de inicio de la traducción para facilitar su expresión debido a que se excluyó al primer exón en cada caso (Figura 1A). Por otro lado, a los iniciadores antisentido se le agregó la secuencia diana para la enzima de restricción XbaI (Figura 1A), de esta manera asegurando la inserción en sentido, en el sitio de clonación múltiple del vector de clonación/expresión mediante mutagénesis sitio-dirigida, en este caso pcDNA6 virtual. La calidad de los iniciadores y sus productos fue evaluada *in silico* mediante ClustalX, BLAST, y el programa Serial Cloner (López-López *et al.*, 2018).

CULTIVO CELULAR

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 (ATCC HTB-22) se cultivó en medio RPMI-10 [RPMI-1640 con alta glucosa (Sigma-Aldrich), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco) descomplementado previamente a 56 °C, 50 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y 50 µg/mL de gentamicina (Gibco) empleando botellas de plástico con cuello angular y tapa ventilada estériles de 25 cm² (Corning), los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 37 °C en una incubadora (Binder), con atmósfera húmeda y 5 % de CO₂ siguiendo el protocolo descrito previamente (López-Moreno *et al.*, 2003).

CLONACIÓN DE LOS DOMINIOS IgV DE PD-1 Y PD-L1

Se realizó una extracción DNA genómico (gDNA) a partir de la biomasa de las células MCF-7 obtenidas por centrifugación, y procesadas mediante el método de Aljanabi (Aljanabi & Martinez, 1997), dicho gDNA fue utilizado como templado para la clonación del dominio IgV de PD-L1.

La clonación del dominio IgV de PD-1, se realizó mediante una extracción de sangre periférica a través de punción venosa en un voluntario sano. Se aislaron las células mononucleares empleando un kit comercial de LymphoPrep (Sigma-Aldrich), y se procedió a la extracción del gDNA, empleando la metodología previamente descrita. La región génica de interés de *Pdcd1* fue clonada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando un máster-mix cristal (Jena Bioscience), y la reacción se llevó a cabo en un termociclador Miniamp Plus (Applied Biosystem) con las siguientes condiciones: 35 ciclos de reacción, con una etapa de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, una etapa de alineamiento a 63 °C por 1 minuto 30 segundos y finalmente una etapa de elongación a 72 °C por 1 minuto 30 segundos. Por otro lado, la región génica de interés de *Pdl1* fue clonada por PCR empleando las siguientes condiciones: 35 ciclos de reacción, con una etapa de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, una etapa de alineamiento a 52 °C por 1 minuto 30 segundos y finalmente una etapa de elongación a 72 °C por 1 minuto 30 segundos. Los amplicones obtenidos fueron observados en un gel de agarosa (GE) al 1.5 % p/v y teñidos con SybrGold (Invitrogen) siguiendo las condiciones descritas previamente (López-López *et al.*, 2018).

SECUENCIACIÓN DE LOS IgVS

La banda correspondiente a cada producto de la PCR observada en los geles de agarosa de los genes *Pdcd1* y *Pdl1*, fue escindida del gel con un bisturí estéril (Ambiderm) para su purificación empleando el kit comercial *Agarose Gel Extraction Kit* (Jena Bioscience), cada muestra obtenida fue cuantificada utilizando un espectrofotómetro tipo nanodrop (Thermo Fisher) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, con algunas modificaciones. Las muestras fueron secuenciadas en la unidad de servicio LANBAMA del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) con el método de didesoxinucleótidos marcados, empleando un Termociclador Verity (Applied Biosystems), y los secuenciadores automatizados series 3500 y 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias experimentales obtenidas se compararon con las secuencias registradas en las bases de datos con el programa BLAST de NCBI. Finalmente, las secuencias obtenidas fueron registradas en el GenBank.

OBTENCIÓN DEL DNA RECOMBINANTE

Una vez verificada la identidad de cada uno de los productos de PCR de cada fragmento genético IgV de interés, así como el vector de clonación y expresión pcDNA6/V5-HIS A (gentilmente donado por el Dr. Vianney

Ortiz del CINESTAV-IPN), fueron individualmente sometidos a digestiones enzimáticas empleando las enzimas BamHI (New England Biolabs), y XbaI (New England Biolabs), siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se incubó durante 2 h a 37 °C, y fue detenida mediante inactivación enzimática de la muestra a 80 °C durante 20 minutos. Cada producto digerido fue coincubado por separado con alícuotas del plásmido también digerido, para realizar una reacción de ligación empleando la enzima T4 ligasa (New England Biolabs), disuelta en su amortiguador específico, para obtener el DNA recombinante (rDNA) como construcciones plasmídicas modificadas, denominadas como pD1 y pDL1.

TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

Para la transformación bacteriana, se realizó un protocolo para la producción de bacterias competentes de la cepa *Escherichia coli* BL21-DE3, para ello se siguió la metodología estándar descrita previamente (Chang *et al.*, 2017). Brevemente, se realizó un cultivo en medio de infusión cerebro y corazón o BHI (BD) y se incubó a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, el cultivo se transfirió a tubos Falcon (Falcon) estériles de 15 mL y se incubaron en hielo para ser tratadas con soluciones de cloruro de magnesio y cloruro de calcio (Mg-CaCl₂) (Chang *et al.*, 2017). A las bacterias competentes se les añadió individualmente una alícuota de las construcciones pD1 o pDL1, se incubaron en hielo por 30 min., los tubos fueron transferidos a baño María (Labnet) a 42 °C durante 1.5 min. e inmediatamente después fueron colocados en hielo.

Posteriormente, a cada tubo se le agregó medio SOB (del inglés *Super Optimal Broth*) sin antibiótico en condiciones de esterilidad y se incubaron a 37 °C durante 45 min. Finalmente, una alícuota fue sembrada con asa de distribución en placas Petri (Nunc) con agar SOB o BHI suplementado con 100 mg/mL de ampicilina (Gibco) (SOB-amp o BHI-amp), e incubadas a 37 °C toda la noche para el aislamiento y selección de colonias transformantes.

EVALUACIÓN DE TRANSFORMANTES

Las bacterias transformantes fueron evaluadas mediante el método de PCR, para ello las colonias desarrolladas en el agar BHI-amp (o SOB-amp) fueron seleccionadas al azar y transferidas a tubos Falcon de 15 mL conteniendo 5 mL de medio BHI-amp (o SOB-amp) y cultivadas a 37 °C toda la noche. El rDNA fue extraído utilizando el método de lisis alcalina (Birnoim & Doly, 1979) y fueron visualizados en gel de agarosa al 1 %

p/v. El rDNA obtenido fue utilizado como templado para una PCR confirmatoria empleando los iniciadores específicos para amplificar al IgV de PD-1 o el IgV de PD-L1. Los amplicones fueron analizados en un gel de agarosa al 2 % p/v.

EXPRESIÓN DE RECOMBINANTES

La expresión proteica recombinante de los dominios IgV de PD-1 y PD-L1 se realizó mediante un ensayo de expresión piloto, para ello se transfirieron individualmente alícuotas tipo asada de algunas de las colonias aisladas de los cultivos de transformantes (*E. coli* BL21-DE3) positivas para PD-1 o PD-L1 desarrolladas en placas Petri con agar SOB-amp, a tubos Falcon de 15 mL conteniendo 5 mL de medio SOB-amp e incubadas durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente 50 mL del cultivo, fueron subcultivados en 50 mL de medio SOB-amp a 37 °C en agitación orbital a 150 rpm. El desarrollo bacteriano se monitoreó espectrofotométricamente hasta alcanzar una absorbancia de 0.6 a una longitud de onda de 600 nm, para inmediatamente inducir la expresión de las proteínas recombinantes con la adición de 1 mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma-Aldrich). Se recolectó 1 mL del cultivo cada hora, a lo largo de 7 horas, y su biomasa fue aislada por centrifugación a 5000 x *g* durante 10 min., en tubos tipo Eppendorf estériles de 1.5 mL (López-López *et al.*, 2018; López-Moreno *et al.*, 2003). Las biomásas se resuspendieron en 50 mL de amortiguador de corrida de Laemmli o TGS (compuesto por Tris 25 mM, Glicina 190 mM, y SDS 3.5 mM), y fueron lisadas por choque térmico sometiéndolas a 3 ciclos de congelación y ebullición. Las muestras fueron centrifugadas a 13,000 x *g* durante 1 min., y los sobrenadantes obtenidos fueron transferidos a nuevos tubos Eppendorf de 1.5 mL. Los sobrenadantes fueron mezclados con 10 mL de amortiguador de muestra de Laemmli 5X (compuesto por Tris-HCl 312.5 mM pH 6.8, SDS 10 % p/v, glicerol 25 %, azul de bromofenol 0.5 % p/v, y β-mercaptoetanol 10 % v/v) e incubados en agua destilada en ebullición (~100 °C) durante 5 min., posteriormente una alícuota de 15 mL de cada muestra fueron analizadas en geles de poliacrilamida (del inglés SDS-PAGE) al 15 % teñido con azul brillante de Coomassie R-250 (López-López *et al.*, 2018; López-Moreno *et al.*, 2003), para evidenciar la presencia de los dominios recombinantes IgV de PD-1 y PD-L1, a fin de determinar el tiempo óptimo para la expresión recombinante.

MODELADO 3D

Con las traducciones *in silico* de las secuencias genéticas experimentales, se ingresaron al portal Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) para la predicción de un modelo 3D para cada uno de los dominios IgV de PD-1 y PD-L1, los resultados obtenidos fueron visualizados empleando el software Chimera 1.17.3, como fue reportado previamente (López-López *et al.*, 2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis *in silico* de cada una de las secuencias IgV de PD-1 y PD-L1 permitió el diseño de los iniciadores específicos que fueron sintetizados (Figura 1A), con ellos se estandarizaron las condiciones experimentales para una PCR punto final, con la que se clonaron cada uno de dichos fragmentos IgV, una temperatura de alineamiento de 63 °C para el IgV de PD-1 y 52 °C para el IgV de PD-L1 (Figura 1A). Los productos obtenidos se pusieron en evidencia electroforéticamente en geles de agarosa, observando una banda con un tamaño de 375 pares de bases (pb) para el IgV de PD-1, y una banda de 357 pb para PD-L1 (Figura 1B), consistente con lo esperado. Cada una de esas bandas fueron aisladas y secuenciadas, las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de referencia presentes en las bases de datos, mostrando una identidad del 99 % para el IgV de *Pdcd1* (Figura 1C), variando en la posición 300 donde hay un cambio de T por A en la secuencia de referencia NM_005018.3 (Figura 1C). Esta diferencia entre la secuencia de referencia y la secuencia experimental puede deberse a los polimorfismos naturales presentados por cada ser humano, dado que la secuencia experimental obtenida aquí para el IgV de PD-1, fue clonada desde el gDNA de un donador sano. Por otro lado, al realizar el análisis de homología *in silico*, para la secuencia experimental obtenida de la PCR del fragmento IgV de *Pd11*, se obtuvo un 100 % de identidad con la secuencia genética de referencia NR_052005.2 (Figura 1D). Esta identidad pudo deberse a que el IgV de PD-L1 provenía de un cultivo celular homogéneo de la línea tumoral de cáncer de mama MCF-7 (Cabanillas-Bojórquez *et al.*, 2023). Estos resultados confirman que las secuencias clonadas *in vitro* corresponden a los fragmentos IgV consistentes con los exones 2 del gen *Pdcd1* y el exón 3 del gen *Pd11* y concuerdan con lo reportado en la literatura para estas moléculas (Shi *et al.*, 2013).

Colonias típicas de *E. coli* BL21 transformadas con las construcciones plasmídicas pD1 y pDL1 fueron obtenidas de los cultivos en placas de agar SOB-amp se muestran en la Figura 2A, consistentes con otros reportes similares donde emplearon esa misma cepa bacteriana (López-López *et al.*, 2018; López-Moreno *et al.*, 2003). Las bacterias transformadas fueron seleccionadas por su capacidad de sobrevivir en medio suplementado con ampicilina, por la presencia de este gen de resistencia en nuestro vector de expresión. Debido a que existe la posibilidad de que las bacterias sean transformadas con el vector sin los fragmentos de interés, fue necesario emplear una PCR para determinar la presencia de cada uno de los fragmentos deseados. Algunas de esas colonias fueron verificadas, evidenciando la presencia de las bandas de 375 pb para el IgV de PD-1, y de 357 pb para el IgV de PD-L1 (Figura 2B) la portación de los genes de interés, similar a lo descrito por otros

autores en la literatura (Kalim *et al.*, 2017; Zhansaya *et al.*, 2020). Con ello fue posible demostrar que las colonias seleccionadas contenían los insertos de interés y que podrían ser utilizadas para inducir la expresión recombinante de los dominios IgV tanto de PD-1 como de PD-L1.

Las secuencias genéticas experimentales permitieron realizar una traducción *in silico* para comparar cada una con las secuencias aminoácidas de referencia, una estrategia que ha sido empleada previamente por otros autores (López-López *et al.*, 2018), dicho análisis permitió observar que ambas secuencias experimentales obtenidas aquí, son idénticas al 100 % en secuencias de aminoácidos, como lo muestran los resultados observados en la Figura 2C y 2D, donde la diferencia genética del 1 % para el IgV de PD-1 no tuvo impacto en la secuencia de aminoácidos, y confirmando lo esperado para el IgV de PD-L1 dada la identidad total. Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura (Kalim *et al.*, 2017; Zhansaya *et al.*, 2020).

Posterior a la expresión recombinante el análisis de SDS-PAGE al 15 % para el IgV de PD-1, se logró observar una banda que aumentaba su intensidad de expresión a lo largo del tiempo, con un peso molecular aproximado de 14 kDa, tamaño que corresponde a lo estimado para el dominio IgV de PD-1 (Figura 2E). Asimismo, se logró determinar que la hora óptima de inducción de la proteína fue a las 4 horas post-inducción (Figura 2G). Los resultados observados son consistentes a lo reportado por Zhansaya y colaboradores (2020) (Zhansaya *et al.*, 2020), quienes al

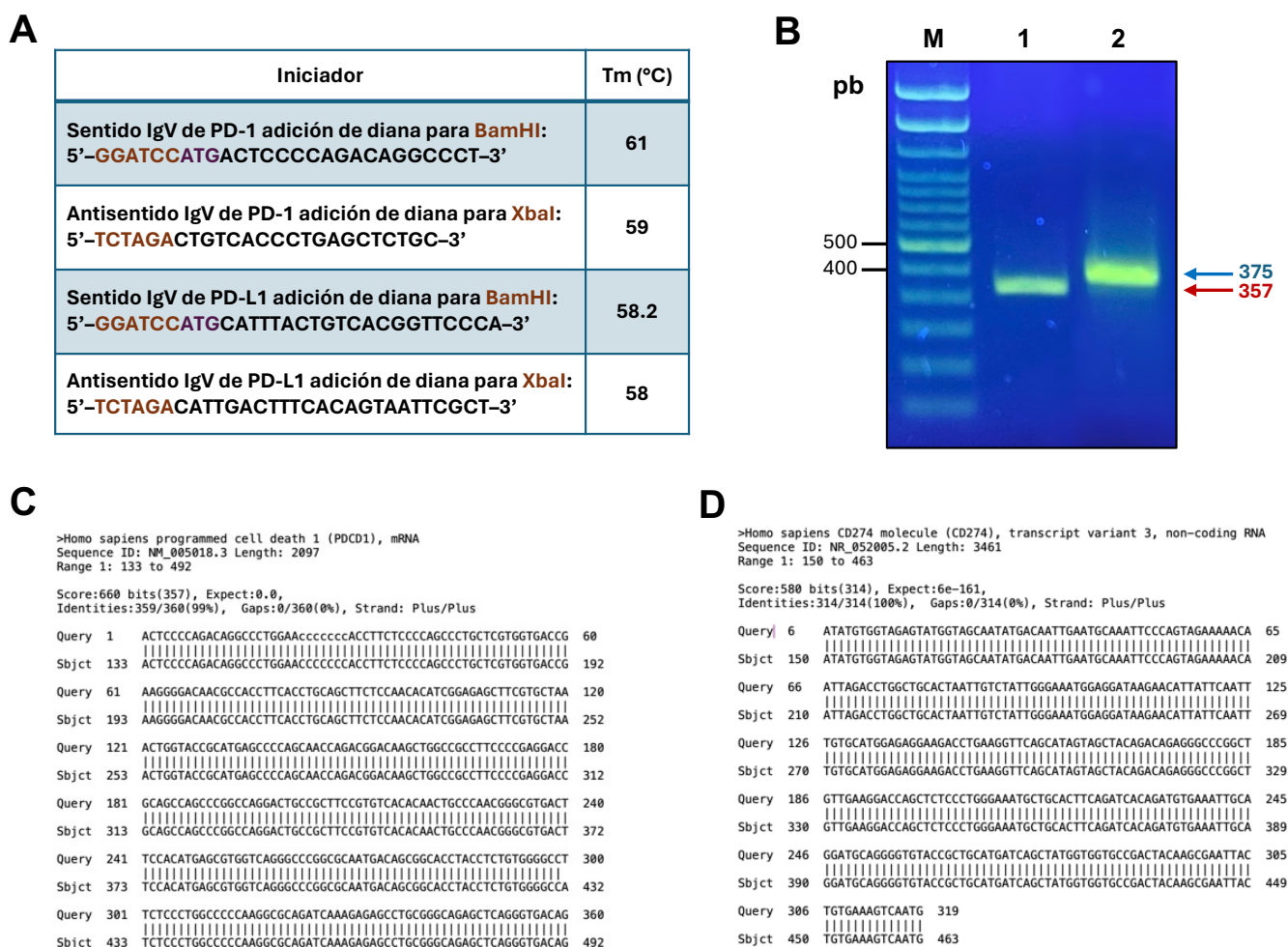


Figura 1. Clonación y secuenciación de los IgV de PD-1 y PD-L1. **A)** Secuencias de iniciadores específicos para cada IgV, con la adición de las dianas para las enzimas de restricción en 5' BamHI, y en 3' XbaI, así como la adición de un codón de iniciación y las temperaturas de fusión. **B)** Productos de PCR correspondientes a los IgV purificados previo a la secuenciación genética. Línea M, marcador de 100 pb; línea 1, IgV de PD-L1; línea 2, IgV de PD-1. **C)** y **D)** Alineamientos de las secuencias IgV de PD-1 y del IgV de PD-L1, respectivamente. Los detalles de las secuencias IgV experimentales obtenidas aquí, se observan como "Query" en las figuras correspondientes.

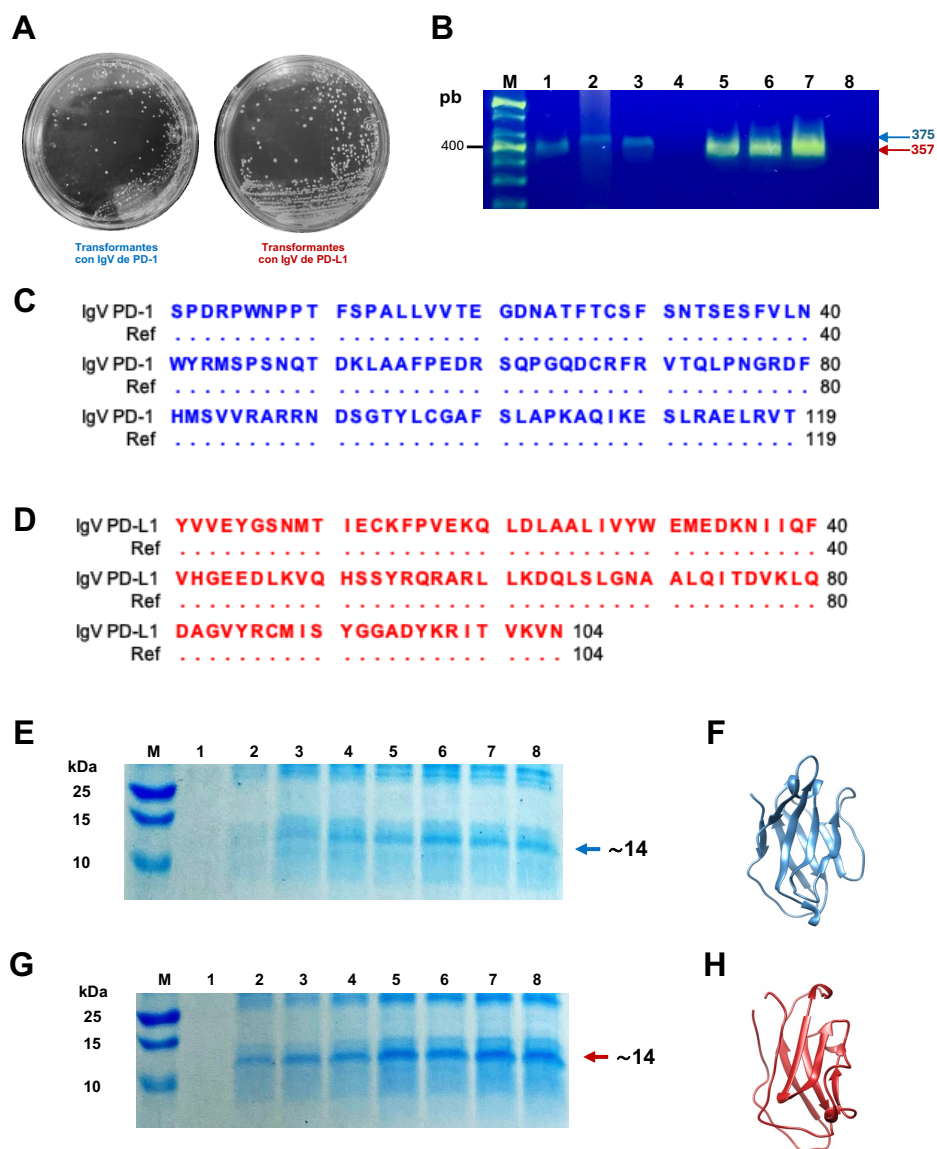


Figura 2. Producción recombinante de los IgV de PD-1 y PD-L1. **A)** Fotografías representativas de las colonias de *E. coli* BL21 transformadas con pD1 o pDL1, cultivadas en agar SOB-amp. En la imagen izquierda, las transformantes de IgV de PD-1 (texto azul), en la imagen derecha, las transformantes de IgV de PD-L1 (texto rojo). **B)** Confirmación de la presencia de los IgV en el DNA plasmídico (pDNA) aislado de las bacterias transformantes, observadas en un gel de agarosa al 2 % p/v teñido con SybrGold. Línea M, Marcador de 100 pb; líneas 1, 2 y 3 colonias portadoras del IgV de PD-1; línea 4, plásmido vacío como control negativo; líneas 5, 6 y 7, colonias portadoras del IgV de PD-L1, línea 8, plásmido vacío como control negativo. **C)** y **D)** comparativa de las secuencias aminoácidas derivadas de la secuenciación genética de los IgV de PD-1 (texto en color azul) y PD-L1 (texto en color rojo), con las secuencias de referencia correspondiente. **E)** y **G)** Cinética de expresión recombinante de cada IgV. Línea M, marcador de peso molecular Precision Plus Protein; líneas 1 a la 8 tiempo en horas post-inducción desde 0 a 7. En cada caso, se señala la banda de incremento de aproximadamente 14 kDa, correspondiente a cada IgV, **E)** PD-1 y **G)** PD-L1. **F)** Modelo *in silico* 3D del IgV de PD-1, predicho de la secuencia mostrada en **C)**, empleando la plataforma Phyre² y visualizado en el software Chimera 1.17.3. **H)** Modelo *in silico* 3D del IgV de PD-L1, predicho de la secuencia mostrada en **D)**, empleando la plataforma Phyre² y visualizado en el software Chimera 1.17.3.

expresar el dominio extracelular completo de la proteína PD-1 de ser humano, obtuvieron una hora óptima de inducción de 4 horas post-inducción, y una banda de 22 kDa, estas diferencias de peso molecular, se debe a que ellos produjeron todo el dominio extracelular de la proteína, y nosotros solo el dominio IgV. Por otro lado, en la expresión recombinante de PD-L1 también se obtuvo una banda que aumentaba su intensidad de expresión a lo largo del tiempo, con un peso molecular aproximado de 14 kDa, consistente con el peso molecular esperado para un dominio IgV (Figura 2G) (Fantacuzzi *et al.*, 2024; Kalim *et al.*, 2017; Zak *et al.*, 2015; Zhansaya *et al.*, 2020). Asimismo, se determinó que la hora óptima de inducción fueron a las 4 h post-inducción. Lo observado es similar a lo reportado por (Kalim *et al.*, 2017), quienes al expresar el dominio completo extracelular de PD-L1 obtuvieron una banda de 30 kDa y una hora óptima de expresión a las 5 h post inducción (Kalim *et al.*, 2017). También en este caso, las diferencias en peso molecular se deben a que ese grupo de investigación realizó la clonación del gen del dominio extracelular completo de PD-L1, mismo que contiene además de un dominio IgV, un dominio adicional constante tipo inmunoglobulina (IgC) (Fantacuzzi *et al.*, 2024; Kalim *et al.*, 2017; Zak *et al.*, 2015).

El análisis 3D de los dominios IgV de PD-1 y PD-L1 mostraron estructuras típicas de dominios variables tipo inmunoglobulina con hojas beta antiparalelas en un acomodo tridimensional tipo sándwich (Odales *et al.*, 2020). La base de datos disponibles en el portal Phyre 2.0 muestra que nuestras secuencias generan con sus algoritmos, estructuras tridimensionales consistentes con las proteínas PD-1 y PD-L1 obtenidas de los análisis cristalográficos disponibles en la base de datos PDBe (del inglés Protein Data Bank in Europe) 3rrq para PD-1, y 7xad para PD-L1, confirmando que la clonación y expresión recombinante reportada aquí, fue exitosa, para cada uno de los dominios IgV. Adicionalmente, estas estructuras son consistentes con las reportadas en la literatura (Fantacuzzi *et al.*, 2024; Zak *et al.*, 2015), donde se detalla mediante el análisis cristalográfico de estas proteínas PD-1 y PD-L1 humanas, fortaleciendo nuestros resultados y permitiendo avanzar en la generación de un MAb o el diseño de un inmunoterapéutico útil para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, donde se ha demostrado que bloquear este punto de control, favorece positivamente el tratamiento de los pacientes con cáncer, al potenciar una respuesta adaptativa celular mediada por linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ infiltrantes de tumor (Borst *et al.*, 2021; Brahmer *et al.*, 2012; Hirano *et al.*, 2005; Muenst *et al.*, 2015; Pecorino, 2012; Shi *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2016; Zhang & Zhang, 2020).

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible concluir que se logró la clonación y expresión recombinante de los dominios extracelulares IgV tanto de PD-1 y PD-L1, y que tanto su secuencia genética como su estructura 3D confirman estos datos. Asimismo, nuestros resultados establecen las bases moleculares que permitirán disponer de una fuente antigénica cuasi-inagotable de estas proteínas IgV, un aspecto biomédico crítico para la posterior producción de un MAb, o un MAb humanizado (o zumab) u otro inmunoterapéutico, algo que aún no se logra en México, lo que, de concretarse, beneficiará a miles de pacientes con cáncer de nuestro país.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONAHCYT CB-2014-240185, y al LBM-FCQB por el por el financiamiento de este proyecto.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

APROBACIÓN DE COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y DE ÉTICA

No aplica

REFERENCIAS

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. In *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692-4693.
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513-1523.
- Borst, J., Busselaar, J., Bosma, D. M. T., & Ossendorp, F. (2021). Mechanism of action of PD-1 receptor/ligand targeted cancer immunotherapy. In *European Journal of Immunology*, 51(8), 1911–1920. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/eji.202048994>
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q. M., Hwu, W.-J., Topalian, S. L., Hwu, P., Drake, C. G., Camacho, L. H., Kauh, J., Odunsi, K., Pitot, H. C., Hamid, O., Bhatia, S., Martins, R., Eaton, K., Chen, S., Salay, T. M., Alaparthi, S., Grosso, J. F., ... Wigginton, J. M. (2012). Safety

- and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26), 2455–2465. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1200694>
- Cabanillas-Bojórquez, L. A., Montes-Ávila, J., Vega-García, M. O., López-Moreno, H. S., Castillo-López, R. I., & Gutiérrez-Dorado, R. (2023). Effect of Optimized Chitosan Coating Obtained by Lactic Fermentation Chemical Treatment of Shrimp Waste on the Post-Harvest Behavior of Fresh-Cut Papaya (*Carica papaya* L.). *Fermentation*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation9030220>
- Chan, L. C., Li, C. W., Xia, W., Hsu, J. M., Lee, H. H., Cha, J. H., Wang, H. L., Yang, W. H., Yen, E. Y., Chang, W. C., Zha, Z., Lim, S. O., Lai, Y. J., Liu, C., Liu, J., Dong, Q., Yang, Y., Sun, L., Wei, Y., ... Hung, M. C. (2019). IL-6/JAK1 pathway drives PD-L1 Y112 phosphorylation to promote cancer immune evasion. *Journal of Clinical Investigation*, 129(8), 3324–3338. <https://doi.org/10.1172/JCI126022>
- Chang, A. Y., Chau, V. W., Landas, J. A., & Yvonne. (2017). Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI methods*, 1(22-25). Disponible en: <https://static.igem.org/mediawiki/2018/d/d2/T-NYMU-Taipei-protocol-competent-cell.pdf>
- Chen, J., Jiang, C. C., Jin, L., & Zhang, X. D. (2016). Regulation of PD-L1: A novel role of pro-survival signalling in cancer. In *Annals of Oncology*, 27(3), 409–416. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv615>
- Fantacuzzi, M., Paciotti, R., & Agamennone, M. (2024). A Comprehensive Computational Insight into the PD-L1 Binding to PD-1 and Small Molecules. *Pharmaceuticals*, 17(3), 316. <https://doi.org/10.3390/ph17030316>
- Hamanishi, J., Mandai, M., Matsumura, N., Abiko, K., Baba, T., & Konishi, I. (2016). PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. In *International Journal of Clinical Oncology*, 21(3) Springer Tokyo. <https://doi.org/10.1007/s10147-016-0959-z>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hirano, F., Kaneko, K., Tamura, H., Dong, H., Wang, S., Ichikawa, M., Rietz, C., Flies, D. B., Lau, J. S., Zhu, G., Tamada, K., & Chen, L. (2005). Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Research*, 65(3), 1089–1096. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.1089.65.3>
- Iwai, Y., Hamanishi, J., Chamoto, K., & Honjo, T. (2017). Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. In *Journal of Biomedical Science*, 24(1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0329-9>
- Kalim, M., Chen, J., Wang, S., Lin, C., Ullah, S., Liang, K., Ding, Q., Chen, S., & Zhan, J. (2017). Construction of high level prokaryotic expression and purification system of PD-L1 extracellular domain by using *Escherichia coli* host cell machinery. *Immunology Letters*, 190, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.06.004>
- López-López, K., Apodaca-Medina, A. I., León-Sicairos, C. R., Murúa-López, C. C., Ortiz-Navarrete, V. F., Chávez-Ontiveros, J., Beltrán-López, E., & López-Moreno, H. S. (2018). Cloning and recombinant expression of elongation factor-1 α of *Leishmania mexicana*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 18(12), 709–712. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2347>
- López-Moreno, H. S., Correa, D., Laclette, J. P., & Ortiz-Navarrete, V. F. (2003). Identification of CD4+ T cell epitopes of *Taenia solium* paramyosin. In *Parasite Immunology*, 25(10):513-6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2003.00658.x>
- Muenst, S., Soysal, S. D., Tzankov, A., & Hoeller, S. (2015). The PD-1/PD-L1 pathway: Biological background and clinical relevance of an emerging treatment target in immunotherapy. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 19, Issue 2, pp. 201–211). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.980235>
- Odales, J., Guzman Valle, J., Martínez-Cortés, F., & Manoutcharian, K. (2020). Immunogenic properties of immunoglobulin superfamily members within complex biological networks. *Cellular Immunology*, 358, 104235. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104235>
- Pecorino, L. (2012). *Molecular Biology of Cancer*. 3th edition, Oxford University Press, United Kingdom.

- Shi, L., Chen, S., Yang, L., & Li, Y. (2013). The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *Journal of Hematology and Oncology*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-74>
- Su, S., Hu, B., Shao, J., Shen, B., Du, J., Du, Y., Zhou, J., Yu, L., Zhang, L., Chen, F., Sha, H., Cheng, L., Meng, F., Zou, Z., Huang, X., & Liu, B. (2016). CRISPR-Cas9 mediated efficient PD-1 disruption on human primary T cells from cancer patients. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep20070>
- Wellenstein, M. D., & de Visser, K. E. (2018). Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. In *Immunity*, 48(3), 399–416. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.004>
- Yang, H., Zhou, X., Sun, L., & Mao, Y. (2019). Correlation between PD-L2 expression and clinical outcome in solid cancer patients: A meta-analysis. *Frontiers in Oncology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00047>
- Zak, K. M., Kitel, R., Przetocka, S., Golik, P., Guzik, K., Musielak, B., Dömling, A., Dubin, G., & Holak, T. A. (2015). Structure of the Complex of Human Programmed Death 1, PD-1, and Its Ligand PD-L1. *Structure*, 23(12), 2341–2348. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.09.010>
- Zhang, Y., & Zhang, Z. (2020). The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. In *Cellular and Molecular Immunology*, 17(8), 807–821. Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6>
- Zhansaya, A., Kanatbek, M., Kanat, T., Bakhytkali, I., Darkhan, K., Arman, K., Pavel, T., Kasym, M., & Yerlan, R. (2020). Recombinant Expression and Purification of Extracellular Domain of the Programmed Cell Death Protein Receptor. In *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 8(4). www.RBMB.net

Frecuencia y distribución de genotipos del virus del papiloma humano en mujeres atendidas en hospitales públicos de Culiacán, Sinaloa

Frequency and distribution of human papillomavirus genotypes in women treated in public hospitals in Culiacan, Sinaloa.

Osuna-Espinoza, G.E.^{1*}, Méndez-Martínez, R.S.^{2*}, Durán-Pérez, S.A.¹, Báez-Flores, M.E.¹, Vázquez-Vega, S.³, Osuna-Ramírez, I.¹ y Rendón-Maldonado, J.G.^{1*}.

¹Unidad de Investigaciones en Salud Pública "Dra. Kaethe Willms", Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Josefa Ortiz de Domínguez y Av. de las Américas S/N, Burócratas, Culiacán, Sinaloa 80010. ²Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando #82, Tlalpan, 2do piso, Torre de Investigación Básica, 14080, Ciudad de México. ³Unidad de Investigación Epidemiológica y en Servicios de Salud, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Doctores 330, Cuauhtémoc, 06720, Ciudad de México.

RESUMEN

El virus del papiloma humano (VPH), el principal factor de riesgo del cáncer cervicouterino (CaCu), es el cuarto cáncer más común en mujeres en México. Existen varios genotipos del VPH clasificados en virus de alto o bajo riesgo (VPH-AR, VPH-BR) oncogénico. En Sinaloa existe poca información sobre genotipos virales circulantes entre la población femenina. El objetivo del trabajo fue estimar la prevalencia, distribución de genotipos e infecciones múltiples de VPH en mujeres sinaloenses. Estudio descriptivo, transversal, observacional y prospectivo. Se recolectaron muestras de endo-exocérvix de mujeres sinaloenses que acudieron a consulta durante febrero 2023 a febrero 2024 al Hospital de la Mujer, la Unidad de Especialidades Médicas de Detección y Diagnóstico de Cáncer de Mama (UNEME DEDICAM) y al Instituto Sinaloense de Cancerología. Se extrajo el ADN y fue analizado para identificar genoma viral mediante PCR. Los resultados muestran que la edad promedio de las mujeres participantes fue de 41.4 años (IC95%: 38.6-44.2). El inicio de vida sexual en promedio fue 18.6 años (IC95%: 17.6-19.6). La prevalencia de infección por VPH fue de 33.3%. De las 21 mujeres VPH+, el 52.4% de sus parejas también desarrollaron esta infección. La distribución porcentual de infección por genotipos fue de 85% para VPH16, 30% para VPH11 y 20% para VPH81. El 90% de las mujeres infectadas por VPH tuvo infección múltiple ($p=0.026$). En el análisis de concordancia el genotipo VPH 16, que fue el más prevalente, tiene concordancia estadísticamente significativa con los genotipos VPH31, -39, -52, -58 y -59.

Palabras clave: Cáncer cervical, Infección por VPH, Infección múltiple, PCR.

ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is considered the main risk factor for cervical cancer (CaCu), which is the fourth most common cancer in women. There are several genotypes of HPV which are classified as high or low oncogenic risk viruses (HR-HPV, BR-HPV). In Sinaloa there is little information on the viral genotypes circulating in the female population. The aim of this study was to estimate the prevalence, genotype distribution and multiple HPV infections in Sinaloa women. This is a descriptive, cross-sectional, observational and prospective study. Samples of endo-exocervix were collected from women who attended for consultation during February 2023 to February 2024 at the Hospital de la Mujer, the Unidad de Especialidades Médicas de Detección y Diagnóstico de Cáncer de Mama (UNEME DEDICAM) and the Instituto Sinaloense de Cancerología. DNA was extracted and subsequently analyzed to identify the viral genome by PCR. The results show that the average age of female participants was 41.4 years (95%CI: 38.6-44.2). The average sexual debut was 18.6 years (95%CI: 17.6-19.6). The prevalence of HPV infection was 33.3%. Of the 21 women who had HPV, 52.4% of their partners also developed HPV infection. The percentage distribution of infection by viral genotype was 85% for HPV16, 30% for HPV11, and 20% for HPV81. Ninety per cent of HPV-infected women had multiple infections ($p=0.026$). Concordance analysis showed that HPV genotype 16, which was the most prevalent genotype, had statistically significant concordance with HPV genotypes 31, -39, -52, -58 and -59.

Keywords: Cervical cancer, HPV infection, Multiple HPV infection, PCR.

*Autor de correspondencia: José Guadalupe Rendón Maldonado

Email: jrendonm@uas.edu.mx

ORCID ID: [0000-0002-9823-6913](https://orcid.org/0000-0002-9823-6913)

Registro ORCID Autores: OE: [0009-0007-1399-1543](https://orcid.org/0009-0007-1399-1543); MM: [0000-0002-8310-6796](https://orcid.org/0000-0002-8310-6796); DP: [0000-0002-1009-2020](https://orcid.org/0000-0002-1009-2020);

ME: [0000-0003-1389-3568](https://orcid.org/0000-0003-1389-3568); SV: [0000-0001-7544-0906](https://orcid.org/0000-0001-7544-0906); ID: [0000-0002-4419-0710](https://orcid.org/0000-0002-4419-0710);

Revista online: <https://revistas.uas.edu.mx/index.php/QBU/index>

Enviado: Mayo 2024

Aceptado: Julio 2024

INTRODUCCIÓN

El virus del papiloma humano (VPH), pertenece a la familia Papillomaviridae, que son virus ADN de doble cadena circular, en la que se han clasificado más de 200 genotipos virales distribuidos en el reino animal; sin embargo, sólo algunos infectan al ser humano (Ochoa Carrillo, 2014; Fournier Pérez, 2013). El genoma de estos virus se compone de 3 regiones, la región LCR (región larga de control) que participa en el control de la replicación viral, la región de genes tempranos (E, del inglés early), conformada por genes que codifican para proteínas tempranas no estructurales (E-1 a E7); y la región de los genes tardíos que codifican para proteínas estructurales (L1 y L2) que forman la cápside viral cuyas secuencias de genes son altamente conservadas en todos los genotipos de VPH (Félix Beltrán, 2014).

Para facilitar el estudio del VPH, se han clasificado en virus de alto riesgo (VPH-AR y de bajo riesgo oncogénico (VPH-BR). Los de alto riesgo se asocian directamente con el cáncer cervicouterino (CaCu), así como con cáncer de cabeza y cuello, cáncer de garganta, de pene, de vulva y de ano (OMS, 2023, OMS, 2024; Sendagorta et al., 2019). Esta particularidad oncogénica se fundamenta en la capacidad de los VPH-AR que se integran en el genoma de la célula hospedera. Se ha descrito que las oncoproteínas tempranas E6 y E7 virales intervienen en la oncogénesis; mientras que los virus de bajo riesgo sólo se limitan a lesiones verrugas de la piel que no desarrollan cáncer, debido al menos en parte, a que el genoma viral no se integra al genoma de la célula hospedera, sino que permanece como ADN episomal dentro de la célula (Félix Beltrán, 2014; Lelo de Larrea et al., 2012). Desde principios de los años 90's, se describió el proceso carcinogénico del VPH y se ha reportado que el mecanismo está mediado por las oncoproteínas E6 y E7, las cuales inhiben los supresores de tumores mediante inactivación de p53 y el complejo pRB-E2F (factor de elongación 2, del genoma celular, respectivamente (Sendagorta et al., 2019; Hausen, 1976). El supresor de tumor p53 es uno de los coordinadores de la señalización celular. Generalmente este supresor se encuentra en bajos niveles y transcripcionalmente inactivo, cuando ocurre un daño celular se incrementan las concentraciones de p53 y la activación de la vía post-traduccional, lo que conduce hacia una vía de reparación del ADN, por su parte E7 interrumpe el complejo pRB-E2F que desregula la proliferación celular. En caso de daño severo, se detiene el ciclo celular y toma la vía de apoptosis para eliminar células dañadas. El mecanismo por el que los VPH inhiben a p53 se debe a que la oncoproteína E6 viral induce la

degradación por la formación de un complejo con la proteína ubiquitina ligasa E3 (Felix Beltran, 2014). Por su parte, la oncoproteína E7 es la encargada de la desregulación y proliferación del ciclo celular, además aumenta la inestabilidad genómica y promueve la acumulación de anomalías cromosómicas, en conjunto crean un entorno favorable para la transformación de las células epiteliales, esta oncoproteína inhibe la unión de pRB con el factor de transcripción E2F, esta unión es la encargada de detener el ciclo celular, por consecuencia cuando E7 bloquea la unión las células proliferan sin control, formándose un acumulo de células. (Sendagorta et al., 2019; Beltrán Lissabet, 2014).

La infección por el VPH es considerada el principal factor necesario, más no suficiente para el CaCu, el cual es el cuarto cáncer más común en mujeres en el mundo, y se han descrito diversos factores de riesgo como el genotipo de VPH-AR, la carga viral por unidad celular y la persistencia de infección múltiple (Hausen, 1976). Adicionalmente, se han reportado factores ambientales como el uso de anticonceptivos hormonales durante 5 o más años, el número de embarazos a término, tabaquismo, la edad de inicio de vida sexual, presencia de coinfecciones y deficiencias nutricionales. El factor nutricional es uno de los más importantes debido a que deficiencias del estado nutricional disminuye la capacidad de respuesta del sistema inmunológico y permite que el virus continúe la replicación lo que evita la regresión o eliminación de la infección viral (Ochoa Carrillo, 2014).

Actualmente, la infección por VPH es un problema de salud pública mundial, por lo que es importante contar con un monitoreo de la progresión de la infección, mediante un diagnóstico y tratamiento oportunos, antes de que se desarrolle la aparición de lesiones premalignas con el consecuente CaCu. En México, es el segundo cáncer más frecuente después del cáncer de mama, y en el mundo es el cuarto cáncer con mayor prevalencia (OMS, 2023). Está ampliamente descrito que el desarrollo de la malignidad se basa en los genotipos del VPH-AR, así como las lesiones intraepiteliales escamosas precursoras (Ili et al., 2024). Debido a lo anterior, el estudio del genotipado viral es imprescindible para conocer sus implicaciones pronósticas, ya que del genotipo viral dependen factores como la gravedad de la infección (Hausen, 1976). Además, este tipo de estudios permite contar con un panorama epidemiológico de la infección, y evaluar los efectos de las actuales vacunas disponibles en México (Chacón et al., 2007), por lo que el objetivo de este estudio fue estimar la prevalencia, distribución de genotipos, e infecciones múltiples de VPH en mujeres sinaloenses que acuden a los centros de salud de Culiacán, Sinaloa, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO Y CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

Estudio científico de carácter descriptivo, transversal, observacional y prospectivo. Se incluyeron todas las mujeres que acudieron al Hospital de la Mujer, UNEME o al Instituto Sinaloense de Cancerología de febrero de 2023 a febrero de 2024 para realizarse la citología vaginal como medida preventiva de CaCu, y que cumplieron con los criterios de selección y firmaron la carta de consentimiento informado. Los criterios de selección fueron los siguientes: Criterios de inclusión, mujeres sinaloense mayores de 18 años, que acudieron a uno de los centros de salud, que aceptaron participar en el estudio y firmaron el consentimiento informado; Criterios de exclusión, mujeres nacidas fuera de Sinaloa, mujeres con histerectomía, y Criterios de eliminación, mujeres con datos incompletos necesarios para el cumplimiento de los objetivos o cantidad y calidad de muestra insuficiente.

Las muestras fueron tomadas mediante un raspado exo- y endo-cervical, con ayuda de un citobrush estéril, se realizó un raspado en el orificio endocervical rotándolo a 360° para posteriormente guardarlo en solución amortiguadora de fosfatos (PBS 1x) con pH de 7.4 para su posterior análisis en el laboratorio.

EXTRACCIÓN DE ADN

Se llevó a cabo utilizando un kit de columna siguiendo las instrucciones del fabricante (Jena Bioscience). La muestra fue utilizada para recuperar las células mediante centrifugación y a la pastilla celular se le adicionaron 300 μ L de solución de lisis y 2 μ L de ARNasa. Se agitó con vórtex durante 30 segundos y se incubó a 60°C durante 5 min. Se añadieron 8 μ L de Proteinasa K (25 mg/mL) y se mezcló por pipeteo. Finalmente se incubó la muestra a 60 °C durante 10 min y se centrifugó a 10,000 x g durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadió 500 μ L de etanol. Posteriormente, se utilizó una columna en tubo de 2 mL y se añadió 100 μ L del amortiguador de activación en la columna. Se centrifugó a 10,000 x g durante 30 s desechando el flujo. Se utilizaron 600 μ L de solución ADN-Binding directamente en la columna y se centrifugó durante 1 min a 10,000 x g. Se añadieron 500 μ L de amortiguador de lavado en la columna y se centrifugó durante 30 s a 10,000 x g (Dairawan y Shetty, 2020). El ADN recuperado fue cuantificado mediante el equipo EPOCH en el Laboratorio 9 "Virus y Cáncer" del Instituto Nacional de Cancerología. Se tomó un 1 μ L de ADN para su

medición a una absorbancia de 260/280nm para verificación de pureza y concentración.

AMPLIFICACIÓN DEL GEN CONSTITUTIVO DE β -GLOBINA HUMANA

Se utilizó el gen de β -globina como control interno de calidad, para verificar la integridad del ADN, por medio de la amplificación de un fragmento del gen que genera un producto de PCR de 280 pares de bases. Se utilizaron los iniciadores: GH20 (5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3') y PC04 (5'CAACTTCATCCACGTTACC3') (Tewari *et al.*, 1996), en una mezcla de reacción con los siguientes reactivos: 6 μ L de amortiguador de reacción 10x; 3 μ L de dNTPs (2 mM), 3.6 μ L de MgCl₂ (1.5 mM), 0.6 μ L de PC04 (10 mM), 0.6 μ L de GH20 (10 mM), 0.2 μ L de TaqGold 1 U. Una vez realizada la mezcla en los microtubos se utilizaron las siguientes condiciones: un ciclo de activación de la enzima Taq Gold a 94 °C durante 7 min, 38 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C durante 30 s, elongación a 72 °C durante 30 s y un último ciclo a 72 °C durante 7 min.

AMPLIFICACIÓN DE GENOMA VIRAL (GP5+ y GP6+)

La amplificación de la región L1 de VPH mediante los primers GP se llevó a cabo para identificar la presencia de VPH mediante PCR. Se realizó una mezcla con los siguientes reactivos: 6 μ L de amortiguador de reacción 10x, 3 μ L de dNTPs, 3 μ L de MgCl₂, 0.6 μ L de GP5+, 0.6 μ L de GP6+ y 0.2 μ L de TaqGold. Las secuencias que se utilizaron fueron las siguientes: GP5+ (5'TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC3') y GP6+ (5'GAAAAATAAACTGTAATCATATTC3') (Sepúlveda *et al.*, 2006). Se utilizaron controles positivos de ADN de células HeLa y para el control negativo agua inyectable sin ADN. Las condiciones utilizadas para la reacción fueron las siguientes: un ciclo de activación de la enzima Taq Gold a 95 °C durante 7 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 35 s, alineamiento a 48 °C durante 35 s, elongación a 72 °C durante 40 s y un último ciclo a 72 °C durante 10 min.

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X, usado en electroforesis en gel de agarosa para separar ácidos nucleicos. Se añadieron a cada pozo 3 μ L del amortiguador de corrida (5X Green Flexi Buffer) según el número de muestras y se añadió 5 μ L de ADN, para nuestros controles positivos se utilizó ADN de células HeLa y

para el control negativo agua inyectable sin ADN. Se programó a un voltaje de 85 voltios durante 35 minutos con un amperaje de 115.

GENOTIPIFICACIÓN DEL VPH

La genotipificación se realizó utilizando el equipo "Ampliquality HPV-TYPE Express v.3.0" el cual identifica 40 genotipos de VPH de bajo y alto riesgo. Se preparó la PCR con 20 μ L de HPV-TYPE Express mix + 5 μ L de ADN, las condiciones fueron las siguientes: Un ciclo de activación de la enzima Taq Gold a 94 °C durante 12 min, 50 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 50 °C durante 30 s, elongación a 72 °C durante 30 s y un último ciclo a 72 °C durante 5 min (Méndez-Martínez *et al.*, 2020).

Para poder visualizar los genotipos se utilizaron las tiras del kit colocándolas en la bandeja del equipo y se añadió a cada tira 20 μ L de DEN solution + 10 μ L del producto de amplificación, se sometieron a un ensayo de hibridación de líneas inversas, las condiciones fueron las siguientes: 1 ciclo con HYB-1 solución a 42 °C durante 60 min, 1 ciclo con COND + solución durante 15 min, 2 ciclos con RIN solution durante 2 min, 1 ciclo con NBT/BCIP solution durante 5 min y un ciclo con STOP solution durante 2 min. Posteriormente con ayuda de una hoja de interpretación incluida en el kit se identificaron los genotipos virales.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez obtenidos los datos, fueron organizados mediante cuadros y gráficas que mejor representaron la información. Para las variables cualitativas, se calcularon frecuencias, porcentajes e intervalos de confianza del 95% (IC95%); mientras que para las variables cuantitativas se estimaron medidas de tendencia central (media, mediana), medidas de posición (percentil 25 o cuartil 1 y percentil 75 o cuartil 3) e IC95%. Para verificar el cumplimiento de los objetivos se utilizó el estadístico de prueba Z (prueba de hipótesis acerca de una proporción poblacional). El coeficiente de concordancia Kappa fue calculado entre pares de genotipos de VPH. La distribución porcentual de VPH por características sociodemográficas fue probada usando el estadístico Ji- cuadrada de Pearson. Un valor p menor de 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron con el software estadístico Stata Intercooled versión 13.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DEL GRUPO DE ESTUDIO

La edad promedio de las mujeres participantes en el presente estudio fue de 41.4 años, estimación que coincide con reportes previos en grupos de estudio similar con una media de 41.1 años (Lozano *et al.*, 2015). Más de la tercera parte (35%) de las participantes previamente tuvieron alguna ITS a lo largo de su vida sexual, aunque usualmente la frecuencia es mayor (80%), las participantes encuestadas desconocen o no recuerdan si tuvieron algún episodio de ITS (Frontanilla *et al.*, 2021). Respecto a la escolaridad, el 30% de las mujeres contaban con el nivel secundaria, seguido de preparatoria (n= 17, 28.3%) (Figura 1). En relación con la ocupación, la mayoría eran ama de casa (n= 38, 63.3%); mientras que el 33.3% refirió ser empleada. Tanto el nivel de escolaridad, como la ocupación son variables importantes pues se relacionan con aspectos sociodemográficos de la población, por lo que a mayor grado de escolaridad y mejores ingresos se espera que haya un mejor manejo y control de infecciones de este tipo (Sendagorta *et al.*, 2019). Otra variable no menos importante es el inicio de vida sexual (Medina *et al.*, 2018). En este estudio se reporta que la edad promedio de nuestras participantes fue a los 18.6 años (IC95%: 17.6-19.6). Dos de las mujeres refirieron haber iniciado su vida sexual a los 14 años; sin embargo, una mujer inició a los 36 años. La mediana del número de parejas sexuales entre las mujeres fue de 2 parejas (percentil 25 = 1 y percentil 75 = 3). El 43.3% (n= 26) refirieron sólo tener una pareja sexual (Figura 1). La edad de la menarca referida fue a la edad de 12.8 años (IC95%: 12.4-13.2) y el número de partos promedio fue de 2.5 hijos (IC95%: 2.2-2.9). Esto refleja un grupo de estudio de mujeres en edad productiva y reproductiva con un nivel de escolaridad de secundaria y preparatoria, y principalmente amas de casa.

Respecto a otras variables analizadas, el 30% (n= 18) refirió tener al menos un aborto. El 55% (n= 33) indicó haber usado el dispositivo intrauterino (DIU) en algún tiempo de su vida. El 21.7% (n= 13) señaló haber usado anticonceptivos orales y el 38.3% (n= 23) dijo haber utilizado condón. El 40% (n= 24) refirió usar jabón íntimo mismo porcentaje que dijo haber usado tampones, de las cuales el 18.3% (n= 11) indicó haber usado tampones y jabón íntimo. Adicionalmente, el 35% (n= 21) indicó haber presentado infección de transmisión sexual (ITS). De las 21 mujeres que presentaron ITS, el 52.4% (n= 11) de sus parejas también desarrollaron esta infección. El 6.7% (n= 4) de las mujeres entrevistadas

manifestaron haber tenido una cirugía urogenital. El 30% (n= 18) manifestó haber tenido quistes y/o tumores. El 21.7% (n= 13) presentó vaginitis bacteriana. La presencia de diabetes fue referida en el 10% (n= 6) de las participantes; sin embargo, ninguna de estas variables se relacionó con la infección por VPH.

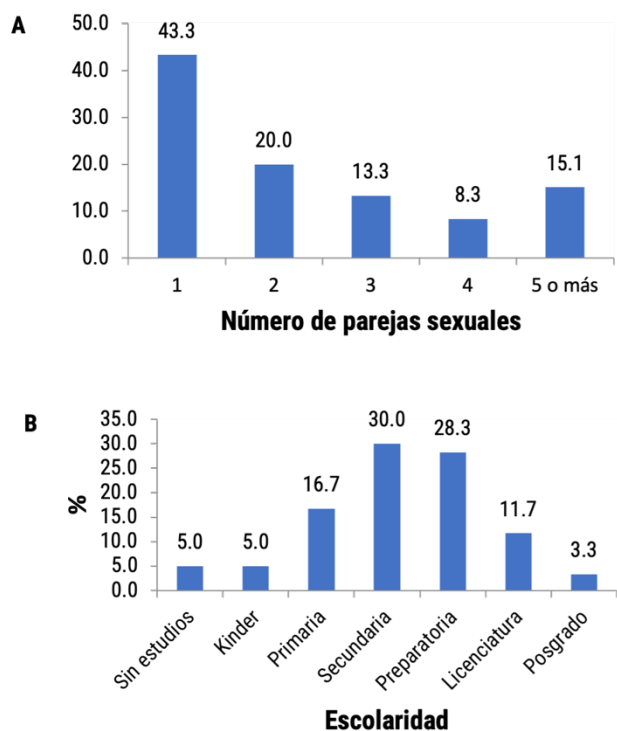


Figura 1. Número de parejas sexuales y grado de escolaridad de las mujeres participantes. A) Distribución porcentual de las participantes según número de parejas sexuales. La mayoría de las mujeres (43.3%) refirieron haber tenido una pareja sexual mientras que el porcentaje más bajo (8.3%) refirieron tener cuatro parejas sexuales. B) El nivel de escolaridad reportado fue de secundaria, que coincide con la media nacional. Seguido por el nivel de preparatoria, la escolaridad con menor porcentaje de frecuencia (3.3%) se obtuvo en mujeres que contaban con posgrado.

IDENTIFICACIÓN DE GENOMA VIRAL

La prevalencia de infección por VPH en este grupo de mujeres fue de 33.3% (n= 20) (Figura 2 y 3). El 23.3% (n= 14) del total de las mujeres refirió contar con la vacuna anti-VPH; sin embargo, el 15% (n= 3) de las mujeres infectadas por VPH refirió estar vacunada, por lo que la evaluación de la eficacia de la vacuna es un tema que debe analizarse con detalle.

La infección por VPH es considerada el agente etiológico de una de las ITS's más comunes en el mundo, tanto en hombres como en mujeres.

Estimaciones del Centro para el Control de Enfermedades de Estados Unidos reportan alrededor de 43 millones de infecciones por VPH (CDC, 2023) alrededor del mundo. Ili *et al.* (2024) realizaron un estudio en Chile relacionado a esta infección cuyo resultado muestra una prevalencia de infección del 36% por VPH (Ili *et al.*, 2024); mientras que en otro estudio realizado en el área metropolitana del Valle de México se estimó una prevalencia de VPH del 9% mediante PCR (Heredía Caballero *et al.*, 2017). Ambas prevalencias distan de la reportada en nuestro estudio (33.3%), lo que confirma la variabilidad de los datos debido, al menos en parte a las distintas poblaciones estudiadas, y en consecuencia es un problema de salud pública que debe ser atendido con el fin de identificar factores de riesgo modificables para disminuir el problema de salud (Chacón *et al.*, 2007). Sin embargo, según reportes de la Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, en México la prevalencia de VPH en mujeres con citología normal se ha estimado de 9.1 al 40.9%, por lo cual nuestros resultados se encuentran dentro del rango estimado y quizá tengan relación con la heterogeneidad de la población mexicana (Juárez González *et al.*, 2020) ya que en previos reportes por nuestro grupo de investigación se ha estimado una prevalencia de infección del 52% entre mujeres sinaloenses con citología vaginal normal de clínicas de Mazatlán (Centro de Salud), Culiacán (IMSS 046) y Guasave (IMSS 032) (Camacho-Ureta *et al.*, 2018).

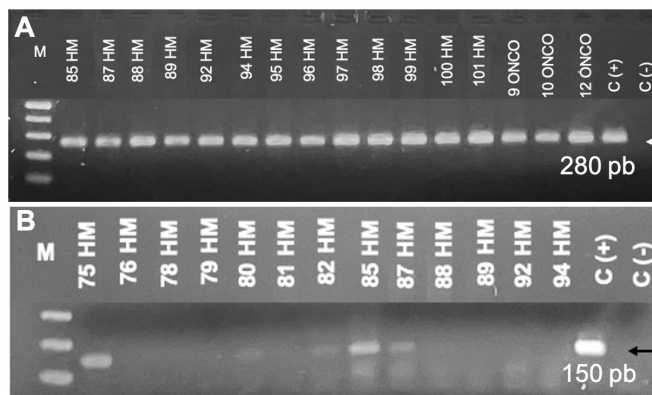


Figura 2. Integridad del ADN e identificación de infección por VPH. A) Electroforesis en geles de agarosa que muestran la amplificación de un fragmento de 280 pb del gen β -globina humana como control interno de reacción. M=marcador de 100 pb, C(+)= Control positivo, y C(-)= Control negativo (agua inyectable sin ADN). B) Electroforesis en agarosa de los productos de PCR de la amplificación de genoma viral mediante oligos GP5+/GP6+. M=marcador de 100 pb, C(+)= Control positivo (ADN de células HeLa), y C(-)= Control negativo (agua inyectable sin ADN).

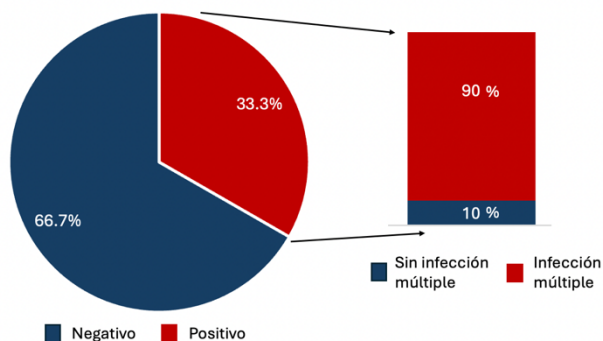


Figura 3. Infección por VPH y distribución porcentual de las participantes con infección múltiple. Se muestra que el 90% de las mujeres positivas a la infección por VPH (33%) tuvieron infección múltiple.

GENOTIPIFICACIÓN DE VPH

La distribución porcentual de los genotipos virales de alto riesgo identificados entre las mujeres participantes se muestra en la tabla 1. Entre los genotipos virales de bajo riesgo, el VPH-11 fue el de mayor prevalencia (30%), seguido por VPH-81 (20%). Para los genotipos clasificados como de probable alto riesgo, los de mayor proporción fueron VPH-66 y VPH-67 en un 25 y 20%, respectivamente. En cuanto a los genotipos de alto riesgo la distribución fue VPH16 (85%) (Cuadro 1), el cual es un genotipo de alto riesgo fue más frecuente en pacientes con edades entre 36 y 55 años (35.9%) junto con los VPH 31, VPH 58, VPH 59 con excepción del VPH 39 que se presentó en pacientes de 18 a 35 años. Con respecto a la escolaridad, el VPH16 fue más frecuente entre las participantes profesionistas (44.4%), y la infección múltiple más común entre este grupo de mujeres fue por genotipos VPH6, VPH66 y VPH70. Para los VPH de bajo y probable alto riesgo fue más frecuente en aquellas mujeres que refirieron tener tres o más parejas sexuales (Tabla 2). En ningún caso la distribución del genotipo de VPH fue asociado con las características sociodemográficas, $p < 0.05$.

De las 60 mujeres sinaloenses, que acudieron al Hospital de la Mujer, UNEME o al Instituto Sinaloense de Cancerología, 20 resultaron positivas a VPH, de las cuales el 90% (n= 18) tuvieron infección múltiple. En previos estudios realizados en la región, se ha reportado una prevalencia de infección por VPH de 57.4% (Benítez-Bueno, 2016) por lo que es común que se presente variación en la frecuencia y distribución de genotipos circulantes a lo largo de distintos períodos de tiempo. El genotipo de alto

riesgo identificado por Benítez-Bueno (2016) fue el VPH-16 concordando con nuestros resultados, y al evaluar las infecciones múltiples de 2 o más genotipos de VPH tuvo un porcentaje de 72.7%, menor al reportado en el presente estudio respecto al porcentaje del 90% de infección múltiple (Benítez-Bueno, 2016). Esto puede deberse a que la prevalencia de virus circulantes durante distintos períodos de tiempo es variable, lo cual representa un reto para la evaluación de la eficacia de los programas actuales de vacunación.

Tabla 1. Distribución porcentual de los genotipos virales de las 20 pacientes VPH-AR positivas.

VPH genotipos	Porcentaje	Intervalo de confianza del 95%	
		Límite inferior	Límite superior
16	85.0	62.1	96.8
18	5.0	0.1	24.9
31	25.0	8.7	49.1
35	5.0	0.1	24.9
39	20.0	5.7	43.7
45	5.0	0.1	24.9
51	10.0	1.2	31.7
52	10.0	1.2	31.7
56	10.0	1.2	31.7
58	30.0	11.9	54.3
59	25.0	8.7	49.1

Es importante destacar que sobre el VPH-90, de riesgo desconocido se identificó mediante la metodología empleada en este estudio una prevalencia del 15% (Cuadro 7). Este genotipo ha sido poco estudiado, por lo que se carece de información y se desconoce el riesgo oncogénico pues es raramente reportado. Quiroga-Garza et al. en el año 2013, calcularon una prevalencia, distribución y asociación de este genotipo a lesiones cervicales o cáncer en mujeres. El 4% (n= 32) de su población que acudieron a su atención las cuales iban referidas con una citología

Tabla 2. Distribución de infección por VPH-AR y variables sociodemográficas.

Característica	Genotipo de VPH/Casos (%)					
	16	31	39	58	59	
Edad	18 – 35	3 (18.8)	1 (6.3)	2 (12.5)	1 (6.3)	1 (6.3)
	36 – 55	14 (35.9)	4 (10.3)	2 (5.1)	5 (12.8)	4 (10.3)
	56 - más	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Escolaridad	Sin estudios	2 (33.3)	1 (16.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (16.7)
	Primaria	2 (20.0)	0 (0.0)	1 (10.0)	1 (10.0)	1 (10.0)
	Secundaria	5 (27.8)	2 (11.1)	1 (5.6)	2 (11.1)	1 (5.6)
	Preparatoria	4 (23.5)	1 (5.9)	1 (5.9)	1 (5.9)	0 (0.0)
	Profesional	4 (44.4)	1 (11.1)	1 (11.1)	2 (22.2)	2 (22.2)
Ocupación	Empleada	6 (28.6)	3 (14.3)	1 (4.8)	3 (14.3)	2 (9.5)
	Ama de casa	11 (28.2)	2 (5.1)	3 (7.7)	3 (7.7)	3 (7.7)
Número de parejas sexuales	1	6 (23.1)	3 (11.5)	1 (3.8)	2 (7.7)	3 (11.5)
	2	1 (8.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
	3	10 (45.5)	2 (9.1)	3 (13.6)	4 (18.2)	2 (9.1)
Total	17 (28.3)	5 (8.3)	4 (6.7)	6 (10.0)	5 (8.3)	

no contaba con este genotipo y la mujer restante tenía infección múltiple con un portador del genotipo VPH-90. El 100% tenían infección múltiple. Estos autores, también mencionan que este genotipo se ha encontrado en mujeres latinas y llegan a la conclusión que este genotipo no produce alguna lesión estando solo; sin embargo, al estar presente con otros genotipos puede incrementar el riesgo de complicaciones (Quiroga-Garza *et al.*, 2013).

Lozano *et al.* (2015) realizaron un análisis de las coinfecciones por VPH, las muestras fueron recolectadas del 2008 al 2011, y se determinó que el 31.6% presentaron coinfección del total de las citologías positivas para VPH con lesiones de bajo y alto grado, así como lesiones con significado incierto e inflamación (Lozano *et al.*, 2015); estos resultados no se asemejan a los de este estudio donde el 90% de las muestras positivas a VPH tuvieron infección múltiple, por otro lado Deluca *et al.* (2004) reportaron un 14.7% de infecciones múltiples en sus muestras positivas (Deluca *et al.*, 2004) por ende podemos deducir que estos estudios no coinciden en los porcentajes de infecciones múltiples (Chacón *et al.*, 2007). En resumen, es necesario llevar a cabo más estudios sobre este padecimiento y determinar el por qué se tiene tanta variabilidad en las proporciones de este problema de salud pública.

ANÁLISIS DE CONCORDANCIA DE GENOTIPOS DE VPH

Con el propósito de determinar si la presencia de algún genotipo del VPH involucra la presencia de un segundo genotipo, se calculó el coeficiente de concordancia de Kappa, además, se estimaron los porcentajes de concordancia y el valor *p* para evidenciar si la concordancia es estadísticamente significativa. Para este análisis se consideró a las 60 mujeres participantes, se evidenció que el genotipo VPH16 tiene una concordancia, estadísticamente significativa, con los genotipos VPH31 (concordancia del 80%, Kappa de 0.3739 y *p*=0.0001), VPH39 (concordancia del 78.3%, Kappa=0.3060 y *p*=0.0005), VPH52 (concordancia del 75.0%, Kappa=0.1604 y *p*=0.0111), VPH58 (concordancia del 81.8%, Kappa=0.4388 y *p*=0.0000) y VPH59 (concordancia del 76.7%, Kappa=0.2696 y *p*=0.0037). Cabe mencionar que aun cuando el porcentaje de concordancia es mayor del 80%, se refleja una probabilidad estadística, sin que necesariamente sea estadísticamente significativa, como se observa con la infección múltiple entre los genotipos VPH31 y VPH45. De la misma manera se puede observar con el resto de los genotipos de alto riesgo, probable alto riesgo y bajo riesgo (Tabla 3).

CONCLUSIONES

Se reporta una prevalencia de la infección por VPH en el 33.3% de las mujeres sinaloenses, que acudieron al Hospital de la Mujer, UNEME DEDICAM o al Instituto Sinaloense de Cancerología, de las cuales el 90% tuvieron infección múltiple.

Los genotipos de bajo riesgo identificados en la población de estudio fueron VPH-11 (30%) y VPH-81 (20%); mientras que los genotipos clasificados como probable alto riesgo fueron VPH-66 y VPH67 (25 y 20%, respectivamente). El principal genotipo de alto riesgo fue VPH-16 (85%).

El genotipo VPH 16 tuvo concordancia estadísticamente significativa con los genotipos VPH 31, VPH 39, VPH 52, VPH 58 y VPH 59. Para futuras investigaciones se puede investigar si existe alguna relación entre estos genotipos y si presentan algún factor para la progresión de las lesiones del cuello uterino.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a las voluntarias participantes en el estudio, así como a las facilidades otorgadas para realizar el muestreo al Dr. José Arturo Figueroa Camacho, director del Hospital de la Mujer, y al Dr. Joel Murillo Llanes. El proyecto se realizó con fondos institucionales PROFAPI-UAS (2022/A-033), y fondos de la empresa Análisis Delia Barraza y Asociados, con quien se cuenta con convenio de colaboración.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores no tienen conflicto de intereses que declarar.

APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio se realizó atendiendo los lineamientos de la Ley General de Salud 2003 en materia de investigación tomando en cuenta los siguientes artículos: ARTÍCULO 13.- En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar y confidencialidad de los datos personales y ARTÍCULO 14.- La Investigación que se realice en seres humanos deberá desarrollarse conforme a las siguientes bases: Deberá adaptarse a los principios científicos y éticos que justifican la investigación médica, especialmente en lo que se refiere a su posible

Tabla 3. Estimación del porcentaje de concordancia, coeficiente de concordancia Kappa y valor p entre genotipos de VPH de alto riesgo. Porcentaje de concordancia

Coeficiente Kappa (valor p).

	VPH18	VPH31	VPH35	VPH39	VPH45	VPH51	VPH52	VPH58	VPH59
	70.0	80.0	70.0	78.3	73.3	71.7	75.0	81.7	76.7
VPH16	-0.0325 (0.7370)	0.3739 (0.0001)	-0.0325 (0.7370)	0.3060 (0.0005)	0.0822 (0.0544)	0.0485 (0.2446)	0.1604 (0.0111)	0.4388 (0.0000)	0.2696 (0.0037)
VPH18		90.0 -0.0286 (0.6195)	100.0 1.000 (0.0000)	91.7 -0.0274 (0.6062)	96.7 -0.0169 (0.5522)	95.0 -0.0227 (0.5743)	95.0 -0.0227 (0.5743)	88.3 -0.0294 (0.6316)	93.3 0.3143 (0.0004)
VPH31			90.0 -0.0286 (0.6195)	85.0 -0.0800 (0.7337)	90.0 -0.0286 (0.6195)	88.3 -0.0500 (0.6677)	88.3 -0.0500 (0.6677)	83.3 0.3000 (0.0098)	93.3 0.5636 (0.0000)
VPH35				91.7 -0.0274 (0.6062)	96.7 -0.0169 (0.5522)	95.0 -0.0227 (0.5743)	95.0 -0.0227 (0.5743)	88.3 -0.0294 (0.6316)	93.3 0.3143 (0.0004)
VPH39					95.0 0.3836 (0.0001)	93.3 0.3023 (0.0062)	96.7 0.6512 (0.0000)	90.0 0.3478 (0.0029)	85.0 -0.0800 (0.7337)
VPH45						95.0 -0.0227 (0.5743)	95.0 -0.0227 (0.5743)	91.7 0.2647 (0.0012)	90.0 -0.0286 (0.6195)
VPH51							93.3 -0.0345 (0.6053)	86.7 -0.0526 (0.6842)	88.3 -0.0500 (0.6677)
VPH52								90.0 0.2105 (0.0276)	88.3 -0.0500 (0.6677)
VPH58									88.3 0.3000 (0.0098)

Estadísticamente significativo al 5%

contribución a la solución de problemas de salud y al desarrollo de nuevos campos de la ciencia médica.

APROBACIÓN DE COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y DE ÉTICA

Este proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Ética e Investigación del Hospital de la Mujer.

REFERENCIAS

- Alfaro Castro, A. & Fournier Pérez, M. (2013). Virus del papiloma humano. *Revista Medica de Costa Rica y Centroamerica* LXX, 211-217. <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/606/art3.pdf>
- Beltrán Lissabet, J.F. (2014). Aspectos generales sobre la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus del Papiloma Humano. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 45, 108-118. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181231236005>.
- Benítez-Bueno, C. S. (2016). Detección molecular de virus del papiloma humano en mujeres con citología vaginal normal (2015). Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Camacho-Ureta, E.A., Méndez-Martínez, R.S., Vázquez-Vega, S., Martínez, U.O., Arenas, R.S., Castillo-Ureta, H., Ramírez, I.O., Torres Montoya, E.H., López Moreno, H.S., García-Carranca, A. & Rendón-Maldonado, J.G. (2018). High frequency of HPV16 European variant E350G among Mexican women from Sinaloa. *Indian Journal Medical Research* 148,323-328. doi [10.4103/ijmr.IJMR_61_17](https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_61_17)
- Centro Para el Control de Enfermedades. (2023). Retrieved from Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. ([https://www.cdc.gov/std/spanish/vph/stdfact-hpv-s.htm#:~:text=El%20VPH%20\(e%20virus\)%3A,momento%20si%20no%20se%20vacunan](https://www.cdc.gov/std/spanish/vph/stdfact-hpv-s.htm#:~:text=El%20VPH%20(e%20virus)%3A,momento%20si%20no%20se%20vacunan)).
- Chacón, J., Sanz, I., Rubio, M.D., De la Morena, M.L., Díaz, E., Mateos, M.L. & Baquero, F. (2007). Detección y genotipado del virus del papiloma humano de alto riesgo en muestras de lesiones cervicales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 25, 311-316. <https://doi.org/10.1157/13102266>
- De Larrea, G.Z.L., Molina, F.M., Ferreyra, C.F.S., Morales, J.Á., Rivas, M.L., Lara, M.R. & Malagón, G.V. (2012). Cáncer cérvicouterino y virus del papiloma humano. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología* 77, 315-321. <https://doi.org/10.4067/s0717-75262012000400014>
- Deluca, G.D., Lucero, R.H., De Civetta, M.T.M., Vicente, L., De Gorodner, O.L., Schelover, E. & Alonso, J.M. (2004). Human papillomavirus genotypes in women with cervical cytological abnormalities from an area with high incidence of cervical cancer. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46, 9-12. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652004000100002>
- Frontanilla, T., Cáceres, R., Samaniego, R., Ortíz, X. & Henning, R. (2021). Prevalence of sexual infections diagnosed by molecular biology methods in a paraguayan population sample. *Revista de Salud Publica del Paraguay* 11, 30-34. <https://doi.org/10.18004/rspp.2021>. accedido 30 de diciembre 2021.
- Hausen, H. Z. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Research*, 36 (2pt2), 294. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/175942/>
- Heredia-Caballero, A., Palacios-López, G., Castillo-Hernández, M., Hernández-Bueno, A. & Medina-Arizmendi, F. (2021). Prevalence and typing of human papilloma virus genotypes in women of the Metropolitan Area of the Valley of Mexico. *Ginecología y Obstetricia de México* 85, 809-818. <https://doi.org/10.24245/gom.v85i12.1537>
- Ili, C., López, J., Reyes, M.E., Viscarra, T., Buchegger, K., Zanella, L., Aguayo, F. & Brebi, P. (2024). Detección e integración del virus del papiloma humano de alto riesgo en lesiones pre-neoplásicas en mujeres del sur de Chile: un estudio transversal. *Revista Chilena de Infectología* 41, 27-35. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182024000100027>
- Lozano, T.G., García, E.G., Monsalve, J.G., Ballester, C.I., Oroval, E.A., Gadea, M.S.J., Gallego, M.N. & Medina, S.A. (2015). Análisis de las coinfecciones mixtas por el virus del papiloma humano (VPH) de alto y bajo riesgo en lesiones de significado incierto. *Clínica e Investigación en Ginecología y*

- Obstetricia 42, 24. <https://doi.org/10.1016/j.gine.2013.10.008>
- Medina, M.L., Medina, M.G. & Merino, L.A. (2018). Principales conductas de riesgo sobre papilomavirus humano en universitarios argentinos. *Avances en Odontostomatología* 34,311-319. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852018000600005
- Méndez-Martínez, R., Maldonado-Frías, S., Vázquez-Vega, S., Caro-Vega, Y., Rendón-Maldonado, J.G., Guido-Jiménez, M., Crabtree-Ramírez, B., Sierra-Madero, J.G. & García-Carrancá, A. (2020). High prevalent human papillomavirus infections of the oral cavity of asymptomatic HIV-positive men. *BMC Infectious Diseases* 20. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4677-9>
- Ochoa-Carrillo, F. J. (2014). Virus del papiloma humano. Desde su descubrimiento hasta el desarrollo de una vacuna. Parte I/III. Elsevier. *Gaceta Mexicana de Oncología* 13, 308-315. <https://biblat.unam.mx/hevila/Gacetamexicanadeoncologia/2014/vol13/no5/7.pdf>
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2023). Infecciones de Transmisión Sexual. [https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis))
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2024). Papilomavirus humano y cáncer. [https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/human-papilloma-virus-and-cancer#:~:text=Magnitud%20del%20problema&text=A%20nivel%20mundial%2C%20en%202019,c%3A1nc%20en%20hombres%20\(1\).](https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/human-papilloma-virus-and-cancer#:~:text=Magnitud%20del%20problema&text=A%20nivel%20mundial%2C%20en%202019,c%3A1nc%20en%20hombres%20(1).)
- 18- Quiroga-Garza, G., Zhou, H., Mody, D.R., Schwartz, M.R. & Ge, Y. (2013). Unexpected High Prevalence of HPV 90 Infection in an Underserved Population: Is It Really a Low-Risk Genotype? *Archives Of Pathology & Laboratory Medicine* 137, 1569-1573. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0640-0a>
- Sendagorta-Cudós, E., Burgos-Cibrián, J. & Rodríguez-Iglesias, M. (2019). Infecciones genitales por el virus del papiloma humano. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 37,324-334. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.01.010>
- Sepúlveda-Arias, J.C., Henao Bonilla, J., Mantilla Muriel, L.E., Porras Hurtado, G.L. & Angarita Beltrán, L. (1988). Detección del virus del papiloma humano (VPH) en pacientes con citología anormal: un estudio preliminar. *Revista Médica de Risaralda* 12, 14-21. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5030451>
- Shetty, P.J. (2020). The Evolution of DNA Extraction Methods. *American Journal Of Biomedical Science & Research* 8, 39-45. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2020.08.001234>
- Tewari, R., Gillemans, N., Harper, A., Wijgerde, M., Zafarana, G., Drabek, D., Grosveld, F. & Philipsen, S. (1996). The human β -globin locus control region confers an early embryonic erythroid-specific expression pattern to a basic promoter driving the bacterial lacZ gene. *Development* 122, 3991-3999. <https://doi.org/10.1242/dev.122.12.3991>

Biorrefinería energética a partir de semilla residual de aguacate (*Persea americana* cv. "Hass")

Energetic biorefinery from waste avocado seed (*Persea americana* cv. "Hass")

Peraza-Regalado, K.A.^{1‡}, Valdez-Ontiveros, J.E.^{1‡}, Juárez-Cota, M.F.², Ambriz-Pérez, D.L.^{1,2,3}, Santos-Ballardo, D.U.^{2,4*}

¹Ingeniería en Energía, Universidad Politécnica de Sinaloa, Carr. Municipal Libre Mazatlán Higuera Km 3 Genaro Estrada, 82199. Mazatlán, Sinaloa. ²Maestría en Ciencias Aplicadas, Universidad Politécnica de Sinaloa, Carr. Municipal Libre Mazatlán Higuera Km 3 Genaro Estrada, 82199 Mazatlán, Sinaloa. ³Estancias posdoctorales por México, 2022. CONAHCYT. ⁴Laboratorio de ecotoxicología, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán., Av. Sábalo Cerritos S/N, 82112. Mazatlán, Sinaloa.

RESUMEN

En México, el 90.2 % de la energía proviene de combustibles fósiles. El aguacate Hass "*Persea americana*" es un producto con una gran importancia comercial, sin embargo, su procesamiento se asocia a la generación de residuos que usualmente no se manejan de manera adecuada, es importante que este tipo de subproductos se revalorice para disminuir la huella ambiental de la industria, al mismo tiempo que se obtengan productos de valor agregado. En el presente trabajo se realizó la caracterización de la semilla residual de aguacate, analizando su contenido de humedad, sólidos totales, volátiles y fijos, contenido de cenizas, además se realizó extracción de aceite y se analizó su perfil de ácidos grasos. La semilla presentó 52.82 % de humedad, 95.68 % de sólidos totales y 97.78 % de sólidos volátiles, lo que sugiere buen potencial para la transformación de biocombustibles. La extracción de aceite de semilla con solventes mostró un rendimiento de 3.6 %. Con un perfil de ácidos grasos que sugiere que podría utilizarse para la producción de biodiésel con buena calidad. Mientras que, el mejor potencial metanogénico de la semilla desgrasada mostró una producción total acumulada de 178.94 ± 4.90 mililitros de metano por gramo de sólido volátil (mL CH₄/gSV). Además, el digestato generado de la digestión anaeróbica de la semilla desgrasada con el inóculo Be-Gaia mostró un buen potencial como biofertilizante, manteniendo resultados similares a utilizar un fertilizante comercial. Los resultados del presente trabajo sugieren que a partir de este material es posible generar rutas de proceso para una biorrefinería energética que aproveche la semilla de aguacate *Persea americana* "Hass".

PALABRAS CLAVE: Biorrefinería, Biocombustibles, Biofertilizante, Semilla de aguacate

ABSTRACT

In Mexico, almost 90.2 % of the energy comes from fossil fuels. The avocado Hass "*Persea americana*" is a product of great commercial importance; however, its processing is associated with waste generation, which usually is not managed properly. It is important that this type of by-product could be re-valORIZED to reduce the environmental footprint of this industry while value-added products are obtained. In the present work, the characterization of the residual defatted avocado seed was carried out, analyzing its moisture content, total, volatile, and fixed solids, ash content, and oil extraction was also carried out, and the fatty acid profile was analyzed. The seed presented 52.82 % humidity, 95.68 % total solids, and 97.78 % volatile solids, which suggests good potential for biofuel transformation. Seed oil extraction with solvents showed a yield of 3.6 %, with a fatty acid profile that indicates that it could be used for good-quality biodiesel production. On the other hand, the best methanogenic potential of the defatted seed showed a total accumulated production of 178.94 ± 4.90 milliliters of methane per gram of volatile solid (mL CH₄/gVS). Furthermore, the digestate generated from the anaerobic digestion of the defatted seed with the Be-Gaia inoculum showed good potential as a biofertilizer, maintaining results similar to commercial fertilizer. This work's results suggest that it is possible to generate process routes for an energy biorefinery that takes advantage of the *Persea americana* "Hass" avocado residual seed from this material.

KEYWORDS: Biorefinery, Biofuels, Biofertilizer, Avocado seeds

*Autor de correspondencia: Ulises Santos Ballardo

Email: ulises.ballardo@ciad.mx; ORCID ID: [0000-0001-5058-8621](https://orcid.org/0000-0001-5058-8621)

‡Estos autores tuvieron el mismo nivel de participación en el presente trabajo.

Registro ORCID Autores: PR: [0009-0006-8845-5529](https://orcid.org/0009-0006-8845-5529); VO: [0009-0009-8091-5300](https://orcid.org/0009-0009-8091-5300); JC: [0009-0001-5835-5934](https://orcid.org/0009-0001-5835-5934);

AP: [0000-0001-5722-891X](https://orcid.org/0000-0001-5722-891X);

Revista online: <https://revistas.uas.edu.mx/index.php/QBU/index>

Enviado: Julio 2024

Aceptado: Septiembre 2024

INTRODUCCIÓN

En la constante búsqueda de alternativas sostenibles y respetuosas con el medio ambiente para satisfacer nuestras crecientes necesidades energéticas, el desarrollo de fuentes de energía renovables ha pasado a ser una prioridad global. Durante décadas, la principal fuente de energía de la humanidad ha mostrado una evidente dependencia de los combustibles fósiles, comprendiendo el 80 % de la demanda actual de energía primaria a nivel mundial; esto se relaciona directamente con casi dos tercios de las emisiones globales de dióxido de carbono (Foster & Elzinga, 2016; Gómez *et al.*, 2016).

En México, el consumo de energía a partir de combustibles fósiles asciende al 90.2 % y se ha reportado que su explotación desmedida ha tenido un impacto relevante en el cambio climático y la degradación del medio ambiente (Reuters, 2015).

En respuesta a la problemática de los combustibles fósiles, los biocombustibles se presentan como una alternativa con buen potencial, ya que ofrecen la posibilidad de reducir la dependencia de los carburantes fósiles y, al mismo tiempo, contribuir a la mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero. Estos productos, elaborados a partir de materias primas renovables, se considera que pueden jugar un papel fundamental en la transición hacia un sistema energético más limpio y sostenible (Orrego-Alzate & Cardona-Alzate, 2020).

Por otro lado, en México la capacidad instalada para generar energía a partir de la biomasa es de alrededor de 640 Mega Watts (MW) con una capacidad de generación de 1,400 GigaWatts-hora (GWh). Se ha reportado que la producción de bioenergía está presente en 21 estados, siendo Veracruz el líder con 264 MW de capacidad instalada. El recurso principal utilizado es el bagazo, residuos agrícolas y desechos orgánicos de origen vegetal o animal (SENER, 2023).

Por otro lado, en el caso específico de México, que se considera un país con una gran diversidad de recursos naturales y una relevante producción agrícola, donde destacan productos como el aguacate "Hass" (*Persea americana* "Hass"), el cual además de ser un fruto valorado a nivel mundial, presenta un potencial inexplorado como fuente de biocombustibles. Además, México es uno de los principales productores y exportadores de aguacate a nivel mundial, se ha reportado que el cultivo del aguacate "Hass" ha crecido notablemente en los últimos años. Su producción alcanzó los 2.4 millones de toneladas para el año de 2020 en

México, representando el 43 % de la producción mundial (Cruz-López *et al.*, 2022; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2022).

De la producción total de aguacate, una parte se exporta, y la otra se queda en el país para su consumo y procesamiento. El sector productivo de aguacate genera una gran cantidad de residuos derivados de la obtención de productos como guacamole, conservas, pastas, etc.; dichos residuos cuentan con un alto contenido de materia orgánica que tiene potencial de transformarse en productos de valor agregado (ya sea para la producción de energía térmica u obtención de biocombustibles). El principal residuo de esta industria es la semilla de aguacate, que podría convertirse en fuente de compuestos bioactivos y/o biocombustibles, aunque su potencial para generación de biorrefinerías no se ha estudiado a fondo (García-Vallejo *et al.*, 2023; Sandoval-Contreras *et al.*, 2023).

Perea-Moreno *et al.* (2016) analizaron varios parámetros de este subproducto, tales como humedad (35.2 %), poder calorífico superior o PCS (19.145 MJ/kg), poder calorífico inferior o PCI (17.889 MJ/kg), y la composición elemental (48.01 % de carbono, 5.76 % de hidrógeno, 0.45 % de nitrógeno), contenido de cenizas (2.86 %) y contenido de aceite (1.72 %). Se estableció una correlación entre el análisis elemental y los valores más altos de calentamiento (PCS) de la semilla de aguacate, lo que indica que este material tiene potencial como fuente de biocombustible.

Por otro lado, García-Vallejo *et al.* (2023) analizaron el potencial uso de residuos de aguacate para obtención de compuestos antioxidantes y biogás, reportando la recuperación de compuestos fenólicos (como catequinas y epicatequinas) usando extracciones con ácido acético y se reportó también una producción de 234 nanómetros cúbicos de metano por kilogramo de sólido volátil (nm³/kg SV), concluyendo que dicho material presenta un interesante potencial como fuente de antioxidantes y biogás.

Si bien se ha reportado la potencial versatilidad de esta semilla como material para diversos usos, tales como productos cosméticos y alimenticios, solo se han esbozado algunos intentos de aprovechar la semilla residual de aguacate como fuente energética, además de que en la actualidad hay muy pocos reportes del aprovechamiento integral de la biomasa mediante esquemas de biorrefinerías (García-Vallejo *et al.*, 2023; Sandoval-Contreras *et al.*, 2023). Por lo que, en el presente trabajo, se exploró el potencial de la semilla residual de aguacate "Hass" como fuente de una biorrefinería energética para la obtención en cadena de

biodiésel y biogás (a partir de la biomasa desgrasada). Además, se analizó el potencial de los digestatos resultantes del proceso de digestión para la producción de biofertilizante. Este enfoque podría representar una parte de una solución prometedora para reducir la dependencia de los combustibles fósiles y, al mismo tiempo, contribuir a la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero, así como a la disminución de residuos sólidos agroindustriales, avanzando hacia un futuro energético sostenible y respetuoso con el medio ambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

La biomasa residual de semilla de aguacate *Persea americana* "Hass" fue recolectada de tquerías locales de la ciudad de Mazatlán, Sinaloa.

Por otro lado, los inóculos utilizados en las pruebas de potencial metanogénico fueron lodos activados proporcionados por las empresas locales Be-Gaia® y Tostaditas Blancas®, estos fueron denominados como LB y LT, respectivamente.

CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA DE AGUACATE E INÓCULOS (SÓLIDOS TOTALES Y VOLÁTILES, HUMEDAD Y CENIZAS)

Los contenidos de humedad (H), sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV) y sólidos fijos o cenizas (SF) se evaluaron según lo reportado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) (EPA, 2001). Para la determinación de humedad, se realizó una prueba por triplicado empleando semillas de aguacate de un peso aproximado de 29.5 g. Se pesaron los platos (W_{platos}) y las muestras (W_{muestra}) y se ingresaron a un horno de secado por convección (Novatech® HS35-ED) a 70°C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se tomó el peso total seco del recipiente con la muestra y se comparó con el peso total inicial que se tenía para obtener el porcentaje de humedad de la semilla completa. Para el cálculo de ST, se calentaron los platos de evaporación (crisoles) a 103-105°C por 15 minutos en un horno de secado (Novatech® HS35-ED) para la eliminación de humedad. Se dejaron enfriar en un desecador y se tomó su peso (W_{crisol}). Posteriormente, se colocaron 5 g de la muestra y se registró su peso (W_{muestra}), finalmente se secaron las muestras a 103-105°C por 24 h. Se dejaron enfriar en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente (25°C) y se registró el peso (W_{total}). Las pruebas se realizaron por triplicado y el resultado se presentó como porcentaje promedio \pm desviación estándar. Para el caso de la caracterización de

los lodos activados de Be-Gaia (LB) y los lodos activados de Tostaditas Blancas (LT) se realizó el mismo proceso, pero con muestras de 6 g. Para el cálculo de porcentaje de sólidos totales se empleó la ecuación 1 (EPA, 2001).

$$(1) \text{ ST (\%)} = \frac{W_{\text{total}} - W_{\text{crisol}}}{W_{\text{muestra}} - W_{\text{crisol}}} * 100$$

Donde: ST (%) = porcentaje de sólidos totales; W_{total} = Peso de crisol + muestra; W_{crisol} = Peso de crisol; W_{muestra} = Peso de muestra.

Para la determinación de SV y SF, los crisoles con las muestras secas se calcinaron utilizando una mufla a 550°C durante 6 horas, posteriormente el residuo fue pesado ($W_{\text{volátil}}$). Los SV y SF se calcularon por triplicado y se presentan como porcentajes promedios \pm desviación estándar, empleando las ecuaciones 2 y 3 para su cálculo (EPA, 2001).

$$(2) \text{ SV (\%)} = \frac{W_{\text{total}} - W_{\text{volátil}}}{W_{\text{total}} - W_{\text{crisol}}} * 100$$

Donde: SV (%) = porcentaje de sólidos volátiles; W_{total} = Peso de crisol + muestra; W_{crisol} = Peso de crisol; $W_{\text{volátil}}$ = Peso de muestra después del proceso de calcinación.

$$(3) \text{ SF (\%)} = \frac{W_{\text{volátil}} - W_{\text{crisol}}}{W_{\text{total}} - W_{\text{crisol}}} * 100$$

Donde: SF (%) = porcentaje de sólidos fijos; W_{total} = Peso de crisol + muestra; W_{crisol} = Peso de crisol; $W_{\text{volátil}}$ = Peso de muestra después del proceso de calcinación.

PREPARACIÓN DE LA SEMILLA DE AGUACATE

Las semillas fueron preparadas mediante un secado en un horno de convección (Novatech® HS35-ED) a 70°C durante 48 horas con la finalidad de retirar la humedad. Posteriormente, se trituró y molió la semilla hasta obtenerse una harina fina con el objetivo de contar con mayor superficie de contacto con el disolvente y alcanzar la mejor extracción de aceite posible. Con la harina de aguacate se prepararon 3 muestras de aproximadamente 63 g cada una, envueltas en papel filtro de celulosa para su ingreso al equipo de extracción soxhlet.

EXTRACCIÓN DE ACEITE DE LA SEMILLA DE AGUACATE

Se realizó la extracción de aceite mediante la técnica soxhlet utilizando la metodología propuesta por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC). En la figura 1 se muestra el montaje de los equipos soxhlet utilizados para el proceso de extracción. Se empleó como

solvente una mezcla de metanol:cloroformo (2:1). La prueba se realizó por triplicado y el resultado se representó como porcentaje promedio de aceite extraído (\pm desviación estándar). Posteriormente, el producto se colocó en un rotavapor a 60°C para la separación de la mezcla de solventes (AOAC, 1999). El porcentaje de aceite extraído se calculó por la diferencia de peso mediante la ecuación 4.

$$(4) \text{ Aceite (\%)} = \frac{(\text{Matraz} + \text{Aceite}) - \text{Matraz}}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

Finalmente, la biomasa residual de semilla desgrasada de aguacate se secó a 60°C durante 24 horas para eliminar el exceso de solventes y se almacenó ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) para su posterior uso.

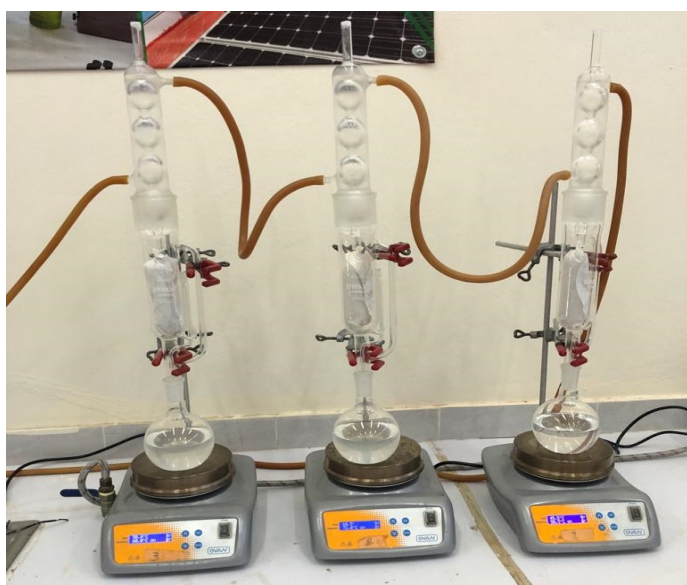


Figura 1. Equipos de extracción Soxhlet. *Elaboración propia*

DETERMINACIÓN DE POTENCIAL METANOGÉNICO DE LA SEMILLA DESGRASADA DE AGUACATE

Se llevaron a cabo pruebas de determinación del potencial metanogénico mediante procesos por lotes haciendo uso de dos inóculos distintos. Además, se utilizaron dos sustratos: (1) harina de semilla de aguacate completa (esto como control y comparativo de la posible producción de biogás a partir de la semilla completa), y (2) harina obtenida a partir de residuos de semilla de aguacate desgrasada, resultante del proceso de extracción de aceite descrito en el punto 2.4. Para el set experimental se utilizaron biorreactores de vidrio con capacidad de 60 mL, los cuales fueron sellados herméticamente haciendo uso de un septum para posteriormente realizar pruebas periódicamente. Para las muestras se

manejó una relación de 2:1 en proporción de inóculo:sustrato, y cada biorreactor se trabajó con un volumen de 45 mL (Armenta-Medel *et al.*, 2023). Los reactores se mantuvieron a una temperatura constante de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ para la digestión anaeróbica, con un tiempo de retención hidráulica de 42 días. Todos los biorreactores fueron homogenizados diariamente mediante agitación manual para asegurar la mezcla adecuada del inóculo con el sustrato (Santos-Ballardo *et al.*, 2015; Velarde-Meza *et al.*, 2023).

El volumen de metano se midió usando un eudiómetro con desplazamiento de NaOH (1N), además se efectuaron mediciones con biorreactores que contenían solamente inóculo (utilizados como blancos) para obtener la producción endógena de estos (para restarlo a la producción de los demás biorreactores que contienen mezcla de sustrato e inóculo para el ajuste de producción de metano) (Santos-Ballardo *et al.*, 2015).

DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

El contenido de ácidos grasos se realizó mediante una extracción, separación, metilación, purificación y una cuantificación por los métodos descritos por Folch *et al.* (1957) y la AOAC (1999). La detección y cuantificación de los ácidos grasos se realizó mediante un cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 7890B equipado con un detector de ionización de flama con una columna capilar de 30 cm x 0.32 mm x 0.24 μm (Omegawax 320) marca Supelco. La temperatura del inyector y detector fue programada a 250°C por 40 minutos, para la separación y cuantificación de los ácidos grasos se empleó una mezcla de 37 ácidos grasos.

PRUEBA DE POTENCIAL DE MEJORADOR DE SUELOS DE LOS DIGESTATOS

Se emplearon 2 charolas de germinación con 338 cavidades cada una, en estas se asignaron 5 segmentos con 65 cavidades respectivamente, dentro de las cuales se introdujeron 2 semillas de maíz junto a un sustrato especial para el cultivo (Turba Terrafertil®). El riego se llevó a cabo con un atomizador de 250 mL tres veces al día; durante la mañana, en la tarde cuando no había radiación solar directa y durante la noche.

Transcurridos seis días de cultivo, todas las cavidades habían germinado y alcanzado una considerable altura para el inicio del experimento. Para la prueba con el digestato se empleó una jeringa de 3 mL para agregar alrededor de 1.5 mL de digestato obtenido de la producción de biogás contando con 2 muestras: (1) desgrasada Tostaditas Blancas (digestato

obtenido de la digestión anaeróbica de semilla de aguacate desgrasada con LT) y (2) desgrasado Be-Gaia (digestato obtenido de la digestión anaeróbica de aguacate desgrasada con LB). Además de estos, se incluyó en el ensayo un fertilizante comercial (Agrolita®) como control positivo. El último segmento se dejó crecer sin ningún mejorador de suelo, mismo que se usó como control negativo.

Una vez añadidos los digestatos y fertilizante, se realizaron mediciones de altura cada tres días empleando 10 cultivos al azar para obtener una estimación del promedio de altura de la sección. Posteriormente, avanzada una semana, se realizaron pruebas comparativas como complemento del análisis.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados para la caracterización de la semilla de aguacate, las pruebas de potencial metanogénico y las pruebas de potencial de biofertilizante se expresaron como promedio con desviación estándar ($n=3$, $n=3$ y $n=10$, respectivamente). Para analizar diferencias significativas se realizaron pruebas ANOVA y comparación de medias por la prueba de Fisher (LSD, $\alpha=0.05$). Utilizando el software estadístico Minitab® 18.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA DE AGUACATE

La cantidad de ST, SV y SF obtenidos por la metodología propuesta se muestran en la tabla 1 (AOAC, 1999). El contenido de humedad de la semilla de aguacate completa fue de $52.82 \pm 0.030\%$, cifra cercana a la obtenida en un estudio previo de caracterización de este tipo de materiales, donde el porcentaje de humedad para la semilla de aguacate fue de $44.4 \pm 1.9\%$ (di Bitonto *et al.*, s.f.).

En cuanto a los ST, se observó una variación importante (con diferencia estadística significativa), el valor bajo observado en la semilla desgrasada puede estar relacionado con que esas muestras se sometieron a un proceso de secado previo. En cuanto a SV, se reportó un valor alto, de aproximadamente 98% para ambos sustratos, esto es importante porque este parámetro está relacionado con la cantidad de materia orgánica que puede ser aprovechable para su transformación y utilización; por lo que valores altos representan mejor potencial metanogénico. Los resultados obtenidos en el presente trabajo son comparables directamente con lo obtenido por Perea-Moreno *et al.*

(2016), donde realizaron la caracterización de semilla de aguacate (*Persea americana* L.) obteniendo resultados de H (35.20%), SF (2.86%), ST (64.8%) y SV (97.14%), concluyendo que este subproducto tiene buen potencial para obtención de bioenergía.

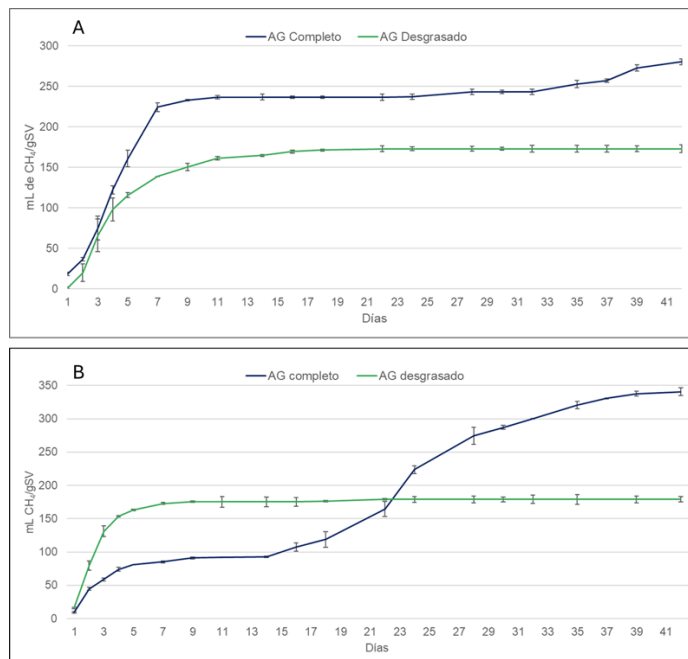


Figura 2. Producción acumulada de metano durante la digestión anaeróbica de semillas de aguacate completas y desgrasadas utilizando dos inóculos anaeróbicos (A: Lodos activados de tostaditas blancas® y B: Lodos activados de Begaia®). Los datos representan el promedio con desviación estándar ($n=3$). mL CH₄/gSV: Mililitros de metano por gramo de sólido volátil añadido al reactor.

En la tabla 1, se comparan los parámetros de caracterización realizados en el presente trabajo para la semilla de aguacate completa y desgrasada, con otras fuentes de biomasa actualmente utilizadas para biocombustibles como la semilla de oliva y la cáscara de almendra reportados por Mata-Sánchez *et al.* (2013) y Gómez *et al.* (2016), respectivamente. Se observa que el porcentaje de humedad de la semilla de aguacate casi triplica a la humedad presentada en la semilla de oliva, y es seis veces mayor a la cáscara de almendra; por otro lado, el porcentaje de sólidos volátiles se encuentra más de 10 por ciento por arriba de las otras dos fuentes. Mientras que el contenido de cenizas respecto a la semilla de oliva difiere un 1.45% y un 1.72% de la cáscara de almendra; la diferencia en el contenido de cenizas con lo reportado para semillas de oliva y cáscara de almendras pudo ser debido a que en los trabajos mencionados se realizó el análisis de cenizas del total de biomasa y en el presente trabajo se calculó a partir de los sólidos totales

presentes. Por otro lado, los resultados obtenidos para contenido de SV indican que los materiales analizados en el presente trabajo tienen buen contenido de materia orgánica para aprovecharse en la generación de productos de interés y resultan competitivos con otros materiales que ya se han probado con los mismos fines.

EXTRACCIÓN DE ACEITE DE LA SEMILLA DE AGUACATE

La obtención de aceite promedio de las tres muestras por el método soxhlet fue de 3.6 ± 0.09 %, valor que pudiera considerarse bajo, sin embargo, debido a la gran cantidad de material disponible pudiera ser aceptable utilizarse con estos fines. Los resultados obtenidos están dentro del rango de reportes previos con este tipo de materiales donde se reportan contenidos de aceite (para diferentes variedades de aguacate) que abarcan un rango de 1.32 a 3.90 % (Abaide *et al.*, 2017; Morais *et al.*, 2017; Flores *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2022), también, son superiores al trabajo de Perea-Moreno *et al.* (2016), donde reportaron contenidos de aceite de semilla de aguacate en el rango de 1.46 y 1.96 %, donde a pesar de los valores aparentemente bajos, se reporta que estos materiales tienen un potencial adecuado para su uso como bioenergéticos.

DETERMINACIÓN DE PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Los resultados del perfil de ácidos grasos se muestran en la Tabla 2. Se observa que el aceite de semilla de aguacate obtenido en el presente trabajo presenta mayores niveles de ácido linoleico (33.08 ± 0.63 %) y oleico (16.77 ± 1.42 %) seguido de Cis-11,14,17-eicosenoico (17.38 ± 2.08 %) y palmítico (11.08 ± 1.31 %); por otro lado, la distribución de los ácidos grasos presentes observada consistió en una mayoría de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) alcanzando aproximadamente 58 %, mientras que los saturados (SFAs) y monoinsaturados (MUFAs), reportaron porcentajes aproximados de 23 y 20 %, respectivamente comparando el contenido de ácidos grasos del aceite de semilla de aguacate con aceite de pulpa de aguacate obtenido por prensado hidráulico, se puede apreciar un perfil similar, siendo los componentes mayoritarios el ácido palmítico, oleico, linoleico y linoléico (Huanca *et al.*, 2023).

En otra investigación, Ge *et al.* (2018) reportaron el perfil de ácidos grasos (AG) de semillas de 16 variedades de aguacate, obteniendo como ácidos grasos mayoritarios al ácido linoleico, palmítico, oleico y palmítoleico (40%, 24%, 16% y 6%, respectivamente). Además, los autores

reportaron que 69 % de los AG totales fueron insaturados mientras que 31 % fueron saturados. Por otro lado, Ge *et al.* (2020) reportaron que los AG que predominaron en el aceite de semilla de aguacate fueron el linoleico, oleico y palmítico, ambos resultados fueron muy similares a los obtenidos en el presente trabajo.

POTENCIAL DEL ACEITE DE SEMILLA DE AGUACATE COMO MATERIA PRIMA PARA BIODIESEL

El biodiesel es un biocombustible alternativo al diesel convencional, con características biodegradables, no es tóxico, presenta lubricidad adecuada para funcionar en motores diesel, un punto de inflamación alto, además, se considera libre de sulfuro y de compuestos aromáticos; este se puede obtener a partir de aceites vegetales y/o grasas animales (Ambriz-Pérez, *et al.*, 2021).

Se ha reportado que las propiedades químicas y físicas del biodiesel pueden determinarse por la composición orgánica de los ácidos grasos que lo forman, las principales propiedades que influyen la calidad del biodiesel son la longitud de cadena de los AG, y el grado de insaturación de dichas cadenas. Muchas de las variaciones de calidad del biodiesel que se obtiene a partir de diferentes materias primas se pueden explicar por estos dos factores. Por ejemplo, un grado de saturación medio de los AG, tiene una correlación muy alta con diferentes propiedades del biocombustible obtenido, destacando el desempeño en frío, la viscosidad, la densidad aparente, la gravedad específica, el número de cetano y el valor de yodo. Por otro lado, al presentarse longitudes largas en las cadenas de AG conducen a disminución en el número de cetano y a una baja estabilidad oxidativa (lo que afecta la vida de anaquel del biodiesel), aunque se mejora el desempeño en frío (Fazal *et al.*, 2011; Santos-Ballardo *et al.*, 2015). A pesar de que existen muchos parámetros de calidad para el biodiesel, la mayoría de los expertos enfoca su atención en dos propiedades consideradas como críticas: la estabilidad oxidativa y el desempeño en frío. Para un desempeño en frío adecuado se recomiendan bajas concentraciones de SFAs de cadena larga. Pero al mismo tiempo para mantener una buena estabilidad oxidativa los aceites para biodiesel deben contener bajas concentraciones de PUFAs y elevadas concentraciones de SFAs y MUFAs; debido a esto, se recomienda de manera general que los aceites que vayan a utilizarse como materia prima para biodiesel, mantengan un perfil de ácidos grasos balanceados, lo que permitirá generar biodiesel con un desempeño adecuado (Kent-Hoekman *et al.*, 2012).

De acuerdo con el perfil de ácidos grasos obtenido en el presente trabajo (22.85 % SFAs, 19.81 % MUFAs y 57.34 % PUFAs), el aceite obtenido a partir de semilla de aguacate presenta un potencial adecuado para emplearse como fuente de biodiesel. Es decir que debido a los porcentajes de ácidos grasos presentes en el aceite de semilla de aguacate, realizar un proceso de transesterificación utilizando este componente podría resultar en un biocombustible con propiedades favorables.

POTENCIAL METANOGÉNICO DE LA SEMILLA DE AGUACATE

Los rendimientos de la producción de acumulada de metano por gramos de sólido volátil acumulada a partir de semilla de aguacate desgrasada (y completa como comparativa) se midieron utilizando dos inóculos diferentes (LB y LT) y se realizaron pruebas de potencial metanogénico por triplicado. La figura 2 muestra la evolución de la producción neta de metano tras 42 días de digestión anaeróbica, donde la producción total acumulada correspondiente al inóculo LT fue de 280.15 ± 3.60 mL CH₄/gSV para la harina de semilla de aguacate completa (AGC), y de 172.80 ± 4.90 mL CH₄/gSV para la harina de semilla desgrasada (AGD). Por otro lado, la producción obtenida de lodos activados Be-Gaia (Tabla 3), alcanzaron una producción acumulada de 340.61 ± 5.80 mL CH₄/gSV para AGC, y un total de 178.94 ± 4.90 mL CH₄/gSV para AGD.

Estos resultados se pueden comparar con el trabajo realizado por Rashama *et al.* (2021), donde se reportó la producción potencial de metano de semillas de aguacate con un rango teórico de 449 y 592 mL CH₄/gSV, basándose en la composición proximal y elemental. Los resultados obtenidos en el presente trabajo para semilla completa fueron menores; esto puede ser debido a que normalmente los cálculos teóricos de potencial metanogénico no toman en cuenta algunos factores como la compatibilidad de inóculo-sustrato, y la presencia de compuestos recalcitrantes y/o inhibidores que puedan inhibir a los microorganismos metanogénicos siendo necesario realizar las pruebas experimentales para comprobarlos (García-Vallejo *et al.*, 2023).

Existen pocos reportes del aprovechamiento de semilla de aguacate para generación de biogás, los resultados más destacados son la obtención de 122.60-234.58 nm³ CH₄/kg SV (García-Vallejo *et al.*, 2023), la producción de 0.1525 nanolitros de metano por gramo de biomasa añadida al reactor (nL CH₄/g de biomasa) (Vintila *et al.*, 2019) y el reporte de 201 mL biogás/g sustrato (Gómez *et al.*, 2016). Adicional a estos reportes de laboratorio, se registró que una planta de producción de

aceite de aguacate localizada en Kenia, usa los residuos de aguacate (semillas y cascara) como materia prima para dos digestores anaeróbicos, donde producen más de 5000 m³ de biogás (con aproximadamente 66 % de metano), una vez que se purifica el biogás (alcanzando 94 % de metano), se alcanza una producción de energía de 300 KW, lo que es suficiente para las demandas energéticas de la planta, y el exceso se utiliza para la energía de los tractores de los granjeros locales (Olivado., s.f.). Es importante destacar que en ninguna de estas aproximaciones realizaron el aprovechamiento de la semilla desgrasada o residual.

En cuanto al comportamiento de las cinéticas de producción de biogás se observó que, con LT, se mostró un comportamiento típico para sustratos ricos en materia orgánica ya que la producción se observó en los primeros 7-8 días, después de ese periodo la generación de metano fue prácticamente nula, lo que pudiera indicar que los consorcios aprovecharon la materia orgánica de manera rápida, en los primeros días de la digestión. En general, el comportamiento con el inóculo de LT fue bastante similar para ambos sustratos. Para el caso de LB se observó que la biomasa desgrasada igualmente se transformó de manera importante los primeros días del proceso, mientras que la semilla completa sufrió un periodo de adaptación y la producción se incrementó a partir del día 19 de digestión (Figura 2). También, se pudo observar que la producción de metano para ambos inóculos fue mayor con la biomasa completa de la semilla, esto puede explicarse debido a que este material aún contenía los lípidos que son los compuestos con mayor potencial metanogénico teórico (Santos-Ballardo *et al.*, 2015; Ambriz-Pérez *et al.*, 2021), y cuando se realizó el proceso de desgrasado se retiraron materiales que pudieran potenciar la producción de biogás.

A pesar de esto, la producción de biogás (metano) obtenida a partir de la biomasa desgrasada es interesante, porque se trata de un segundo producto energético ligado a un potencial biodiesel como producto inicial; sería conveniente realizar análisis del potencial energético de las dos posibles rutas propuestas (biogás a partir de semilla completa o producción de aceites para biodiesel sumándole biogás de la semilla

Tabla 1. Caracterización de la semilla de aguacate (completa y desgrasada)

Materia orgánica	H (%)	ST (%)	SV (% de ST)	SF (% de ST)
Semilla de aguacate completa*	52.82 ± 0.030 ^a	47.68 ± 0.004 ^b	97.78 ± 0.002 ^a	2.22 ± 0.002 ^a
Semilla de aguacate desgrasada*	1.78 ± 0.004 ^b	98.22 ± 0.004 ^a	97.49 ± 0.001 ^a	2.51 ± 0.001 ^a
Semilla de aguacate completa ^a	35.20	64.8	97.14	2.86
Semilla de oliva ^b	18.45	NR	82.44	0.77
Semilla de Almendra ^c	7.63	NR	82.14	0.50

Los valores reportados son el promedio con desviación estándar (n=3). % = Porcentaje; H = Humedad; SF = Sólidos fijos; ST = Sólidos totales; SV = Sólidos volátiles; NR = No reportado; *Resultados reportados en el presente trabajo; ^aPerea-Moreno et al. (2016); ^bMata-Sánchez et al. (2013) y ^cGómez et al. (2016). Letras diferentes por columna representan diferencias significativas ($\alpha = 0.05$, LSD Fisher).

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos (%) de los lípidos de la semilla de aguacate

Ácido graso	Nomenclatura	Fracción (%)
Pentadecanoico	C15:0	4.01 ± 0.16
Palmitico	C16:0	11.08 ± 1.31
Palmitoleico	C16:1, cis-9	1.41 ± 0.31
Heptadecanoico	C17:0	4.14 ± 0.28
Cis-10-Heptadecanoico	C17:1	0.48 ± 0.02
Estearico	C18:0	0.72 ± 0.04
Oleico	C18:1 (cis-9)	16.77 ± 1.42
Linoleico	C18:2 (cis-9,12)	33.08 ± 0.63
Linolenico	C18:3 (cis-9,12,15)	5.38 ± 0.62
Araquidico	C20:0	0.52 ± 0.01
Eicoseico	C20:1	0.53 ± 0.01
Cis-11,14,17-eicosenoico	C20:3	17.38 ± 2.08
Cis-11,14,17-eicosatrenoico	C20:3	0.42 ± 0.02
Behénico	C22:0	0.66 ± 0.07
Erúcico	C22:1	0.62 ± 0.04
Cis-11,14-docosadienico	C22:2	0.47 ± 0.08
Tricosanoico	C23:0	0.60 ± 0.02
Lignocérico	C24:0	1.11 ± 0.24
Cis-4,7,10,13,16,19,-docosaheptaenoico	C22:6	0.61 ± 0.03
	SFAs	22.85
	MUFAs	19.81
	PUFAs	57.34

Los datos representan promedios de tres mediciones con desviación estándar. SFAs: Ácidos grasos saturados; MUFAs: Ácidos grasos mono-insaturados; PUFAs: Ácidos grasos poli-insaturados.

desgrasada) para valorar su potencial real para generación de energía. Finalmente, no se observaron diferencias estadísticas en el potencial metanogénico de la semilla desgrasada para los dos inóculos utilizados (Tabla 3), lo que pudiera sugerir una mayor versatilidad para usar el material independientemente de los inóculos disponibles.

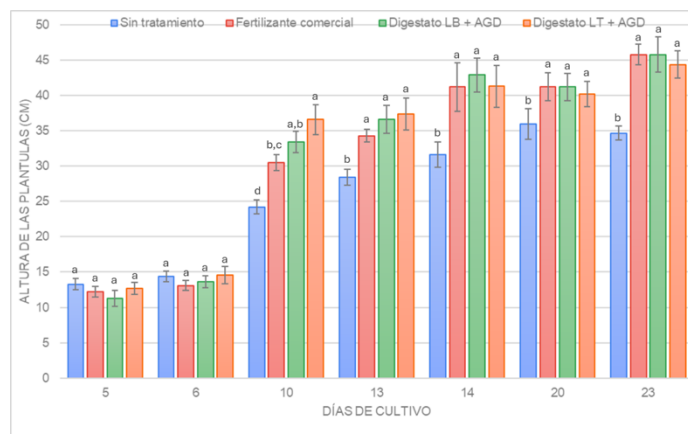


Figura 3. Crecimiento registrado por las plántulas de maíz bajo diferentes tratamientos. Cada medición corresponde a promedio con desviación estándar ($n=10$). Se realizó ANOVA y comparación de medias para los diferentes tratamientos en cada día de cultivo ($\alpha=0.05$, LSD Fisher).

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL COMO BIOFERTILIZANTE DE LOS DIGESTATOS OBTENIDOS DE LA DIGESTIÓN ANAERÓBICA

Los resultados de la prueba de crecimiento de plántulas de maíz demostraron que la adición de los digestatos obtenidos a partir de las digestiones anaeróbicas de la AGD (con diferentes inóculos) tuvieron efectos positivos en el crecimiento de las plantas, comparados con el control (sin fertilizante). Como control positivo se utilizó un fertilizante comercial.

En la figura 3, se muestra el crecimiento registrado por las muestras durante el período de estudio. A lo largo de 23 días no se observaron diferencias significativas entre los dos tratamientos adicionados con el digestato y el tratamiento con el fertilizante comercial; mientras que el tratamiento que no fue adicionado con ningún mejorador de suelos fue significativamente menor.

Estos resultados obtenidos son interesantes ya que se demuestra que la aplicación como biofertilizante de los digestatos, obtenidos a partir de la digestión anaeróbica de las semillas desgrasadas de aguacate, presenta un potencial como promotor de crecimiento vegetal equiparable a los

productos comerciales (basados en nitrógeno, urea y/o amoníaco), sin embargo, se trata de un componente orgánico derivado del aprovechamiento de biomasa residual de aguacate, por lo que evita las desventajas ambientales de este tipo de productos (Santos-Ballardo *et al.*, 2015; Armenta-Medel *et al.*, 2023; Velarde-Meza *et al.*, 2023), esto puede representar un impulso para el aprovechamiento de este tipo de residuos bajo el enfoque de biorrefinería, validando el uso de los digestatos obtenidos de la digestión anaeróbica.

CONCLUSIONES

El presente estudio demuestra que la semilla de aguacate cuenta con un porcentaje de materia orgánica aprovechable bastante alto, y que, aunque el rendimiento del proceso de extracción de aceite pudiera parecer bajo, se encuentra dentro del rango reportado en trabajos previos. Además, el perfil de los ácidos grasos obtenidos muestra potencial para posible materia prima para biodiesel, aunque se recomendaría realizar algunas pruebas de caracterización como índice de cetano, índice de acidez, índice de peróxido, etcétera.

Además, los resultados de la generación de biogás fueron significativamente altos, observándose que la semilla completa muestra potencial metanogénico más elevado que la semilla desgrasada; sin embargo, este último material presenta la ventaja de que generaría energía renovable a partir de un segundo proceso aprovechando el subproducto de la extracción de aceite, además de que mostró el mismo potencial utilizando ambos inóculos, dándole mayor versatilidad en su potencial uso como fuente de biogás al no presentar diferencias entre los inóculos utilizados.

Por otro lado, el digestato generado a partir de la digestión anaeróbica de la semilla desgrasada (con ambos inóculos) mostró características como promotor de crecimiento vegetal similar a un fertilizante comercial con la ventaja de ser de naturaleza orgánica.

El presente trabajo puede ser un parteaguas para el aprovechamiento integral de este importante subproducto industrial, lo que permitiría la generación de 3 productos (en cadena) de valor agregado, siendo estos: aceite con potencial uso para biodiesel, biomasa desgrasada con potencial de generación de biogás y biofertilizante. Estos resultados pueden aportar a la generación de energía accesible y a la disminución de la contaminación derivada de esta importante industria, acercando a la política de cero residuos que se busca en la actualidad.

Tabla 3. Condiciones de operación y resumen de los resultados obtenidos en las pruebas de digestión anaeróbica por lotes de los diferentes experimentos.

	AGC + LT	AGD + LT	AGC + LB	AGD + LB
Temperatura de operación (°C)	37 ± 1	37 ± 1	37 ± 1	37 ± 1
Tiempo de retención hidráulica (TRH) (días)	41	41	41	41
Producción acumulada de metano (mL CH ₄ gVS ⁻¹)	280.15 ± 3.60 ^b	172.80 ± 4.90 ^c	340.61 ± 5.80 ^a	178.94 ± 4.90 ^c

Los datos representan los promedios de tres mediciones con desviaciones estándar.

AGC: Semilla aguacate completa; AGD: Semilla desgrasada aguacate; LT: Lodos activados de tostaditas blancas; LB: Lodos activados de Be-gaia; mL CH₄/gSV = Mililitros de metano por gramo de sólido volátil añadido al reactor. Letras diferentes entre columnas representan diferencias significativas estadísticamente ($\alpha = 0.05$, LSD Fisher).

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a la Universidad Politécnica de Sinaloa (UPSIN) por el apoyo con sus equipos e instalaciones. A la Dra. Nidia Araiza Lizarde por el apoyo técnico con las pruebas de potencial de los digestatos como biofertilizante.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Se declara que no existen conflictos de interés con respecto a la investigación, la autoría y/o la publicación de este manuscrito.

REFERENCIAS

Abaide, E.R., Zobot, G.L., Tres, M.V., Martins, R.F., Fagundez, J.L., Nunes, L.F., Druzian, S., Soares, J.F., Dal Pra, V., Silva, J.R.F., Kuhn, R.C., Mazutti, M.A. (2017). Yield, composition, and antioxidant activity of avocado pulp oil extracted by pressurized fluids. *Food Bioprod. Process.* 102, 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.01.008>. AIE. Agencia Internacional de Energía. (2015). Consumo de energía procedente de combustibles fósiles (% del total) -México. Recuperado de: <https://datos.bancomundial.org/indicador/EG.USE.COMM.FO.ZS?locations=MX>. Acceso 4 de Julio de 2024.

Ambriz-Pérez, D.L., Palomares-Ruiz, I.Y., Gómez-Córdoba, F.J., Mejias-Brizuela, N.Y., Araiza-Lizarde, N., Santos-Ballardo, D.U. (2021) Integral valorización from industrial Persian lime processing wastes (*Citrus latifolia* Tanaka): simultaneous recovery of oils

and antioxidants. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 20(1): 367-380.

AOAC. (1999). Official Methods of Analysis International. 17th Edition, Association of Analytical Communities, Gaithersburg.

Armenta-Medel, B., Lezama-Rosas, J.G., Juárez-Cota, M.F., Santos-Ballardo, D.U., Ambriz-Pérez, D.L. (2023). Potencial de obtención de biodiesel y biogás a partir de semilla de guamúchil (*Pithecellobium dulce*). *Identidad Energética.* 7(1): 43-47.

Cruz-López, D. F., Caamal-Cauich, I., Pat-Fernández, V.G., Reza-Salgado, J. (2022). Competitividad de las exportaciones de aguacate Hass de México en el mercado mundial. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 13(2): 355-62. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i2.2885>.

di Bitonto, L., Reynel-Avila, H., Mendoza-Castillo, D., Pastore, C., & Bonilla-Petriciolet, A. (2019). Valorization of mexican waste biomasses for bioenergy applications. *Bulgarian Chemical Communications, Special Issue B* 51: 99 – 102. DOI:10.34049/bcc.51.B.003. Disponible en: http://bcc.bas.bg/BCC_Volumes/Volume_51_Special_B_2019/BCC-51-B-IProPBio.pdf#page=97

EPA. Environmental Protection Agency. (2001). Method 1684: Total, Fixed, and Volatile Solids in Water, Solid, and Biosolids Draft, EPA-821-R-01-015 January 2001. Recuperado de <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015->

- [10/documents/method_1684_draft_2001.pdf](https://doi.org/10.1155/2019/3563750). Acceso 04 de Julio de 2024.
- Fazal, M.A., Haseeb, A.S.M.A., Masjuki, M.M. (2011). Biodiesel feasibility study: An evaluation of material compatibility; performance; emission and engine durability. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 15: 1314-1324.
- Flores, M., Ortiz-Viedma, J., Curaqueo, A., Rodriguez, A., Dovale-Rosabal, G., Magana, F., Vega, C., Toro, M., Lopez, L., Ferreyra, R., Defilippi, B.G. (2019). Preliminary studies of chemical and physical properties of two varieties of avocado seeds grown in Chile. *J. Food Qual.* 2019 <https://doi.org/10.1155/2019/3563750>
- Folch, J., Lee, M., Sloane-Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 497-509.
- Foster, S., Elzinga, D. (2016). El papel de los combustibles fósiles en un sistema energético sostenible. Naciones Unidas, Crónicas ONU. Recuperado de <https://www.un.org/es/chronicle/article/el-papel-de-los-combustibles-fosiles-en-un-sistema-energetico-sostenible>. Accesado 04 de Julio de 2024.
- García-Vallejo, M.C., Solarte-Toro, J.C., Ortiz-Sanchez, M., Chamorro-Anaya, L., Chamorro-Anaya, L., Peroza-Piñeres, P., Pérez-Cordero, A., Cardona-Alzate, C.A. (2023) Exploring the production of antioxidants and biogas from avocado (*Persea Americana* var. *Americana*) residues as an alternative for developing rural bioeconomies. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 33: 101089. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101089>.
- Ge, Y., Dong, X., Lui, Y., Yang, Y., Zhan, R. (2021) Molecular and biochemical analyses of avocado (*Persea americana*) reveal differences in the oil accumulation pattern between the mesocarp and seed during the fruit development period. *Scientia Horticulturae*. 276: 109717.
- Ge, Y., Si, X., Wu, B., Dong, X., Xu, Z., Ma, W. (2018) Oil content and fatty acid composition of the seed of 16 Avocado (*Persea americana*) accessions collected from southern china and their application in a soap bar. *Journal of Agricultural Science*. 10(11): 69-78.
- Gómez, N., Rosas, J. G., Cara, J., Martínez, O., Albuquerque, J. A., & Sánchez, M. E. (2016). Slow pyrolysis of relevant biomasses in the Mediterranean basin. Part 1. Effect of temperature on process performance on a pilot scale. *J Clean Prod*, 120, 181–190.
- Huanca, J. C. M., Hernández, M. C. Q., & Huamán, A. S. L. (2023). Ácidos grasos y criterios de calidad del aceite de palta obtenido mediante tres sistemas de extracción libres de solvente. *Agroindustrial Science*, 13(1), 39-49. <http://dx.doi.org/10.17268/agroind.sci.2020.01.10>
- Kent-Hoekman, S., Broch, A., Robbins, C., Cenicerros, E., & Natarajan, M. (2012). Review of biodiesel composition, properties and specifications. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 16: 143-169.
- Mata-Sánchez, J., Pérez-Jiménez, J. A., Díaz-Villanueva, M. J., Serrano, A., Núñez-Sánchez, N., & López-Giménez, F. J. (2013). Statistical evaluation of quality parameters of olive stone to predict its heating value. *Fuel*, 113, 750–756.
- Morais, D.R., Rotta, E.M., Sargi, S.C., Bonafe, E.G., Suzuki, R.M., Souza, N.E., Matsushita, M., Visentainer, J.V. (2017). Proximate composition, mineral contents and fatty acid composition of the different parts and dried peels of tropical fruits cultivated in Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 28, 308–318. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160178>.
- Olivado. (2019). How Our Factory in Kenya Thrives on Sustainable Practices. Available online: <https://www.olivado.com/factory-kenya-sustainable-practices> (acceso en 7 de Julio 2024).
- Orrego-Alzate, C. E., & Cardona-Alzate, C. A. (2020). Informe técnico sobre propuestas de desarrollo de biorefinerías a partir del uso de residuos de cosecha, postcosecha e industrialización de la fruta fresca, para su aprovechamiento en la producción de energía u otros subproductos. Colombia: Fontagro.
- Perea-Moreno, A. J., Aguilera-Ureña, M. J., Manzano-Agugliaro, F. (2016). Fuel properties of avocado stone. *Fuel*. 186: 358-364.
- Rashama, C., Ijoma, G.N., Matambo, T.S. (2021). Appraising different models for predicting biomethane potential: the case of

- avocado oil processing by-products. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 23 (1): 409–415. <https://doi.org/10.1007/s10163-020-01116-0>.
- Reuters. (2015). Producción de crudo de EU crecerá en 2015: AIE. El economista. Disponible en: <https://www.eleconomista.com.mx/mercados/Produccion-de-crudo-de-EU-crecera-en-2015-AIE-20150310-0037.html>. Ultimo acceso 15 Agosto de 2024.
- Rodríguez-Martínez, B., Romaní, A., Eibes, G., Garrote, G., Gullón, B., Del Río, P.G. (2022). Potential and prospects for utilization of avocado by-products in integrated biorefineries. *Bioresource Technology.* 364: 128034.
- Sandoval-Contreras, T., González Chávez, F., Poonia, A., Iñiguez-Moreno, M., Aguirre-Güitrón, L. (2023) Avocado Waste Biorefinery: Towards Sustainable Development. *Recycling*, 8: 81. <https://doi.org/10.3390/recycling8050081>.
- Santos-Ballardo, D. U., Font-Segura, X., Sánchez-Ferrer, A., Barrena, R., Rossi, S., & Valdez-Ortiz, A. (2015). Valorisation of biodiesel production wastes: Anaerobic digestion of residual *Tetraselmis suecica* biomass and co-digestion with glycerol. *Waste Management and Research*, 33, 250–257.
- Secretaría de energía (SENER). Balance nacional de energía 2022. Disponible en: <https://base.energia.gob.mx/BNE/BalanceNacionalDeEnerg%C3%ADa2022.pdf>. Consultado 04 de Julio de 2024.
- Tan, C.X., Tan, S.S., Ghazali, H.M., Tan, S.T. (2022). Physical properties and proximate composition of Thompson red avocado fruit. *Br. Food J.* 124, 1421–1429. <https://doi.org/10.1108/BFJ-09-2020-0803>.
- Vintila, T., Ionel, I., Rufis Fregue, T.T., Wächter, A.R., Julean, C., Gabche, A.S. (2019) Residual biomass from food processing industry in Cameroon as feedstock for second-generation biofuels. *BioResources* 14:3731–3745. <https://doi.org/10.15376/biores.14.2.3731-3745>.
- Velarde-Meza, J.C., Tiznado-Osuna, L.J., Aguilera-Hernández, Y.M., Santos-Ballardo, D.U. (2023) Producción de biogás a partir de residuos agroindustriales de mango Ataulfo y heces caninas. *Identidad Energética.* 6(1): 31-37

***Enterococcus faecium* aisladas del contenido intestinal de *Penaeus vannamei* propiedades de seguridad, tecnológicas y probióticas**

***Enterococcus faecium* isolated from the intestinal contents of *Penaeus vannamei*: safety, technological, and probiotic properties**

Castañeda-Ruelas, G.M.¹, Gámez-Bayardo, S.¹, Domínguez-Lagunes, S.¹, Fierros-Pérez, C.E.², Durán-Pérez, S.¹, Hernández-Díaz, L.J.¹, Jiménez-Edeza, M.^{1*}

¹Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Microbiológico, CAEF Gestión de la Calidad e Inocuidad Alimentaria UAS-CA-323, Programa de Posgrado Integral en Biotecnología, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. Las Américas S/N, Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa, México, CP. 80013. ²Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Sinaloa, Av. Las Américas S/N, Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa, México, CP. 80013.

RESUMEN

La microbiota intestinal del camarón (*Penaeus vannamei*) ha sido reconocida como fuente de bacterias probióticas útiles para su aplicación biotecnológica. El objetivo de este estudio fue evaluar la sobrevivencia y actividad probiótica *in vitro* de cinco cepas ácido-lácticas aisladas de camarón. Las cepas fueron aisladas del intestino del camarón y analizadas mediante la secuenciación del gen ADN_r 16S. La sobrevivencia de las cepas se evaluó mediante retos de acidez (pH 3, 5, 6 y 7), temperatura (4, 15, 30, 37 y 45 °C) y salinidad (4%, 6% y 8% NaCl) durante 24 h. La capacidad tecnológica, probiótica y seguridad de las cepas fueron determinadas por diversas pruebas *in vitro*. Las cinco cepas nativas correspondieron a la orden *Lactobacillales*, y se relacionaron filogenéticamente (>99.9 %) con la cepa *Enterococcus faecium* (DSM_20477). El análisis multivariante indicó un carácter de sobrevivencia similar ($\approx 94\%$) entre las cepas de *E. faecium*, cuya proliferación ocurre a condiciones >15 °C, pH 5 - 7 y <6% NaCl. La capacidad probiótica varió entre las cepas de *E. faecium* ($P < 0.05$) según las propiedades de hidrofobicidad, autoagregación, coagregación y antagonista. El potencial tecnológico de las cepas fue similar según su poder acidificante, proteolítico y lipolítico ($P > 0.05$). La sensibilidad a siete antibióticos y ausencia de hemólisis fue también observada en todas las cepas. Las características fisiológicas de las cepas autóctonas del intestino del camarón permiten proponerlas como potenciales agentes probióticos para el desarrollo de productos biotecnológicos.

PALABRAS CLAVE: Camarón, *Enterococcus*, Microbiota, Probiótico.

ABSTRACT

The gut microbiota of shrimp (*Penaeus vannamei*) has been recognized as a source of probiotic bacteria and beneficial for biotechnological applications. The aim of this study was to evaluate the survival and probiotic activity *in vitro* of five lactic acid strains isolated from shrimp. The strains were isolated from the shrimp gut and analyzed by sequencing the 16S rDNA gene. The survival of the strains was evaluated by challenges of acidity (pH 3, 5, 6, and 7), temperature (4, 15, 30, 37, and 45 °C) and salinity (4%, 6% and 8% NaCl) for 24 h. The technological, probiotic and safety capacity of the strains were determined by various *in vitro* tests. The five native strains corresponded to the order *Lactobacillales* and were phylogenetically related (>99.9%) to the *E. faecium* strain (DSM_20477). Multivariate analysis indicated a similar survival rate ($\approx 94\%$) among *E. faecium* strains, whose proliferation occurs at conditions >4 °C, pH 5 - 7, and <6% NaCl. Probiotic capacity varied among *E. faecium* strains ($P < 0.05$) according to hydrophobicity, self-aggregation, co-aggregation, and antagonistic properties. The technological potential of the strains was similar according to their acidifying, proteolytic, and lipolytic power ($P > 0.05$). Sensitivity to seven antibiotics and the absence of hemolysis were also observed in all strains. The physiological characteristics of autochthonous strains of shrimp gut allow them to be proposed as potential probiotic agents for developing of biotechnological products.

KEYWORDS: Shrimp, *Enterococcus*, Microbiota, Probiotic.

*Autor de correspondencia: Maribel Jiménez Edeza

E-mail: mjimenez@uas.edu.mx

ORCID ID: [0000-0002-9835-9665](https://orcid.org/0000-0002-9835-9665)

Registro ORCID Autores: CRGM. [0000-0001-8970-0035](https://orcid.org/0000-0001-8970-0035); GBS: [0000-0001-9592-6743](https://orcid.org/0000-0001-9592-6743); DLS: [0000-0002-8101-1855](https://orcid.org/0000-0002-8101-1855)

Revista Online: <https://doi.org/10.24304/2474-7989>; DPSA: [10.24304/2474-7989](https://doi.org/10.24304/2474-7989); HDLJ: [10.24304/2474-7989](https://doi.org/10.24304/2474-7989); 2020; HDLJ [10.24304/2474-7989](https://doi.org/10.24304/2474-7989)

Revista online: <https://revistas.uas.edu.mx/index.php/QBU/index>

Enviado: Septiembre 2024

Aceptado: Octubre 2024

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la pesca y acuicultura constituyen uno de los sectores de producción de alimentos de origen animal de mayor crecimiento económico, debido al rendimiento de cosecha y valor monetario del producto. A nivel mundial, se estima que la actividad tiene una derrama económica de 4 600 millones de dólares anuales (FAO, 2022). La camaricultura es una de las técnicas más atractivas de la acuicultura, dado que el camarón figura como uno de los productos mayormente comercializados a nivel mundial, y producidos principalmente en Asia y América Latina (FAO, 2020). La especie más cultivada en estas áreas corresponde a *Penaeus vannamei* (camarón patiblanco) con 4 966 mil toneladas anuales (FAO, 2020).

Es reconocido que la camaricultura se encuentra constantemente amenazada por diversos agentes infecciosos virales (virus de la cabeza amarilla, virus del síndrome de la mancha blanca, síndrome de crecimiento lento) y bacterianos (vibriosis) causantes de enfermedades que afectan el crecimiento, desarrollo y producción del camarón, pudiendo llegar a causar la muerte de este y generando grandes pérdidas económicas (Wikumpriya *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2022). Para el control de las enfermedades infecciosas se recurre generalmente al uso de agentes antimicrobianos, cuyo espectro de acción puede ser limitado para la prevención y control de las enfermedades, y el uso desmedido de estos agentes favorecen la contaminación del medio ambiente, la emergencia de microorganismos multirresistentes, la pérdida de la sanidad del animal y el riesgo en la salud del consumidor (Wikumpriya *et al.*, 2023).

Actualmente, existe un interés creciente en la utilización de compuestos fitoquímicos (Gámez-Bayardo *et al.*, 2021), bacteriófagos (Ninawe *et al.*, 2020), vacunas (Amatul-Samahah *et al.*, 2020), agentes probióticos (Hai, 2015), productos simbióticos (Abdel-Latif *et al.*, 2022), inmunostimulantes (Castañeda-Ruelas *et al.*, 2022) y métodos epigenéticos (Wikumpriya *et al.*, 2023) como métodos de vanguardia para mejorar la calidad y seguridad de la actividad acuícola. Los agentes probióticos son microorganismos con propiedades bioactivas que ofrecen promisoriamente mejorar la salud y nutrición de animales en gorda, incluyendo el camarón (Hai, 2015; Oussaief *et al.*, 2020; Abdel-Latif *et al.*, 2022). El aislamiento y la caracterización de los microorganismos probióticos nativos es un área de interés, dado que para su uso deben cumplir con requisitos de seguridad (patogenia y resistencia antimicrobiana), carácter funcional y potencial tecnológico mediante la producción de ácido láctico y otros metabolitos bioactivos benéficos (Oussaief *et al.*, 2020).

Particularmente, el género *Enterococcus* son un grupo de coccos Gram + que pertenecen a la familia de *Lactobacillus*, y han sido reconocidos como bacterias ácido-lácticas que pueden comportarse como patógenos, comensales o simbiotes intestinales del hospedero (Hanchi *et al.*, 2018). *Enterococcus faecium* se considera una de las especies más importantes de este género que es utilizada como agente de fermentación y probiótico sin reporte de efectos adversos (Zommiti *et al.*, 2022). Adicionalmente, el carácter versátil de *E. faecium* para resistir y sobrevivir en diversas condiciones ha sido descrito como características que favorecen su aprovechamiento industrial (Oussaief *et al.*, 2020). Actualmente, se han comercializado varias cepas de *E. faecium* para su uso como tratamiento preventivo de enfermedades infecciosas y suplemento alimenticio para el hombre y animales (Zommiti *et al.*, 2022).

La demanda mundial de soluciones libres de químicos y menos dañinas que soporten la sanidad y engorda de los productos pesqueros se han señalado necesarias para atender los objetivos de desarrollo sostenible vinculados a la práctica acuícola. Por ello, el objetivo del presente estudio fue obtener nuevas cepas probióticas adaptadas al camarón y hábitat marino. Posteriormente, se evaluó *in vitro* la sobrevivencia, el potencial probiótico y tecnológico para exponer su posible uso como agentes bioactivos para la industria acuícola.

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

Se recolectaron asepticamente muestras de heces y tripas de larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* que se encontraban en estanques de cultivo experimental y alimentados con una formulación comercial a base de proteína de pescado (Camaronina Plus®). Las muestras recolectadas fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso. Brevemente, se homogeneizó 1 g del intestino o heces de camarón con 9 mL de solución salina (NaCl 0.9%, p/v) durante 2 min. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron (0.1 mL) en agar de Man Rogosa y Sharpe suplementado con L-Cisteína (0.5 g/L) (MRS-Cys). Los cultivos se incubaron a 37 °C por 72 h en condiciones anaeróbicas. Las colonias seleccionadas se purificaron en agar MRS-Cys y se preservaron en caldo MRS-Cys con glicerol (28%, v/v) a -20 °C hasta su uso.

EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN bacteriano se extrajo a partir de cultivos puros en caldo MRS-cys. Brevemente, los cultivos se centrifugaron a 4 500 rpm durante 10 min, y

la pastilla se resuspendió con amortiguador de fosfatos. La suspensión se transfirió a un microtubo, se añadieron 450 μL de solución 0.1 M de hidróxido de sodio (NaOH) / 0.5%, v/v de docecilsulfato sódico (SDS) y 225 μL de solución 3 M de acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) / 1.8 M de ácido acético (CH_3COOH), y se centrifugó nuevamente a 15,000 rpm por 5 min. Los sobrenadantes se recuperaron en microtubos (600 μL) que contenía isopropanol grado reactivo, y se almacenaron -20°C por 24 h. Posteriormente, se añadieron 500 μL de solución de etanol al 70%, y se centrifugaron a 15 000 rpm por 5 min. La pastilla se homogenizó con 200 μL de agua nanopura, el ADN extraído se almacenó a -80°C hasta su uso.

IDENTIFICACIÓN POR SECUENCIA ADN 16S Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para la amplificación se utilizó la región del gen ADNr 16S utilizando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 μL , y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: paso inicial de desnaturalización de 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificación [94°C por 1 min (desnaturalización), 56°C por 1 min (alineamiento) y 72°C por 1 min (extensión)], y extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR se purificaron, y posteriormente el gen ADNr 16S fue secuenciado por MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur). La calidad de las secuencias del gen ADNr 16S se analizaron con el programa Geneious (v8.1.6). Para la comparación *in silico* de las secuencias se utilizó el programa 16S biodiversity tool y la base de datos del GenBank utilizando el MOLE-BLAST. El árbol filogenético se construyó utilizando el programa FastTree (v.2.1.11).

ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

Para la preparación de la suspensión bacteriana, se inoculó una colonia en 10 mL de MRS-cys, y se incubó a 37°C por 24 h en condiciones de anaerobiosis. El cultivo se centrifugó (5 000 rpm por 10 min a 4°C), y la pastilla se disolvió en amortiguador de fosfato (PBS) 1X para ajustar una concentración de 1.0×10^8 Unidades formadoras de colonia (UFC)/mL (OD = 0.1, $\lambda = 625 \text{ nm}$).

CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA

ACTIVIDAD ACIDIFICANTE

Las suspensiones bacterianas estandarizadas se inocularon en leche desnatada de vaca estéril al 1%, y los cultivos se incubaron a 37°C . El cambio de pH y la concentración bacteriana (UFC/mL) se determinaron

durante 48 h (0, 3, 6, 12 y 24 h) usando un medidor de pH y cuenta total en placa, respectivamente.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA, pH Y NaCl

Para la evaluación del crecimiento microbiano frente a diferentes condiciones de temperatura (4, 15, 30, 37°C y 45°C), pH (3, 5, 6 y 7) y cloruro de sodio (NaCl) 4, 6 y 8% p/v, se inocularon las suspensiones bacterianas estandarizadas en caldo MRS-cys al 1% previamente ajustado con cada condición. Los ensayos de pH y NaCl se incubaron a 37°C . Mientras que, los ensayos de temperatura se incubaron según el tratamiento y se ajustaron a pH 7. El pH de los medios fue ajustado con soluciones de 0.1 M de NaOH y 0.1 M de ácido clorhídrico (HCl) antes de que los medios fueran esterilizados. La concentración bacteriana (UFC/mL) se cuantificó por diluciones seriadas y cuenta total en placa durante los tiempos 0, 3, 6, 12 y 24 h.

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y LIPOLÍTICA

La actividad proteolítica (AP) y lipolítica (AL) se evaluaron según el método descrito por Moslehishad *et al.* (2013) y Meng *et al.* (2018), respectivamente. Alícuotas de 50 μL de cada sobrenadante obtenidos tras la centrifugación ($5\,000 \times g$, 10 min, 4°C) de un cultivo bacteriano en caldo MRS-cys fueron depositados en pozos ($\varnothing = 6.5 \text{ mm}$) de placas agar de leche descremada al 1% para AP y agar tributirina al 1% para AL. La placa se incubó a 37°C por 24 h y 72 h para AP y AL, respectivamente. La AP y AL se determinaron midiendo el diámetro (mm) de las zonas claras alrededor de los pozos.

CARACTERIZACIÓN PROBIÓTICA

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA

Para evaluar la actividad antagonista se utilizaron las siguientes cepas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) y *Escherichia coli* (ATCC 25922). Se extendió 1 mL de la suspensión bacteriana ajustada (1.0×10^8 UFC/ml) de cada de cada cepa en cajas de agar Mueller-Hilton, y se colocaron 50 μL del cultivo de bacteria ácido lácticas (1.0×10^8 UFC/mL) en pozos ($\varnothing = 6.5 \text{ mm}$) previamente hechos en el medio de cultivo. Un sensidisco de sulfamethoxazole-trimethoprim 30 μg se incluyó como control de fenotipo de susceptibilidad. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h. La actividad antimicrobiana se determinó utilizando la Ecuación (1) descrita por Mohd *et al.* (2020):

$$\text{Zona de inhibición (ZOI)} = \text{ZOI (mm)} - \text{Diámetro del pozo (mm)} \quad (1)$$

AUTOAGREGACIÓN

La autoagregación se realizó siguiendo la metodología establecida por Angmon *et al.* (2016) con algunas modificaciones. Alícuotas de 4 mL de una suspensión bacteriana estandarizada en PBS se agitaron por 10 s, y se incubaron a 37 °C por 4 h. La absorbancia de las muestras se midió a 600 nm. El porcentaje de la autoagregación fue expresado usando la Ecuación (2):

$$\% \text{ Autoagregación} = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \times 100 \quad (2)$$

Donde A_t y A_0 representan la absorbancia en el tiempo 4 h y tiempo 0 h, respectivamente.

COAGREGACIÓN

Para la coagregación se siguió la metodología descrita por Collado *et al.* (2008). Las cepas bacterianas patógenas utilizadas fueron: *S. aureus* (ATCC 29213), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. Typhimurium* (ATCC 14028) y *E. coli* (ATCC 25922). Brevemente, se prepararon suspensiones en PBS de las bacterias ácido-lácticas y de las cepas patógenas descritas previamente. Posteriormente, se mezclaron 2 mL de las suspensiones celulares de las cepas patógenas con 2 mL de las bacterias ácido-lácticas por 10 s, y se incubaron a 37 °C por 4 h. Alícuotas individuales de 4 mL de las bacterias ácido-lácticas y 4 mL de las cepas patógenas se incluyeron como controles. La absorbancia de las muestras se midió a 600 nm. El porcentaje de la coagregación fue determinado usando la Ecuación (3):

$$\% \text{ Coagregación} = \left(\frac{\frac{A_x + A_y}{2} - (A_{x+y})}{\frac{A_x + A_y}{2}}\right) \cdot 100 \quad (3)$$

Donde A_x y A_y representan la absorbancia de la suspensión de las bacterias ácido-lácticas y bacterias patógenas, respectivamente. A_{x+y} representa la absorbancia de la mezcla de las bacterias ácido-lácticas y cepas patógenas.

HIDROFOBICIDAD

La hidrofobicidad de la superficie bacteriana se calculó midiendo la adhesión microbiana a los hidrocarburos, de acuerdo con la metodología propuesta por Santos *et al.* (2016). Se añadieron 1 mL de hexano a cada una de las suspensiones de las bacterias ácido-lácticas ajustadas (OD = 1.0, $\lambda = 625$ nm) en PBS (A_0), y se dejaron reposar por 10 min a a 25 °C para crear una suspensión de dos fases. Posteriormente, se agitaron por

2 min y se dejaron reposar por 20 min a 25 °C. Finalmente, se removió la fase acuosa y se midió su absorbancia a 600 nm (A). La hidrofobicidad se calculó con la Ecuación (4):

$$\% \text{ Hidrofobicidad} = \left(1 - \frac{A_0}{A}\right) \times 100 \quad (4)$$

Donde A_0 y A corresponden a los valores de absorbancia inicial y final, respectivamente.

CARACTERIZACIÓN DE LA SEGURIDAD

SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

Para la evaluación de susceptibilidad antimicrobiana se siguió el método de difusión Kirby-Bauer y los lineamientos establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos (CLSI, 2016). Un panel de 13 antibióticos fue utilizado: cloranfenicol (C, 30 µg/mL), tetraciclina (Te, 30 µg/mL), amikacina (AK, 30 µg/mL), gentamicina (CN, 10 µg/mL), ácido nalidíxico (NA, 30 µg/mL), ceftazidima (CAZ, 30 µg/mL), ampicilina (AMP, 10 µg/mL), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT, 25 µg/mL), sulfisoxazol (G, 25 µg/mL), neomicina (N, 30 µg/mL), estreptomina (S, 10 µg/mL), amoxicilina con ácido clavulánico (AMC, 30 µg/mL) y cefoperazona (CFP, 75 µg/mL). Brevemente, se extendió una alícuota de 1 mL de cada suspensión de las bacterias ácido-lácticas (1.0×10^8 UFC/mL) en placas de agar Müller Hinton y se colocaron los sensidiscos sobre la superficie de la placa inoculada. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Para medir el diámetro (mm) de los halos de inhibición de las bacterias ácido-lácticas sobre el agar se utilizó un Vernier. Basados en los halos de inhibición (mm), las bacterias se clasificaron como sensible, intermedio y resistente de acuerdo con los criterios de inhibición reportados por la CLSI (2016). Se calculó el índice de multiresistencia (IMR) a antibióticos como el cociente del número de antibióticos con fenotipo de resistencia entre el total de antibióticos evaluados (Krumperman *et al.*, 1983). Los ensayos se realizaron por duplicado.

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Se extendió una alícuota de 1 mL de cada suspensión bacteriana (1.0×10^8 UFC/mL) en placas de agar sangre de ternera al 5%. Posteriormente, las cajas de Petri fueron incubadas a 37 °C por 48 h. La hemólisis se revisó visualmente y se clasificó como α (halo verdoso), β (halo claro) o γ (sin halo). Los ensayos se realizaron por triplicado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el programa Minitab versión 17.0 y Excel versión 16.75.2. Brevemente, los

datos se expresaron como la media \pm desviación estándar calculados según la prueba: cuatro réplicas (retos de temperatura, pH, salinidad, y actividad acidificante en la leche) o tres réplicas (caracterización probiótica, actividad proteolítica y actividad lipolítica). El análisis de significancia estadística se realizó mediante una ANOVA de una vía (tiempo o cepa). Cuando fue necesario, se utilizó la prueba de Tukey para discriminar diferencias entre las medias con un nivel de significación de $P < 0.05$. Un análisis multivariado de conglomerado de observaciones se empleó para los parámetros evaluados en la sobrevivencia de las cepas de *E. faecium* de acuerdo con su similitud.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS DE *PENAEUS VANNAMEI*

Con base al análisis filogenético del marcador ADNr 16S, las cinco cepas aisladas del contenido intestinal de camarón correspondieron al orden *Lactobacillales*, y se relacionaron filogenéticamente ($>99.9\%$) con la cepa *E. faecium* (DSM 20477) (Figura 1). Estudios previos han señalado que *E. faecium* puede coexistir como microbiota del camarón proveyendo beneficios a la salud, y cuyas propiedades bioactivas y tecnológicas lo han perfilado para su uso industrial y terapéutico (Chino de la Cruz *et al.*, 2023; Zaghoul *et al.*, 2023). La ceracana relación genética de las cepas de estudio con la cepa *E. faecium* (DSM 20477) permiten sugerir su potencial probiótico, dado que previamente se ha descrito que esta cepa de referencia tiene la capacidad de producir sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) para el control de patógenos (Ng *et al.*, 2020).

CARACTERIZACIÓN TECNOLÓGICA

EFFECTO DE LA TEMPERATURA, pH, NaCl Y ACIDIFICACIÓN DE LA LECHE

La Figura 2 ilustra el comportamiento de las cepas de *E. faecium* aisladas del contenido intestinal del camarón frente a los diferentes retos. La temperatura, el pH, y el NaCl (%) son predictores del crecimiento de las cepas de *E. faecium* ($P < 0.05$) durante el tiempo evaluado. Así mismo, la inoculación de las cepas de *E. faecium* en la leche de vaca evidencia la capacidad fermentativa de las bacterias en el periodo de evaluación ($P < 0.05$). El carácter acidificante de las cepas en la leche descremada se mostró con un valor $\Delta\text{pH} = 1.42 \pm 0.04$, y una proliferación bacteriana promedio de 9.4 ± 0.6 Log UFC/mL. El análisis multivariante indica un carácter de sobrevivencia de las cepas de *E. faecium* similar ($\approx 94\%$) y señala las siguientes condiciones hostiles o limitantes para su crecimiento: pH 3, 8% NaCl y 4 °C. Mientras que, la proliferación de las cepas fue a condiciones >15 °C, $>$ pH 5 - 7 y $<$ 6% NaCl (Figura 3).

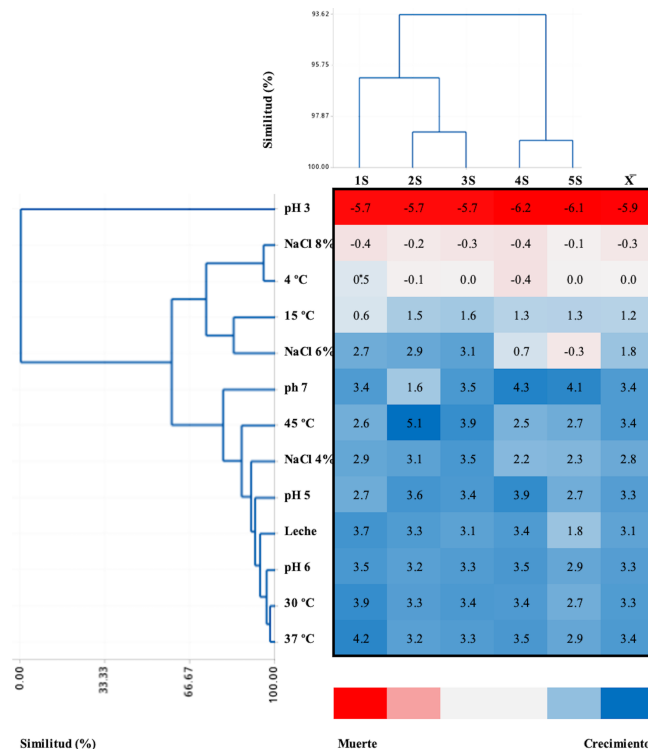


Figura 3. Perfil de sobrevivencia de las cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del contenido intestinal de camarón frente a diferentes retos después de 24 h de exposición. Los valores son la media aritmética (Log UFC/mL de *E. faecium*) de cuatro réplicas. La leyenda de rojo a azul indica los Log de reducción o aumento de la concentración de *E. faecium*, respectivamente

El comportamiento de las bacterias ácido-lácticas frente a diversas condiciones de temperatura, pH y salinidad ha sido ampliamente estudiado (Oussaief *et al.*, 2020; Grujović *et al.*, 2020; Sagiroglu *et al.*, 2022; Naik *et al.*, 2023). Algunos autores han descrito que, *E. faecium* tiene la habilidad de crecer en un rango de: temperatura de 4 a 45 °C, pH ácido (2 - 4) y salinidad 2 - 8% (Naik *et al.*, 2023), valores similares a los observados en nuestro estudio. La tolerancia de las cepas de *E. faecium* a condiciones diversas de temperatura, pH y salinidad permite inferir su estabilidad, crecimiento a gran escala y la capacidad de adaptación a diversos sistemas de producción de alimentos (Hanchi *et al.*, 2018).

El criterio de viabilidad en valores de pH bajo es fundamental para la selección de los probióticos que deben sortear el mecanismo de defensa del hospedero y llegar vivos al lugar de destino (Samedi & Charles, 2019). Las cepas de estudio presentaron la capacidad de sobrevivir a pH ácido (< 12 h) y proliferar a valores de 5 a 7 logaritmos, lo cual pudiera garantizar su sobrevivencia en diversos hospederos. Al respecto, se ha descrito que la tolerancia a pH 2.5 durante 4 h de cultivo es una característica deseada del probiótico para garantizar la sobrevivencia en

el tracto gastrointestinal de hombre (Ammor & Mayo, 2007). Mientras que, los camarones carecen de ácido gástrico, y su sistema digestivo tiende a tener valores de pH que van ligeramente de ácido a neutro (Imaizumi *et al.*, 2021).

Adicionalmente, el crecimiento microbiano y la acidificación de la leche por parte de las cepas de *E. faecium* (Figura 2) son indicadores del carácter fermentativo y producción de metabolitos, proponiendo su uso intencional como ingrediente para mejorar los atributos sensoriales, organolépticos, preservativos y nutritivos de los alimentos (Hanchi *et al.*, 2018). Particularmente, la actividad fermentativa de las bacterias ácido-lácticas es una propiedad atractiva debido a la conversión de los carbohidratos en metabolitos como ácidos orgánicos, peróxido de

hidrógeno, bacteriocinas, dióxido de carbono y diacetilo, cuyas propiedades antioxidantes y antimicrobianas han sido expuestas (Samedi & Charles, 2019, Ng *et al.*, 2020).

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA Y LIPOLÍTICA

El potencial proteolítico y lipolítico de las cepas de *E. faecium* se muestra en el Tabla 1. Todas las cepas mostraron poder proteolítico y lipofílico similar ($P > 0.05$), con un halo de 13.4 ± 1.2 mm y 15.7 ± 0.9 mm, respectivamente. El poder proteolítico y lipolítico de algunas bacterias

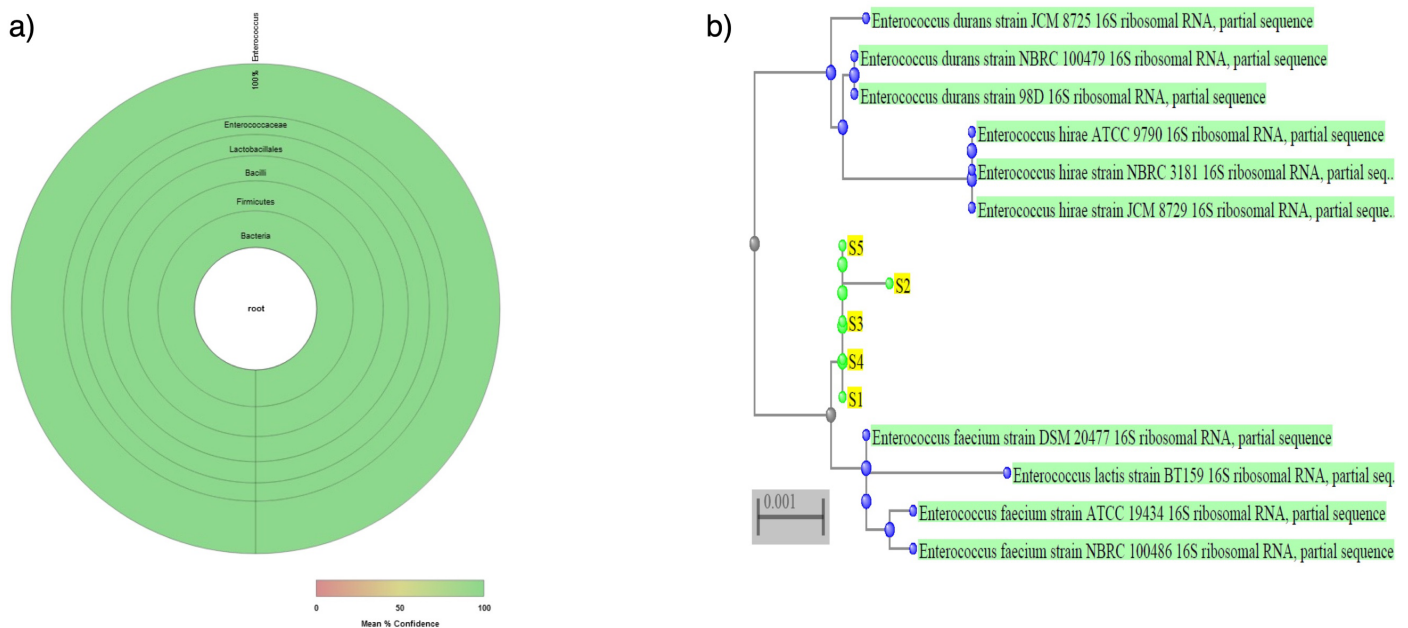


Figura 1. Identificación (a) y dendrograma de similitud (b) de las cepas ácido-lácticas aisladas del contenido intestinal de camarón mediante el análisis de secuencia de ADNr 16S. Las cepas de este estudio se indican subrayadas en amarillo.

ácido-lácticas está relacionado con la capacidad enzimática de degradar macromoléculas (proteínas o lípidos) que permitan liberar péptidos y ácidos grasos cortos que favorecen los atributos organolépticos de los alimentos fermentados y confieren propiedades bioactivas (Terzic-Vidojevic *et al.*, 2021). Algunos estudios han descrito la actividad proteolítica y lipolítica de cepas de *E. faecium* aisladas de diversas fuentes, señalando que estas propiedades pueden variar entre cepas (Ammor & Mayo, 2007; Oussaief *et al.*, 2020).

CARACTERIZACIÓN PROBIÓTICA

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA

La actividad antagonista de las cepas de *E. faecium* frente a los patógenos seleccionados fue dependiente de la cepa y el patógeno evaluado ($P < 0.05$) (Tabla 1). La actividad antagonista se observó frente a *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium*. Mientras que, *E. coli* y *S. aureus* no fueron inhibidas por las ninguna de las cepas de *E. faecium*. La capacidad de *Enterococcus* de producir sustancias con poder antimicrobiano (ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, entre otros) es una de las características más buscadas

para su selección como probiótico (Samedi & Charles, 2019). Las enterocinas (bacteriocinas) son péptidos sintetizados por *Enterococcus* que se han identificado con bajo nivel de toxicidad y poder antimicrobiano contra microorganismo patógenos (Im *et al.*, 2023). Así mismo, las bacterias ácido-lácticas son capaces de neutralizar el crecimiento de patógenos a través de la producción de ácidos orgánicos que tienen la función de acidificar el entorno y producir la muerte celular de los patógenos (Zapašnik *et al.*, 2022). Dado el carácter antagonista de las cepas de *E. faecium* observado (Tabla 1), resulta relevante la identificación de los metabolitos que confiere esta propiedad como lo ha descrito Chino de la Cruz *et al.* (2023).

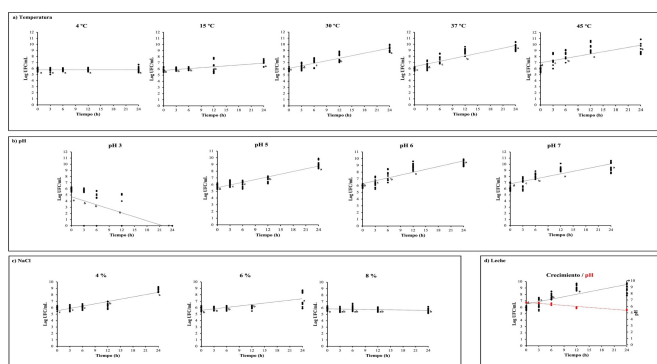


Figura 2. Curva de crecimiento de las cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del contenido intestinal de camarón frente a diferentes retos de temperatura (a), pH (b), salinidad (c) y acidificación y crecimiento en leche (d). Los valores son la media \pm desviación estándar de cuatro réplicas. Los valores seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes por una prueba de análisis de varianza ajustada de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$.

Algunos estudios han determinado que el potencial antagonista de bacterias ácido-lácticas puede ser limitado frente a ciertos patógenos. Generalmente, se ha descrito un poder antimicrobiano mejor para bacterias patógenas Gram positivas (Soleimani *et al.*, 2023), como se observó en este estudio (Tabla 1). No obstante, el poder antagonista de cepas de *E. faecium* aisladas de diversos orígenes han sido eficientemente probadas frente a patógenos humanos (Oussaief *et al.*, 2020; Ng *et al.*, 2020; Soleimani *et al.*, 2023), fitopatógenos (Naik *et al.*, 2023), y patógenos del camarón (Chino de la Cruz *et al.*, 2023). Por lo tanto, la propiedad antagonista del *E. faecium* lo perfila como potencial biopreservativo en la industria alimentaria (Zapašnik *et al.*, 2022) o agente terapéutico (Ng *et al.*, 2020; Chino de la Cruz *et al.*, 2023).

AUTOAGREGACIÓN, COAGREGACIÓN E HIDROFOBICIDAD

En el Tabla 1 se muestran los valores de autoagregación, coagregación e hidrofobicidad de *E. faecium* aislado del contenido intestinal de camarón. La capacidad de autoagregación (7.2 – 25.1%), coagregación (32.5 – 58.1%) e hidrofobicidad (2.5 – 15.2%) variaron según la cepa en estudio ($P < 0.05$).

Algunos autores han determinado que cepas de *E. faecium* aisladas de alimentos presentaron un grado de autoagregación que oscila de $\approx 16\%$ a 50% (Oussaief *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2023; Soleimani *et al.*, 2023). La autoagregación es una propiedad de adherencia de las bacterias para mantenerse juntas y formar un consorcio simbiótico que confiere protección al estrés ambiental y la respuesta del hospedero (Han *et al.*, 2023). La autoagregación está implicada en la formación de uniones de las bacterias ácido-lácticas con el epitelio intestinal, previniendo la adherencia de patógenos y mejorando la salud del hospedero (Collado *et al.*, 2008).

La coagregación es una propiedad que refiere la capacidad de adherencia de las bacterias ácido-lácticas con microorganismo patógenos para evitar su adherencia al epitelio del hospedero (Collado *et al.*, 2007). Soleimani *et al.* (2023) señalaron que cepas de *E. faecium* aislada de alimentos presentaron valores de coagregación que oscilaron entre 30% - 60%, siendo esta propiedad variante según el probiótico o patógeno. Estos valores coinciden con lo observado en este estudio, y propone a las cepas como agentes capaces de desplazar a bacterias patógenas.

La hidrofobicidad es considerada como una de las propiedades con mayor beneficio para el uso de las bacterias ácido-lácticas (Naik *et al.*, 2023). Esta característica es un indicativo de las propiedades de la pared celular para favorecer la adherencia y colonización de estas bacterias en las células epiteliales del hospedero (Han *et al.*, 2023). La literatura ha señalado que la hidrofobicidad es una propiedad no estable ($\approx 8.7\%$ a 94%) entre las bacterias ácido-lácticas, la cual depende de la cepa evaluada o el solvente empleado (Oussaief *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2023; Naik *et al.*, 2023).

CARACTERIZACIÓN DE SEGURIDAD SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS

Las cinco cepas de *E. faecium* fueron susceptibles a siete antibióticos del panel evaluado, y se clasificaron en un perfil de resistencia común:

Tabla 1. Potencial probiótico y tecnológico de las cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del contenido intestinal de camarón

Cepa	Proteólisis (mm)	Lipólisis (mm)	Antagonismo (mm)		Autoagregación (%)	Coagregación (%)			Hidrofobicidad (%)	
			Lm	Se		Sa	Lm	Ec		Se
1S	15.2 ± 1.8	16.5 ± 4.9	4.9 ± 2.3	2.4 ± 0.1 ^{ab}	25.1 ± 0.2 ^a	53.5 ± 1.7 ^a	46.3 ± 0.4 ^b	44.6 ± 0.3 ^c	51.4 ± 1.3 ^a	2.5 ± 0.6 ^e
2S	12.7 ± 1.5	15.3 ± 1.0	5.1 ± 1.8	2.7 ± 0.4 ^a	17.0 ± 1.8 ^b	53.0 ± 1.4 ^a	45.4 ± 0.0 ^b	49.7 ± 0.7 ^b	50.4 ± 1.6 ^a	4.0 ± 0.5 ^d
3S	14.1 ± 2.8	17.2 ± 1.5	5.0 ± 1.4	2.4 ± 0.3 ^{ab}	7.2 ± 0.2 ^d	50.0 ± 1.2 ^{ab}	52.1 ± 0.2 ^a	51.9 ± 0.2 ^a	28.2 ± 2.2 ^b	5.7 ± 0.7 ^c
4S	12.3 ± 1.9	17.8 ± 1.3	2.6 ± 1.4	1.2 ± 0.5 ^b	7.6 ± 0.6 ^d	57.1 ± 1.1 ^a	55.2 ± 0.3 ^a	43.1 ± 1.0 ^d	55.8 ± 0.8 ^a	15.2 ± 0.3 ^a
5S	12.6 ± 1.4	17.6 ± 3.7	3.8 ± 2.1	1.8 ± 0.4 ^b	14.3 ± 0.7 ^c	48.2 ± 2.2 ^b	32.5 ± 0.2 ^c	51.5 ± 0.2 ^a	49.9 ± 1.5 ^a	9.8 ± 0.2 ^b
P	0.372	0.828	0.647	0.034	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000

Los valores son la media ± desviación estándar de tres réplicas. Los valores seguidos de letras minúsculas diferentes son significativamente diferentes por una prueba de análisis de varianza ajustada de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$. El nombre de las bacterias utilizadas se representó con las siguientes siglas: *Listeria monocytogenes* (Lm), *Salmonella enterica* (Se), *Staphylococcus aureus* (Sa) y *Escherichia coli* (Ec).

Tabla 2. Actividad hemolítica y resistencia antimicrobiana de las cepas de *Enterococcus faecium* aisladas del contenido intestinal del camarón.

Cepa	Hemólisis	Resistencia antimicrobiana						IMR
		G	AK	S	NA	CAZ	CFP	
1S	γ							0.46
2S	γ							0.46
3S	γ							0.46
4S	γ							0.46
5S	γ							0.46

(γ): Hemólisis gamma. Las cepas de *E. faecium* se clasificaron según el mecanismo de resistencia: inhibidores de las rutas metabólicas (□), inhibidores de la síntesis de proteínas (▨), inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (■), e inhibidores de la síntesis de la pared celular (■). IMR: índice de multi-resistencia.

AK, NA, CAZ, G, S y CFP (**Tabla 2**). El perfil de resistencia observado en las cepas de estudio está asociado a mecanismos de inhibición de la síntesis de pared celular (cefalosporinas), proteínas (aminoglucósidos), ácidos nucleicos (quinolonas) y rutas metabólicas (sulfonamidas) (Reygaert, 2018). Las cepas presentaron un índice de multiresistencia de 0.46, lo que indica que la fuente de aislamiento se encuentra continuamente expuesta a antibióticos de acuerdo con los límites de resistencia reportados por Thenmozhi *et al.* (2014). Es reconocido el uso indiscriminado de los antibióticos en la acuicultura, y su impacto en el fenotipo de resistencia emergente en las bacterias (Amatul-Samahah *et al.*, 2020).

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana ha sido utilizada como herramienta que permite definir la evolución del fenotipo de resistencia de las bacterias ácido-lácticas, y valorar la seguridad de su uso (Im *et al.*, 2023). Particularmente, la resistencia a ampicilina, ácido nalidíxico, ceftriaxona, eritromicina, estreptomina, kanamicina, piperacilina/tazobactam y vancomicina ha sido descrita en cepas de *E. faecium* aisladas de diversas fuentes (Oussaief *et al.*, 2020; Naik *et al.*, 2023; Zaghoul *et al.*, 2023). Chino de la Cruz *et al.* (2023) identificaron genes relacionados con la resistencia a macrólidos, aminoglucósidos y tetraciclinas en el genoma de *E. faecium* aislada de camarón, lo cual es consistente con nuestras observaciones.

Algunos de los antibióticos que constituyen el fenotipo de resistencia de las cepas de estudio corresponde a cefalosporinas (CAZ y CFP), aminoglucósidos (AK y G) y sulfonamidas (G), los cuales se relacionan con una resistencia de origen intrínseco del género *Enterococcus* (Reygaert, 2018; Chino de la Cruz *et al.*, 2023). Esta cualidad favorece su potencial uso, dado el bajo riesgo de transmisión horizontal entre bacterias y su sobrevivencia en caso de un esquema terapéutico del hospedero (Oussaief *et al.*, 2020).

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Todas las cepas de *E. faecium* se clasificaron como γ -hemolíticas (Tabla 2). La seguridad de uso de cepas nativas como probióticos es uno de los aspectos más relevantes. La seguridad de cepas de *E. faecium* ha sido ampliamente debatida dado la dualidad de la bacteria para comportarse como patógeno o simbiote (Hanchi *et al.*, 2018; Zommiti *et al.*, 2022). Diversos métodos genotípicos y fenotípicos se han empleado para definir la virulencia de bacterias ácido-lácticas, incluyendo especies de *Enterococcus* (Oussaief *et al.*, 2020; Oruc *et al.*, 2021; Chino de la Cruz *et al.*, 2023; Soleimani *et al.*, 2023). Nuestros estudios son consistentes con

los de otros autores, quienes reportan la ausencia de hemólisis *in vitro* en cepas de *E. faecium* aisladas de diversos orígenes (Oussaief *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2023; Zaghoul *et al.*, 2023; Soleimani *et al.*, 2023). De Vuyst *et al.* (2004) han sustentado el uso seguro de cepas de *Enterococcus* como fermento de alimentos, dada la ausencia de la actividad hemolítica. La capacidad de hemólisis refiere la facultad de la bacteria para lisar los glóbulos rojos, por lo que la ausencia de esta propiedad en las cepas de estudio (**Tabla 2**) es al menos un indicador de su posible uso seguro.

CONCLUSIONES

El contenido intestinal del camarón es fuente de cepas *E. faecium* cuyas características fisiológicas permiten proponerlas como agentes con propiedades probióticas y tecnológicas que puedan favorecer al ambiente y la sustentabilidad de las prácticas acuícolas. Adicionalmente, la estabilidad de estas cepas frente a diferentes parámetros fisicoquímicos y la capacidad fermentativa permite proponerlas para el desarrollo de productos biotecnológicos que promuevan el crecimiento y la sanidad del camarón. Un aspecto relevante es la seguridad de uso de estas cepas, por ello la evaluación continua de la evolución de la resistencia antimicrobiana y la búsqueda intencionada de genes de virulencia son requeridos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico del personal del Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Microbiológico (LiDIM) de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

- Abdel-Latif, H. M. R., Dawood, M. A. O., Alagawany, M., Faggio, C., Nowosad, J., Kucharczyk, D. (2022). Health benefits and potential applications of fucoidan (FCD) extracted from brown seaweeds in aquaculture: An updated review. *Fish & Shellfish Immunology* 122, 115-130. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.01.039>.
- Amatul-Samahah, M. A., Haryani, W. H., Mohd, N. F., Amal, M. N., Zamri-Saad, M. & Ina-Salwany, M. Y. (2020). Vaccination trials against

- vibriosis in shrimp: A review. *Aquaculture Reports* 18(100471), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100471>
- Ammor, M. S. & Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science* 76, 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.022>.
- Angmo, K., Kumari, A. & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Science and Technology* 66, 428-435. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.057>
- Castañeda-Ruelas, G. M., Fajardo López, A. J., Berrios, J. J. & Mendoza-López, I. A. (2022). Growth yield and health benefit of farm shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed in a pre-fattening phase with a diet based on wheat (*Triticum sativum*) and chickpea (*Cicer arietinum*) enriched with spirulina (*Spirulina maxima*). *Veterinaria México OA* 9, 1-14. <https://doi.org/10.22201/fmvz.24486760e.2022.966>
- Chino de la Cruz C.M., Cornejo-Granados, F., Gallardo-Becerra, L., Rodríguez, M. E., Ochoa-Leyva, A. & López, A. (2023). Complete genome sequence and characterization of a novel *Enterococcus faecium* with probiotic potential isolated from the gut of *Litopenaeus vannamei*. *Microbial Genomics* 9, 1-15. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000938>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2016). Performance standards for antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty sixth Informational Supplement, M100-S26. CLSI, EUA.
- Collado, M. C., Meriluoto, J. & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology* 226, 1065-1073. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>
- De Vuyst, L., Foulquié, M. R. & Revest, H. (2004). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology* 84, 299-318. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00425-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00425-7).
- Gámez-Bayardo, S., Castañeda-Ruelas, G. M., Mora-Rochín, S., López-López, E., Valdez-González, F. J., Gutiérrez-Dorado, R. & Jiménez-Edeza, M. (2021). Nutraceutical potential of nejayote as a supplement to the conventional diet for feeding Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) infected with *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica* 9, 29-50.
- Grujović, M. Z., Mladenovic, K. G. & Comić, L. R. (2020). Tolerance of autochthonous lactic acid bacteria to different processing conditions in vitro. *Food and Feed Research* 47, 119-129. <https://doi.org/10.5937/ffr47-29426>.
- Hai, N. V. (2015). The use of probiotic in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology* 119, 917-935. <https://doi.org/10.1111/jam.1288>.
- Han, K., Park, S., Sathiyaseelan, A. & Wang, M. H. (2023). Isolation and characterization of *Enterococcus faecium* from fermented Korean soybean paste with antibacterial effects. *Fermentation* 9, 760. <https://doi.org/10.3390/fermentation9080760>
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K. & Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns – an update. *Frontiers in Microbiology* 9, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791>
- Im, E. J., Lee, H. H. Y., Kim, M. & Kim, M. K. (2023). Evaluation of *Enterococcal* probiotic usage and review of potential health benefits, safety, and risk of antibiotic-resistant strain emergence. *Antibiotics* 12, 1327. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081327>
- Imaizumi, K., Tinwongger, S., Kondo, H. & Hirono, I. (2021). Analysis of microbiota in the stomach and midgut of two penaeid shrimps during probiotic feeding. *Scientific Reports* 11, 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89415-w>
- Krumperman, P. H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 165-170. <https://doi.org/10.1128/aem.46.1.165-170.1983>
- Lane, D. J. (1991). "16S/23S rRNA sequencing," in *Nucleic acid Technique sin Bacterial Systematics*, eds E. Stackebrandt and M. Goodfellow. John Wiley and Sons, EUA.
- Lee, D., Yu, Y. B., Choi, J. H., Jo, A. H., Hong, S. M., Kang, J. C. & Kim, J. H. (2022). Viral shrimp diseases listed by the OIE: a review. *Viruses* 14, 1-62. <https://doi.org/10.3390/v14030585>
- Meng, Z., Zhang, L., Xin, L., Lin, K., Yi, H. & Han, X. (2018). Thecnological characterization of *Lactobacillus* in semihard artisanal goat cheeses from different Mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science* 101, 2887-2896. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14003>.

- Mohd, M. I., Nur, S., Najeeb, N. A., Fahd, A. A. & Mohd, S. K. (2020). Evaluation of antibacterial potential of biosurfactant produced by surfactin-producing *Bacillus* isolated from selected Malaysian fermented foods. *Food Biotechnology* 34, 1-24. <https://doi.org/10.1080/08905436.2019.1710843>.
- Moslehishad, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M. R., Ezzatpanah, H. & Moosavi-Movahedi, A. A. (2013). The proteolytic activity of selected lactic acid bacteria in fermenting cow's and camel's milk and the resultant sensory characteristics of the products. *International Journal of Dairy Technology* 66, 279-285. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12017>.
- Naik, P. M. K., Naik, R. G., Naik, B. G., Nandish, M. S., Ekabote, S. D. & Sreenivasa, M. Y. (2023). Investigation on antibacterial, probiotic and plant growth promoting attributes of *Enterococcus faecium* MYSBC14 from blue cherry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 22, 439-448. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2023.04.003>.
- Ng, J. Z., Zarin, M. A., Lee, C. K., Phapugrangkul, P. & Tan, J. S. (2020). Isolation and characterization of *Enterococcus faecium* DSM 20477 with ability to secrete antimicrobial substance for the inhibition of oral pathogen *Streptococcus mutans* UKMCC 1019. *Archives of Oral Biology* 110, 104617. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104617>
- Ninawe, A. S., Sivasankari, S., Ramasamy, P., Seghal, G. & Selvin, J. (2020). Bacteriophage for aquaculture disease control. *Aquaculture International* 28, 1925-1938. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00567-4>.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2022). Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Disponible en: <https://www.fao.org/3/cc0461es/online/sofia/2022/world-fisheries-aquaculture.html>. 07 de septiembre, 2024.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. Disponible en: <https://www.fao.org/3/ca9229es/ca9229es.pdf>. 07 de septiembre, 2024.
- Oruc, O., Cetin, O., Darilmaz, D. O. & Yüsekdog, Z. (2021). Determination of the biosafety of potential probiotic *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from traditional white cheeses. *LWT – Food Science and Technology* 148, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111741>
- Oussaief, O., Jrad, Z., Sbissi, I., Nara, W., Khorchani, T. & Et-Halmi., H. (2020). *Journal of Food Process Preservation* 44, e14685. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14685>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *Microbiology* 4, 482-501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Sagiroglu, A., Özdemir N. & Çon, A. H. (2022). Multifunctional potentials of lactic acid bacterial isolates from Turkish traditional fermented foods. *Letters in Applied Microbiology* 76, 1-14. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovac012>
- Samedi, L. & Charles, A. L. (2019). Evaluation of technological and probiotic abilities of local lactic acid bacteria. *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 7, 9-19. <https://doi.org/10.12691/jaem-7-1-3>.
- Santos, T. T., Ornellas, R. M. S., Arcucio, L. B., Oliveira, M. M., Nicoli, J. R., Dias, C. V., Trovatti, A. P. & Vinderola, G. (2016). Characterization of lactobacilli strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. *LWT - Food Science and Technology* 73, 259-266. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.003>
- Soleimani, H., Shokri, R., Nami, Y., Khandaghi, J. & Panahi, B. (2023). Potential probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from Duimaj, an Iranian traditional snack food, using biochemical, molecular and computational approaches. *LWT* 184, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115091>.
- Terzic-Vidojevic, A., Veljovic, K., Popovic, N., Tolinacki, M. & Golic, N. (2021). *Enterococci* from raw-milk cheeses: current knowledge on safety, technological, and probiotic concerns. *Foods* 10, 2753. <https://doi.org/10.3390/foods10112753>
- Thenmozhi, S., Rajeswari, P., Suresh, T., Saipriyanga, V. & Kalpana, M. (2014). Multi-drug resistant patterns of biofilm forming *Aeromonas hydrophila* from urine samples. *International Journal of Pharmacy Science Research* 5, 2908-2918. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(7\).2908-18](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(7).2908-18)
- Wikumpriya, G. C., Prabhatha, M. W. S., Lee, J., Kim, C. H. (2023). Epigenetic modulations for prevention of infectious diseases in shrimp aquaculture. *Genes* 14, 1-26. <https://doi.org/10.3390/genes14091682>

- Zaghloul, E. H., Abuohashish, H. M., El Sharkawy, A. S., Abbas, E. M., Ahmed, M. M. & Al-Rejaie, S. S. (2023). Probiotic potential of the marine isolate *Enterococcus faecium* EA9 and in vivo evaluation of its antiseptis action in rats. *Marine Drugs* 21, 2-19. <https://doi.org/10.3390/md21010045>
- Zapaśnik, A., Sokołowska, B. & Bryła, M. (2022). Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. *Foods* 11, 1283. <https://doi.org/10.3390/foods11091283>.
- Zommiti, M., Chevalier, S., Feuilleley, M. G. & Connil, N. (2022). Special Issue "Enterococci for Probiotic Use: Safety and Risk": Editorial. *Microorganisms* 10, 604. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030604>

Desarrollo y optimización de películas comestibles de almidón de maíz incorporando aceite esencial de citronela y nanopartículas de calcio

Development and optimization of edible corn starch films incorporating citronella essential oil and calcium nanoparticles

Calderón-Castro, A.^{1*}, Ahumada-Meza, J.A.¹, Limón-Valenzuela, V.¹, Aguilar-Palazuelos, E.¹, Fitch-Vargas, P.R.², Delgado-Nieblas, C.I.¹, López-Díaz, A.¹, Camacho-Hernández, I.L.¹, Ruiz-Armenta, X.A.¹, Jacobo-Valenzuela, N.¹

¹Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa, Cd. Universitaria, Av. de las Américas y Josefa Ortiz S/N, 80010, Culiacán, Sin., México. ²Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa, Paseo Claussen S/N, Col. Los Pinos, 82000, Mazatlán, Sinaloa, México.

RESUMEN

Las películas comestibles (PCs) son capas delgadas de materiales orgánicos biodegradables que sirven como alternativa a los envases plásticos. Estas películas pueden basarse en proteínas, polisacáridos o lípidos. El almidón se destaca como material base debido a su capacidad para formar una barrera efectiva contra algunos gases, además de su alta solubilidad y flexibilidad. Para mejorar sus propiedades funcionales, se añaden compuestos como el aceite de citronela (AC), que ofrece propiedades hidrofóbicas y antimicrobianas, y nanopartículas de carbonato de calcio (NPCC), que refuerzan las propiedades mecánicas de las películas. Este estudio tuvo como objetivo formular PCs con almidón de maíz nativo, AC y NPCC, y evaluar sus propiedades funcionales. Se realizó en dos etapas: en la primera, se elaboraron las PCs mediante la técnica de casting, evaluando diferentes concentraciones de AC (0-2%) y NPCC (0-2%) en permeabilidad al vapor de agua (PVA), solubilidad en agua (S), resistencia a la tracción (σ), elongación (ϵ) y módulo de Young (E). En la segunda etapa, se optimizó la formulación utilizando el método numérico de superficie de respuesta. Los resultados mostraron que un aumento en AC disminuyó PVA, S, σ y E, pero aumentó ϵ . Por otro lado, un aumento en NPCC redujo PVA y S ligeramente, pero aumentó E y σ , y disminuyó ϵ . Las condiciones óptimas de procesamiento fueron 1.38% de AC y 1.71% de NPCC, indicando que logran un balance entre propiedades funcionales, lo que sugiere que son una alternativa prometedora a los envases plásticos en la industria alimentaria.

Palabras clave: Almidón, Propiedades Funcionales, Optimización, Superficie de Respuesta

ABSTRACT

Edible films (EFs) are thin layers of biodegradable organic materials that serve as an alternative to plastic packaging. These films can be made from proteins, polysaccharides, or lipids, with starch being the major material due to its ability to form effective barriers against gases, along with its high solubility and flexibility. To enhance their functional properties, substances such as citronella oil (AC) are incorporated, providing hydrophobic characteristics, while calcium carbonate nanoparticles (NPCC) reinforce the mechanical properties of the films. This study aimed to formulate EFs using native corn starch, AC, and NPCC, and to evaluate their functional properties. It was conducted in two stages: firstly, the EFs were prepared using the casting technique, assessing different concentrations of AC (0-2%) and NPCC (0-2%) for water vapor permeability (PVA), water solubility (S), tensile strength (σ), elongation (ϵ), and Young's modulus (E). In the second stage, the formulation was optimized using a numerical response surface method. The results indicated that increasing citronella oil decreased WVP, WS, σ , and E values, however ϵ was increased. On the other hand, increasing calcium carbonate nanoparticles slightly reduced WVP and WS but enhanced E and σ , while decreasing ϵ . The optimal processing conditions were 1.38% AC and 1.71% NPCC, achieving a suitable balance between functional properties. This suggests that the edible films are a promising alternative to plastic packaging in the food industry.

Keywords: Starch, Functional Properties, Optimization, Response Surface

*Autor de correspondencia: Abraham Calderón Castro

E-mail: abcalcas@uas.edu.mx ORCID ID: [0000-0001-6652-5705](https://orcid.org/0000-0001-6652-5705)

Revista online: <https://revistas.uas.edu.mx/index.php/QBU/index>

INTRODUCCIÓN

El proceso de envasado resulta ser una parte fundamental de la industria alimentaria, ya que permite preservar la frescura y las propiedades del producto durante su transporte y hasta su consumo. Los tipos de envases más utilizados para este fin son los plásticos (representando alrededor del 70% del total de envases utilizados a nivel mundial), sin embargo, su falta de biodegradabilidad y su origen derivado de materiales no renovables presentan desafíos ambientales significativos (Hammam, 2019).

Además, la interacción de ciertos plásticos con los alimentos puede provocar la liberación de compuestos que pueden afectar la salud humana al consumir dichos productos. Por lo tanto, la industria alimentaria ha buscado innovar en el desarrollo de envases biodegradables y películas comestibles (PCs) como una propuesta resolutoria ante los problemas antes planteados (Aguilar-Palazuelos *et al.*, 2023).

La investigación en biopelículas y recubrimientos a partir de polímeros orgánicos de grado alimenticio está en crecimiento. Estas películas refuerzan los alimentos, previenen la pérdida de humedad y permiten un intercambio controlado de gases. Además, facilitan la liberación de ingredientes activos, como vitaminas y antimicrobianos, mejorando la protección y vida útil del producto, así como mantienen la frescura y reducen la pérdida de aroma y color durante el almacenamiento (Dhumal & Sarkar, 2018).

En la fabricación de PCs, el almidón nativo se destaca como un material orgánico muy utilizado, debido a que ofrece propiedades similares a las de los polímeros sintéticos utilizados en envases de alimentos, como transparencia y ausencia de olor y sabor. Sin embargo, una desventaja es su menor resistencia a la humedad, lo que puede limitar su eficacia en entornos húmedos y reducir su vida útil en ciertos productos alimenticios (Lescano *et al.*, 2021; Aguilar-Palazuelos *et al.*, 2023).

Para mejorar las propiedades de las PCs y superar algunas de estas limitaciones, se pueden añadir componentes específicos que aporten características adicionales. Un ejemplo es el aceite de citronela (AC), conocido por sus efectos antimicrobianos, antifúngicos y antivirales. Este aceite no solo contribuye a la conservación de los alimentos al inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados. Asimismo, se ha demostrado que el AC posee propiedades antioxidantes, lo que puede

ayudar a proteger los alimentos contra la oxidación y el deterioro (Wen-Ru *et al.*, 2013; Kumoro *et al.*, 2021).

Además de estos componentes, las nanopartículas de carbonato de calcio (NPCC) resultan altamente beneficiosas en las PCs a base de almidón. Estas nanopartículas no solo mejoran las propiedades estructurales, como la resistencia y durabilidad, sino que también incrementan la funcionalidad general de la película. Aunque algunas NPCC ya se utilizan comercialmente en productos alimentarios y farmacéuticos, su inclusión en las PCs sigue siendo objeto de investigación para optimizar sus beneficios específicos en este tipo de materiales (Limón-Valenzuela *et al.*, 2022; Gómez-Álvarez & Zapata-Montoya, 2024).

Para maximizar el potencial de los componentes en las PCs de almidón, la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) es fundamental. La MSR optimiza la formulación y procesamiento al evaluar el impacto de variables como la concentración de almidón y los aditivos. Utiliza técnicas estadísticas para identificar combinaciones que mejoran propiedades críticas como la resistencia a la humedad y la actividad antimicrobiana. Al analizar interacciones entre componentes, la MSR ayuda a desarrollar materiales más efectivos y sostenibles, respondiendo a la creciente demanda de soluciones ecológicas en la industria alimentaria (Calderón-Castro *et al.*, 2019; Limón-Valenzuela *et al.*, 2022). Por lo tanto, este estudio tuvo el objetivo de formular PCs a partir de almidón nativo, AC y NPCC, optimizando sus propiedades funcionales mediante MSR.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Para la elaboración de las PCs se utilizó almidón de maíz nativo (*Zea mays* L.) con una relación amilosa:amilopenctina de 25:75% (pH = 5.5, Humedad = 12.5%) proporcionado por Ingredion (Jalisco, México); glicerol anhídrido suministrado por JT Baker® (Pa., Estados Unidos), aceite esencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) adquirido en Aceites y Esencias, S.A. (Ciudad de México, México) y NPCC (SkySpring Nanomaterials, Inc., Texas, Estados Unidos).

MÉTODOS

ELABORACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES

Las PCs se elaboraron mediante la técnica de *casting*, siguiendo la

metodología descrita de Calderón-Castro *et al.* (2018). La **Tabla 1** muestra el diseño experimental utilizado para la elaboración de las PCs a partir de almidón de maíz, considerando el aceite de citronela (AC) y las nanopartículas de carbonato de calcio (NPCC) en concentraciones de 0.0% a 2.0%, como factores de estudio. El número de tratamientos se definió utilizando un diseño compuesto central rotatable de segundo orden, con $\alpha = 1.414$.

Se preparó una suspensión de almidón de maíz al 5% p/v (5 g en 100 mL de agua destilada), a la que se añadieron NPCC y AC en las concentraciones especificadas. Las suspensiones se mezclaron durante 10 min a 700 rpm en un agitador magnético a temperatura ambiente (25 °C) para asegurar una homogeneidad adecuada en la mezcla inicial. Posteriormente, se calentaron hasta alcanzar 80 °C (temperatura elegida para facilitar la gelatinización del almidón, lo que mejora su capacidad de formación de película), momento en el cual se incorporó el glicerol (20 %). Se vertieron 25 ± 1 mL de la solución en moldes de acrílico (144 cm²) y se secaron en un horno de convección (Modelo DKN402C) a 50 °C durante 5 ± 0.5 h. Esta temperatura se seleccionó para facilitar la evaporación controlada del agua, minimizando la formación de burbujas y asegurando una textura uniforme en las películas, mientras que el tiempo de secado permite una deshidratación adecuada que previene la formación de películas frágiles. El espesor de las PCs se midió con un micrómetro digital (Digital Insize, Modelo 3109-25 A, España), obteniendo valores de 50 ± 5 µm. Finalmente, las películas se almacenaron en un recipiente con una solución saturada de Mg(NO₃)₂·6H₂O para mantener una humedad relativa (HR) del 53%.

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS

Se evaluaron las propiedades mecánicas de las PCs mediante la resistencia a la tracción (σ) (MPa) y la elongación (ϵ) (%), siguiendo las directrices de la ASTM D882-02 utilizadas por Fitch-Vargas *et al.* (2024). Se utilizó un analizador de textura universal (INSTRON 3342) a una velocidad de deformación de 1 mm s⁻¹. Las PCs se cortaron en tiras de 100 mm de largo y 15 mm de ancho, con una sección de prueba de 50 mm, realizando veinte repeticiones para cada tratamiento.

PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (PVA)

La PVA de las PCs se determinó gravimétricamente a 25 °C, según el método de Fitch-Vargas *et al.* (2016). Se utilizaron frascos de vidrio con áreas registradas de 0.0032 m², y se añadieron 15 g de cloruro de calcio

granular (JT Baker®, Center Valley, EE. UU.). Las PCs se colocaron sobre el borde superior de cada frasco y se aseguraron con parafilm. Luego, las muestras se ubicaron en un desecador (Dry Keeper, Sanplatec Corp., Osaka, Japón) con una solución saturada de cloruro de sodio para generar una humedad relativa del 75%. El aumento de peso del cloruro de calcio se registró cada 12 h durante 4 días en quintuplicado hasta alcanzar el equilibrio. Con estos datos se generó un gráfico de aumento de peso versus tiempo para determinar la tasa de permeabilidad (Mp/t) mediante análisis de regresión. La PVA se calculó con la ecuación 1:

$$PVA = (M_p \cdot E) / (A \cdot t \cdot \Delta p) \quad (1)$$

Dónde: PVA= Permeabilidad al vapor de agua (g m Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻²); Mp = masa de humedad absorbida (g); E = espesor de la película (m); A = área de la superficie expuesta de la película (m²); t = tiempo (s); Δp = diferencia de presión parcial a través de la película (3169.9 Pa).

SOLUBILIDAD EN AGUA (S)

La solubilidad en agua (S) se determinó siguiendo la metodología de Chiumarelli & Hubinger (2014). Donde, S se expresó como el porcentaje de material disuelto, y se calculó usando la ecuación 2:

$$S = (m_i - m_f) / (m_i) 100 \quad (2)$$

Donde: S = solubilidad en agua (%), m_i = peso inicial de la muestra (g), y m_f = peso final de la muestra (g).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó un modelo de segundo orden con dos factores para predecir el comportamiento experimental, según la ecuación 3:

$$y_i = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_1^2 x_1^2 + b_2^2 x_2^2 + b_1 b_2 x_1 x_2 \quad (3)$$

Donde: y_i = la respuesta genérica, b_i = coeficientes de regresión, x₁ = AC y x₂ = NPCC. El análisis de datos experimentales se realizó mediante la metodología de superficie de respuesta utilizando el software Design Expert® versión 8 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, Estados Unidos), para explorar las relaciones entre estos factores y la respuesta global. Se llevó a cabo una optimización numérica de las variables de respuesta para identificar las condiciones óptimas de AC y NPCC que permitieran obtener películas con propiedades mecánicas y de barrera deseadas. Se establecieron varios criterios para cada variable de respuesta (**Tabla 2**): maximizar la σ y la ϵ para asegurar que las PCs sean fuertes, duraderas

Tabla 1. Diseño experimental y resultados para combinaciones de AC y NPCC en la elaboración de PCS de almidón de maíz

Tratamiento*	Variables independientes			Variables dependientes			
	AC	NPCC	S	PVA	σ	ϵ	E
	(%)	(%)	(%)	($\text{g m s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}$)	(MPa)	(%)	(MPa)
1	0.29	0.29	25.66	7.44×10^{-11}	4.98	1.98	452.66
2	1.71	0.29	19.85	5.35×10^{-11}	8.81	0.88	747.87
3	0.29	1.71	14.69	4.09×10^{-11}	2.72	3.09	256.59
4	1.71	1.71	10.30	1.01×10^{-11}	7.40	2.64	466.64
5	0.00	1.00	19.27	5.03×10^{-11}	4.09	2.28	188.64
6	2.00	1.00	10.60	1.90×10^{-11}	9.06	1.28	737.90
7	1.00	0.00	35.84	8.90×10^{-11}	8.51	1.19	698.02
8	1.00	2.00	10.99	2.00×10^{-11}	5.16	3.34	387.36
9	1.00	1.00	14.74	4.16×10^{-11}	7.91	1.73	493.45
10	1.00	1.00	17.67	3.66×10^{-11}	8.05	1.51	604.23
11	1.00	1.00	18.75	4.72×10^{-11}	7.48	1.56	516.17
12	1.00	1.00	18.38	4.12×10^{-11}	8.37	2.00	552.77
13	1.00	1.00	15.09	3.56×10^{-11}	7.55	1.97	541.19

*Orden estándar, AC = Aceite de citronela, NPCC = Nanopartículas de carbonato de calcio, S = Solubilidad en agua, PVA = Permeabilidad al vapor de agua, σ = Resistencia a la tracción, ϵ = Elongación, E = Módulo de Young.

y flexibles; minimizar la PVA para prevenir la transferencia de humedad; y minimizar la S para garantizar estabilidad en diversas condiciones (Calderón-Castro *et al.*, 2018).

Mediante el software se determinó la deseabilidad individual y la deseabilidad global se determinó mediante la ecuación 4:

$$DG = (d_1 d_2 \dots d_m)^{1/m} \quad (4)$$

donde: d_1 representa la deseabilidad de las respuestas independientes y m es el número de respuestas. Finalmente, las PCs se prepararon utilizando las condiciones optimizadas para validar los modelos empleados, realizando los experimentos por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PROPIEDADES DE BARRERA

SOLUBILIDAD EN AGUA (S)

La S en las PCs es necesaria para el envasado de alimentos. Se prefiere que las películas tengan baja S para evitar la pérdida de calidad del alimento debido a la sensibilidad al agua (Silva *et al.*, 2019).

Acorde al análisis realizado, el modelo de S obtuvo un valor de $R^2_{ajustada} = 0.8609$, coeficiente de variación (CV) = 14.48%, desviación estándar (DE) = 2.58 unidades, p de $F < 0.01$ y no presentó falta de ajuste ($p > 0.05$), tal como se muestra en la **Tabla 3**.

Los valores de S de las PCs desarrolladas en este estudio varían entre 10.30% y 35.84%. Estos resultados son indicativos de una buena resistencia a la disolución en contacto con el agua, lo cual es esencial para mantener la integridad del envase hasta el momento de consumo (Wongphan & Harnkarnsujarit, 2020). En comparación con otros estudios, los valores obtenidos son competitivos. Silva *et al.* (2019) reportaron una S que oscila entre $10 \pm 2\%$ y $23 \pm 4\%$ en películas elaboradas con gelatina, quitosano y almidón de yuca, lo que sugiere un rendimiento similar en términos de resistencia a la disolución. Por otro lado, Choque-Quispe *et al.* (2021) encontraron valores de S que van de 19.77% a 54.08% en películas a base de almidón de papa, mucilago de nopal y glicerol, lo que indica que estas formulaciones son más solubles y, por lo tanto, menos efectivas para mantener la integridad del envase.

Limón-Valenzuela *et al.* (2022) reportaron valores de S entre 23.97% y 43.48% para películas de almidón de maíz con nanopartículas de carbonato de calcio (NPCC), utilizando un menor porcentaje de NPCC en su formulación (0 – 1%). Esto sugiere que, a pesar de la menor concentración, sus películas aún presentan una S que se asemeja a los hallazgos de este estudio, destacando la efectividad de las formulaciones en cuanto a la resistencia a la disolución.

La **Figura 1a** muestra cómo varía el comportamiento de la S en las películas de almidón de maíz nativo, AC y NPCC en función del contenido de estos últimos componentes. Se observa que la S disminuyó ligeramente con el aumento de NPCC y disminuyó notablemente al incrementar AC. La reducción de S al incrementarse los niveles de NPCC se pueden deber a la formación de una matriz más cohesiva que dificulta la disolución en agua, como indicaron Sun *et al.* (2014) y Limón-Valenzuela *et al.* (2022). Por su parte, el porcentaje de AC aumenta la hidrofobicidad de la película, reduciendo S, posiblemente al homogenizar la matriz y limitar la interacción con el agua, como mencionan Corrêa-Vianna *et al.* (2021) y Singh *et al.* (2022). Por otro lado, Cao *et al.* (2017) observaron que la adición de aceite esencial de borraja redujo S de 38.70% a 31.11%, mientras que Song *et al.* (2017) reportaron una reducción de solubilidad similar al añadir aceite esencial de limón a películas de almidón de trigo, debido a la formación de una capa externa que limita la difusión del agua.

PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (PVA)

La PVA es una propiedad importante en las PCs ya que determina la difusión de agua del ambiente al producto alimenticio y viceversa. Los

envases empleados como envoltorios de productos deben controlar la pérdida de agua del producto al ambiente, para prevenir la deshidratación del producto y afectar así, su calidad. Por otro lado, deben evitar la absorción del agua del ambiente por el producto, porque ello genera un incremento en la humedad que facilita el deterioro de este (Kong *et al.*, 2022).

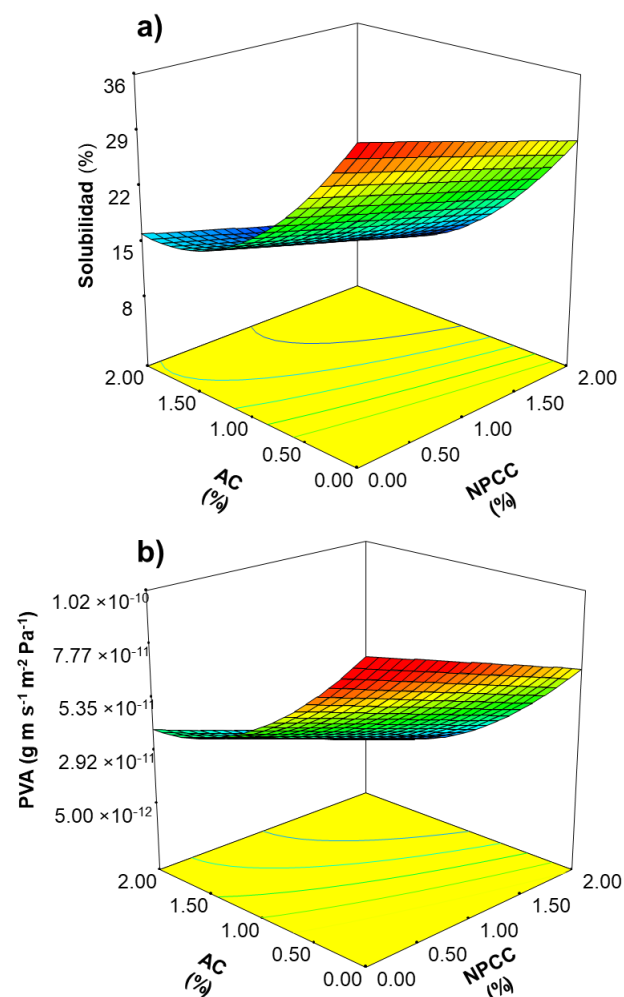


Figura 1. Efecto del contenido del AC y de las NPCC sobre las propiedades de barrera de las PCs: a) Solubilidad en agua, b) Permeabilidad al vapor de agua.

Acorde al análisis realizado, el modelo de la PVA obtuvo un valor de $R^2_{ajustada} = 0.9457$, $CV = 11.65\%$, $DE = 5.01 \times 10^{-12}$, p de $F < 0.01$ y no presentó falta de ajuste ($p > 0.05$), tal como se muestra en la **Tabla 3**.

En este estudio, se han obtenido valores de PVA que oscilan entre 1.01×10^{-11} y 8.90×10^{-11} $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{Pa}^{-1}$. Estos resultados son significativos,

Tabla 2. Criterios y límites para la optimización.

Nombre	NPCC (%)	AC (%)	S (%)	PVA (g m s ⁻¹ m ⁻² Pa ⁻¹)	σ (MPa)	ε (%)	E (MPa)
Objetivo	Rango	Rango	Mínimo	Mínimo	Máximo	Máximo	Máximo
Límite inferior	0	0	10.29	1.01×10 ⁻¹¹	2.72	0.87	188.64
Límite superior	2	2	35.84	8.90×10 ⁻¹¹	9.06	3.33	747.87
Importancia	3	3	3	3	1	1	1
Peso	1	1	1	1	1	1	1

NPCC = Nanopartículas de carbonato de calcio, AC = Aceite de citronela, S = Solubilidad en agua, PVA = Permeabilidad al vapor de agua, σ = Resistencia a la tracción, ε = Elongación, E = Módulo de Young.

Tabla 3. Coeficientes de regresión y análisis de varianza de los modelos de las variables de respuesta para la elaboración películas comestibles.

	S (%)	PVA (g m s ⁻¹ m ⁻² Pa ⁻¹)	σ (MPa)	ε (%)	E (MPa)
Intercepto	+35.84	+1.01 ×10 ⁻¹⁰	+3.55	+1.82	+446.44
AC	-21.98 (< 0.05)	-6.04 ×10 ⁻¹¹ (< 0.05)	+1.31 (< 0.05)	-0.08 (< 0.05)	-162.04 (< 0.05)
NPCC	-3.97 (< 0.05)	-1.69 ×10 ⁻¹¹ (< 0.05)	+6.06 (< 0.05)	-0.52 (< 0.05)	+226.63 (< 0.05)
AC²	+6.07 (< 0.05)	+1.48 ×10 ⁻¹¹ (< 0.05)	-1.40 (< 0.05)	+0.56 (< 0.05)	NS (> 0.05)
NPCC²	NS (> 0.05)	NS (> 0.05)	-1.65 (< 0.05)	NS (> 0.05)	NS (> 0.05)
R² ajustada	0.8609	0.9457	0.9323	0.9244	0.8845
CV (%)	14.48	11.65	7.55	10.24	11.25
DE	2.58	5.01×10 ⁻¹²	0.52	0.20	57.51
Valor F	25.76	70.63	42.29	49.92	46.94
P de F	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Falta de ajuste	0.1876	0.4052	0.1498	0.6998	0.1996

AC = Aceite de citronela, NPCC = Nanopartículas de carbonato de calcio, S = Solubilidad en agua, PVA = Permeabilidad al vapor de agua, σ = Resistencia a la tracción, ε = Elongación, E = Módulo de Young, NS = No significativo.

ya que tener valores de PVA bajos es fundamental para garantizar la calidad y frescura de los productos alimenticios (Al-Hashimi *et al.*, 2020). Los resultados obtenidos son comparables a los reportados por Limón-Valenzuela *et al.* (2022), quienes encontraron valores de PVA entre 0.87×10^{-11} y 3.39×10^{-11} g m s⁻¹ m⁻² Pa⁻¹ en películas elaboradas con almidón de maíz y NPCC. Asimismo, coinciden con los datos de Ghasemlou *et al.* (2013), que registraron valores de PVA de 3.37 a 7.79×10^{-11} g m s⁻¹ m⁻² Pa⁻¹ en películas de almidón de maíz con aceites esenciales de *Zataria multiflora Boiss* y *Mentha pulegium*. No obstante, estos resultados son inferiores a los reportados por Pirouzifard *et al.* (2020), quienes hallaron valores de PVA entre 5.58×10^{-11} y 9.53×10^{-11} g m s⁻¹ m⁻² Pa⁻¹ en películas de almidón de papa reforzadas con goma zedo y aceites esenciales de salvia. También son menores que los de Sun *et al.* (2014), que reportaron valores de PVA entre 1.58 y 5.36×10^{-10} g m s⁻¹ m⁻² Pa⁻¹ para películas que combinan almidón de maíz, glicerol y nanopartículas de carbonato cálcico.

La **Figura 1b** ilustra cómo varía la PVA en las películas elaboradas con almidón de maíz nativo, AC y NPCC. Se observa que el aumento en el contenido de NPCC provocó una ligera disminución en la PVA, mientras que la incorporación de AC redujo significativamente la PVA. Según Sun *et al.* (2014), las nanopartículas de calcio contribuyen a una estructura más densa y homogénea en la película, mejorando la interconexión entre las moléculas del polímero y dificultando el paso de vapor de agua. Además, las NPCC, siendo más hidrofóbicas que el almidón, también pueden limitar la difusión de moléculas de agua. Por otro lado, el AC, al ser un componente hidrofóbico, reduce la tensión superficial de la película, lo que dificulta aún más la difusión de agua a través de ella (Song *et al.*, 2017; Al-Hashimi *et al.*, 2020).

PROPIEDADES MECÁNICAS

RESISTENCIA A LA TRACCIÓN (σ)

Acorde al análisis realizado, el modelo de σ obtuvo un valor de $R^2_{ajustada} = 0.9323$, CV = 7.55%, DE = 0.52, p de F < 0.01 y no presentó falta de ajuste (p > 0.05), tal como se muestra en la **Tabla 3**.

La σ de una película, que define el máximo estrés que puede soportar antes de romperse, está influenciada por la estructura química del polímero. Películas con polímeros de alto peso molecular y alta cristalinidad muestran mejor resistencia a la tracción en comparación con aquellas con polímeros de bajo peso molecular y baja cristalinidad (Kong *et al.*, 2022; Shah *et al.*, 2023).

Los resultados de σ obtenidos en este estudio, que varían entre 2.72 y 9.06 MPa, son comparables con los reportados en varios estudios previos, donde también se observaron altos valores de σ . Por ejemplo, Al-Hashimi *et al.* (2020) encontraron valores similares, de 4.40 a 8.60 MPa, para películas de almidón de mijo con aceite esencial de clavo. Silva *et al.* (2019) reportaron rangos similares, de 2.09 a 8.76 MPa, para películas elaboradas a partir de gelatina, quitosano y almidón de yuca.

En contraste, los trabajos de Pirouzifard *et al.* (2020) y Dos Santos-Caetano *et al.* (2018) reportaron valores inferiores. Pirouzifard *et al.* hallaron σ entre 1.62 y 4.72 MPa en películas de almidón de papa reforzadas con goma zedo y aceites esenciales de salvia, mientras que Dos Santos-Caetano *et al.* encontraron valores de 0.32 a 1.74 MPa en películas de almidón de yuca con aceites esenciales.

La **Figura 2a** muestra que la σ de las películas hechas con almidón de maíz nativo, AC y NPCC varió según la composición. Aumentos en el contenido de NPCC incrementaron σ , lo cual se atribuye a la distribución uniforme de las nanopartículas en la matriz de la película, que mejora la rigidez al reducir la movilidad del polímero (Sun *et al.*, 2014; Limón-Valenzuela *et al.*, 2022). En contraste, un aumento en la cantidad de AC disminuye σ , ya que los aceites esenciales pueden generar heterogeneidad en la matriz de la película, lo que tiende a reducir las interacciones intermoleculares y por lo tanto aumentar la flexibilidad (Do Evangelho *et al.*, 2019; Corrêa-Vianna *et al.*, 2021).

ELONGACIÓN (E)

La ϵ es la capacidad de la película para soportar cambios deformantes sin romperse. Es un indicativo de la flexibilidad de la película y está relacionada con la composición química de la película. Esta propiedad queda determinada por la fuerza de interacción molecular y la estructura interna de las PCs (Singh *et al.*, 2022; Shah *et al.*, 2023).

De acuerdo con el análisis realizado, el modelo para la ϵ mostró un valor de $R^2_{ajustada}$ de 0.9244, un CV de 10.24%, una DE de 0.20 y un valor p de F < 0.01. Además, no se detectó falta de ajuste en el modelo (p > 0.05), como se presenta en la **Tabla 3**.

En este estudio, los valores de ϵ oscilaron entre 0.88% y 3.34%. Estos resultados fueron superiores a los reportados por Dos Santos-Caetano *et al.* (2018), quienes encontraron valores de ϵ de 0.32% a 1.74% en películas de quitosano y almidón de yuca. También son más altos que los obtenidos por Pirouzifard *et al.* (2020), que reportaron valores de ϵ de 1.62% a 4.72% en películas de almidón de papa reforzadas con goma

zedo y aceites esenciales de salvia. Estos hallazgos sugieren que las formulaciones y los tipos de plastificantes utilizados influyen significativamente en las propiedades de ϵ de las PCs.

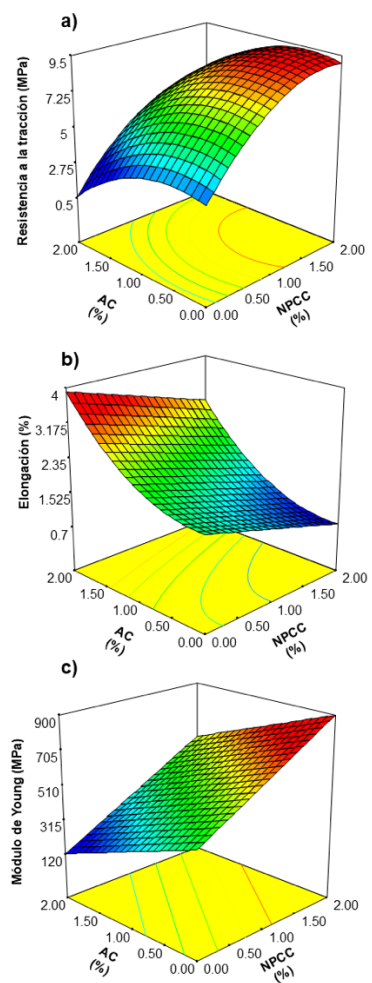


Figura 2. Efecto del contenido del AC y de las NPCC sobre las propiedades mecánicas de las PCs: a) Resistencia a la tracción, b) Elongación, c) Módulo de Young.

En La **Figura 2b** se observa que un aumento en la concentración de NPCC redujo ϵ , mientras que un incremento en la cantidad de AC aumentó los valores de ϵ en las PCs. La reducción de ϵ con NPCC se puede deber a su distribución uniforme en la matriz, que reduce la movilidad de las cadenas de polímero y aumenta la rigidez de la película ([Sun et al., 2014](#); [Limón-Valenzuela et al., 2022](#)). En contraste, la adición de AC puede interrumpir la cohesión y uniformidad de la matriz polimérica debido a su naturaleza hidrofóbica y baja masa molar, lo que puede provocar una separación entre las cadenas de polímero. Esta alteración en las interacciones intermoleculares aumenta la flexibilidad y, por ende, ϵ ([Al-](#)

[Hashimi et al., 2020](#); [Corrêa-Vianna et al., 2021](#)). Este comportamiento es similar al observado por [Song et al. \(2017\)](#), quienes encontraron que la adición de aceite esencial de limón a películas de almidón incrementó notablemente la flexibilidad.

MÓDULO DE YOUNG (E)

El E mide la rigidez de una película comestible y refleja la energía necesaria para deformarla, considerando los ángulos de enlace y la longitud de unión entre los átomos en las cadenas del polímero. Las variaciones en estos parámetros pueden afectar significativamente la rigidez y el comportamiento mecánico de las películas ([Silva et al., 2019](#); [Shah et al., 2023](#)).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el modelo del E mostró un valor de $R^2_{ajustada}$ de 0.8845, un CV de 11.25%, y una DE de 57.51. Además, presentó un valor p de $F < 0.01$, indicando significancia estadística, y no presentó falta de ajuste ($p > 0.05$), como se muestra en la **Tabla 3**.

Los valores obtenidos para E en este estudio, oscilaron entre 188.64 y 747.87 MPa, fueron similares y ligeramente mayores a los reportados por [Venkatachalam et al. \(2023\)](#) quienes encontraron valores de E entre 400 y 500 MPa en PCs compuestas por quitosano y almidón de arroz glutinoso nativo enriquecida con aceites esenciales como ajo, galanga, cúrcuma y lima kaffir. También fueron más altos que los valores de 150 205 MPa reportados por [Silva et al. \(2020\)](#) para películas de olietileno de baja densidad (LDPE) reforzados con nanopartículas de óxido de calcio (CaO).

La **Figura 2c** muestra que el E aumentó con la concentración de NPCC debido a su distribución uniforme y refuerzo de la matriz de almidón, mejorando su rigidez ([Sun et al., 2014](#); [Limón-Valenzuela et al., 2022](#)). En cambio, el aumento en la concentración de aceites esenciales redujo E, ya que estos compuestos hidrofóbicos interfieren con las interacciones entre los monómeros del almidón, disminuyendo la cohesión y rigidez de la película ([Al-Hashimi et al., 2020](#); [Corrêa-Vianna et al., 2021](#)).

OPTIMIZACIÓN DE PROPIEDADES MECÁNICAS Y DE BARRERA

En la **Figura 3** se muestra el gráfico de deseabilidad global, donde se reflejan las variables analizadas con un rango de deseabilidad de 0 a 1, siendo 1 el valor óptimo. En teoría, se busca alcanzar una deseabilidad de 1, indicando el mejor cumplimiento posible de los criterios establecidos. En este gráfico, se observa que tanto el contenido de NPCC

como el de AC tienen una deseabilidad de 1, ya que no se aplicaron criterios específicos a estas variables. La S presentó un valor de 1, cumpliendo plenamente con el criterio impuesto. La PVA alcanzó una deseabilidad de 0.91, cumpliendo en un 91% con el criterio establecido. La σ obtuvo un valor de 0.87, lo que señala que cumple en un 87% con los criterios entre el límite inferior y superior. En cuanto a la ϵ , presentó una deseabilidad de 0.41, cumpliendo aproximadamente un 41% del rango requerido. Finalmente, el E mostró una deseabilidad de 0.75, logrando un 75% del objetivo. En conjunto, se obtuvo una deseabilidad global de 0.83, lo que sugiere que, en general, se lograron satisfactoriamente los objetivos establecidos en el proceso.

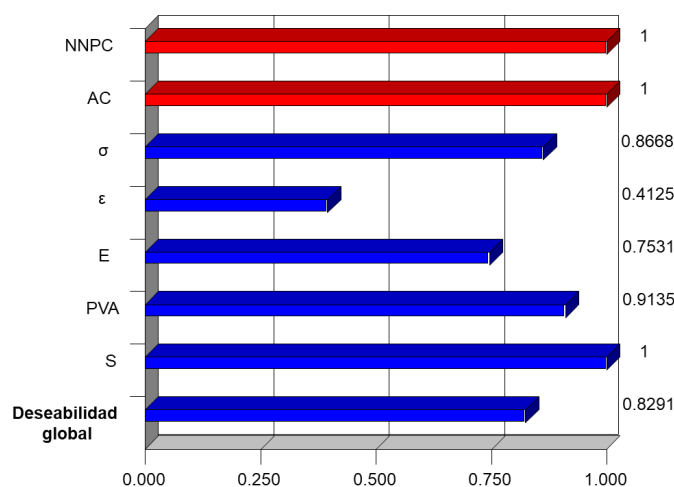


Figura 3. Deseabilidad individual y global de las variables de proceso y de respuesta analizadas durante la optimización de las películas comestibles.

De acuerdo con la optimización, el tratamiento óptimo fue con NPCC del 1.71% y AC del 1.38%. Los valores predichos de las variables de respuesta bajo estas condiciones óptimas del proceso fueron $S = 10.29\%$, $PVA = 1.70 \times 10^{-11} \text{ g m s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}$, $\sigma = 8.22 \text{ MPa}$, $\epsilon = 1.8906\%$ y $E = 609.82 \text{ MPa}$. Estos resultados reflejan el desempeño esperado del sistema bajo las condiciones optimizadas.

Para validar el modelo, se prepararon PCs usando los valores óptimos de NPCC y AC. Los resultados experimentales fueron: $S = 12.43 \pm 4.02\%$, $PVA = 1.35 \times 10^{-11} \pm 7.92 \times 10^{-12} \text{ g m s}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ Pa}^{-1}$, $\sigma = 9.16 \pm 2.10 \text{ MPa}$, $\epsilon = 1.58 \pm 0.53\%$ y $E = 630.14 \pm 45.28 \text{ MPa}$. Comparando estos resultados con los valores predichos, los valores fueron muy similares entre sí, confirmando que el modelo es preciso para predecir las propiedades óptimas de las películas de almidón de maíz nativo bajo las condiciones especificadas.

CONCLUSIONES

El análisis de las PCs de almidón de maíz mostró que el modelo matemático de predicción utilizado fue robusto, con valores de $R^2_{ajustada} > 0.80$, $p \text{ de } F < 0.01$, y $CV \leq 14.48\%$, asegurando la fiabilidad de los resultados obtenidos. Los contenidos de NPCC y AC demostraron tener efectos significativos sobre las propiedades de barrera y mecánicas de las películas. Las NPCC mejoraron la resistencia a la tracción y el E, y redujeron la ϵ , lo que indica un aumento en la rigidez y la integridad de las películas. Sin embargo, también causaron una ligera disminución en la PVA y S. Por otro lado, el AC redujo la resistencia a la tracción, el E y la PVA, mientras que aumentó la ϵ , resultando en películas más flexibles y menos cohesivas. La formulación óptima para las PCs se identificó con 1.71% de NPCC y 1.38% de AC, mejorando de manera significativa las propiedades mecánicas y de barrera. Estos resultados subrayan el potencial de las películas comestibles de almidón de maíz con estas adiciones como una alternativa sostenible en la industria de envases y embalajes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Laboratorio de Caracterización Físicoquímica y Reológica del Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERÉS.

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Aguilar-Palazuelos, E., Fitch-Vargas, P. R., Pérez-Vega, L. F., Camacho-Hernández, I. L., Zazueta-Morales, J. J. & Calderón-Castro, A. (2023). Functional characterization of edible films based on reactive extrusion acetylated corn starch. *Journal of Food Measurement and Characterization* 17(3), 2363-2373. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01797-1>
- Al-Hashimi, A. G., Ammar, A. B., G., L., Cacciola, F. & Lakhssassi, N. (2020). Development of a millet starch edible film containing clove essential oil. *Foods* 9, 184. <https://doi.org/10.3390/foods9020184>
- Calderón-Castro, A., Vega-García, M. O., de Jesús Zazueta-Morales, J., Fitch-Vargas, P. R., Carrillo-López, A., Gutiérrez-Dorado, R. &

- Aguilar-Palazuelos, E. (2018). Effect of extrusion process on the functional properties of high amylose corn starch edible films and its application in mango (*Mangifera indica* L.) cv. Tommy Atkins. *Journal of Food Science and Technology* 55, 905-914. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2997-6>
- Calderón-Castro, A., Jacobo-Valenzuela, N., Félix-Salazar, L. A., Zazueta-Morales, J. D. J., Martínez-Bustos, F., Fitch-Vargas, P. R. & Aguilar-Palazuelos, E. (2019). Optimization of corn starch acetylation and succinylation using the extrusion process. *Journal of Food Science and Technology* 56, 3940-3950. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03863-x>
- Cao, T. L., Yang, S. Y. & Song, K. B. (2017). Characterization of barnyard millet starch films containing borage seed oil. *Coatings* 7, 183. <https://doi.org/10.3390/coatings7110183>
- Chiumarelli, M. & Hubinger, M. D. (2014). Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. *Food Hydrocolloids* 38, 20-27. <https://doi.org/10.3390/coatings7110183>
- Choque-Quispe, D., Froehner, S., Ligarda-Samanez, C. A., Ramos-Pacheco, B. S., Palomino-Rincón, H., Choque-Quispe, Y., Solano-Reynoso, A. M., Taípe-Pardo, F., Zamalloa-Puma, L. M., Calla-Florez, M., Obregón-Yupanqui, M. E., Zamalloa-Puma, M.M. & Mojo-Quisani, A. (2021). Preparation and chemical and physical characteristics of an edible film based on native potato starch and nopal mucilage. *Polymers* 13, 3719. <https://doi.org/10.3390/polym13213719>
- Corrêa-Vianna, T., Oliveira-Marinho, C., Maragoni-Júnior, L., Adnan-Ibrahim, S. & Pioli-Vieira, R. (2021). Essential oils as additives in active starch-based food packaging films: a review. *International Journal of biological Macromolecules* 182, 1803-1819. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.170>
- Dhumal, C. V. & Sarkar, P. (2018). Composite edible films and coatings from food-grade biopolymers. *Journal of Food Science and Technology* 55, 4369-4383. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3402-9>
- Do Evangelho, J. A., Da Silva-Dannenberg, G., Biduski, B., Mello-El Halal, S. L., Kringel, D. H., Gularte, M. A., Fiorentini, A. M. & Da Rosa-Zavarese, E. (2019). Antibacterial activity, optical, mechanical, and barrier properties of corn starch films containing orange essential oil. *Carbohydrate Polymers* 222, 114981. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.114981>
- Dos Santos-Caetano, K., Almeida-Lopes, N., Haas-Costa, T. M., Brandelli, A., Rodrigues, E., Hickmann-Flôres, S. & Cladera-Oliveira, F. (2018). Characterization of active biodegradable films based on cassava starch and natural compounds. *Food packaging and shelf life* 16, 138-147. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.006>
- Fitch-Vargas, P. R., Aguilar-Palazuelos, E., de Jesús Zazueta-Morales, J., Vega-García, M. O., Valdez-Morales, J. E., Martínez-Bustos, F. & Jacobo-Valenzuela, N. (2016). Physicochemical and microstructural characterization of corn starch edible films obtained by a combination of extrusion technology and casting technique. *Journal of Food Science* 81(9), E2224-E2232. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13416>
- Fitch-Vargas, P. R., Aguilar-Palazuelos, E., Ruiz-Armenta, X. A., Delgado-Nieblas, C. I., Barraza-Elenes, C. & Calderón-Castro, A. (2024). Development of edible films based on reactive extrusion succinylated corn starch for the preservation of mango (*Mangifera indica* L. Cv. Kent). *Journal of Food Measurement and Characterization* 18(3), 2345-2358. <https://doi.org/10.1007/s11694-024-02378-0>
- Ghasemlou, M., Aliheidari, N., Fahmi, R., Shojaee-Aliabadi, S., Keshavarz, B., Cran, M. & Khaksar, R. (2013). Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydrate Polymers* 98, 1117-1126. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.026>
- Gómez-Alvarez, L. M. & Zapata-Montoya, J. (2024). Effect of fortification with CaCO₃ nanoparticles obtained from eggshell on the physical and sensory characteristics of three food matrices. *Heliyon* 10(2). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24442>
- Hammam, A. R. (2019). Technological, applications, and characteristics of edible films. *SN Applied Sciences* 1(632). <https://doi.org/10.1007/s42452-019-0660-8>
- Kong, I., Degraeve, P. & Pui, L. P. (2022). Polysaccharide-based edible films incorporated with essential oil nanoemulsions: physico-

- chemical, mechanical properties and its application in food preservation- a review. *Foods* 11, 555. <https://doi.org/10.3390/foods11040555>
- Kumoro, A. C., Wardhani, D., Retnowati, D. & Haryani, K. (2021). A brief review on the characteristics, extraction and potential. *International Conference on Chemical and Material Engineering* 1053. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1053/1/012118>
- Lescano, M., Vásquez, N., Tarrillo, S., Yoplac, I. & Velásquez-Barreto, F. F. (2021). Development and Optimization of Biofilms Made from Potato or Arracacha Starch. *Starch - Stärke* 73(9-10). <https://doi.org/10.1002/star.202100075>
- Limón-Valenzuela, V., Aguilar-Palazuelos, E., Martínez-Bustos, F., Montoya-Rodríguez, A., Camacho-Hernández, I. L., Zazueta-Morales, J. J. & Carrillo-López, A. (2022). Elaboration of edible starch films using CaCO₃ nanoparticles and plasticizers by optimized extrusion-casting process. *Biotechnia* 24(3), 52-62. <https://doi.org/10.18633/biotechnia.v24i3.1508>
- Pirouzifard, M., Yorghanlu, R. A. & Pirsá, S. (2020). Production of active film based on potato starch containing Zedo gum and essential oil of *Salvia officinalis* and study of physical, mechanical, and antioxidant properties. *Journal of thermoplastic composite materials* 33, 915-937. <https://doi.org/10.1177/0892705718815541>
- Shah, Y. A., Bhatia, S., Al-Harrasi, A., Afzaal, M., Saeed, F., Anwer, M. K., Khan, M. R., Jawad, M., Akram, N. & Faisal, Z. (2023). Mechanical properties of protein-based food packaging materials. *Polymers* 15, 1724. <https://doi.org/10.3390/polym15071724>
- Silva, O. A., Pellá, Michelly G., Pellá, Matheus G., Caetano, J., Simões, M. R., Bittencourt, P. R. S. & Dragunski, D. C. (2019). Synthesis and characterization of a low solubility edible film based on native cassava starch. *International Journal of Biological Macromolecules* 128, 290-296. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.132>
- Silva, C., Bobillier, F., Canales, D., Antonella Sepúlveda, F., Cament, A., Amigo, N. & Zapata, P. A. (2020). Mechanical and antimicrobial polyethylene composites with CaO nanoparticles. *Polymers* 12(9), 2132. <https://doi.org/10.3390/polym12092132>
- Singh, G. P., Bangar, S. P., Yang, T., Trif, M., Kumar, V. & Kumar, D. (2022). Effect on the properties of edible starch-based films by the incorporation of additives: A review. *Polymers* 14, 1987. <https://doi.org/10.3390/polym14101987>
- Song, X., Zuo, G. & Chen, F. (2017). Effect of essential oil and surfactant on the physical and antimicrobial properties of corn and wheat starch films. *International of Journal of Biological Macromolecules* 107, 1302-1309. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.114>
- Sun, Q., Xi, T., Li, Y. & Xiong, L. (2014). Characterization of corn starch films reinforced with CaCO₃ nanoparticles. *PloS one* 9(9), e106727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106727>
- Venkatachalam, K., Rakkapao, N. & Lekjing, S. (2023). Physicochemical and antimicrobial characterization of chitosan and native glutinous rice starch-based composite edible films: Influence of different essential oils incorporation. *Membranes* 13(2), 161. <https://doi.org/10.3390/membranes13020161>
- Wen-Ru, L., Qing-Shan, S., You-Sheng, O., Yi-Ben, C. & Shun-Shan, D. (2012). Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(16), 7483-7492. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4460-y>
- Wongphan, P. & Harnkarnsujarit, N. (2020). Characterization of starch, agar and maltodextrin blends for controlled dissolution of edible films. *International Journal of Biological Macromolecules* 156, 80-93. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.056>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA