

Contenido

9 Reyber Parra Contreras
Presentación

11 David Sierra Porta, Terenzio Soldovieri
Radiación de una carga acelerada en un medio con resistencia ///
Radiation of an accelerated charge in a medium with resistance

23 L. González, G. Reyes, J. Rivera, I. Zabala, L. Atencio
Actividad antagonista de un inhibidor no-Lantibiótico de clase II en *Enterococcus faecalis* autóctono frente a cepas relacionadas ///
Antagonistic activity of a no-Lantibiotic class II inhibitor in *enterococcus faecalis* autochthonous against related strains

40 Nacarid Delgado, Fredy Ysambertt, Eduardo Padilla, Gerson Chávez, Bélgica Bravo y Nelson Márquez
Estabilización de emulsiones con mezclas de un surfactante no-iónico y derivados de lignina sintetizados con asistencia de microondas ///
Stabilization of emulsions with mixtures of a nonionic surfactant and lignin derivatives synthesized by the assistance of a microwave

57 Rossyflor Tablante, Ángela Matos Acurero
Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y CoCl₂ sobre la producción de aloína en hojas de plantas de *Aloe vera* (L.) Burm. F. regeneradas *in vitro*. ///
Effect of different concentrations of NaCl and CoCl₂ on the production of aloin in regenerated *in vitro* leaves of *aloe vera*

67 Zoraida Medina, Gresly Castro, Astrid Salcedo, Ricardo Alonso Silva, Marynés Montiel
Detección de Aflatoxina M₁ en muestra de leche cruda y pasteurizada en el ganado vacuno de Mene Mauroa. Región Occidente de Venezuela ///
Detection of Aflatoxin M₁ in raw and pasteurized milk of bovine cattle from Mene Mauroa western region of Venezuela

79 Anyelo Durán, Kevin Sánchez, Roxana Acosta, Divar Bohórquez, Enrique Durán, Luis Gallardo, José Luengo, Nereida Valero
Pesquisaje de virus dengue y otros agentes infecciosos en donantes de sangre voluntarios. Resultados preliminares ///
Screening of dengue virus and other infectious agents in voluntary blood donors. Preliminary results

95 Édixon Ochoa
Documento histórico
La ovariectomía y el advenimiento de la cirugía abdominal en Venezuela

101
Normas para la presentación de trabajos



Año 5 N° 12

Mayo - Agosto 2014

Revista de la Universidad del Zulia

Revista de la Universidad del Zulia



Fundada en 1947
por el Dr. Jesús Enrique Lossada

Ciencias Exactas Naturales y de la Salud

Año 5 N° 12
Mayo - Agosto 2014
Tercera Época
Maracaibo - Venezuela

REVISTA DE LA UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

Tercera Época

**Ciencias Exactas
Naturales y de la Salud**

Año 5 N° 12 Mayo-Agosto 2014

Fundada en 1947 por el Dr. Jesús Enrique Lossada
Adscrita a la Cátedra Libre HISTORIA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA



Gobernación
Bolivariana
del **Zulia**

¡El Zulia Nombre y
Luz de Venezuela!

PUBLICACIÓN AUSPICIADA
POR LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA
Y LA GOBERNACIÓN BOLIVARIANA DEL ESTADO ZULIA

Esta revista fue impresa en papel alcalino.

*This publication was printed on acid-free paper that meets
the minimum requirements of the American National Standard for
Information Sciences-Permanence for Paper for
Printed Library Materials, ANSI Z39.48-1984*

**Indizada, registrada y/o catalogada
electrónicamente en las siguientes bases de datos:**

**REVENCYT
REVICYHLUZ
LATINDEX
CLASE
PERIÓDICA**

Issuu:

**[http://Issuu.com/
revistadelauniversidaddelzulia](http://Issuu.com/revistadelauniversidaddelzulia)**

REVISTA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA

© 2014. Universidad del Zulia

ISSN 0041-8811

Depósito legal pp 76-654

Depósito legal ppi 201502ZU4666

Portada:

Concepto gráfico: Laura González

Diagramación: Diannella Castellano

Montaje y Diagramación de la revista:

Diannella Castellano

REVISTA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA.

Calle 67 (prolongación Cecilio Acosta) con Av. 16 (Guajira).

Nueva sede rectoral de la Universidad del Zulia. Edificio Fundadesarrollo.

Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. Teléfono/Fax: 58-261-7831611.

Correos electrónicos: revistauniversidaddelzulia@gmail.com, revistadeluz@gmail.com

Revista de la Universidad del Zulia

Tercera Época

El Dr. Jesús Enrique Lossada, luego de trabajar infatigablemente hasta lograr la reapertura de la Universidad del Zulia, el 01 de octubre de 1946, le aportó a esta institución su primera revista científica: la Revista de la Universidad del Zulia, fundada por este insigne zuliano, el 31 de mayo de 1947. En su Tercera Época la revista mantiene la orientación que le asignara su fundador: es un órgano científico de difusión de trabajos parciales o definitivos de investigadores y/o equipos de investigación nacionales y extranjeros. La revista posee un carácter multidisciplinario, por ello su temática se divide en tres grandes ejes: a. ciencia sociales y artes; b. ciencias del agro, ingeniería y tecnología; c. ciencias exactas, naturales y de la salud. Su publicación es cuatrimestral. Cada número, de los tres del año, se corresponde con uno de los tres ejes temáticos. La Revista de la Universidad del Zulia, por su naturaleza histórica y patrimonial, está adscrita a la Cátedra libre Historia de la Universidad del Zulia.

Directores y Responsables

Eméritos

Jesús Enrique Lossada
José Ortín Rodríguez
José A. Borjas Sánchez
Felipe Hernández
Antonio Borjas Romero
César David Rincón
Sergio Antillano

Directora

Imelda Rincón Finol

Coordinador

Reyber Antonio Parra Contreras

Editora Asociada

Marines Montiel

Comité Editorial

Imelda Rincón (LUZ)
Reyber Parra (LUZ)
Teresita Álvarez (LUZ)
Jesús Medina (LUZ)
José Lárez (UNERMB)
Marielis Villalobos (LUZ)

Comité Asesor

Nelson Márquez (LUZ)
Judith Aular (LUZ)
Rutilio Ortega (LUZ)
Tahís Ferrer (LUZ)
Alí López (ULA)
Antonio Castejón (LUZ)
Ana Judith Paredes (LUZ)
María Dolores Fuentes Bajo
(Universidad de Cádiz, España)
Néstor Queipo (LUZ)
Ana Irene Méndez (LUZ)
Mayela Vílchez (LUZ)
Modesto Graterol (LUZ)
Mario Ayala (UBA Argentina)
Tomás Fontaines (UDO)
Enrique Pastor Seller
(Universidad de Murcia, España)
Lourdes Molero (LUZ)

Traducción

Rhona Parra



Autoridades

Jorge PALENCIA
Rector

Judith AULAR DE DURÁN
Vice-Rectora Académica

María Guadalupe NÚÑEZ
Vice-Rectora Administrativa

Marlene PRIMERA
Secretaria

Imelda Rincón Finol
*Coordinadora de la Cátedra Libre Historia de la
Universidad del Zulia*

Contenido

9 Reyber Parra Contreras
Presentación

11 David Sierra Porta, Terenzio Soldovieri
Radiación de una carga acelerada en un medio con resistencia ///
Radiation of an accelerated charge in a medium with resistance

23 L. González, G. Reyes, J. Rivera, I. Zabala, L. Atencio
Actividad antagonista de un inhibidor no-Lantibiótico de clase II en
Enterococcus faecalis autóctono frente a cepas relacionadas ///
*Antagonistic activity of a no-Lantibiotic class II inhibitor in enterococcus
faecalis autochthonous against related strains*

40 Nacarid Delgado, Fredy Ysambertt, Eduardo Padilla, Gerson
Chávez, Bélgica Bravo y Nelson Márquez
Estabilización de emulsiones con mezclas de un surfactante no-iónico y
derivados de lignina sintetizados con asistencia de microondas ///
*Stabilization of emulsions with mixtures of a nonionic surfactant and
lignin derivatives synthesized by the assistance of a microwave*

57 Rossyflor Tablante, Ángela Matos Acurero
Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y CoCl₂ sobre la producción
de aloína en hojas de plantas de *Aloe vera* (L.) Burm. F. regeneradas *in*
vitro. ///
*Effect of different concentrations of NaCl and CoCl₂ on the production of
aloin in regenerated in vitro leaves of aloe vera*

67 Zoraida Medina, Gresly Castro, Astrid Salcedo, Ricardo Alonso
Silva, Marynés Montiel

Detección de Aflatoxina M₁ en muestra de leche cruda y pasteurizada en el
ganado vacuno de Mene Mauroa. Región Occidente de Venezuela ///
*Detection of Aflatoxin M₁ in raw and pasteurized milk of bovine cattle
from Mene Mauroa western region of Venezuela*

79 Anyelo Durán, Kevin Sánchez, Roxana Acosta, Divar Bohórquez,
Enrique Durán, Luis Gallardo, José Luengo, Nereida Valero

Pesquisaje de virus dengue y otros agentes infecciosos en donantes de
sangre voluntarios. Resultados preliminares ///
*Screening of dengue virus and other infectious agents in voluntary blood
donors. Preliminary results*

95 Édixon Ochoa

Documento histórico

La ovariectomía y el advenimiento de la cirugía abdominal en Venezuela

101

Normas para la presentación de trabajos

Presentación

La *Revista de la Universidad del Zulia* continúa con su misión de difundir el conocimiento científico, de la mano con valiosos investigadores de Venezuela y de otras naciones, quienes cuentan con este órgano para llevar sus productos de investigación a diversos espacios académicos y comunitarios.

Esa fue la noble aspiración del Dr. Jesús Enrique Lossada, destacado universitario y luchador social, a quien debemos la aparición de nuestra primigenia revista zuliana en el año 1947. Por aquellos días, la Universidad del Zulia retornaba a la historia luego de un período de penumbras y de olvido gubernamental, para constanciarse con un pueblo que padeció por décadas la ausencia de su Alma Mater. Pero finalmente se cumplió aquello que el propio Lossada resumió al referirse a este paso del oscurantismo a la luz: *post nubila phoebus*. La *Revista de la Universidad del Zulia* formó parte de aquellos haces luminosos que disiparon las sombras que se cernían sobre el Zulia a mediados del siglo XX, lo cual fue posible gracias al talento, la dedicación y entrega de figuras señeras como el Dr. Jesús Enrique Lossada.

En esta oportunidad, la sección Ciencias Exactas, Naturales y de la Salud, ofrece seis artículos, con el siguiente orden de aparición en la presente edición: *Radiación de una carga acelerada en un medio con resistencia*, de David Sierra Porta y Terenzio Soldovieri; *Actividad antagonica de un inhibidor no-Lantibiótico de clase II en Enterococcus faecalis autóctono frente a cepas relacionadas*, a cargo de L. González, G. Reyes, J. Rivera, I. Zabala, L. Atencio; *Estabilización de emulsiones con mezclas de un surfactante no-iónico y derivados de lignina sintetizados con asistencia de microondas*, de Nacarid Delgado, Fredy Ysambertt, Eduardo Padilla, Gerson Chávez, Bélgica Bravo y Nelson Márquez; *Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y CoCl₂ sobre la producción de aloína en hojas de plantas de Aloe vera (L.) Burm. F.² regeneradas in vitro*, de Rosyflor Tablante y Ángela Matos Acurero; *Detección de Aflatoxina M₁ en muestra de leche cruda y pasteurizada en el ganado vacuno de Mene Mauroá. Región Occidente de Venezuela*, de Zoraida Medina, Gresly Castro, Astrid Salcedo, Ricardo Alonso Silva y Marynés Montiel; *Pesquisaje de virus dengue y otros agentes infecciosos en donantes de sangre voluntarios. Resultados preliminares*, de Anyelo Durán, Kevin Sánchez, Roxana Acosta, Divar Bohórquez, Enrique Durán, Luis Gallardo, José Luengo y Nereida Valero.

De igual manera, en sintonía con el carácter patrimonial de la *Revista de la Universidad del Zulia* y su vinculación con la historia, ofrecemos el trabajo del Dr. Édixon Ochoa, *La ovariectomía y el advenimiento de la cirugía abdominal en Venezuela*, donde se analiza la trascendencia de la labor médico-quirúrgica del Dr. Francisco Eugenio Bustamente, rector de la Universidad del Zulia a finales del siglo XIX y precursor de la medicina operatoria en nuestro país.

Reyber Parra Contreras

Coordinador

Radiación de una carga acelerada en un medio con resistencia

*David Sierra Porta**

*Terenzio Soldovieri***

RESUMEN

Se estudia el sistema dinámico consistente de una partícula cargada radiante en una dimensión cuya dinámica está descrita por la ecuación Lorentz-Dirac no relativista, sujeta a las siguientes fuerzas: (1) una fuerza armónica $-\omega_0^2 x$ donde ω_0 es la frecuencia angular natural, y (2) una fuerza de resistencia proporcional a la velocidad $-Bdx/dt$, donde B es una constante positiva relacionada con las propiedades del medio en el que se mueve la partícula. Nuestra metodología consiste en resolver la ecuación diferencial en estas condiciones, de tal manera que su dinámica se determina completamente. A partir de un estudio de estabilidad de la solución exacta se determina un rango de valores para ω_0 en los cuales el sistema es estable, consiguiendo relación directa con el factor de amortiguamiento B . Se muestran gráficas para la aceleración de la partícula en función del tiempo para distintos valores del factor B , resultando muy dependiente de este último y persistiendo el problema de la pre-aceleración reportado en la literatura para dicha ecuación.

PALABRAS CLAVE: ecuación Lorentz-Dirac, partícula cargada, fuerza de resistencia.

* Centro de Modelado Científico (CMC) y Laboratorio de Astronomía y Física Teórica (LAFT).

** Departamento de Física, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia.

Maracaibo 4004. Venezuela. E-mail: dsporta@cmc.org.ve

Radiation of an accelerated charge in a medium with resistance

ABSTRACT

The aim of this project is to study the consistent dynamic system of a radiant charged particle in one dimension, whose dynamic is described by the Lorentz-Dirac no relativistic equation, subject to the following forces: (1) an harmonic force $-\omega_0^2 x$ where ω_0 is the natural angular frequency, and (2) a resistance force proportional to the speed $-Bdx/dt$, where B is a positive constant related to the properties of the medium in which the particle moves. Our methodology consists on solving the differential equation in these conditions, so like that, its dynamic is completely determined. A range of values for ω_0 was obtained from a stability study of the exact solution, in which the system is stable, achieving direct relationship with the damping factor B . Graphics of the particle acceleration versus time for the different values of the B factor are shown, being very dependent of the latter and persisting the pre-acceleration problem reported in literature for said equation.

KEYWORDS: Lorentz-Dirac equation, charged particle, resistance force.

Introducción y motivación

Desde La Ecuación de Lorentz-Dirac (ELD) es una ecuación diferencial no-lineal de tercer orden la cual describe la dinámica de una partícula cargada bajo la influencia de una fuerza externa que puede ser debida a su propio campo electromagnético. La expresión correcta de la ecuación LD para partículas puntuales que autointeractúan con sus propios campos ha sido tema recurrente en la búsqueda de una formulación coherente de la Electrodinámica Clásica a partir de la formulación del problema original (Lorentz, 1909). A pesar de que la ELD está soportada en sólidos basamentos físicos (Relatividad Especial y Electrodinámica) esta posee propiedades matemáticas inusuales. De hecho, ya de entrada, la formulación de la ecuación exhibe dificultades teóricas que se han debatido a lo largo de décadas en la extensa literatura dedicada al tema. Dos particularidades de la ELD que llaman mucho la atención son: (1) la presencia de soluciones con valores crecientes y sin límite (comportamiento fuera de control), es decir, soluciones en las que la aceleración de la partícula crece al infinito

en la medida que el tiempo aumenta, y (2) movimientos preacelerados con antelación a las fuerzas aplicadas, o en otras palabras, la presencia de una aceleración negativa en $t=0$, lo que indica que la partícula antes de sentir la interacción del campo electromagnético de fondo ya está acelerada, una cuestión que en la electrodinámica clásica es absurdo, puesto que como sabemos, una partícula cargada que entra en un campo electromagnético se acelera producto de la fuerza de interacción que provoca el campo mismo. Estas dos anteriores particularidades, forman parte de una lista de propiedades no físicas expuestas por la mencionada ecuación (Yaghjian, 1992). Una solución a este problema fue discutida por Yaghjian (Yaghjian, 2006) y fue discutida más adelante por Rohrlich (Rohrlich, 1997) y Medina (Medina, 2006). A. Cabo Montes de Oca y J. Castiñeiras (Cabo, 2013) sugieren, para solucionar las dificultades antes mencionadas, que la fuerza del campo que actúa sobre la partícula debe desaparecer de forma instantánea después de una eliminación repentina de la fuerza externa. Estos últimos, proponen una mínima modificación de la ecuación LD para tratar de poner en práctica esta propiedad. La modificación a la ecuación está asegurada dado que se construye a mano respetando la preservación de la covarianza de Lorentz, así entonces, con un ejemplo sencillo usando una fuerza constante se muestra que se elimina dicha aceleración descontrolada. En otros trabajos recientes (Vogt, 2003), se discute el carácter inestable de las soluciones de la ELD y se resalta la necesidad de métodos como la reducción de orden en aras de derivar una ecuación de movimiento física aceptable. La discusión se ilustra con el ejemplo paradigmático del oscilador armónico no relativista. Se ilustra la eliminación de la pre-aceleración no causal con la introducción de una pequeña corrección en la ELD.

Dirac en 1938 (Dirac, 1938) hace una deducción de la ELD, la cual escrita en lenguaje compacto y en este caso en D dimensiones, viene dada por,

$$\ddot{x}^\mu F_{ext}^\mu + b \left(\dddot{x}^\mu + \frac{1}{c^2} \dot{x}^\mu \ddot{x}^\nu \dot{x}_\nu \right), \quad (1)$$

donde las líneas de mundo de la partícula están descritas por las posiciones $x^\mu(\tau)$, las cuales dan las coordenadas de la partícula en función del tiempo propio τ . El índice $\mu=0,1,2,3$, indica la coordenada, siendo $x^0(\tau)$ la coordenada temporal y $x^{i=1,2,3}(\tau)$ las coordenadas espaciales. Los puntos indican derivadas con respecto al tiempo propio, F_{ext}^μ es la fuerza externa por unidad de masa, $b=2q^2k(3mc^3)^{-1}$, con $k=(4\pi\epsilon_0)^{-1}=8.988 \times 10^9 Nm^2C^{-2}$, m es la masa de la partícula, q su carga y $c=2.988 \times 10^{10} m/s$ es la velocidad de la luz en el vacío. Para el caso particular de un electrón se tiene que $b=6.25 \times 10^{-24} s$, donde $e=-1.6 \times 10^{-19} C$ es la carga del electrón y $m_e=9.1 \times 10^{-28} Kg$ su masa. El parámetro b es una escala temporal relacionada con el radio clásico del electrón $r_e \approx 2.818 \times 10^{-15} m$, también conocido como Radio de Lorentz: el cual

puede ser interpretado como el tiempo que necesita la luz para viajar una distancia igual a r_e . Dado que la ELD es una ecuación diferencial ordinaria de tercer orden, no sólo deben ser dadas la posición inicial y la velocidad, sino también la aceleración para especificar una solución única.

El límite no relativista de la ELD (1) para una dimensión (eje X en el presente caso) viene dado por,

$$\ddot{x} = F_{ext} + b \ddot{x}, \quad (2)$$

que es precisamente la ecuación de movimiento que será considerada en el presente estudio. Aquí los puntos representan derivadas con respecto al tiempo t .

La principal motivación de este manuscrito es generalizar los resultados obtenidos recientemente por Vogt y Letelier (Vogt, 2003), en la cual han considerado las soluciones de la ecuación (2) anterior, bajo las consideraciones más simples posibles matemáticamente hablando. Los autores anteriores han encontrado soluciones haciendo la suposición de considerar la fuerza externa proporcional a las líneas de mundo de la partícula x , es decir, una fuerza armónica. Estas suposiciones se hacen en virtud de la simplicidad necesaria para obtener soluciones analíticas, sin el uso de métodos numéricos correspondientes.

Ahora bien, en vista de los problemas que hemos expuesto de la ELD, y en particular el de la aparición de una preaceleración existente antes de la interacción, una de las cosas que pudiera ser intentada para resolver este problema es la introducción de una fuerza externa que disipe, absorba o mitigue la energía, de modo que esto contribuya a hacer desaparecer la preaceleración. Una manera de lograr esto consiste en la inclusión de amortiguamiento al sistema, lo que significa que parte de la energía debe ser reducida producto de un proceso de dispersión o de transformación de energía de forma que la fuerza inicial se haga menor. El amortiguamiento es un parámetro fundamental en el campo de la mecánica ondulatoria, en el desarrollo de modelos matemáticos que permiten complejizar y enriquecen el estudio y análisis de tales sistemas. Análogamente al caso de una partícula que se mueve en el seno de un fluido en el régimen laminar, en la ELD, la partícula se mueve en un medio bajo la dominación de un campo electromagnético que le transmite una fuerza a dicha partícula y determina así su dinámica. En este caso es posible pensar en generalizar las soluciones ya existentes (Vogt, 2003) incluyendo además de la fuerza armónica, una fuerza proporcional a la velocidad, lo cual implica incorporar amortiguamiento interno en el medio, adicional a la ya presente por medio del campo electromagnético existente. Es de esperar que nuestra nueva solución incorpore a la solución encontrada

por Vogt y Letelier cuando se hace el límite en el que el amortiguamiento desaparece. Sin embargo, producto de la inclusión de un nuevo término proporcional a la velocidad (con factor de acoplamiento B), es necesario establecer ecuaciones analíticas adicionales que permitan relacionar este último con la frecuencia natural del sistema. Esto es necesario en aras de tener valores o rango de valores correctos y adecuados para que las nuevas soluciones tengan sentido físico y matemático. Lo que se consigue es que los nuevos parámetros están relacionados por medio de una relación que se obtiene con la ayuda de un estudio de estabilidad numérica de la solución encontrada.

En la siguiente sección se establece el problema y se exponen las soluciones de la ELD con la consideración de tanto fuerza armónica como de resistencia proporcional a la velocidad. Se expone el procedimiento de análisis de estabilidad de la solución encontrada para obtener relaciones adecuadas para los valores de ambos factores. Luego se exponen las consideraciones finales y por último las referencias bibliográficas.

1. ELD no relativista con fuerza armónica y amortiguamiento

Se considerará, mediante el uso de la ecuación LD en el límite no relativista, el sistema dinámico consistente en el movimiento en una dimensión (eje X) de una partícula cargada sujeta a una fuerza armónica $-\omega_0^2 x$ donde, como se sabe, ω_0 es la frecuencia angular, y una fuerza de resistencia o amortiguamiento proporcional a la velocidad $-Bdx/dt$, donde B es una constante positiva ($B \geq 0$) relacionada con las propiedades del medio en el que se mueve la partícula.

De esta manera la ecuación de movimiento (2) puede ser escrita como,

$$\ddot{x} = -\omega_0^2 x - B\dot{x} + b\ddot{x}. \quad (3)$$

Esta ecuación representa una situación un poco más general que la estudiada en la referencia (Vogt, 2003), donde se considera el movimiento de la partícula sólo sometida a la fuerza armónica $-\omega_0^2 x$. La solución exacta de la ecuación (3) es

$$x = c_1 e^{\alpha_1 t} + e^{\alpha_2 t} (c_2 \cos \alpha_3 t + c_3 \sin \alpha_3 t), \quad (4)$$

donde a_1 , a_2 y a_3 son cantidades definidas en términos de los parámetros propios del sistema:

$$a_1 := \frac{12Bb + 4 + \beta^{2/3} + 2\beta^{1/3}}{6b\beta^{1/3}}, \quad a_2 := \frac{-12Bb - 4 - \beta^{2/3} + 4\beta^{1/3}}{12b\beta^{1/3}}, \quad a_3 := \sqrt{3} \frac{12Bb + 4 - \beta^{2/3}}{12b\beta^{1/3}}, \quad (5)$$

con $B := 36Bb + 108\omega_0^2 b^2 + 8 + 12b(81\omega_0^4 b^2 - 12B^3 b + 54Bb\omega_0^2 - 3B^2 + 12\omega_0^2 b)^{1/2}$, y c_1 , c_2 y c_3 son constantes de integración arbitrarias que pueden ser fijadas en función de las condiciones iniciales, tal que

$$c_1 = \frac{(\alpha_2^2 + \alpha_3^2)x_0 - 2\alpha_2 v_0 + a_0}{(\alpha_1 - \alpha_2)^2 + \alpha_3^2}, \quad c_2 = \frac{\alpha_1(\alpha_1 - 2\alpha_2)x_0 + 2\alpha_2 v_0 - a_0}{(\alpha_1 - \alpha_2)^2 + \alpha_3^2}, \quad (6)$$

$$c_3 = \frac{\alpha_1(\alpha_2^2 - \alpha_3^2 - \alpha_2\alpha_1)x_0 + (\alpha_1^2 - \alpha_2^2 + \alpha_3^2)v_0 + (\alpha_2 - \alpha_1)a_0}{\alpha_3(\alpha_1)}.$$

En las expresiones anteriores x_0 , v_0 , y a_0 , son la posición, la velocidad y la aceleración iniciales, respectivamente, es decir, la posición, la velocidad y la aceleración en $t=0$. Podemos ver de manera evidente que a_1 es estrictamente definido positivo, cosa que no puede evidenciarse de a_2 y a_3 . En efecto podemos notar que en el caso particular de $B=0$ la solución de Vogt y Letelier puede ser recuperada. Esto quiero decir que la solución de estos últimos es sólo un caso límite de nuestra solución más general (4). Más aún, en vista de la presencia del primer término de la solución (4), uno pudiera hacer $c_1=0$ para poder eliminar las soluciones no físicas que se incrementan a infinito en la medida en que t también crece a un número muy grande. Esto puede hacerse porque en efecto como dijimos $a_1 > 0$. En este caso y luego de tomar primera y segunda derivada a $x(t)$ en la ecuación (4), podemos expresar desparametrizando las expresiones, a la aceleración en términos de la velocidad y la posición de la partícula, lo que quedaría expresado en forma más compacta como

$$a(t) = 2\alpha_2 v(t) - (\alpha_2^2 + \alpha_3^2)x(t), \quad (7)$$

que es la ecuación de un oscilador armónico con fricción, es decir, un oscilador amortiguado, con factor de amortiguamiento dado por $2\alpha_2$ y frecuencia natural de oscilación dada por $(\alpha_2^2 + \alpha_3^2)^{1/2}$. De esto último podemos inferir que dado que la ecuación (7) se encuentra expresada en su forma estándar entonces es lógico pensar que $\alpha_2 > 0$. Para examinar la

solución matemática de la ecuación diferencial, podemos describir dos tipos de escenarios posibles. Si el rozamiento es pequeño, esto es, pequeño comparado con la frecuencia ($\alpha_2 \ll \omega_0$), entonces la partícula oscilará de manera decreciente hasta que el sistema llegue al equilibrio. Si el rozamiento es grande, esto es $\alpha_2 \gg \omega_0$, entonces la partícula no oscilará y llegará a una posición de equilibrio lentamente.

Por otro lado, es posible encontrar un rango de valores para $b\omega_0$ de manera tal que el sistema sea estable (Aguirregabiria, 1997). En efecto, la ecuación (3) puede ser escrita como,

$$\ddot{x} + \gamma \dot{x} + \omega^2 x = C e^{\lambda t}, \quad (8)$$

donde C es una constante arbitraria y donde λ , γ y ω son las soluciones de sistema de ecuaciones,

$$\lambda = \frac{1}{b} + \gamma, \quad \lambda \omega^2 = \frac{\omega_0^2}{B}, \quad -\frac{B}{b} = \omega^2 - \lambda \gamma, \quad (9)$$

que se obtienen al comparar término a término la ecuación (3) con la ecuación que resulta de la derivada respecto al tiempo t de (8), eliminando antes el factor $Ce^{\lambda t}$ mediante esta última. A partir de las anteriores ecuaciones es posible escribir $\omega^2 = \omega_0^2 - b\omega^2 \gamma$, $\gamma = b(\omega^2 - \gamma^2) + B$, de tal manera que con la finalidad de simplificar notación al introducir cantidades adimensionales $x = b^2 \omega^2$ e $y = b\gamma$ como variables dinámicas, tenemos que

$$x = x_0 - xy, \quad y = x - y^2 + B, \quad (10)$$

donde $x_0 = b^2 \omega_0^2$. Equivalentemente,

$$x = y(1+y) - Bb, \quad x_0 = y(1+y)^2 - Bb(1+y). \quad (11)$$

Como $x_0 > 0$, entonces (11) tiene una sola raíz real dada por,

$$y = \frac{(\alpha - 2)^2 - 12Bb}{6\alpha}, \quad (12)$$

donde,

$$\alpha = \left(-36 Bb + 8 + 108 x_0 + 12 \sqrt{12 B^3 b^3 - 3 B^2 b^2 - 54 B b x_0 + 81 x_0^2 + 12 x_0} \right)^{1/3}. \quad (13)$$

Como $y > 0$, el sistema dinámico objeto de estudio tiene un punto fijo. Para estudiar su estabilidad en dicho punto hay que calcular los valores propios del diferencial de la transformación T establecida por (10). El problema de los valores propios para la diferencial de la anterior transformación conduce a los autovalores

$$\eta = \frac{-3 y \pm \sqrt{-[y(3 y + 4) + 4 Bb]}}{2}, \quad (14)$$

es obvio de (14) que los valores propios η son complejos y la condición para que exista estabilidad asintótica viene dada por $|\eta| < 1$, o bien $y < ((13 - 12Bb)^{1/2} - 1)/6$, esto nos da una relación tal que

$$b \omega_0 < \sqrt{\frac{23 - 72 Bb + (712 Bb) \sqrt{13 - 12 Bb}}{54}}, \quad (15)$$

que para $B=0$ resulta en $b \omega_0 < 0.95$ en completa concordancia con el valor mostrado por J. M. Aguirregabiria (Aguirregabiria, 1997). Por último, como en (33) la cantidad subradical debe ser positiva entonces resulta que $0 < Bb < 0.40$.

Conclusiones

Para resumir, en el presente manuscrito se ha considerado el sistema dinámico consistente de la ELD para la descripción de una partícula cargada radiante en la región confinada por un campo electromagnético, en la oportunidad de añadir un ingrediente adicional al estudiado Vogt y Letelier (Vogt, 2003) y J. M. Aguirregabiria (1997), que consiste en agregar a la fuerza armónica $-\omega_0^2 x$ una fuerza de rozamiento proporcional a la velocidad hasta el primer orden $-B dx/dt$ que produce amortiguamiento al sistema. Esto nos permite generalizar los resultados obtenidos anteriormente. La hipótesis principal consiste en que dicho amortiguamiento pudiera cancelar un poco el efecto de la preaceleración existente y que origina uno de los grandes problemas de este sistema en particular. En efecto se evidencia primeramente que la introducción de este término de amortiguamiento establece unas condiciones para los valores que pueden tomar dicho factor en términos de la frecuencia natural del sistema. El resultado anterior proporciona el rango

de valores de $0 < Bb < 0.40$ para los cuales el sistema es estable y condiciona la dinámica de la partícula lo cual puede verse en la figura 1.

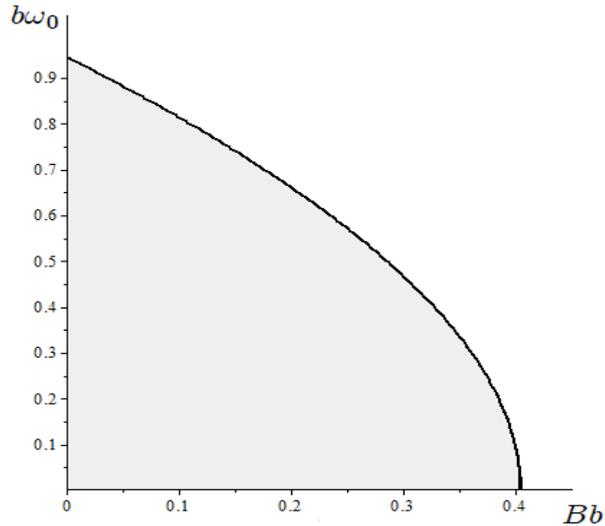


FIGURA 1. Región de valores posibles para $b\omega_0$ y Bb .

El diseño La figura 2(a) muestra las curvas de aceleración para un electrón en función del tiempo que se obtienen a partir de (7) para distintas frecuencias angulares ω_0 con valores $1.1 \times 10^{23} \text{s}^{-1}$, $1.0 \times 10^{23} \text{s}^{-1}$, $0.8 \times 10^{23} \text{s}^{-1}$, $0.5 \times 10^{23} \text{s}^{-1}$, tomándose como condiciones iniciales $x(0) = 2.818 \times 10^{-15} \text{m}$, $v(0) = 0$ y manteniéndose constante $Bb = 0.15$.

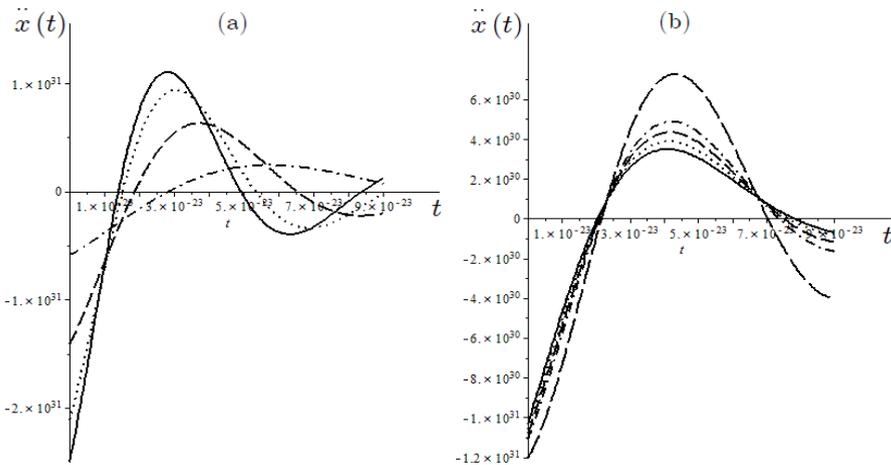


FIGURA 2. Curvas de aceleración de un electrón para (a) distintas frecuencias angulares $\omega_0 = 1.1 \times 10^{23} \text{s}^{-1}$ (línea continua); $1.0 \times 10^{23} \text{s}^{-1}$ (línea punteada); $0.8 \times 10^{23} \text{s}^{-1}$ (línea trazos), $0.5 \times 10^{23} \text{s}^{-1}$ (línea puntos y trazos) y manteniéndose constante $Bb=0.15$ y (b) distintos factores de amortiguamiento $Bb=0.30$ (línea continua); $Bb=0.25$ (línea punteada); $Bb=0.20$ (línea trazos cortos); $Bb=0.15$ (línea puntos y trazos); $B=0$ (línea trazos largos) y manteniéndose constante $\omega_0=0.8 \times 10^{23} \text{s}^{-1}$. Condiciones iniciales para ambos casos $x(0)=2.818 \times 10^{-15} \text{m}$, $v(0)=0$.

Este amortiguamiento es el debido a la radiación emitida por la partícula cargada acelerada, en este caso el electrón, representado por el término de tercera derivada en (2). Por otro lado, en la figura 2(b) se muestran las curvas de aceleración para un electrón en función del tiempo que se obtienen a partir de (15) pero esta vez para distintos factores de amortiguamiento Bb con valores 0.25, 0.20, 0.15, 0, respectivamente, manteniendo constante la frecuencia angular $\omega_0=0.7 \times 10^{23} \text{s}^{-1}$ y usando las condiciones iniciales antes fijadas. Se puede observar que a medida que disminuye B , la amplitud de la aceleración aumenta como era de esperarse, efecto que se complementa al amortiguamiento ya mencionado en el párrafo anterior. Finalmente se observa que el problema de la preaceleración persiste en esta solución, aunque resolver este problema no era objetivo del presente trabajo, puede evidenciarse que la consideración de B distinto de cero disminuye la preaceleración, lo que se corresponde con nuestra hipótesis inicial y puede ser observado en la figura 2(b).

La solución de las ecuaciones para las situaciones más complejas será explorada en una extensión del presente manuscrito. De particular interés parece conveniente la mejora de los cálculos numéricos de las soluciones de las ecuaciones plagadas sistemáticamente con inestabilidades debido

a la existencia de las soluciones fuera de control no físicas. Un problema específico que puede plantearse es la aplicación de esta metodología al movimiento dimensional de una partícula bajo la acción de un potencial de repulsión de Coulomb.

Se ha demostrado que las jerarquías de ecuación de la forma (8) y (9) son no sólo del interés teórico, sino que se puede utilizar para resolver problemas numéricos en la práctica. Un ejemplo lineal en la que todo puede ser calculado analíticamente ha sido analizado para hacerse una idea del problema general. Hemos descrito un conjunto de rutinas que pueden ser usados para poner a prueba con gran facilidad la convergencia del método y para calcular con bajo esfuerzo algunas soluciones de la Ecuación de Lorentz-Dirac (y ecuaciones con la misma estructura) que son difíciles o imposibles de obtener por medio de los métodos usuales. Puede uno esperar que dicha rutina no siempre converja, sin embargo, en este caso resuelve sorprendentemente bien coincidiendo bastante bien con los resultados previos en la literatura.

Agradecimientos

Agradecemos que este trabajo haya sido auspiciado y financiado por la División de Investigación (DI) de la Facultad Experimental de Ciencias (FEC) bajo el número 001-2013.

Referencias

- Aguirregabiria, J. M. (1997). *Solving forward Lorentz-Dirac-like equations*, J. Phys. A: Math. Gen. 30 (1997) 2391-2402.
- Cabo Montes de Oca, A. and J. Castiñeiras, *On radiation reaction and the Abraham-Lorentz-Dirac equation*, arXiv:1304.2203 [gr-qc].
- Dirac, P.A.M. (1938). *Classical theory of radiating electrons*, Proc. R. Soc. (London) A167 (1938) 148.
- Lorentz, H. A. (1909). *The theory of electrons*, Leipzig: Teubner, 1909 (2nd edition, 1916).
- Medina, Rodrigo (2006). *Radiation reaction of a classical quasi-rigid extended particle*, Journal of Physics A: Mathematical and General 39 (14): 3801-3816. 2006.
- Rohrlich F. (1997). *The dynamics of a charged sphere and the electron*, Am J Phys 65 (11) p. 1051 (1997).
- Vogt, D. and Letelier, P. S., *On the Solutions of the Lorentz-Dirac Equation*, arXiv:physics/0307005.
- Yaghjian, Arthur D. (1992). *Relativistic dynamics of a charged particle*, Lecture notes in Physcs, m11, Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.

Yaghjian, Arthur D. (2006). *Relativistic Dynamics of a Charged Sphere: Updating the Lorentz-Abraham Model*. Lecture Notes in Physics 686 (2nd ed.). New York: Springer. Chapter 8, 2006.

Actividad antagónica de un inhibidor no- Lantibiótico de clase II en *Enterococcus faecalis* autóctono frente a cepas relacionadas

L. González*

G. Reyes

J. Rivera

I. Zabala

L. Atencio

RESUMEN

La aparición de cepas bacterianas resistentes a múltiples antibióticos acarrea la necesidad de buscar alternativas a este problema de salud pública. Ante este panorama el género *Enterococcus* presenta compuestos con propiedades antibióticas (bacteriocinas o enterocinas) con capacidad de inhibir bacterias relacionadas. El objetivo de esta investigación se basó en cuantificar la actividad antagónica de una bacteriocina no-lantibiótica clase II, presente en la cepa autóctona *E. faecalis* Eq40, en unidades arbitrarias por mililitro (UA/mL) a través del método de difusión en pozos, empleando cocultivos para medir el antagonismo frente al crecimiento bacteriano. Eq40 inhibió el crecimiento de cepas Gram positivas, y su compuesto extracelular resultó un péptido constitutivo estable en UA/mL en medio sólido y líquido, incluso a dilución 10⁶, generando >180UA/mL y halos inhibitorios de 14mm de diámetro. Diluciones mayores afectaron la actividad. La actividad antagónica del

*Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Apartado 526. Maracaibo, Venezuela.

E-mail: lgonzalezpaz@gmail.com

RECIBIDO: 15-04-2015 /// ACEPTADO: 20-05-2015

compuesto analizado puede considerarse para una futura aplicación en pro del control de patógenos como *E. faecalis* y *S. aureus*, conforme aumenten los estudios y se establezcan los mecanismos de acción.

PALABRAS CLAVE: patógenos, antibióticos, bacteriocinas, enterocinas.

Antagonistic activity of a no-Lantibiotic class II inhibitor in enterococcus faecalis autochthonous against related strains

ABSTRACT

The appearance of bacterial strains resistant to multiple antibiotics leads to the necessity of seeking alternatives for this public health problem. Given this scenario, the genre "*Enterococcus*" presents compounds with antibiotic properties (bacteriocins or enterocins) capable of inhibiting the growth of related bacteria. The aim of this investigation was quantifying the antagonistic activity of a no-Lantibiotic class II bacterium, present in the autochthonous strain *E. faecalis* Eq40 in arbitrary units per millimeter (AU/mm); through the wells diffusion method and using co-cultures in order to calculate the antagonism against the bacterial growth. Eq40 inhibited the growth of Gram positive strains, and its extracellular compound turned out to be a constitutive peptide stable in AU/MM in a solid and liquid medium, even at 10^6 dilution, generating >180 AU/mm and inhibitory halos of 14mm of diameter. Higher dilutions affected the activity. The antagonistic activity of the analyzed compound might be considered for future application in favor of the control of pathogens, such as *S. aureus* and *E. faecalis*, while the studies increase and the mechanism of action are established.

KEYWORDS: pathogens, antibiotics, bacteriocins, enterocins.

Introducción

El constante surgimiento de bacterias resistentes a los antibióticos, ha acarreado la necesidad de buscar alternativas autóctonas, que permitan tratar este creciente problema de salud pública a nivel mundial. Ante este

panorama existen compuestos con propiedades antibióticas, producidos por bacterias como las ácido lácticas (BAL), entre las que se resalta las del género *Enterococcus*, que reciben el nombre de bacteriocinas, o enterocinas por su origen enterococico, las cuales son moléculas o péptidos extracelulares capaces de inhibir el crecimiento de bacterias relacionadas, a la vez que presentan la ventaja de ser biodegradables, por su composición proteica (Kirkup, 2006). El antagonismo entre bacterias, mediado por inhibidores proteicos, es un área de investigación relevante a nivel mundial, y se presenta como una posible opción para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por bacterias resistentes a los antibióticos, permitiendo el desarrollo de alternativas priorizadas con beneficio al sector salud, industrial, alimentario y biotecnológico en general (Álvarez, 2011; Izquierdo et al., 2009; Brogden, 2005).

El propósito de esta investigación se basó en evaluar la actividad antibiótica de un inhibidor del grupo de enterocinas, encontrado en cepas autóctonas de la especie bacteriana *Enterococcus faecalis*, aislada de muestras de quesos y específicamente agrupado en los péptidos extracelulares no-lantibióticos de clase II, previamente caracterizado por el laboratorio de genética y biología molecular (LGBM), FEC-LUZ. Para ello se realizó la medición parcial de su actividad antagonica expresada en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL).

1. Materiales y metodología

1.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se estudió una cepa silvestre de *Enterococcus faecalis*, previamente aislada e identificada a partir de muestras de queso semiduro comercializados en el estado Zulia, Venezuela, y caracterizada por producir un péptido extracelular del grupo de bacteriocinas (enterocinas) del tipo no-lantibiótico de clase II, con propiedades inhibitorias frente a Gram positivas, cuyos determinantes genéticos asociados a su síntesis, se encuentran codificados en el cromosoma bacteriano. Fue catalogada para este estudio como *E. faecalis* Eq40. Se utilizaron como biocontroles indicadores de sensibilidad ante antibióticos (CLSI, 2014), a las estirpes Gram positivas *E. faecalis* ATCC®29212 y *S. aureus* subsp *aureus* ATCC®25923, para los estudios de susceptibilidad (CLSI, 2014). De igual forma se utilizó como control negativo de producción de bacteriocinas, la cepa ya referida ATCC®25923 y una cepa silvestre de *E. faecalis* Eq10, que es una estirpe de la misma especie que la Eq40. Todas las cepas fueron criopreservadas a -20°C con glicerol al 20%p/v, hasta su utilización (Ausubel *et al.*, 2002).

1.2. Evaluación de actividad antagonica de la cepa de *E. faecalis* Eq40

Para la medición de la actividad antagonica del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II del grupo de las enterocinas, se evaluó la actividad residual de la cepa *E. faecalis* Eq40, de interés para este estudio, por ser productora de la exoproteína mencionada. Se utilizó el método en medio solido de difusión en pozos. A una placa de Petri que contenía 20mL de agar TSA (Tryptic Soy Agar, Merck®, Alemania) se le extrajeron “bocados” a modo de pozos con una pipeta Pasteur estéril. El medio TSA se inoculó previamente por hisopado con una alícuota de unas 10⁶UFC/mL según la escala de McFarland de la cepa sensible *E. faecalis* ATCC®29212, obtenida a partir de un cultivo de 24h, incubado en caldo infusión cerebro corazón (CICC) (HIMEDIA®, India) a 37°C. Se colocó en los pozos 50µL del cultivo de la cepa de *E. faecalis* autóctona a ensayar, y se incubó 24h a 37°C. Para evitar la formación de catabólitos inhibitorios no deseados en el CICC, que puedan generar un falso positivo, el tubo de cultivo de la cepa problema fue sellado con parafina y papel parafilm, para establecer una atmosfera con un bajo contenido de oxígeno, sumado al previo ajuste de pH con buffer fosfato a pH 7.4 (Sigma, EUA) (Pérez, 2004; Toi *et al.*, 2000).

1.3. Evaluación de la actividad antagonica de la cepa autóctona de *E. faecalis* según la cinética de crecimiento

Para ello se utilizó el protocolo propuesto por Zapata *et al.* (2009), con modificación en el tiempo de toma de muestras y evaluación de la actividad para el estudio de la actividad antagonica en medio sólido y líquido. Se inoculo 1mL de un cultivo de la cepa a evaluar (Eq40) en 9mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth, Merck®, Alemania) inoculado con la cepa biocontrol *E. faecalis* ATCC®29212. Las cepas se obtuvieron a partir de un cultivo de 24h, crecidas en caldo TSB a 37°C. El cocultivo establecido (Eq40+biocontrol) se incubó a 35°C. Seguidamente se tomó un inóculo de 100µL del cultivo cada 120min, diluido en 900µL de solución isotónica (NaCl al 0,9%) por un período de 48h, y se monitoreó el crecimiento bacteriano de la cepa Eq40, mediante recuento en placa, determinando el número de UFC/mL (para el ensayo en medio líquido) y según el aumento del halo de inhibición, medido en diámetro, aplicando el método en medio solido de difusión en pozos previamente señalado. Ambos ensayos se realizaron en función del tiempo y por triplicado.

Para observar el efecto antagonico de la cepa Eq40 sobre la cinética de crecimiento de representantes Gram positivos, se empleó para el estudio en medio solido el biocontrol *E. faecalis* ATCC®29212, y para el ensayo en medio liquido la cepa *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC®25923, puesto que esta última, además de ser una bacteria Gram positiva sensible a los antibióticos, permite

su recuperación del cocultivo bacteriano por ser otra especie relacionada, y por ende su cuantificación. Para esta discriminación se utilizaron los medios de cultivos selectivos Agar Membrana Filtrante para enterococos (Merck®, Alemania) y el medio Agar Vogel Johnson (HIMEDIA®, India) para *S. aureus*.

1.4. Extracción parcial del péptido extracelular de la cepa autóctona de *E. faecalis* para el estudio y medición de la actividad antagónica

Una vez establecida y confirmada la actividad antimicrobiana asociada a antagonistas de origen extracelular en la cepa *E. faecalis* Eq40, se buscó obtener el péptido de la enterocina no-lantibiótica de clase II responsable de la actividad inhibitoria, para su posterior medición, empleando los mismos lineamientos propuestos para la confirmación de actividad antagónica mediante el método directo de difusión en pozos, frente a la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212, pero en este caso, con un diseño experimental basado en la utilización de los sobrenadantes o extractos crudos de bacteriocina (ECB) tras una centrifugación inicial 15min a 14.000rpm. Los sobrenadantes se sometieron a una precipitación con ácido tricloroacético (ATCA) (Sigma, EUA) siguiendo el procedimiento de Fath *et al.* (1994), modificado según los lineamientos propuestos por Dumont (2004). La concentración final de ATCA en el sobrenadante, fue del 10%v/v. Los ECB tratados y alícuotados en eppendorf, se incubaron en hielo durante 45min y posteriormente, se centrifugaron a 15.000rpm durante 15min.

Los sedimentos se lavaron con propanona (Sigma, EUA) al 100% preenfriada a -20°C para retirar el ATCA residual, este procedimiento se repitió tres veces, y posteriormente se resuspendió el ECB en una solución de buffer fosfato a pH 7.4 (Sigma, EUA). Finalmente, se depositaron 50µL de los concentrados en placas de agar TSA previamente inoculadas superficialmente con la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212, para luego ser incubadas 24h a 37°C. Al igual que lo indicado en la sección para la confirmación de actividad antagónica.

1.5. Determinación de las unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL) del inhibidor No-Lantibiótico de Clase II de la cepa *E. faecalis* Eq40

La actividad antagónica tras la extracción parcial del péptido extracelular agrupado en las enterocinas no-lantibióticas de clase II, se evaluó arbitrariamente en unidades de actividad por mililitro (UA/mL) para lo que se aplicó la fórmula propuesta por Pérez (2004), con la que se define 1UA/mL como el inverso de la máxima dilución en la que se obtuvo un halo de inhibición igual o mayor a 0,5 mm: $UA/mL = (1/d) (1/m) (f)$. Dónde: UA = unidades de actividad, d = dilución donde se detecta un halo de inhibición de

0,5 mm, f = factor de conversión (1000 μL / 1 mL) y m = volumen de muestra (mL).

La actividad se evaluó estableciendo la dilución más alta en la que se observó un halo de inhibición igual o mayor a 0,5mm, según lo propuesto por Pérez (2004), cuando se disolvió una suspensión del ECB en un buffer fosfato a pH 7.4 (Sigma, EUA) luego de la remoción celular por centrifugación, y siguiendo el procedimiento de Fath *et al.* (1994), modificado según los lineamientos propuestos por Dumont (2004). La actividad inhibitoria resultante o residual observada tras las diluciones se determinó como se indicó en el punto 1.2, depositando 50 μL de las diluciones en pozos elaborados en placas de agar TSA previamente inoculadas superficialmente con la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212, para luego ser incubadas 24h a 37°C. Dicho ensayo se hizo por triplicado.

Pasado el periodo de incubación se evaluó la proporcionalidad de la dilución del compuesto antimicrobiano respecto al halo de inhibición, producido sobre la cepa sensible o indicadora *E. faecalis* ATCC®29212. Las diluciones realizadas y evaluadas del ECB fueron de 10^1 a 10^5 .

1.6. Análisis de resultados

Se determinó la proporcionalidad de la dilución de los compuestos no-lantibióticos de clase II respecto al halo de inhibición generado a partir de los ECB, y se evaluó el comportamiento de las UA/mL obtenidas, en relación al halo de inhibición observado, de acuerdo con el diseño experimental planteado. Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico *Origin for Windows* versión 6.0. (Atencio *et al.*, 2009).

2. Resultados y discusión

Se encontró que la estirpe Eq40, seleccionada para la evaluación de su actividad antimicrobiana, ciertamente inhibió el crecimiento de la cepa relacionada empleada como indicador de sensibilidad *E. faecalis* ATCC®29212 (Figura 1) como se ha reportado y siguiendo el diseño experimental propuesto (Álvarez, 2011; Izquierdo *et al.*, 2009; Toi, 2000).

Los resultados obtenidos tras emplear cultivos de 24h de la cepa Eq40 sellados con parafina y papel parafilm, para establecer una atmosfera con un bajo contenido de oxígeno, sumado al previo ajuste de pH con buffer fosfato a pH 7.4, y el ensayo de cocultivo con la cepa catalasa positiva *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC®25923, permiten corroborar que la actividad antagonica mostrada está asociada a productos inhibitorios no relacionados con

catabolitos de tipo fermentativos ni ácidos orgánicos. Además de señalar que el medio de cultivo TSA fue utilizado al ser ampliamente recomendado para detectar actividad antagónica mediada por enterocinas, por su composición proteica elevada y bajo contenido de carbohidratos fermentables, el medio garantiza la neutralización de los compuestos ácidos que se generen, lo que permite de igual manera descartar la participación de ácidos orgánicos en la actividad antimicrobiana (Bautista *et al.*, 2010, Toi *et al.*, 2000). Por ende se está en presencia de compuestos antagónicos que no se ven afectados por las condiciones experimentales establecidas en este ensayo como se ha reportado como las del tipo enterocinas (Martín *et al.*, 2006). Aunque se ha descrito que factores no considerados en este estudio como modificaciones del pH, temperatura y concentración de nutrientes, afectan considerablemente la biosíntesis de diversos tipos de bacteriocinas (Aasen *et al.*, 2000).

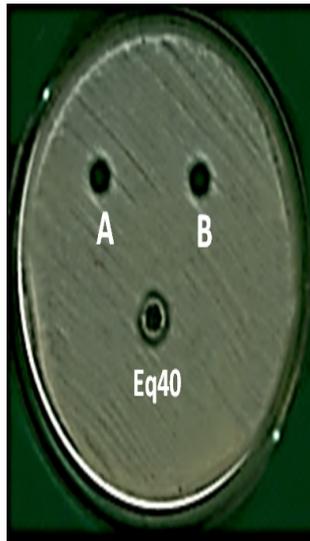


FIGURA 1. Prueba para la confirmación de la actividad antagónica de la cepa de *E. faecalis* Eq40 contra la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212.

Suspensión de la cepa Eq40 y su actividad inhibitoria (flecha blanca) sobre la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212 inoculada a modo de césped en la placa de medio TSA. A, cepa Eq10 (misma especie y control negativo para la producción de bacteriocinas) y B, cepa *S. aureus* ATCC®25923 (especie relacionada y control negativo para la producción de bacteriocinas). Posterior a la incubación 24h a 37°C con bajo suministro de oxígeno y pH 7.4.

2.1. Actividad antagonica de la cepa autóctona de *E. faecalis* según la cinética de crecimiento

Se observó un aumento progresivo en el halo inhibitorio mostrado por la cepa Eq40 de 6 a 10 mm de diámetro en términos de 48h, frente al microorganismo indicador *E. faecalis* ATCC®29212 luego del ensayo en cocultivos en medio sólido a 37°C y pH 7.4; la mayor actividad se alcanzó a las 24h (Figura 2) en fase logarítmica tardía, basados en la curva de crecimiento de la cepas evaluadas y empleando inóculos estandarizados según mediciones turbidimétricas establecidas previamente en función de la escala McFarland. Esta cinética típica de un metabolito primario asociado al crecimiento, se ha observado en la producción de bacteriocinas de bacterias lácticas como los enterococos (Zapata *et al.*, 2009; Herranz, 2000).

No obstante, también existen casos en los que la máxima actividad antimicrobiana se alcanza durante la fase estacionaria del crecimiento, momento en el que los nutrientes comienzan a escasear y la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana puede conferir una ventaja en la competición por los sustratos limitantes (Herranz, 2000).

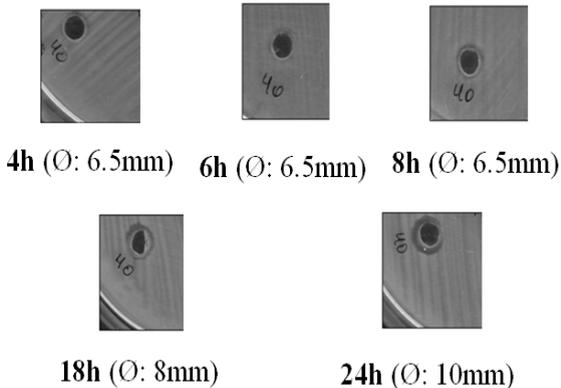


FIGURA 2. Actividad antagonica de la cepa de *E. faecalis* Eq40 según la cinética de crecimiento en medio sólido expresada en diámetro (Ø) y en términos de 24h.

Estos resultados se correlacionan con los reportados en investigaciones que indican que debido a que los antagonistas de origen ribosómico son en su mayoría metabolitos estrechamente afectados por la cinética de crecimiento, se logra una mejor producción mediante la optimización de las condiciones de crecimiento del microorganismo productor, sin prescindir de su presencia (Aymerich *et al.*, 2000).

Del mismo modo en los ensayos empleando medios de cultivo líquidos de propósito general, a 37°C y pH 7.4, se observó cómo se reducía la población de la cepas indicadora *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC®25923, cuando fue cocultivada con la cepa Eq40, con una disminución en el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) en promedio desde $3,0 \times 10^{10}$ hasta unas 1×10^9 UFC/mL, en términos de 24h (Figura 3).

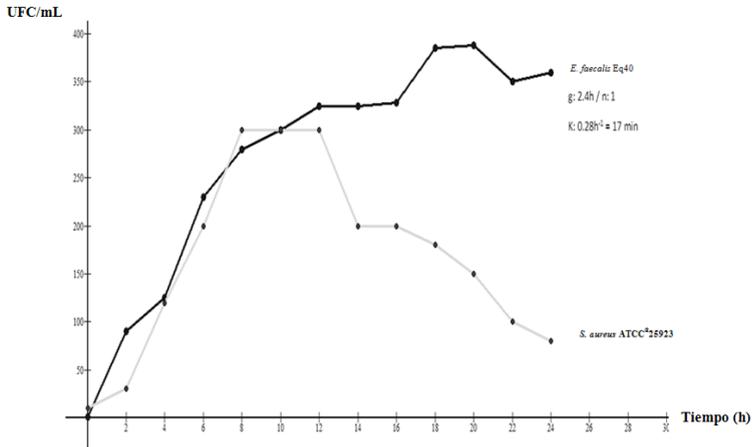


FIGURA 3. Cinética de crecimiento y actividad antimicrobiana del antagonista extracelular de la cepa *E. faecalis* Eq40 en medio líquido.

Número de UFC/mL (eje Y) de la cepa indicadora *S. aureus* ATCC®25923 (línea gris de puntos negros), en términos de 24h (eje X), en cocultivos frente a la cepa evaluada Eq40 (líneas negra).

En ambos ensayos (cocultivos en medio sólido y medio líquido) se apreció un descenso de la actividad antimicrobiana transcurrido el tiempo descrito, lo cual es un fenómeno que se ha observado en la mayoría de las bacteriocinas caracterizadas. No obstante, existen excepciones demostradas por otros autores, ya que en algunos ensayos la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas se mantiene relativamente constante y estable durante un tiempo considerable (Aymerich *et al.*, 2000; Krier *et al.*, 1998). En este sentido Herranz (2000) y De Vuyst *et al.*, (1996) señalaron que, en general, la tasa de inactivación de las bacteriocinas es mayor en los cultivos con pH estabilizado, como sucedió en este estudio.

La cepa Eq40 presentó en este estudio un efecto inhibitorio tanto sobre la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212, así como también frente a la especie *S. aureus* subsp *aureus* ATCC®25923 al igual que lo reportado para exotoxinas relacionadas del género *Enterococcus* (Izquierdo *et al.*, 2009).

La actividad antagonica se corresponde con las características descritas para estirpes productoras de bacteriocinas del género y se ha asociado a la interacción con ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas (Álvarez, 2011).

Estos resultados coinciden con estudios en los que se establecieron las condiciones óptimas para el control de microorganismos patógenos usando cocultivos en diversos sistemas alimentarios ensayados, evaluando cepas del género *Enterococcus* productoras de bacteriocinas frente a estirpes relacionadas como *S. aureus* (Muñoz *et al.*, 2007).

La heterogeneidad del espectro de acción antimicrobiano obtenido, se relaciona con lo descrito en la literatura (Cintas *et al.*, 2001). Se reporta que compuestos con este comportamiento, poseen un espectro de acción denominado intermedio, al ser capaces de inhibir a otras cepas distintas al microorganismo productor, incluyendo a miembros del género *Staphylococcus* (Salinas, 2001).

La disminución de la actividad antimicrobiana con el paso del tiempo, puede deberse a la inestabilidad de la bacteriocina a un pH determinado puesto que estas se ven favorecidas o responden más eficientemente a parámetros específicos, también puede corresponder a una degradación proteolítica, he incluso a causa de adsorción por parte de las células productoras. La inactivación de las bacteriocinas por enzimas proteolíticas, liberadas principalmente durante la fase estacionaria, sería otra causa que explicaría la disminución de la actividad antimicrobiana, ya que la producción y/o la actividad de estos antagonistas tiende a ser pH dependiente (Herranz, 2000).

La adsorción de las bacteriocinas a las células productoras es un proceso inespecífico, dependiente del pH y que, probablemente, implica la interacción con los ácidos lipoteicoicos de la pared celular (Aymerich y col., 2000). Se ha determinado que a un pH próximo al fisiológico, se promueve la adsorción de bacteriocinas a las respectivas células productoras, mientras que a pH ácido no se observaba dicho fenómeno, variando ampliamente a pH alcalino (Herranz, 2000).

El hecho de que la actividad antimicrobiana disminuya una vez alcanzado un valor máximo, que depende de la cepa productora y de las condiciones de cultivo, implica que existe un momento en el que la producción cesa y comienza un proceso de degradación o inactivación. La inestabilidad de la actividad antimicrobiana implica que para lograr un rendimiento óptimo de producción de bacteriocinas es imprescindible obtenerlas inmediatamente después de detectar el máximo de actividad, utilizar condiciones que minimicen la agregación o la adsorción, o bien, retirarlas de manera continua del caldo; empleando por ejemplo: adsorbentes o métodos sustitutos a la centrifugación (Herranz, 2000; De Vuyst *et al.*, 1996).

2.2. Extracción parcial del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II de la cepa *E. faecalis* para el estudio y medición de la actividad antagonista en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL)

El antagonista bacteriano de la cepa *E. faecalis* Eq40, se extrajo parcialmente de sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos en fase logarítmica tardía de la cepa evaluada, empleando una modificación del procedimiento descrito por Fath *et al.*, (1994), y siguiendo los lineamientos propuestos por Dumont, (2004) y utilizado por Suárez *et al.*, (2008). Este procedimiento se basó en la precipitación proteica con el empleo de solventes que garantizan la estabilidad de las moléculas bacteriocigénicas, de tipo enterocinas, para su posterior vehiculización en soluciones hidroalcoholadas con pH ajustado. En el ensayo de actividad antimicrobiana en placas, se evidenciaron halos de inhibición (Figura 4).

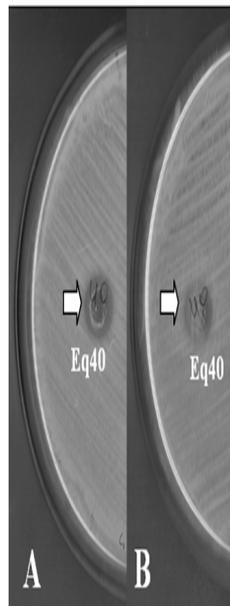


FIGURA 4. Actividad antibacteriana del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II de la cepa silvestre *E. faecalis* Eq40 posterior a su extracción parcial con ATCA.

Halos inhibitorios mostrados por la cepa evaluada (Eq40) en términos del primer nivel de dilución y empleando un volumen de ECB de 50µL. A, *S. aureus* ATCC®25923; B, *E. faecalis* ATCC®29212 (cepas usadas como indicadores de actividad).

Los resultados obtenidos permitieron apreciar un aumento en la actividad antagonica mostrada inicialmente por los ECB al ser empleados luego de su precipitado tras la adición de ATCA al 10%p/v, y su posterior remoción con la adición de una solución de propanona al 100% preenfriada, en términos del primer nivel de dilución 1:10 y en base a un volumen de ECB de 50µL. El incremento en la actividad se vio evidenciado por un aumento en mm de 6 a 11 para la cepa Eq40 (Figura 4), tanto frente a el indicador *E. faecalis* como ante *S. aureus*. Este aumento de la actividad concuerda con lo reportado por diversos autores quienes señalan que al emplear el ATCA se evidencia un aumento en la actividad de las bacteriocinas, lo cual se debe a la capacidad de las exoproteínas con actividad antagonica para mantener sus estabilidad a bajos rangos de pH (Suárez *et al.*, 2008; Dumont, 2004).

Es importante señalar que el hecho de que los diámetros de los halos inhibitorios mostrados por la cepa Eq40 sean similares luego del tratamiento con ATCA, para *E. faecalis* ATCC®29212 y *S. aureus* ATCC®25923, es indicio de que el péptido extracelular no-lantibiótico de clase II es un compuesto antagonico que se comporta de manera análoga frente a los mismos microorganismos indicadores y ante la condiciones de pH, exhibidas por el protocolo.

Al realizar mediciones de pH posterior al tratamiento con ATCA, se pudo apreciar que este se mantuvo entre 7,5 y 8,5, rango tolerable por las cepas del género *Enterococcus* y mediado quizás por la peptona del medio TSA, ya que la alta concentración proteica de este medio de cultivo, y el bajo contenido de carbohidratos fermentables, garantiza con la liberación de amoníaco (NH₃) el aumento del pH y la neutralización del posible ATCA residual, en base a esto, y aunado al hecho de que se observó la inhibición de todas las cepas Gram positivas probadas, se puede inferir que la actividad antagonica esta mediada por el péptido extracelular no-lantibiótico de clase II, y no está asociada al compuesto germicida y queratolítico usado ATCA (Bautista *et al.*, 2010).

Con relación al comportamiento en UA/mL del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II respecto al halo de inhibición, se observó que es aproximadamente lineal (con un ajuste de R² 0,9288) a partir de un halo de inhibición de 6 mm de diámetro, correspondiente a la dilución 10⁵ la cual fue la más alta con actividad visible, y que corresponde a una concentración de 30,6 UA/mL y como lo demuestra la correlación entre las UA/mL y la actividad inhibitoria (Figuras 5 y 6). En relación con el aumento del nivel de dilución del compuesto antagonico el halo de 14 mm corresponde a la concentración de 181,7 UA/mL. La cepa *E. faecalis* ATCC®29212 se usó como indicador de actividad. Diluciones mayores implicaron la pérdida total del

halo de inhibición. Tal efecto puede deberse a una falta de sensibilidad del método para detectar variaciones a bajas concentraciones de la bacteriocina. Del mismo modo, se han reportado posibles problemas en algunos otros aspectos del método como el tiempo de preincubación, el tamaño del pozo, el volumen de la muestra y la pureza del agar, entre otros, generando con ello falsos negativos (De Vuyst *et al.*, 1996).

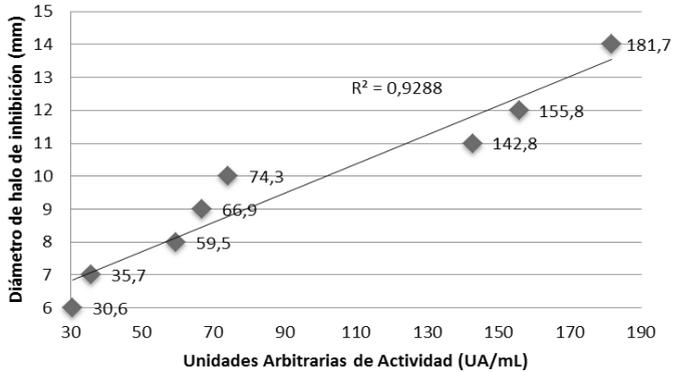


FIGURA 5. Correlación entre el diámetro del halo inhibitorio y las unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL) del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II de la cepa autóctona *E. faecalis* Eq40.



FIGURA 6. Diluciones del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II de la cepa autóctona *E. faecalis* Eq40 para su medición en unidades arbitrarias de actividad por mililitro (UA/mL) frente a la cepa *E. faecalis* ATCC®29212.

Puesto que la proporcionalidad se presentó a partir de la dilución 10^5 , la cual generó un halo de inhibición de 6 mm, mayor a lo requerido por el método de Pérez (2004), se tomó este valor para definir una unidad arbitraria de actividad por mililitro de extracto crudo (UA/mL), por lo que como se mencionó: $1 \text{ UA} / \text{mL} = (10/5) (1/0,050 \text{ mL}) = 40$.

El valor 0,050 representa el volumen de extracto depositado en el pozo. El cálculo anterior indica que un halo de 6 mm es generado a partir de un ECB que contiene una actividad equivalente a 30-40 UA/mL para estos antagonistas exoproteicos de origen ribosómico, resultado muy similar a lo reportado por Germond *et al.*, (2002).

Los resultados tras las diluciones mostraron la disminución gradual en el halo inhibitorio desarrollado por el ECB de la cepa evaluada en relación con el aumento del nivel de dilución del compuesto bacteriocigénico. La dilución del ECB fue de 10^1 a 10^7 (pozos 1-7), se empleó como control el ECB sin diluir (c, en el interior de la placa).

Cabe destacar que el número de UA/mL obtenidas corresponden a la actividad inhibitoria sobre la cepa indicadora *E. faecalis* ATCC®29212; si se deseara aplicarla sobre otro microorganismo indicador, se ha propuesto que habría que determinar del mismo modo las UA/mL, debido a que cada cepa y especie bacteriana sensible a la misma bacteriocina, presenta un grado de inhibición particular, aunque puede extrapolarse los resultados en bacterias de un mismo género y/o cercanamente relacionadas (Pérez, 2004). Para todos los biocontroles ensayados el ECB producido por la cepa Eq40 exhibió una actividad máxima de entre unas 100 y 150UA/mL, presentaron halos de inhibición definidos hasta la dilución 10^6 , y alcanzando una máxima potencia de unas 180UA/mL (Figura 6).

Estos resultados son similares a los parámetros de actividad inhibitoria reportado en UA/mL para bacteriocinas del género como la enterocina 96, la cual inhibe con unas 100UA/mL de forma equivalente a las estirpes del género *Enterococcus* y *Staphylococcus* empleando extractos parcialmente purificados de cepas de *E. faecalis* (Izquierdo *et al.*, 2009). Concentraciones similares también se han reportado en antagonistas como la enterocina B, siendo altamente sensibles las estirpes propias del género *Enterococcus* (Casas *et al.*, 1997). Sin embargo, los resultados obtenidos difieren en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) obtenidas para bacteriocinas del género como la enterolisina A, las cuales son mucho mayores, encontrándose alrededor de unas 1000UA/mL para gran parte de los entes microbianos ensayados (Nilsen *et al.*, 2003).

A pesar de que el espectro de acción antibacteriano de la cepa Eq40 está restringido a Gram positivas, es importante señalar que puede por ende, ser capaz de inhibir el crecimiento de estirpes como *S. aureus* M03A-07, tipificada como una cepa resistente a betalactámicos semisintéticos como metilina

(Rivera *et al.*, 2011). Por lo que con miras a una futura aplicación para el control de patógenos, se recomienda el empleo de métodos que permitan una extracción más eficiente de estos compuestos en cepas autóctonas de *E. faecalis* para poder aplicar conocimientos en proteómica que permitan caracterizar la molécula por electroforesis en geles de poliacrilamida, para determinar así la secuencia aminoacídica del compuesto antagónico y contribuir con su caracterización.

Conclusiones

Se encontró que la estirpe autóctona Eq40, es capaz de inhibir el crecimiento de cepas relacionadas gracias a la producción de un compuesto antagónico extracelular que puede ser explotado como una posible opción para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por bacterias resistentes a los antibióticos.

Apesar de que la actividad antagónica estudiada del péptido extracelular no-lantibiótico de clase II, producido por la cepa enterocócica Eq40 es constitutiva y estable, y no sufrió cambios significativos en el número de UA/mL obtenidas en los diversos ensayos en medio sólido y líquido empleados, se recomienda el empleo de otros métodos y/o técnicas de purificación que permitan una extracción más eficiente de este compuesto bacteriocigénico.

La actividad antagónica del compuesto analizado puede considerarse para una futura aplicación en pro del control de patógenos como *E. faecalis* y *S. aureus*, permitiendo el desarrollo de alternativas priorizadas con beneficio al sector salud, industrial, alimentario y biotecnológico en general, conforme se realicen más estudios, se incrementen los avances biotecnológicos y se establezcan sus mecanismos de acción.

Referencias

- Aasen, I., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., Storro, I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53(2): 159-166.
- Álvarez, C. (2011). Aspectos de seguridad de *Enterococcus faecium* MXVK29 y *Enterococcus faecalis* MXVK22 aislados de productos cárnicos y caracterización molecular de sus bacteriocinas. (Tesis Doctoral). Distrito Federal, México: Universidad Autónoma Metropolitana. 121 p.
- Atencio, L., Rivera, J., Aranaga, V., Navarro, C., Guíñez, J. (2009). Caracterización de plásmidos y de la susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Micrococcus* sp. *Bol. Centro Invest. Biol.*, 43(1): 77-95.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. (2002). Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from

- Current protocols in molecular biology. Hoboken. 3 rd. ed. New York: Wiley. 232 p.
- Aymerich, M., Artigas, M., Garriga, M., Monfort, J., Hugas, M. (2000). Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of *in vitro* production and antilisterial effect in dry fermented sausages. *J Appl. Microbiol.*, 88 (4): 686-694.
- Bautista, A., Álvarez, C., Ponce, A. (2010). Evaluación del efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto crudo de bacteriocina en combinación con conservadores químicos utilizados en la industria cárnica. *NACAMEH.*, 4(2): 69-84.
- Brogden, K. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(3): 238-250.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L., Nes, I., Hernández, P., Holo, H. (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology.*, 143(7): 2287-2294.
- Cintas, L., Casaus, M., Herranz, C., Nes, I., Hernández, P. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci Technol Int.*, 74(4): 281- 305.
- Clinical and Laboratory Standards Institute -CLSI. (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-first informational supplement M100-S24. USA: CLSI Editor. 230 p.
- De Vuyst, L., Callewaert, R., Crabbè, K. (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth conditions. *Microbiology.*, 142(4): 817-827.
- Dumont, F. (2004). Producción inducible de lactococina a, pediocina pa-1, colicina v e interleuquina-2 en cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Madrid, España. 223 p.
- Fath, M., Zhang, L., Rush, J., Kolter, R. (1994). Purification and characterization of colicin V from *Escherichia coli* culture supernatants. *Biochemistry.*, 33(22): 6911-6917.
- Germond, J., Marciset, O., Mollet, B. (2002). Bacteriocinas de *Streptococcus thermophilus*. société des produits nestlé S.A. Oficina española de patentes y marcas. Número de publicación: ES 2 165 860 T3. Case postale 353. 1800 Vevey, CH. 27 p.
- Herranz, C. (2000). Caracterización bioquímica y genética de enterocinas producidas por cepas de "*Enterococcus faecium*" de origen cárnico: optimización de la producción molecular de acción de la enterocina p de "*Enterococcus faecium*" p13. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria. Departamento de Nutrición y Bromatología III. Higiene y Tecnología de los Alimentos. 327 p.
- Izquierdo, E., Wagner, C., Marchioni, E., Aoude, D., Said, E. (2009). Enterocin 96, a novel class II bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* WHE 96, isolated from munster cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75 (13): 4273-4276.

- Kirkup, B. (2006). Bacteriocins as oral and gastrointestinal antibiotics: theoretical considerations, applied research, and practical applications. *Curr. Med. Chem.*, 13(27): 3335-50.
- Krier, F., Revol, A., Germain, P. (1998). Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50(3): 359-363.
- Martín, A., Valdivia, E., Ruiz, M., Soler, J., Martín, M., Maqueda, M., Martínez M. (2006). Characterization of antimicrobial substances produced by *Enterococcus faecalis* MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (*Upupa epops*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(6): 4245-4249.
- Muñoz, A., Ananou, S., Gálvez, A., Martínez, M., Rodríguez, A., Maqueda, M., Valdivia E. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: bactericidal synergism through heat and AS-48. *International Dairy Journal.*, 17(7): 760-769.
- Nilsen, T., Ingolf, F., Nes, I., Holo, H. (2003). Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5): 2975-2984.
- Pérez, M. (2004). Caracterización bioquímica y espectro de inhibición microbiana de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, México. 164 p.
- Rivera, J., Mujica, I., Aranaga, V., Navarro, C., Zabala, I., Atencio, L. (2011). *Staphylococcus aureus* procedentes de quesos: susceptibilidad a antibióticos y su relación con plásmidos. *Rev. Cient.*, 21(3):202-210.
- Salinas, B. (2001). Producción de queso tipo blando, utilizando como cultivos iniciadores bacterias productoras de bacteriocinas. (Trabajo de Grado). Maracaibo: Universidad del Zulia. 145 p.
- Suárez, M., Francisco, A., Beirão, L. (2008). Influencia de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* sobre la vida útil de filetes del híbrido de *Cachama piaractus brachypomus* x *Colossoma macropomum* empacado al vacío. *Vitae*, 15(1):32-40.
- Toi, M., Franz, P., Dicks, T., Holzapfel, W. (2000). Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *J Appl. Microbiol.*, 88(3): 482-494.
- Zapata, S., Muñoz, J., Ruiz, O., Montoya, O., Gutiérrez, P. (2009). Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. *Vitae*, 16(1): 75-82.

Estabilización de emulsiones con mezclas de un surfactante no-iónico y derivados de lignina sintetizados con asistencia de microondas

*Nacarid Delgado^{*1}*
Fredy Ysambert²
Eduardo Padilla¹
Gerson Chávez¹
Bélgica Bravo¹
Nelson Márquez¹

RESUMEN

En este trabajo se realizó la modificación estructural de la lignina de pino proveniente de la precipitación ácida de licor negro residual, del proceso de pulpado de la empresa Mocarpel (LPM), con los anhídridos succínico (AS), maleico (AM) y glutárico (AG) mediante irradiación con microondas en un horno convencional. Las reacciones de acoplamiento se siguieron por la técnica de espectrometría FTIR. Se estudiaron las propiedades emulsionantes de los derivados mediante la preparación de sistemas agua/querosén empleando como referencia emulsiones preparadas con los surfactantes comerciales nonilfenol polietoxilado con 18 unidades repetidas de óxido de etileno (NPE-18) y dodecibencensulfonato de sodio (DBS), con el fin de comparar y evaluar las propiedades obtenidas de las emulsiones preparadas con estos derivados, tanto solos como mezclados con el surfactante NPE-18.

PALABRAS CLAVE: lignina, microondas, surfactantes, emulsiones, estabilidad.

¹Laboratorio de Petroquímica y Surfactantes (LPS). Departamento de Química. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Apartado 526. Maracaibo, Venezuela. E-mail: nacadel@gmail.com*

²Laboratorio de Instrumentación Analítica (LIA). Departamento de Química. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Apartado 526. Maracaibo, Venezuela.

Stabilization of emulsions with mixtures of a nonionic surfactant and lignin derivatives synthesized by the assistance of a microwave

ABSTRACT

In this paper was performed the structural modification of the pine lignin that comes from the acid precipitation of residual black liquor of the pulping process of Mocarpel Company (LPM), with succinic anhydrides (AS), maleic (AM) and glutaric (AG); made through microwave irradiation in a conventional oven. The coupling reactions were followed by the FTIR spectrometry technique. The emulsifying properties of the derivatives were studied through the preparation of water/kerosene systems, using as reference emulsions prepared by the commercial surfactants with nonylphenol polyethoxylated with 18 repeating units of ethylene oxide (NPE-18) and sodium dodecylbenzenesulfonate (DBS), in order to compare and evaluate the properties obtained from the emulsions prepared with these derivatives, both alone and blended with the surfactant NPE-18.

KEYWORDS: lignin, microwave, surfactants, emulsions, stability.

Introducción

La lignina es un polímero natural amorfo de naturaleza aromática que se encuentra en las plantas y también en la madera, al igual que la celulosa (Eriksson *et al.*, 2009). La industria de pulpa y papel ha sido considerada como uno de los más grandes consumidores de recursos naturales y la lignina es uno de los subproductos principales de esta empresa manufacturera (De los Santos Ramos *et al.*, 2009); esta lignina se utiliza principalmente como combustible que genera una fuente energética en el proceso de pulpaje convencional. El interés en usar fibra maderera para la producción de celulosa para papel está creciendo, lo que conlleva a la obtención de grandes cantidades de desechos lignicos que se pueden utilizar para desarrollar nuevas aplicaciones en la industria química (Homma *et al.*, 2008; Ouyang *et al.*, 2009) y farmacéutica (Kubo *et al.*, 2003), entre otras. Puesto que se ha reportado que la lignina posee propiedades tensoactivas (Padilla *et al.*, 2002; Ouyang *et al.*, 2009) ésta se puede aprovechar y a la vez minimizar la contaminación ambiental (Chen

et al., 2008) dándole un valor agregado a los desechos del pulpaje (Holladay *et al.*, 2007; Shulga *et al.*, 2011). La lignina disuelta en estos desechos puede utilizarse como materia prima, ya que solo el 1 - 2% del licor negro donde se encuentra disuelta es utilizado para valiosos procesos industriales (Stewart, 2008). Dependiendo de la aplicación, en algunos casos es necesario modificar estructuralmente la lignina para conferirle propiedades específicas.

En la literatura se ha encontrado un gran número de reacciones de modificación de la lignina (Ouyang *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2001; Stewart, 2008; Zhao *et al.*, 2001; Xiao-Feng *et al.*, 2006; Doczekalska *et al.*, 2007; Hutterman *et al.*, 2001) entre las que se encuentran las reacciones de acilación con anhídridos cíclicos (succínico, maleico, glutárico o ftálico) adicionándole ciertas propiedades surfactantes. Las propiedades de la lignina pueden ser modificadas por reacciones de esterificación con anhídridos cíclicos mediante el uso de la técnica de radiación con microondas (Ysambertt *et al.*, 2009; Maldhure *et al.*, 2011; Delgado *et al.*, 2012), la cual es rápida y sencilla en comparación con el método convencional (Ratanakamnuan *et al.*, 2012). La reacción se realiza con la finalidad de variar el balance hidrofílico-lipofílico de la macromolécula.

En el presente trabajo se realizó la modificación estructural de lignina de pino con AS, AM y AG, para posteriormente utilizarlo como surfactante del tipo aniónico, tanto individualmente como mezclado con un surfactante no iónico comercial de referencia para la formulación de emulsiones agua/ aceite.

1. Parte experimental

1.1. Reactivos, solventes y muestras

El sustrato que se utilizó para la síntesis con microondas fue lignina de pino precipitada con HCl concentrado (Riedel de Haën; 37%) hasta pH 5, a partir de un licor negro suministrado por la empresa Smurfit Morcapel, la cual se modificó con los anhídridos Succínico (Merck; 99%), Maleico (Merck; 99%) y Glutárico (TCI América; 98%). También se empleó solución de hidróxido de sodio (Merck; 99%) y como solventes acetonitrilo (Merck; 99,8%) y etanol (Merck; 99,9%). Para la preparación de las pastillas a medir en el FTIR se utilizó bromuro de potasio (Merck; grado espectroscópico).

Para la preparación de las emulsiones se utilizó el surfactante no iónico Nonilfenol polietoxilado con un número de óxido de etileno (EON) de 18 (NPE-18), suministrado por Oxiteno y el surfactante aniónico Dodecilbencensulfonato de sodio (DBS, Sigma-Aldrich; 80%), como fase oleica se empleó querosén de uso doméstico con un EACN (Número de átomos

de Carbono del alcano equivalente) de 9 y como fase acuosa se utilizaron soluciones acuosas de hidróxido de sodio 0,1 M, dada la baja solubilidad de lignina y sus derivados en medio acuoso.

1.2. Materiales y equipos

Para las síntesis se utilizó un horno microonda de uso doméstico marca Panasonic con una potencia máxima de 1200 Watts. Para la precipitación de los derivados se utilizó una centrifugadora marca Centra®. Para la caracterización de los fragmentos lignicos obtenidos se utilizó un espectrómetro FTIR marca Shimadzu modelo 8400 s. Las emulsiones se prepararon con un homogeneizador Silent Crusher M marca Heidolph, con barra homogeneizador modelo 8F, y en algunos casos se prepararon con un vortex marca Fisher Scientific. Para las pruebas de estabilidad de las emulsiones se utilizó un baño termostático PolyScience con circulador de agua marca LAUDA tipo B. Los valores de conductividad se determinaron con el Microprocessor Conductivity Meter, modelo LF 320 y con la Standard-conductivity cell TetraCon®325. La viscosidad de las emulsiones se determinó con un reómetro marca Brookfield, modelo LVDV-III+, con el Software Rheocal32 para el análisis de los resultados.

1.3. Modificación química de la lignina por medio de radiación microondas

La modificación química de la lignina se realizó siguiendo procedimientos establecidos en estudios previos (Ysambertt *et al.*, 2009; Delgado *et al.*, 2012), empleando los anhídridos: succínico, maleico y glutárico. Todas las reacciones se hicieron al menos por triplicado. Las Figuras 1, 2 y 3 ilustran los esquemas de reacción de la modificación de LPM con AS, AM y AG, respectivamente. Los tres procedimientos asistidos por microondas (MW) se detallan a continuación:

1.3.1. Modificación de lignina con anhídrido succínico

Se tomaron 100 mg de LPM y se mezclaron con 200 mg del anhídrido en un reactor para síntesis, posteriormente se le adicionaron 5 mL de una mezcla de solventes acetonitrilo/etanol en una proporción 4:1 como medio difusor y se llevó a sonicación por 5 min. Luego se sometió a reacción por 80 s en un microondas de uso doméstico a su máxima potencia. Los derivados se precipitaron con una disolución de HCl al 5% y se separaron por centrifugación a 5000 rpm por 15 min, hasta obtener un sobrenadante claro, el sólido se secó en una estufa por un periodo de 24 h (Delgado *et al.*, 2012).

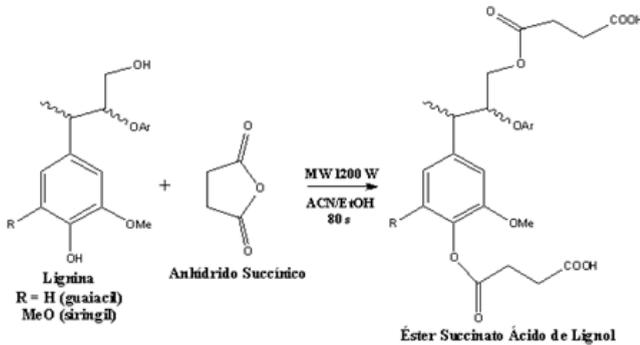


FIGURA 1. Esquema de reacción para la modificación química de lignina de pino con anhídrido succínico (Ar: Aromático, Me: Metilo, ACN: acetonitrilo, EtOH: etanol)

1.3.2. Modificación de lignina con anhídrido maleico

Se tomaron 100 mg de LPM y se mezclaron en un reactor con 500 mg del anhídrido. La reacción se llevó a cabo en ausencia de solvente por 60 s a potencia máxima del microondas. El producto obtenido se precipitó con 5 gotas de HCl concentrado y se separó por centrifugación a 5000 rpm por 15 min, hasta obtener un sobrenadante claro, el sólido se secó en una estufa por un periodo de 24 h (Ysambertt *et al.*, 2009).

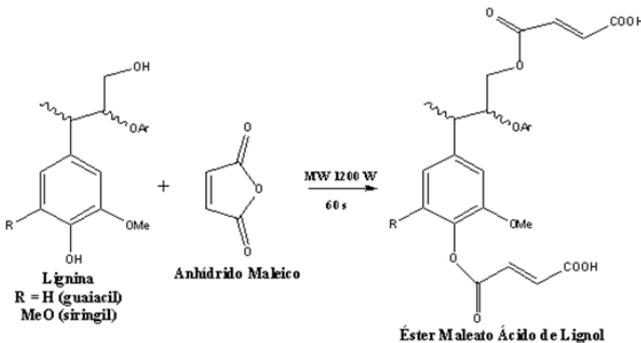


FIGURA 2. Esquema de reacción para la modificación química de lignina de pino con anhídrido maleico (Ar: Aromático, Me: Metilo)

1.3.3. Modificación de lignina con anhídrido glutárico

La reacción se llevó a cabo en ausencia de solvente por 60 s y potencia máxima del microondas mezclando 100 mg de lignina y 200 mg del anhídrido, luego se precipitó el producto con una disolución de HCl al 5%. El producto precipitado se separó por centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos, hasta obtener un sobrenadante claro, el sólido se secó en una estufa por un periodo de 24 h (Delgado *et al.*, 2012).

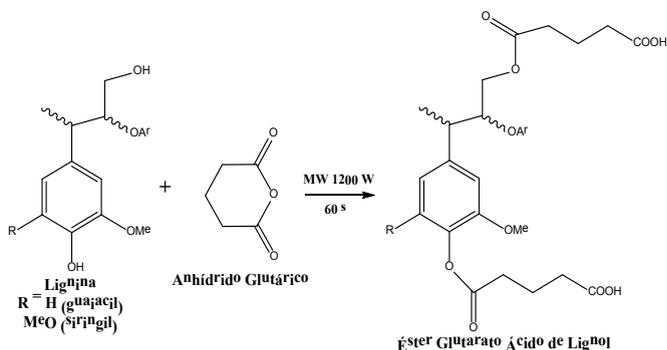


FIGURA 3. Esquema de reacción para la modificación química de lignina de pino con anhídrido glutárico (Ar: Aromático, Me: Metilo)

El rendimiento de los derivados obtenidos se calculó como el porcentaje ganado en peso (% PGP), que no es más que la relación entre la masa de lignina modificada (m_{mod}) y la masa de lignina sin modificar (m_{unmod}), (Ratanakamnuan *et al.*, 2012):

$$\% PGP = \frac{(m_{mod} - m_{unmod})}{m_{unmod}} \times 100$$

1.4. Caracterización espectroscópica

El seguimiento de las reacciones y la caracterización de las fracciones obtenidas se llevaron a cabo por espectrometría FTIR. El análisis FTIR se realizó comparando las bandas de vibración de diferentes grupos funcionales de los derivados y de la lignina de partida. Para obtener los espectros FTIR se pesaron 2 mg de la muestra y se mezclaron con 148 mg de bromuro de potasio, tomando de esta mezcla 100 mg para la preparación de las pastillas. Todos los espectros se realizaron al menos por triplicado, no encontrando diferencias significativas entre éstos.

1.5. Preparación de las emulsiones

Las emulsiones se prepararon a una relación agua/aceite (WOR) de 30/70 v/v. Tanto los surfactantes comerciales como la lignina esterificada fueron preparadas en soluciones de NaOH 0,1 M, a una concentración de 5000 ppm, para evaluar la estabilidad de las emulsiones preparadas con los surfactantes comerciales y con los derivados obtenidos.

También se evaluó la estabilidad de emulsiones agua/querosén empleando mezclas de surfactantes aniónico (DBS o derivado de lignina) y no iónico (NPE-18). Para ello, se realizaron barridos con la finalidad de establecer la relación de la mezcla surfactante aniónico/surfactante no iónico que permitiera obtener las emulsiones más estables. Una vez definidas las fases a emulsionar se procedió a mezclar el querosén y la solución acuosa del surfactante y se procedió a formar las emulsiones con el homogeneizador a 11000 rpm por 30 s. Por último, las emulsiones preparadas (15 mL) fueron aforadas en tubos de barrido, los cuales se sellaron y taparon para evitar pérdidas por evaporación. Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado, no encontrando diferencias significativas entre los resultados, por lo que éstos se expresan como el promedio obtenido.

1.6. Pruebas de estabilidad

La estabilidad de las emulsiones se evaluó después de formada la emulsión y se relacionó con el volumen de fases separadas (Sjöblom, 2001; Padilla *et al*, 2007). Los tubos de barrido se colocaron en un baño termostático a una temperatura de 22 °C, donde se midió la fracción volumétrica de agua que se separó cada 15 minutos durante las primeras dos horas y luego cada hora hasta completar 24 horas.

2. Resultados y discusión

2.1. Caracterización espectroscópica de los derivados obtenidos

Para el monitoreo de las reacciones se usó la técnica de espectroscopía FTIR, lo cual permitió seguir de manera sencilla los cambios estructurales de la esterificación de la lignina durante la síntesis asistida por MW, en función de las señales características en el espectro de FTIR de la lignina reportado en la literatura (Hergert, 1960).

Los espectros FTIR de LPM y los productos esterificados con AS (LPMEAS), AM (LPMEAM) y AG (LPMEAG) se muestran en la Figura 4, donde se evidencia la esterificación por los cambios observados en las señales características de la lignina o modificación de las mismas.

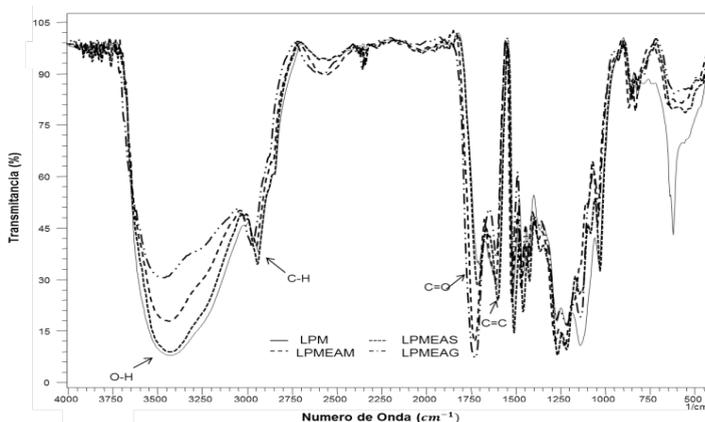


FIGURA 4. Comparación de los espectros FTIR de LPM y de los productos obtenidos por la esterificación con AS, AM y AG

Entre las señales características se observa la vibración de tensión del O-H entre $3.440\text{-}3.430\text{ cm}^{-1}$ como una banda ancha correspondiente a los grupos OH perteneciente a los ácidos carboxílicos, los cuales son productos de la reacción de la apertura del anillo del anhídrido maleico, succínico o glutárico solapadas con las ν O-H de los grupos OH del tipo fenólico y alifáticos de la macromolécula. También se incrementan las señales de tensión ν C-O tipo éster entre $1.220\text{-}1.271\text{ cm}^{-1}$.

Adicionalmente se observa una señal bastante significativa en la zona entre $1.749\text{-}1.724\text{ cm}^{-1}$ perteneciente a las ν C=O, tanto de éster como de ácido carboxílico para los tres derivados obtenidos, notándose un aumento bastante pronunciado en la intensidad de la banda con respecto a la lignina de partida, lo que efectivamente evidencia que ocurrió la esterificación de la lignina (Liu *et al.*, 2007; Safou-Tchiamia *et al.*, 2007; Xiao-Feng *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2001).

El rendimiento de los derivados obtenidos se encuentra alrededor de un 14% (PGP), valores que se encuentran en concordancia con los resultados reportados en estudios similares para la modificación de lignina, celulosa o bagazo de caña de azúcar con AS o AM (Liu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Safou-Tchiamia *et al.*, 2007; Maldhure *et al.*, 2011; Ratanakamnuan *et al.*, 2012).

2.2. Evaluación de la estabilidad de emulsiones preparadas con los derivados de lignina obtenidos por esterificación

La lignina es una macromolécula mayormente de carácter hidrófobo debido a su estructura, a pesar de poseer un gran número de grupos bastante polares ésta sólo es soluble en soluciones alcalinas como NaOH. Para este estudio se utilizó una solución de hidróxido de sodio 0,1 M para poder solubilizar la lignina y los derivados obtenidos y utilizarlos como surfactantes para la estabilización de emulsiones en sistemas surfactante/agua/querosén.

En la Figura 5 se muestra la estabilidad de las emulsiones preparadas con los surfactantes comerciales NPE-18 y DBS, y con los derivados de lignina (LPMEAS, LPMEAM, LPMEAG), expresada como el porcentaje de fase acuosa separada en función del tiempo, a una concentración de 5000 ppm.

En términos generales, los sistemas preparados con los surfactantes comerciales son los más estables; en relación con las emulsiones preparadas con los derivados de lignina, la estabilidad de los derivados se presenta en el orden LPMEAG > LPMEAM > LPMEAS.

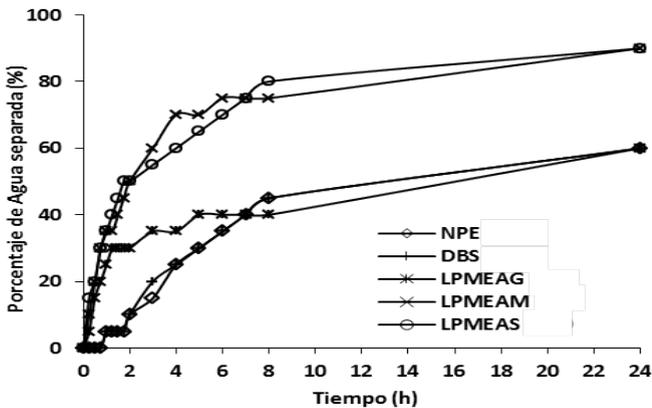


FIGURA 5. Comparación de la estabilidad en función del tiempo de las emulsiones preparadas con los surfactantes comerciales y derivados de lignina a una temperatura de 22 °C (WOR = 30/70).

El sistema más inestable en este caso fue la emulsión preparada con LPMEAS, incluso si se compara con LPMEAM, observándose que no hay mucha diferencia en cuanto a la cantidad de fase acuosa separada; sin embargo, experimentalmente se consiguió que así como se separa la fase acuosa, también se separa la misma cantidad de fase oleica, fenómeno que no ocurre en la emulsión preparada con el derivado LPMEAM, donde experimentalmente la cantidad de fase oleica que se separó durante el transcurso de las 24 horas

de medición fue solo un 10% de la fase oleica. Este orden de estabilidad se debe posiblemente a la adsorción del anfifilo sobre la interfase aceite-agua y la superficie de las gotas de la emulsión, debido a la mayor penetración de las cadenas del anión carboxilato del derivado LPMEAG (presente en la solución básica de NaOH), ya que el anhídrido glutárico posee un átomo de carbono adicional en comparación con los anhídridos maleico y succínico, permitiéndole así al carboxilato del derivado LPMEAG ubicarse mejor en la interfase por poseer una mayor flexibilidad al aumentar el tamaño de la cadena hidrocarbonada.

La incorporación de este grupo funcional acoplado en la lignina le permite a los derivados la adsorción en la interfase agua-aceite, aprovechando el tamaño molecular del biopolímero, evitando así la coalescencia de las gotas tanto por un efecto estérico como eléctrico de las moléculas éster-lignol, y que se desestabilice la emulsión, como se muestra en la Figura 6.

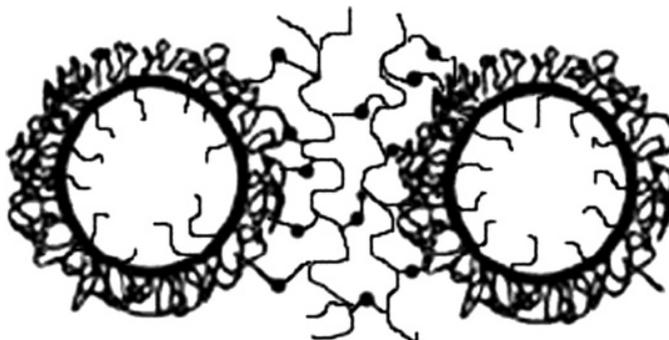


FIGURA 6. Efecto estérico en la estabilización de emulsiones agua/aceite

(Sun *et al*, 2007)

Es importante destacar que la estabilidad de la emulsión preparada con el derivado LPMEAG es comparable a la estabilidad de las emulsiones preparadas con los surfactantes comerciales usados como referencia. Este fenómeno es posible debido a la inserción de un nuevo grupo funcional, lo que demuestra que la reacción de modificación en la lignina de partida produjo un cambio del balance lipofílico-hidrofílico de las cadenas del biopolímero, brindándole carácter surfactante a la nueva estructura y por ende mayor estabilidad en la preparación de emulsiones, ya que la molécula de lignina sin modificar no es muy buen estabilizante de emulsiones. Este comportamiento de la lignina se evidencia en trabajos reportados por Padilla *et al.* (2007) y los resultados obtenidos en este trabajo para sistemas donde las fases son agua y querosén.

En la Tabla 1 se observa que el tipo de emulsión obtenida tanto para las emulsiones preparadas con los surfactantes comerciales como para las preparadas con los derivados de lignina, es del tipo O/W (gotas de aceite dispersas en agua), ya que para todos los casos la conductividad eléctrica es mayor a $1120 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, si se obtienen menores conductividades se habla de emulsiones W/O (gotas de agua dispersas en aceite). Los resultados indican que los derivados de lignina sintetizados en este estudio se comportan como surfactantes aniónicos, lo cual era de esperarse de acuerdo a su estructura.

TABLA 1. Valores de conductividad eléctrica para las emulsiones preparadas con los diferentes surfactantes a $22.0 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Surfactante	Conductividad ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)
NPE-18	3240
DBS	1697
LPMEAG	1327
LPMEAM	1230
LPMEAS	1120

2.3. Evaluación de la estabilidad de emulsiones preparadas con mezcla de surfactantes comerciales y derivados de lignina

Se evaluó la formación de emulsiones agua/querosén estabilizadas con una mezcla binaria de surfactantes aniónico/no iónico, en este caso tanto de los surfactantes comerciales DBS/NPE-18, como de NPE-18 y cada uno de los derivados obtenidos de la modificación de la lignina, evaluando proporciones de mezcla 30/70, 50/50, 70/30 a una concentración total de 5000 ppm en el sistema y una WOR de 30/70, con la finalidad de evaluar el efecto de estas mezclas sobre la estabilidad de las emulsiones. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 7.

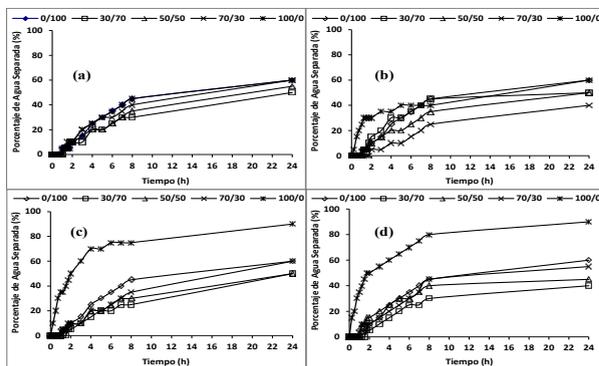


FIGURA 7. Estabilidad de las emulsiones preparadas con mezclas de NPE-18 y los derivados de lignina sintetizados con asistencia microondas a una concentración total de 5000 ppm, y una temperatura de 22 °C. (a) Mezcla DBS/NPE-18. (b) Mezcla LPMEAG/NPE-18. (c) Mezcla LPMEAM/NPE-18. (d) Mezcla LPMEAS/NPE-18

Las emulsiones preparadas con mezclas de surfactantes aniónico/no iónico comerciales (DBS/NPE-18), son más estables que las preparadas con los surfactantes puros, como se observa en la Figura 7a, lo que indica que esta mezcla de surfactantes tiene un efecto positivo en las formulaciones estudiadas (Goloub *et al.*, 2005; Delgado *et al.*, 2007a; Delgado *et al.*, 2007b)

También se evaluó el efecto de adicionar el surfactante NPE-18 a las emulsiones preparadas con LPMEAG (Figura 7b), observándose un comportamiento similar al de la mezcla DBS/NPE-18, obteniendo una marcada estabilidad con respecto a las emulsiones preparadas solo con LPMEAG. Se observa que a medida que aumenta la relación LPMEAG/NPE-18 disminuye el porcentaje de agua separada de la emulsión, siendo 70/30 la relación a la cual se obtiene la mayor estabilidad. Estos resultados confirman el efecto sinérgico (efecto aditivo o de cooperación entre moléculas) que ocurre entre surfactantes no iónicos y derivados lignínicos sintetizados con asistencia microondas.

Del mismo modo, la adición del surfactante NPE-18 a las formulaciones estudiadas con LPMEAM y LPMEAS, Figuras 7c y 7d, respectivamente, produjo un efecto aditivo, incrementando la estabilidad de la emulsión hasta en un 50% con respecto a las emulsiones preparadas únicamente con los derivados sintetizados en este estudio, observándose un orden de estabilidad de las siguientes proporciones derivado/NPE: 30/70 > 50/50 > 70/30, necesitando mayor cantidad de surfactante comercial para obtener una mayor estabilidad.

Es posible que estos derivados necesiten mayor cantidad de surfactante que los derivados de LPMEAG debido a la mayor longitud de la cadena insertada en la macromolécula en este derivado como se discutió anteriormente.

Para todas las formulaciones estudiadas con mezclas de surfactantes y derivados de lignina se determinó que el tipo de emulsión obtenida es aceite en agua (O/W), resultados que se pueden corroborar por las medidas de conductividad eléctrica obtenidas en la Tabla 2.

TABLA 2. Valores de conductividad eléctrica en $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ para las emulsiones preparadas con mezclas de anfífilos (22.0 ± 0.1 °C)

Surfactante/Proporción	0/100	30/70	50/50	70/30	100/0
DBS/NPE-18	3240	2590	2650	2480	1697
LPMEAG/NPE-18	3240	1760	1138	1056	1327
LPMEAM/NPE-18	3240	1868	1454	1252	1230
LPMEAS/NPE-18	3240	2170	1997	1720	1120

Como complemento del estudio de la estabilidad de las emulsiones preparadas con los derivados obtenidos mediante la modificación de la lignina con anhídridos cíclicos (glutárico, maleico y succínico) y las mezclas con el surfactante NPE-18, en la Figura 8 se muestra el tiempo en el que los sistemas emulsionados tardan en alcanzar la relación V/V_{∞} (volumen de agua separada/volumen total) igual a 0,13.

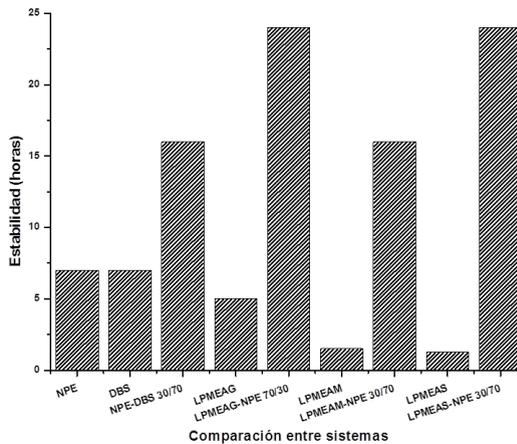


FIGURA 8. Comparación de la estabilidad de emulsiones preparadas a diferentes formulaciones ($V/V_{\infty} = 0,13$)

En esta figura se evidencia una estabilidad marcada para las emulsiones preparadas con mezclas del surfactante comercial y los derivados liginicos sintetizados con asistencia microondas, duplicando y en algunos casos triplicando la estabilidad con respecto a las formulaciones preparadas con los surfactantes puros, observando separación de fases por encima de las 24 horas de preparada la emulsión. Este hecho genera el interés de estudiar estos sistemas con otro tipo de fases oleicas para brindarle una aplicación a nivel industrial como en la industria petrolera, en donde las emulsiones del tipo O/W, como las obtenidas en este estudio, pueden tener potencial aplicación en el transporte de crudos, ya que al tener como fase continua la fase acuosa, se disminuye la viscosidad del crudo en varios órdenes de magnitud, lo que facilitaría las operaciones de producción del mismo (Delgado et al., 2007a; Delgado et al., 2007b).

Consideraciones finales

La radiación MW resultó ser un método rápido y eficiente para llevar a cabo reacciones de esterificación de lignina con anhídridos cíclicos. La espectroscopia FTIR es una herramienta adecuada para seguir este tipo de reacción, observando la aparición de una banda intensa perteneciente al carbonilo de los nuevos grupos carboxilatos de lignol incorporados en la macromolécula.

Los sistemas emulsionados preparados con los surfactantes NPE-18 y DBS fueron más estables que las emulsiones preparadas con los derivados de LPM. Las emulsiones preparadas con estos derivados mostraron una buena tendencia de estabilidad, siendo los sistemas emulsionados con LPMEAG más estables que los sistemas preparados con LPMEAM y LPMEAS. A pesar que algunos estudios reportan que la lignina no es un buen emulsionante, los resultados obtenidos de su modificación estructural revelan efectos positivos al modificar la lignina insertando nuevos grupos funcionales para lograr así un mejor balance hidrofílico-lipofílico en su estructura.

Al utilizar la mezcla derivado liginico/surfactante NPE-18 en la formulación de emulsiones, se logró observar un efecto sinérgico permitiendo estabilizar las emulsiones mediante fuerzas estéricas y de repulsión obteniendo emulsiones más estables que con los surfactantes puros puros. Las mezclas de LPMEAG/NPE-18 en una proporción 70/30, LPMEAS/NPE-18 en una proporción 30/70 y LPMEAM/NPE-18 en una proporción 30/70, igualan y en algunos casos superan la estabilidad de la mezcla de surfactantes DBS/NPE-18 empleada como referencia.

Agradecimientos

El equipo de investigación agradece al CONDES-LUZ de la Universidad del Zulia (Proyecto de investigación CC-0359-11) y al Fonacit (proyecto G-20050000454) por el financiamiento recibido.

Referencias

- Chen, L.; Guangxia, W.; Huanzhen, M.; Zonghuan, Y.; Lianyi, T.; Xiangwei, L.(2008).“Synthesis and application of lignin-based copolymer LSAA on controlling non-point source pollution resulted from surface runoff”, *J. Environ. Sci.*, 20, 820-826.
- De los Santos Ramos, W.; Poznyak, T.; Chairez, I.; Córdova, I.(2009).“Remediation of lignin and its derivatives from pulp and paper industry wastewater by the combination of chemical precipitation and ozonation”, *J. Hazard. Mater.*, 169, 428-434.
- Delgado, N.; Ysambertt, F.; Chávez, G.; Bravo, B.; Márquez, N., Bullón, J.(2012).“Síntesis asistida por microondas de derivados acilados de lignina de diferentes masas molares con posible actividad superficial”, *Avances en Ciencia e Ingeniería*, 3, 3, 19-31.
- Delgado, N.; Ysambertt, F.; Montiel, C.; Chávez, G.; Cáceres, A.; Bravo, B.; Márquez, N. (2007).“Evaluación de emulsiones de crudo en agua con mezclas de surfactantes no-iónicos y aniónicos de uso potencial en la industria petrolera”, *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*, 30, 2, 118-127.
- Delgado, N.; Ysambertt, F.; Montiel, C.; Infante, M.; Chávez, G.; Cáceres, A.; Bravo, B.; Márquez, N. (2007).“Influencia de aminas alifáticas cortas en la estabilidad y propiedades reológicas de emulsiones preparadas con mezclas de surfactantes no iónicos y aniónicos”, *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*, 30, Ed. Especial, 126-135.
- Doczekalska, B.; Bartkowiak, M.; Zakrzewski, R.(2007).“Modification of sawdust from pine and beechwood with the succinic anhydride”, *Holz. Roh. Werkst.*, 65, 187-191.
- Eriksson, K.; Bermek, H.(2009).“Lignin, Lignocellulose, Ligninase, Applied Microbiology: Industrial”, *Encyclopedia of Microbiology*, Third Edition, (Moselio Schaechter, Editor), Oxford: Elsevier, 373-384.
- Goloub, T., Pugh, R.(2005).“The role of the surfactant head group in the emulsification process: Binary (nonionic-ionic) surfactant mixtures”, *J. Colloid Interf. Sci.*, 291, 256-262.
- Hergert, H.(1960).“Infrared spectra of lignin and related compounds. II. Conifer lignin and model compounds”, *J. Org. Chem.*,25, 405-413.
- Holladay, J.; White, J.; Bozell, J.; Johnson, D.(2007).“Top Value Added Chemicals from Biomass.Volume II: Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin”, Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the

- National Renewable Energy Laboratory (NREL). Edited by U.S. Department of Commerce, 5285 Port Royal Rd., Springfield, VA 22161, PNNL-16983, pp. 1, 6, 8, 16, 27, 31-33, 42-45, 48-49.
- Homma, H.; Kubo, S.; Yamada, T.; Matsushita, Y.; Uraki, Y.(2008).“Preparation and Characterization of Amphiphilic Lignin Derivatives as surfactans”, *J. Wood Chem. Technol.*, 28, 4, 270-282.
- Hüttermann, A.; Mai, C.; Kharazipour, A.(2001).“Modification of lignin for the production of new compounded materials”, *Appl. Microbiol. Biot.*, 55, 387-394.
- Kubo, S.; Kadla, J.(2003).“The Formation of Strong Intermolecular Interactions in Immiscible Blends of Poly(vinyl alcohol) (PVA) and Lignin”, *Biomacromol.*, 4, 561-567.
- Liu, C.; Sun, R.; Qin, M.; Zhang, A.; Ren, J.; Xub, F.; Ye, J.; Wu, S.(2007). “Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride”, *Ind. Crop. Prod.*, 26, 212-219.
- Liu, C.; Sun, R.; Qin, M.; Zhang, A.; Ren, J.; Ye, J.; Luo, W.; Cao, Z.(2008). “Succinylation of sugarcane bagasse under ultrasound irradiation”, *Bioresource Technol.*, 99, 1465-1473.
- Maldhure, A.; Chaudhari, A., Ekhe, J.(2011).“Thermal and structural studies of polypropylene blended with esterified industrial waste lignin”, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 103, 625-632.
- Ouyang, X.; Ke, L.; Qiu, X.; Guo, Y.; Pang, Y.(2009). “Sulfonation of alkali lignin and its potential use in dispersant for cement”, *J. Disper.Sci. Technol.*,30, 1, 1-6.
- Padilla, V.; Rangel, M.; Bullón, J.; Rodríguez-Malaver, A.; González, A.; Rojas, O.(2002).“Surfaceactivity of lignin fractions obtained by membrane separation technologies of industrial”, Congreso Iberoamericano de Investigaciones en Pulpa y Papel.
- Padilla, V.; Alayón, M.; García, J.; Valdivieso, A.; Bullón, J.(2007).“Estudio experimental de la estabilidad de emulsiones o/w formadas con licor negro proveniente del proceso de pulpeo alcalino en diferentes fases orgánicas”, *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*, 30, Ed. Especial, 479-484.
- Ratanakamnuan, U.; Atong, D.; Aht-Ong, D.(2012).“Cellulose esters from waste cotton fabric via conventional and microwave heating”, *Carbohydr.Polym.*, 87, 84- 94.
- Safou-Tchiam, R.; de Jésus, B.; Gervais, A.; Sébe, G.; Pétraud, M.(2007).“A preliminary survey of the interfacial bonding of some tropical hardwoods towards succinic anhydride and 2-octen-1-yl succinic anhydride molecules: Impact of lignin and carbohydrate polymers structure on the chemical reactivity”, *Ind. Crop. Prod*,26, 173-184.
- Shulga, G.; Shakels, V., Skudra, S.; Bogdanovs, V.(2011).“Environment Technology Resources”, Proceedings of the 8th International Scientific and Practical Conference, Vol. 1.
- Sjöblom, J.(2001).“Encyclopedic Handbook of Emulsion Technology”, (ed). Marcel Dekker, New York, Vol. 305, pp. 455-495.

- Stewart, D.(2008).“Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics”, *Ind. Crop. Prod.*, 27, 202-207.
- Sun, W.; Sun, D.; Wei, Y.; Liu, S.; Zhang, S.(2007).“Oil-in-water emulsions stabilized by hydrophobically modified hydroxyethyl cellulose: Adsorption and thickening effect”, *J.Colloid Interf. Sci.*, 311, 228-236.
- Xiao, B.; Sun, X.; Sun, R.(2001).“The chemical modification of lignins with succinic anhydride in aqueous systems”, *Polym. Degrad. Stabil.*, 71, 223-231.
- Xiao-Feng, S.; Bin, X.; Baird, M.(2006).“Modification and characterization of fibers of three sandy willow shrub species”, *Forestry Studies in China*, 8, 3, 16-21.
- Ysambertt, F.; Delgado, N.; González, T.; Bravo, B.; Chávez, G.; Márquez, N.; Infante, M.(2009).“Reacciones de esterificación-sulfonación asistida por microondas de ligninas kraft: Influencia de los cambios estructurales sobre la tensión superficial”, *Ciencia*, 17, 3, 255-266.
- Zhao, B.; Chen, G.; Liu, Y.; Hu, K.; Wu, R.(2001).“Synthesis of lignin base epoxy resin and its characterization”, *J.Mater. Sci. Lett.*, 20, 859- 862.

Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y CoCl₂ sobre la producción de aloína en hojas de plantas de *Aloe vera* (L.) Burm. F. regeneradas *in vitro*

Rosyflor Tablante¹

Ángela Matos Acurero²

RESUMEN

La adición de NaCl 100 mM y 300 mM al medio de cultivo Murashige y Skoog durante 60 días permitió la obtención de 18,94 y 16,79 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomasa seca de aloína, es decir, incrementó la producción en 230 y 204%, respectivamente, con respecto a los testigos. Estos resultados demostraron que este compuesto, a esas concentraciones, se comportó como elicitador y, asimismo, que los cultivos *in vitro* son una plataforma útil para incrementar la producción de metabolitos secundarios de importancia económica y medicinal en *A. vera*.

PALABRAS CLAVE: *Aloe vera*, elicitores, NaCl, CoCl₂, metabolitos secundarios.

¹ Laboratorios Marinos S.A (LAMARSA). Piedras Negras- Falcón. Venezuela.

E-Mail: rosyflor21@gmail.com

²Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Citogenética Vegetal.

Effect of different concentrations of NaCl and CoCl₂ on the production of aloin in regenerated in vitro leaves of aloe vera

ABSTRACT

The addition of 100Mm and 300Mm of NaCl in the Murashige and Skoog culture medium during 60 days allowed the obtaining of 18,94 and 16,79 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry biomass of aloin, which means that compared to the controls, the production was increased in 230 and 204% respectively. These results demonstrated that the compound *NaCl*, with those concentrations, acted as an elicitor; and also that the *in vitro* cultures are a useful platform to increase the production of secondary metabolites in *A. vera*, of economic and medicinal importance.

KEYWORDS: *Aloe vera*, elicitors, NaCl, CoCl₂, secondary metabolites.

Introducción

La zábila o *Aloe vera* ha sido usada como medicina tradicional desde la antigüedad. Los metabolitos secundarios producidos por esta planta, especialmente la aloína, son ampliamente utilizados debido a sus propiedades medicinales, cosméticas y alimentarias (Fox et al., 2014, Epifano et al., 2014, Ramírez et al., 2012, Domínguez-Fernández et al., 2012, Harlev et al., 2012). En la actualidad, el cultivo *in vitro* representa una de las herramientas más importantes para la producción de metabolitos secundarios a partir de las plantas (Plazas Ávila, 2015; Shilpa et al., 2010), convirtiéndose en herramienta fundamental para las empresas que comercializan los metabolitos obtenidos a partir de diferentes especies de plantas

Una de las limitaciones para la producción de metabolitos secundarios a través de cultivos *in vitro* es el bajo rendimiento de dichos compuestos, pudiendo incrementarse con la manipulación de los cultivos y el uso de elicitores (Ruiz-García et al., 2014; Pérez-Alonso et al., 2014). En este sentido, los elicitores son agentes, bióticos y abióticos (extractos biológicos, polisacáridos, microorganismos, radiación UV, temperaturas extremas, fungicidas, antibióticos, metales pesados y altas concentraciones de sales), usados para incrementar la productividad de ciertos compuestos de interés en los cultivos (Praveen et al., 2014; Zhu et al., 2014; Mendhulkar y Ali Vakil,

2013). El uso de elicitores en los cultivos *in vitro* es una de las estrategias empleadas en los últimos años para mejorar la producción de metabolitos secundarios.

Por tal razón, debido a la gran demanda actual de compuestos producidos por las plantas de *A. vera*, se hace necesario desarrollar estudios para incrementar la producción de algunos metabolitos de interés, ya que a pesar de las grandes aplicaciones y usos que tienen estas plantas, pocas especies del género *Aloe* han sido sometidas a la acción de elicitores para inducir mayor producción de metabolitos secundarios o para el desarrollo de programas de mejoramiento. Por ello se evaluó el efecto del NaCl y CoCl_2 sobre la producción de aloína en hojas de plantas de *A. vera* regeneradas *in vitro* con el fin de presentar una vía alternativa para la producción de dicho compuesto.

1. Materiales y Métodos

Para el establecimiento de los cultivos, se siguió la metodología de Matos (2007), seleccionando plantas silvestres sanas, de 10 cm de longitud, colectadas y mantenidas bajo condiciones naturales en los jardines del Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia (Maracaibo-Venezuela), para aislar y obtener las yemas apicales que fueron utilizadas como explantes. Estas yemas se desinfectaron bajo condiciones asépticas en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 6%, durante 20 min en constante agitación. Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril.

Estas yemas provenientes de las plantas silvestres se cultivaron y multiplicaron en medios de cultivo constituidos por las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), 3% de sacarosa, 100 mg.L^{-1} de ácido ascórbico, 1 mg.L^{-1} de Kinetina y 1 mg.L^{-1} de BA (Benciladenina) y 0,9% de agar. El pH del medio se ajustó a 5,7- 5,8 y se esterilizó en un autoclave a 121°C de temperatura y 1 atm de presión por 20 min. Las yemas se sembraron en frascos de vidrio cerrados y se colocaron en un cuarto de cultivo a una temperatura de $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ bajo luz continua fluorescente de $40 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Las plantas obtenidas a partir de las yemas anteriores se sembraron en medios controles compuestos de sales de Murashige y Skoog más 1 mg.L^{-1} de Kinetina y 1 mg.L^{-1} de BA (benciladenina) y en medios de cultivo modificados añadiendo distintas concentraciones de NaCl a 100, 200 y 300 mM y CoCl_2 a 10, 20 y 50 μM . Se sembraron 3 plantas de aproximadamente 3 cm de longitud por cada frasco, por día, por tratamiento, con controles para cada día, tanto con NaCl como con CoCl_2 , para un total de 72 plantas analizadas, con subcultivos cada 30 días hasta el momento de la toma de las muestras. Para ello, se recolectaron hojas de plantas que habían sido cultivadas *in*

vitro durante 30, 60 y 90 días para los análisis de contenido de aloína. Se recolectaron las hojas más largas, de aproximadamente la misma longitud. Todos los análisis se hicieron por triplicado.

El proceso de extracción y análisis del contenido de aloína se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Park et al. (1998) en las muestras (por triplicado), tanto de hojas de plantas silvestres como en las hojas de los plantas regeneradas *in vitro*.

El análisis de los extractos etanólicos del compuesto estándar y de las muestras se llevó a cabo mediante separación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), en un sistema Agilent 1100, del Laboratorio de Tecnología de Alimentos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-Zulia.

Los resultados se analizaron con el programa SPSS v.19, mediante análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre medias se estimaron empleando la prueba del test de Tukey para $p \leq 0,05$.

2. Resultados

La curva de calibración fue lineal, con límite de detección para la aloína de 0,05 mg.ml⁻¹ con un tiempo de retención de 42,494 min (Figura 1A). Dado que la aloína se presenta en sus dos isoformas: aloína A y aloína B, tal como se ha descrito con anterioridad (Manitto et al., 1990), para su cuantificación se sumaron los resultados obtenidos para cada pico, obteniéndose el valor total de aloína presente en el extracto. En la Figura 1B puede observarse el cromatograma de la solución del compuesto estándar de aloína (Sigma, 97%). Los picos 1a. y 1b. corresponden a los de la aloína A y B respectivamente.

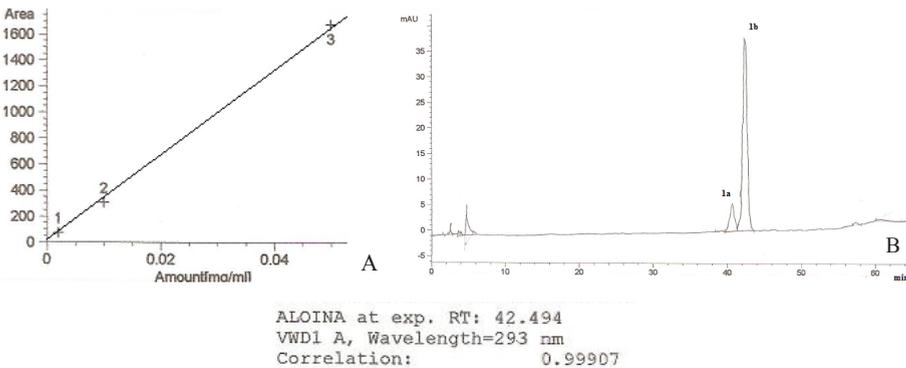


FIGURA 1. A. Curva de calibración del estándar de aloína. B. Cromatograma de la solución del compuesto estándar de aloína (Sigma, 97%). 1a: aloína A, 1b: aloína B.

2.1. Efecto de diferentes concentraciones de CoCl_2 (10 μM , 20 μM y 50 μM) sobre la producción de aloína en hojas de plantas regeneradas *in vitro*.

Para llevar a cabo el presente estudio, los medios de cultivo se suplementaron con dos compuestos (NaCl y CoCl_2) para determinar el efecto elicitor de cada uno de ellos. En el caso del CoCl_2 se utilizaron medios de cultivo con concentraciones de 10, 20 y 50 μM , aumentando, en cada caso, las concentraciones de CoCl_2 , ya que las sales MS tienen dentro de su composición este metal.

Como se observa en la Figura 2, entre las concentraciones de CoCl_2 utilizadas la que obtuvo mayor producción de aloína fue 20 μM (3,72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasa seca), seguido de 10 μM (0,63 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasa seca) y 50 μM (0,36 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasa seca), todas observadas al día 90 de tratamiento y por último en el control del día 30 (0,83 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasa seca). Para el resto de los días no se detectó aloína. El contenido de aloína obtenido con 20 μM de CoCl_2 para el día 90 fue mayor al encontrado en el control.

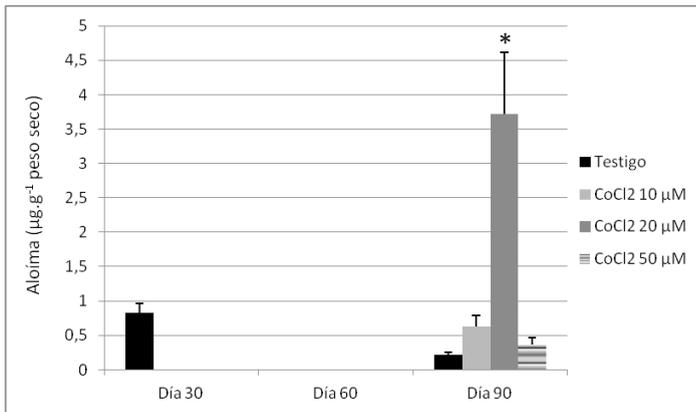


FIGURA 2. Producción de aloína en hojas de plantas de *Aloe vera* regeneradas *in vitro* con diferentes concentraciones de CoCl_2 (10 μM , 20 μM y 50 μM) durante 90 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas de los promedios más sus desviaciones estándar (Tukey, $p \leq 0,05$).

2.2. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl (100mM, 200mM y 300mM) sobre la producción de aloína en hojas de plantas regeneradas *in vitro*.

En la Figura 3 se observan los resultados de las plantas mantenidas en tratamiento con NaCl . Para el día 30 el control tuvo una producción de

1,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomasa seca, con 100mM, 200 mM y 300 mM no se detectó producción de aloína.

A los 60 días de tratamiento, la producción de aloína en las hojas de las plantas sembradas en el medio control fue de 8,22 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomasa seca; con 100 mM fue de 18,94 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasa seca siendo ésta la concentración y el día en el cual hubo mayor producción de este metabolito. Para 200 mM no se detectó aloína. Con 300 mM la producción fue de 16,79 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomasa seca.

Durante el día 90, no se detectó aloína en el medio testigo, con NaCl 100 mM hubo una producción de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomasa seca y de 0,87 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasa seca con 200 mM. El NaCl 300 mM aparentemente inhibió la síntesis de aloína o la cantidad es sumamente baja como para ser detectada.

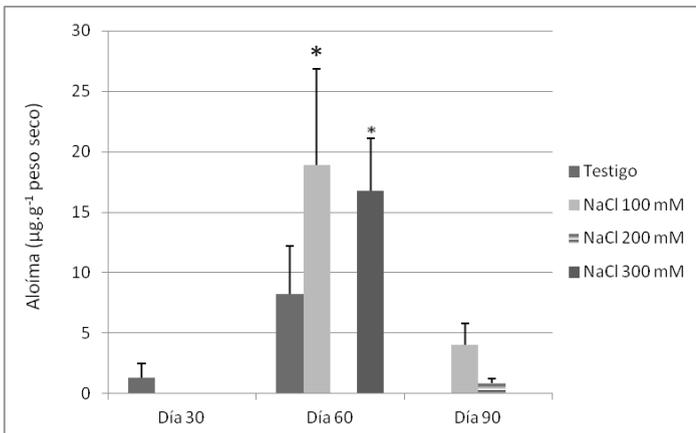


FIGURA 3. Producción de aloína en hojas de plantas de *Aloe vera* regeneradas *in vitro* con diferentes concentraciones de NaCl (100 mM, 200 mM y 300 mM) durante 90 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas de los promedios más sus desviaciones estándar (Tukey, $p \leq 0,05$).

3. Discusión

Los tratamientos con NaCl 100 Mm y 300 Mm al día 60 y CoCl₂ 20 μM al día 90, promovieron la mayor producción de aloína de los medios utilizados. En ambos casos, la producción de aloína fue mayor a la observada en los testigos. Estudios anteriores han demostrado que la adición de metales pesados y sales pueden causar un incremento en la producción de metabolitos secundarios (Hussain et al., 2012; Matos, 2005).

En cultivos de raíces de *Panax ginseng* se observaron incrementos de 1,15 y 1,13 veces en el contenido y productividad de saponina de ginseng al agregar 0,1% w/v de NaCl, (Jeong y Park, 2007). En el presente trabajo, la producción de aloína fue muy variable con este compuesto, observándose sin embargo que para el día 60 la producción de aloína con 100 y 300 mM de NaCl fue mayor con respecto al testigo. Esto indicó que hubo diferencias en cuanto a las concentraciones de NaCl utilizadas siendo la de 100 mM la concentración óptima para la producción de aloína. Este hecho podría estar relacionado con que el estrés abiótico ocasionado por el NaCl puede activar la cascada de señales de las protein kinasas en las plantas (Zhu, 2002). Además, se ha descrito que la exposición a altas concentraciones de NaCl en cultivos *in vitro* puede ocasionar un incremento de la tolerancia a la salinidad de ciertas plantas, como ha ocurrido en híbridos de maíz (Pesqueira et al., 2003), lo cual puede constituir un mecanismo fisiológico de defensa frente al estrés ocasionado por el NaCl, hecho que debe considerarse en futuros estudios de selección de plantas con tolerancia a la salinidad, altamente productoras de compuestos de interés, como la aloína en *A. vera*.

Por otro lado, el tratamiento con CoCl_2 20 μM durante 90 días ocasionó un ligero incremento en el contenido de aloína. Estos resultados coincidieron con los de Matos (2005) quien observó que al añadir 50 μM de CoCl_2 se incrementó la producción de aloína en suspensiones celulares de *A. vera*.

Considerando que la producción de aloína no siguió un patrón general para los días y compuestos utilizados, observándose incluso ausencia de producción en algunos casos, hay que resaltar que debido a su condición de metabolitos secundarios, los compuestos fenólicos como la aloína, son un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista metabólico y la producción de estos compuestos dependerá en gran medida de la composición del medio de cultivo; así como también de factores ambientales, tales como la intensidad luminosa y el estadio de desarrollo de la planta. Todos estos factores pueden causar variaciones cualitativas y cuantitativas en la producción de dichos compuestos por lo que el uso exitoso de elicitores requiere una intensa estandarización con el objeto de lograr una perfecta combinación de medio de cultivo y el tipo correcto de elicitador y su concentración (Baenas et al., 2014; Cai et al., 2011), factores importantes para superar las limitaciones de la producción de metabolitos secundarios incluyendo la estandarización de parámetros físicos y químicos (Shilpa et al., 2010).

Otra posible explicación de por qué en algunos casos no fue posible la detección de aloína podría estar relacionada con el hecho de que se ha observado que la aloína se oxida en los cultivos *in vitro* para dar lugar a la aloe-emodina (Manitto et al., 1990; Matos, 2005, Matos, 2008; Lozano et al., 2011). Además, las células *in vitro* presentan un estado de desarrollo y diferenciación distintos a los de la planta adulta, lo que podría conducir a la expresión o represión de una determinada ruta metabólica y por tanto,

es posible que determinados compuestos no sean observados o lo hagan en menor número y/o cantidad en los materiales *in vitro*. Es igualmente posible que dichas diferencias se deban a condiciones endógenas, ya que a pesar de la homogeneidad del sistema *in vitro*, persisten fuentes de variación difíciles de controlar. En las plantas, la diferenciación consiste en el conjunto de procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos mediante los cuales una célula meristemática adquiere propiedades metabólicas, estructurales y/o funcionales diferentes a las de la célula progenitora, lo que proporciona a los cultivos características propias y únicas, aun cuando estos provengan de una misma planta.

Conclusión

Este estudio demuestra que el contenido de aloína en hojas de plantas de *Aloe vera* regeneradas *in vitro* aumenta considerablemente al añadir NaCl 100 mM y 300 mM durante 60 días al medio de cultivo, es decir, que este compuesto se comporta como un elicitador y, asimismo, que los cultivos *in vitro* son una plataforma útil para incrementar la producción de metabolitos secundarios de importancia económica y medicinal en *A. vera* por lo cual son necesarios nuevos trabajos para el desarrollo de técnicas más rápidas y económicamente viables para la obtención de compuestos de interés como la aloína.

Referencias

- Baenas, N., García-Viguera, C., Moreno, D. (2014). Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. *Molecules* 19: 13541-13563.
- Cai, Z., Riedel, H., Thaw Saw, N.M., Mewis, I., Reineke, K., Knorr, D., Smetanska, I. (2011). Effects of elicitors and high hydrostatic pressure on secondary metabolism of *Vitis vinifera* suspension culture. *Process Biochemistry* 46: 1411-1416.
- Domínguez-Fernández, R.N., Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J.J., Welte-Chanes, J.S., Alvarado-González, J.S., Calderón-Domínguez, G., Garibay-Febles, V., Gutiérrez-López, G.F. (2012). El gel de *Aloe vera*: Estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11(1): 23-43.
- Epifano, F., Fiorito, S., Locatelli, M., Taddeo, V.A., Genovese, S. (2014). Screening for some sources of prenyloxanthraquinones: *Senna alexandrina* Mill. and *Aloe vera* (L.) Burm. F. *Natural Product Research* 29 (2): 180-184. doi: 10.1080/14786419.2014.971792.
- Fox, L.T., du Plessis, J., Gerber, M., van Zyl, S., Boneschans, B., Hamman, J. (2014). *In vivo* skin hydration and anti-erythema effects of *Aloe vera*, *Aloe ferox* and *Aloe*

- marlothii* gel materials after single and multiple applications. *Pharmacognosy Magazine* 10(38): 392-403.
- Harlev, E., Nevo, E., Lansky, E.P., Ofir, R., Bishayee, A. (2012). Anticancer Potential of Aloes: Antioxidant, antiproliferative, and immunostimulatory attributes. *Planta Med.* 78: 843-852.
- Hussain, S, Fareed, S., Ansari, S., Rahman, A., Ahmad, I.Z., Saeed, M. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J. Pharm. Biomed. Sci.* 4(1): 10-20.
- Jeong, G.A., Park, D.H. (2007). Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 130: 436-446.
- Lozano, L., Nova, C., Mejía, L. (2011). Estabilización del gel de *Aloe barbadensis* Miller y disminución de su concentración por adsorción en columna con carbón activado. *Revista ION, Bucaramanga* (Colombia) 24(1): 61-67.
- Manitto, P., Monti, D., Speranza, G. (1990). I principali costituenti dell'Aloe di interesse farmaceutico e cosmetico. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*: 1297.
- Matos A. (2005). Producción de aloesina, aloína A y B y aloe-emodina en cultivos *in vitro* de *Aloe vera* L. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela. España. Departamento de Fisiología Vegetal. 233p.
- Matos, A. (2007). Optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* para la micropropagación de *Aloe vera* L. *Ciencia*, 15 (3): 319-330.
- Matos, A. (2008). Aloesin, aloin and aloe-emodin production in *Aloe vera* L. calli. *Ciencia* 16(4): 389-395.
- Mendhulkar, V.D., Ali Vakil, M.M. (2013). Elicitation of flavonoids by salicylic acid and *Penicillium expansum* in *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees. cell culture. *Research in Biotechnology* 4(2): 01-09.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Park, M.K., Park, J.H., Kim, N.Y., Shin, Y.G., Choi, Y.S., Lee, J.G., Kim, K.H., Lee, S.K. (1998). Analysis of 13 phenolic compounds in aloe species by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* 9(4): 186-191.
- Pérez-Alonso, N.L., Arana, F., Capote, A., Pérez, A., Sosa R., Mollineda, A., Jiménez, E. (2014). Estimulación de cardenólidos en brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados *in vitro* mediante elicitores. *Rev. Colomb. Biotecnol.* XVI(1): 51-61.
- Pesqueira, J., García, M.D., Molina, M.C. (2003). NaCl tolerance in maize (*Zea mays* ssp. *mays*) x *Trypsacum dactyloides* L. hybrid calli and regenerated plants. *Spanish Journal of Agricultural Research* 1(2): 59-63.
- Plazas Ávila, MDLO. (2015). Caracterización y mejora genética de la berenjena (*Solanum melongena*) para compuestos bioactivos. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València. doi:10.4995/Thesis/10251/48563. <http://hdl.handle.net/10251/48563>
- Praveen, N., Thiruvengadam, M., Yang, Y.S., Kim, S.H., Murthy, H.N., Chung, I.M. (2014). Production of gymnemic acid from hairy root cultures of *Gymnema*

- sylvestre* R. Br. as influenced by polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and their antioxidant activity. *Industrial Crops and Products* 54: 54-61.
- Ramírez, L.G., Morón de Salim, A., Catinella, R., Castillo, L. (2012). Efecto bacteriostático y/o bactericida del extracto de gel de *Aloe vera* sobre cultivos de *Listeria monocytogenes*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 62(1): 73-78.
- Ruiz-García, Y., López-Roca, J.M., Bautista-Ortín, A.B., Gil-Muñoz, R., Gómez-Plaza, E. (2014). Effect of combined use of benzothiadiazole and methyl jasmonate on volatile compounds of Monastrell wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 65(2): 238-243; doi: 10.5344/ajev.2014.13119
- Shilpa K., K. Varun, B.S, Lakshmi. (2010). An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J. of Plant Sciences* 5(3): 222-247.
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:247-273.
- Zhu, C., Miao, G., Guo, J., Huo, Y., Zhang, X., Xie, J., Feng, J. (2014). Establishment of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. hairy root culture and optimization of its culture conditions for the production of triptolide and wilforine. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24(6): 823-834. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1402.02045>.

Detección de Aflatoxina M₁ en muestra de leche cruda y pasteurizada en el ganado vacuno de Mene Mauroa. Región Occidente de Venezuela

*Zoraida Medina**

Gresly Castro

Astrid Salcedo

Ricardo Alonso Silva

Marynés Montiel

RESUMEN

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos inmunosupresores y carcinógenos producidas en el metabolismo secundario de especies de *Aspergillus* (*A. flavus* y *A. parasiticus*, particularmente). En Mene Mauroa, el ganado vacuno es sustentado con alimento industrializado, vegetal fresco o combinaciones de ambas, esta última sobre todo durante la sequía. El objetivo de esta investigación se basó en detectar niveles de Aflatoxina M₁ en muestra de leche cruda y pasteurizada de ganado vacuno de Mene Mauroa de la Región Occidente de Venezuela. Los niveles de aflatoxina M₁ se midieron, mediante el método de Microelisa Rida screen Aflatoxin M₁, donde se procesaron 60 muestras de leche (30 de leche cruda y 30 de leche pasteurizada). Estas muestras se obtuvieron de cuatro

*Unidad de Investigaciones en Microbiología Ambiental (UIMA).
E-mail: zoraidamedina@hotmail.com

fincas que sustentaron al ganado vacuno con alimento vegetal (F1), comercializado (F2) y dos de ellas con ambas combinaciones (F3 y F4). En todas las muestras analizadas los niveles de aflatoxina M₁ para leche cruda y pasteurizada del ganado vacuno con los distintos sustentos alimentarios estuvieron dentro de los límites permisibles (0,05ppb y 0,5ppb respectivamente) de acuerdo a lo establecido en el *Codex Alimentarius* no representando riesgo a la salud del consumidor.

PALABRAS CLAVE: aflatoxinas, inmunosupresores, carcinógenos, microelisa, *Aspergillus*.

Detection of Aflatoxin M₁ in raw and pasteurized milk of bovine cattle from Mene Mauroa western region of Venezuela

ABSTRACT

The aflatoxins are immunosuppressive and carcinogenic toxic metabolites produced in the secondary metabolism of *Aspergillus* species, such as *A. flavus* and *A. parasiticus*. In Mene Mauroa, the bovine cattle are sustained with industrialized food, fresh vegetables or the combination of both, the latter especially during the drought station. The aim of this research was based on the detection of aflatoxin M1 levels in raw and pasteurized milk of bovine cattle from Mene Mauroa of the Western Region of Venezuela. The levels of aflatoxin M1 were measured by the method of Microelisa Rida screen Aflatoxin M1; where 60 samples of milk (30 of raw milk and 30 of pasteurized milk) were processed. These samples were obtained from 4 farms that sustained the bovine cattle with: vegetable food (F1), commercial food (F2), and 2 of them with the combination of both (F3 and F4). In all the analyzed samples the levels of aflatoxin M1 for raw and pasteurized milk of bovine cattle with the different food livelihoods were within the permissible limits (0,05 ppb and 0,5 ppb, respectively) representing no risk to consumer health, according to how is established in the *Codex Alimentarius*.

KEYWORDS: aflatoxins, immunosuppressiv, carcinogenic, microplate, *Aspergillus*.

Introducción

Las aflatoxinas (AF) son producidas en la etapa final del crecimiento exponencial de una colonia fúngica, son metabolitos secundarios de hongos y presentan un bajo peso molecular (Bolet y Socarras 2005; Martínez *et al* 2011; Landeros *et al* 2012; Reza *et al* 2013); básicamente estas micotoxinas son producidas por hongos del género *Aspergillus* (*A. flavus* y *A. parasiticus*) (Landeros *et al* 2012). Entre sus principales manifestaciones clínicas asociadas a la exposición de estas sustancias se encuentra el daño hepático y renal, mutagénesis, teratogénesis, carcinogénesis, inmunosupresión y citotoxicidad (Landeros *et al* 2012; Martínez *et al* 2011). Los factores para que un alimento sea contaminado con aflatoxinas son numerosos, caracterizados por temperaturas y humedades relativamente altas, condiciones de transporte y almacenamiento inadecuado y secado deficiente, por tanto la contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia, desde la cosecha, pasando por la recolección, almacenaje, transporte, elaboración y conservación (Requena *et al* 2005; Ortiz, 2009).

Dentro de las aflatoxinas se encuentran los tipos B_1 , B_2 , G_1 y G_2 siendo la B_1 la más importante debido a su toxicidad (Martínez *et al* 2011). Cuando el animal ingiere este tipo de aflatoxina, la misma es biotransformada en el hígado por hidroxilación del carbono 4 a M_1 , siendo tan tóxico como la B_1 que a su vez es excretado en la leche. La cantidad de Aflatoxina M_1 encontrada en leche, generalmente es de 1% a 2% de la AFB_1 ingerida, y puede llegar hasta 6% (Ortiz, 2009; Reyes *et al* 2009).

La presencia de la AFM_1 genera problemas de salud pública ya que es clasificada por la Agencia Internacional de Investigaciones del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) como clase 2B, la cual incluye a las sustancias carcinogénicas para los humanos, además de producir intoxicaciones severas, abortos, vómitos, diarreas y hemorragias internas, y con el tiempo se van acumulando lo cual puede llevar a generar en el individuo enfermedades crónicas (Ortiz, 2009).

Los infantes tienen mayor riesgo de contaminación, ya que la leche se utiliza como fuente primordial en su alimentación, ocurriendo de forma similar con la población de adultos mayores por considerarse una fuente importante de calcio. Este producto de consumo no representa un riesgo para la salud humana, puesto que constituye una fuente nutritiva no superada por ningún otro alimento conocido (Ortiz, 2009), siendo importante su consumo en la población infantil y en los adultos mayores, los cuales no tienen suficientes mecanismos bioquímicos que permitan una adecuada detoxificación. En los niños el cerebro continúa su desarrollo durante muchos años después del nacimiento y esto puede causar una mayor susceptibilidad para que algunos tipos de micotoxinas tengan capacidad de afección al nivel del sistema nervioso central (SNC) (Gimeno, 2011).

En México, analizaron muestras de quesos procedentes de varias industrias por la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), donde evidenciaron que todas las industrias queseras presentaron incidencia de AFM₁, los cuales se registraron en mayores porcentajes durante la época de lluvia, aspecto que puede relacionarse con las condiciones climáticas de humedad y temperatura lo cual permite la proliferación de los hongos (Urban *et al* 2009). Así mismo se ha registrado en algunos países de Europa la presencia de aflatoxina (M₁) en muestras de leche y derivados, lo cual también se relaciona a los períodos estacionales, presentándose en este caso durante el período de invierno, factor físico ambiental que permite una mayor proliferación de los hongos ambientales productores de esta toxina (Kamkar, 2005). En un estudio más reciente en Guadalajara, México, se detectó AFM₁ en el 100% de las muestras analizadas con niveles en el rango de < 0.005 a 0.100 µg/L y de < 0.005 a 0.637 µg/L en leche cruda y pasteurizada respectivamente (Landerero *et al* 2012).

En países como México y Europa, se han realizado investigaciones referentes a la detección de esta micotoxina en muestras de leche y sus derivados, en donde sugieren que la misma se presenta de forma frecuente, por lo cual las políticas sanitarias se deben intensificar ante esta problemática de salud pública (Urban *et al* 2009).

Actualmente en Venezuela no hay controles de calidad estrictos sobre la leche y sus derivados frente a la problemática de las micotoxinas, por esta razón el principal objetivo de esta investigación se basó en detectar niveles de Aflatoxina M₁ en muestra de leche cruda y pasteurizada de ganado vacuno de Mene Mauroa de la Región Occidente de Venezuela.

1. Metodología

1.1. Muestras

Con las medidas de asepsia se procesaron una totalidad de 60 muestras de las cuales, 30 fueron de leche líquida cruda (C), obtenidas en cuatro fincas del Municipio Mene Mauroa estado Falcón y 30 muestras de leche líquida pasteurizada (P) obtenidas de expendios comerciales. Para la misma se tomó en consideración, alimento de consumo del ganado bovino, la totalidad de animales existentes, la totalidad de vacas productoras y enfermedades aparentes (Tabla 1).

TABLA 1. Descripción de la muestra

Muestra	Cant	Descripción de la muestra
Finca 1 (F1)	10	ALIMENTO: pasto. 45 vacas productoras de leche. 346 animales en total. Sin enfermedades aparentes. Hora de toma de Muestra 1:13 pm.
Finca 2 (F2)	5	ALIMENTO: alimento concentrado. 13 vacas productoras de leche. 38 animales en total. Sin enfermedades aparentes. Hora de toma de Muestra 1:52 pm.
Finca 3 (F3)	5	ALIMENTO: pasto y alimento concentrado. 11 vacas productoras de leche. 21 animales en total. Sin enfermedades aparentes. Hora de toma de Muestra 2:08 pm.
Finca 4 (F4)	10	Recolecta leche del municipio, para la fabricación de quesos distribuidos en la zona. Hora de toma de Muestra 3:48 pm.
Marca 1 (M1)	17	Tomada de expendio comercial en la zona norte de la ciudad de Maracaibo. Envases de Cartón sometidos a refrigeración.
Marca 2 (M2)	13	Tomada de expendio comercial en la zona sur de la ciudad de Maracaibo. Envases de Cartón sometidos a refrigeración.

De contenedores de aluminio se realizó la colecta de leche líquida cruda en frascos de vidrios estériles de capacidad de 250mL. Para esto, la muestra se agito antes de ser colectada para tener mejor homogenización. Posterior al mismo se colocó en una cava provista de hielo en barra para el mantenimiento de la temperatura y el posterior traslado al laboratorio para su respectivo análisis. Para el análisis, se agito la muestra y se extrajeron 10mL de cada uno de los frascos que contenían la leche colectada por finca, donde fueron colocados en tubos de ensayo estériles.

Para la colecta de la leche pasteurizada se agitó el envase contenedor de 500 y 1000mL, hasta homogeneizarla, luego se extrajeron 5 ml de muestra y se colocaron en tubos estériles. Así mismo, se registraron características básicas como: fecha de vencimiento, lote y marca (COVENIN, 1998).

1.2. Preparación inicial

Cada muestra se centrifugó en una centrifuga modelo DINAC™ III por 10 min/ 3500g/ a una temperatura de 10°C aproximadamente (ésta se obtuvo por refrigeración previa), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial Ridascreen Aflatoxin M1 30/15 (R-Biopharm, Alemania). Antes del uso todos los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente (20°C-25°C/68°F-77°F).

1.3. Cuantificación de la AFM₁

Se realizó por el método Microelisa Ridascreen AflatoxinM₁ 30/15 (R-Biopharm, Alemania) (Ortiz, 2009; Reyes *et al* 2009; Fernández *et al* 2000; Celik *et al* 2005), que comprende: colocar suficientes pozos en el soporte de la microplaca, para proceder al análisis de las muestras, en cada pocillo, se añadió 100 microlitros de las muestras procesadas anteriormente. Se mezcló la placa suavemente por rotación y luego se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) en oscuridad. Posterior a esto, se eliminó el líquido de los pocillos con golpes suaves de la microplaca y se colocó hacia abajo sobre un papel absorbente hasta asegurar la remoción completa del líquido. Posterior a ello, se adicionaron 250 uL de buffer lavado, en los pocillos y este proceso se repitió dos veces en el cual se adicionaron 100 uL del conjugado enzimático diluido para luego mezclar suavemente por rotación manual, y se incubó a temperatura ambiente (20-25 °C) en oscuridad por 15 minutos, de la misma manera se eliminó el líquido de los pocillos y se dejó la microplaca hacia abajo sobre un papel absorbente hasta asegurar la remoción completa del líquido, donde luego se le adicionaron 250 uL de la solución buffer de lavado, repitiendo el procedimiento dos veces más. Nuevamente se agregaron 100 uL del sustrato-cromógeno a cada pozo mezclando suavemente la placa en forma manual, y se incubó a temperatura ambiente (20-25 °C) por 15 minutos, en oscuridad; luego se agregaron 100 microlitros de solución de parada a cada pocillo, y se mezclaron suavemente por rotación manual. Finalmente se leyó la absorbancia a 650 nm, dentro de los 15 minutos posteriores a la adición de la solución pasada, con un lector de Elisa, marca Epson, modelo ELx800.

1.4. Elaboración de la curva patrón.

Se realizó con 6 pozos sensibilizados con anticuerpos anti-aflatoxinas a concentraciones de 0 ppb (estándar 1), 5 ppb (estándar 2), 10 ppb (estándar 3), 20 ppb (estándar 4), 40 ppb (estándar 5), 80 ppb (estándar 6), por duplicado (12). De esta forma se enfrentaron las absorbancias obtenidas en cada muestra con la curva patrón.

2. Resultados y discusión

Como se puede observar en la Tabla 2, la cual hace referencia a la finca 1 (F1), de las diez muestras analizadas, las mismas se encontraban dentro de los parámetros establecidos por la Comisión del *Codex Alimentarius* (2001), donde el límite de AFM₁ en leche cruda y pasteurizada es de 0,05 ppb y 0,5 ppb, respectivamente; el promedio de concentración de esta finca fue de 0,003 ppb.

TABLA 2. Resultados de AFM1 en leche pasteurizada

Marca	Muestra	Ppb
	Promedio M1	0,0075
	Promedio M2	0,021

M1= muestra 1; M2= muestra 2; P= envase de leche pasteurizada

En esta finca las vacas lecheras fueron alimentadas únicamente con pasto, por tanto, es probable que el vegetal fresco sea menos propenso a la contaminación de AFM₁ debido a que no es un sustrato apropiado para el crecimiento de *Aspergillus flavus*. Numerosos estudios han demostrado que las vacas lecheras alimentadas con pasto, están menos expuestas a contaminación por aflatoxinas por tanto no representan un riesgo para la salud del animal y del ser humano, tal como se demuestra en este estudio (Fernández *et al* 2000; López *et al* 2003).

Para la finca dos (F2), como se observa en la Tabla 2, la concentración de AFM₁ tuvo un promedio de 0,030ppb, determinando de esta forma que la misma no sobrepasó los límites establecidos por la UE y la FDA sin embargo, al compararlas con la F1, la misma presentó una mayor concentración de AFM₁.

Cabe destacar que en esta finca las vacas eran alimentadas con alimento concentrado comercial, observándose un incremento del 10% en relación a la concentración de AFM₁ en el alimento concentrado, esto se debe a su disposición de vulnerabilidad de colonización de especies de *Aspergillus flavus* (Celik, 2005; López *et al* 2003; Rahimi *et al* 2012). En Venezuela por ser un país con clima tropical, la alimentación diaria de las vacas productoras de leche es variada, ya que en el año se presentan épocas de sequía extrema donde los pastizales no proveen del alimento necesario para mantener en buenas condiciones al ganado, por tanto los suplementos concentrados desempeñan un papel importante en su dieta ya que permite elevar el consumo total de energía y proteínas del animal.

En otros estudios han demostrado que el consumo de este tipo de alimento (concentrado) aumenta el riesgo de contaminación con AFB₁ llevando a mayor metabolización de AFM₁. En este estudio se demuestra que las concentraciones encontradas de AFM₁ en la leche de vacas que consumían este tipo de alimento, están bajo los parámetros establecidos por la UE y la FDA. Lo cual sugiere que la leche cruda analizada es segura para la elaboración de alimentos derivados. Sin embargo, a pesar de que las concentraciones AFM1 en las leches analizadas se encontraron dentro de los límites establecidos por los organismos reguladores internacionales, se

deben considerar las condiciones climáticas de los distintos países para de esta manera establecer los niveles de concentraciones que sean seguros de AFM₁ (Celik *et al* 2005; Zavieso, 2006; Montaña *et al* 2007).

Es importante que tanto los productores de alimentos para ganadería, como los productores agropecuarios sean conscientes de la importancia que representan las aflatoxinas en relación a la salud pública, por lo que se hace necesario monitorear permanentemente la presencia de estas micotoxinas en los productos de consumo alimenticio (Urban *et al* 2009), sobre todo en las épocas de lluvias, donde algunos estudios realizados han demostrado la presencia e incremento de esta AF durante estos períodos (Urban *et al* 2009), ocurriendo lo mismo en países Europeos durante períodos de inviernos (Urban *et al* 2009).

En la F3, los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites establecidos por la UE y la FDA, siendo el promedio de 0,013ppb, estos representan un valor medio entre los resultados obtenidos en las dos fincas anteriores (F1 y F2), esto puede deberse al tipo de alimentación mixta de estas vacas, ya que ingerían alimento concentrado y pasto.

La mezcla de dos tipos de alimento, redujo significativamente la concentración de AFM₁ como se demuestra en los resultados. Numerosos autores (Reyes *et al* 2009; Celik, 2005; Montaña *et al* 2007; Combita y Mildenberg 2009) han reportado que la alimentación mixta representa un beneficio para los productores de leche, ya que permite alimentar al ganado de manera segura manteniendo bajos riesgos de contaminación y además aporta todos los nutrientes necesarios para mantener las vacas en buen estado de salud, debido a que mejora la digestión del animal, la disponibilidad de nutrientes consumidos en el pasto, y por tanto la ganancia de peso y el aumento de la producción de leche sin aumentar el riesgo en la salud del animal o del consumidor.

En la F4, los resultados obtenidos se encontraron dentro de los límites permisibles (0,013ppb), notándose que en el sitio se elabora queso artesanal, y la leche es obtenida de varios productores de la zona estudiada, además que el ganado en este sitio consume alimento mixto.

Además, de la influencia que tiene el alimento en la concentración de AFM₁, existen otros factores inherentes al animal como la susceptibilidad a la presencia de las AF que puede influir en su salud de manera negativa. Así mismo el consumo constante del alimento con concentraciones de AFM₁ puede provocar daños a la salud del animal, por estas razones es probable que los datos obtenidos en la F4, sean al igual que la F3, un valor medio en comparación con la F1 y la F2.

Para este estudio, el análisis estadístico descriptivo se efectuó con el paquete Statistix 8.0; el valor de la media es de 0,008ppb y los valores mínimo y máximo de 0,003ppb y 0,030ppb respectivamente, el valor del

mínimo se obtuvo en la finca donde las vacas eran alimentadas solo con pasto y el valor máximo donde las vacas consumían solo alimento concentrado.

Por otro lado, según la prueba de normalidad, el número de muestras analizadas y los datos obtenidos, presentan una dispersión normal en el espacio representando la realidad de la zona estudiada. Por tanto existen altas probabilidades de que todas las fincas de la zona tengan situaciones similares en cuanto a la presencia de AFM₁ en la leche.

Hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las fincas con relación a la presencia de AFM₁ y la prueba de Tukey confirmó que todas las fincas diferían en cuanto a la presencia de AFM₁ ($F_2 > F_3 > F_4 > F_1$).

En relación a la leche pasteurizada, las concentraciones obtenidas en la M1 mostraron un promedio de AFM₁ 0,0075ppb. En el caso de la M2, las concentraciones obtenidas, aunque más elevadas que la muestra anterior, se encontraban también por debajo de los límites establecidos por la UE y la FDA, con un promedio de 0,021ppb.

La leche pasteurizada, es una de las principales formas de consumir la leche de vaca por los humanos, ya que el método de pasteurización, ofrece al consumidor inocuidad y duración del producto. Sin embargo, estudios han demostrado que el almacenamiento y procesado de la leche para la obtención de los distintos productos lácteos, no afecta la estabilidad y distribución de la AFM₁ (Díaz, 2006; Prado *et al* 2008; Rahim, 2009).

La estabilidad de la AFM₁ durante el tratamiento con calor como la pasteurización o tratamiento directo de calor no se ve afectada, por lo tanto la estructura se mantiene estable. La AFM₁ puede estar presente en la leche y sus derivados, pero su concentración puede ser alterada por los procesos de dilución a la cual es sometida, y a la separación de sus componentes para elaborar sus productos. (Kamkar, 2005; Díaz, 2006).

Los resultados obtenidos no representan un riesgo para la salud ya que es probable que las industrias procesadoras de estas leches mantengan controles de calidad continuos que permita tener niveles bajos de AFM₁. No obstante, la manera más efectiva para evitar la contaminación por AFM₁ es controlar diariamente la alimentación de las vacas productoras de leche.

Por otra parte, la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) ha reportado a la AFB1 y AFM1, como compuestos carcinógenos para seres humanos. La presencia de AFM1 en la leche, constituye un riesgo para la población, particularmente en niños debido a la importancia de este producto en su alimentación y a que son considerados más susceptibles a sus efectos adversos, ya que su capacidad de biotransformación de los compuestos carcinógenos es generalmente más lenta que en adultos (Prandiniet *al* 2009; Landero *et al* 2012).

En Venezuela la información sobre los riesgos de contaminación con AFM₁ es limitada y esta situación sugiere que se deben intensificar los estudios que permitan conocer la concentración de AFB₁ en los productos lácteos (Montaño *et al* 2007).

Según el análisis estadístico, la media para estos resultados es de 0,013ppb, el valor mínimo es de 0,006ppb obtenido en la M₁ y el máximo es de 0,037ppb obtenido en la M₂. Al igual que la leche cruda, las muestras tomadas tienen una distribución normal por lo que los datos obtenidos son representativos en base a la población estudiada.

La correlación existente en este estudio, para las dos variables (leche cruda y leche pasteurizada), según Pearson es de 1, lo que significa que existe una correlación perfecta, indicando dependencia total entre las variables ya que cuando la concentración de AFM₁ aumenta en la leche cruda también aumenta en la leche pasteurizada.

En cuanto a la concentración de AFM₁ no existen diferencias significativas entre la leche cruda y la leche pasteurizada ($P > 0.05$), es decir que independientemente del tipo de leche la AFM₁ está presente en concentraciones similares, por lo tanto éstas concentraciones no son afectadas por los procesos a la cual es sometida la leche cruda para la pasteurización o para la obtención de todos sus derivados.

Conclusiones

El 100% de la leche cruda y pasteurizada analizadas presentaron niveles de concentración de AFM₁ dentro de los límites establecidos por la FDA y la UE. El tipo de alimento consumido por el animal influye en la contaminación de la leche con AFM₁, donde la alimentación con pasto disminuye la concentración en las muestras de leche cruda. La alimentación del animal con alimentos mixtos (pasto y Alimentos concentrado) redujo el 50% aproximadamente la concentración de AFM₁ en la leche cruda. La incidencia de AFM₁ tanto en leche cruda como pasteurizada en las zonas estudiadas fue baja. La leche cruda y pasteurizada distribuida en la región estudiada representa un alimento seguro al consumidor por contener concentraciones de AFM₁ dentro de los límites establecidos. No obstante, se sugiere monitoreo en otras fincas y hacia otras regiones del país, lo cual permita establecer parámetros en relación a los niveles de aflatoxina, la cual representa en países como México y algunos países Europeos un problema de salud pública; asimismo se considera que es necesario un monitoreo en las épocas de lluvia, ya que durante este lapso pluvial aumenta la humedad y baja la temperatura, condiciones bioclimáticas que permiten mayor proliferación de hongos ambientales productores de aflotoxinas.

Referencias

- Bolet, M., Socarras, M. (2005). Aflatoxinas: mecanismo de toxicidad en la etiología del cáncer hepático celular. *Rev Cubana Invest Biomed.* 24(1): 54-9. <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v24n1/ibi07105.pdf>
- Çelik, T., Sarımehtetoğlu, B., Küplülü O. Aflatoxin M1 contamination in pasteurised milk. *VETERINARSKI ARHIV.* 75(1): 57-65. 2005.
- Combata, A., Mildenberg, S. (2009). Detección de aflatoxina M₁ en leches frescas comercializadas en la zona del Valle de Cauca (Colombia) mediante la técnica de ELISA (Para obtener el Título de Microbiología Industrial). Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javariana. Bogotá (Colombia). 111 pp.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). (1998). Leche pasteurizada (2ª Revisión). 798-1994. Caracas, Venezuela.
- Comisión Europea. (2006). Reglamento (CE) N° 401/2006 de la Comisión de 23 de febrero de 2006 por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L 70, 12-34.
- Comisión del Codex Alimentarius. (2001). Observaciones sobre el proyecto de nivel máximo para la aflatoxina M1 en la leche. Informe de la 33ª reunión del Comité del Codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos, La Haya, Países Bajos.
- Díaz, G.J., Espitia, E. (2006). Occurrence of aflatoxin M1 in retail milk samples from Bogotá, Colombia. *Food Additives and Contaminants*, 23(8), 811-815.
- Fernández, G., Negrón, G., Isea, G., Sánchez, E. 2000. Reporte de análisis cuantitativo de aflatoxinas por el método de ELISA en muestras de materias primas de alimento balanceado para aves provenientes de una planta ubicada en el municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. *Rev. Cient.* 10 (1): 63-68.
- Gimeno, A., Martins M. (2011). Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos 3ª edición. Special nutrient, INC. Miami FL, USA.
- Kamkar, A. (2005). The study on the contamination of aflatoxin in White cheese marketed in tehran by thin layer chromatography. *Iran J. Food Sci Technol.* 2: 71-8.
- Landeros, P., Noa, M., López, Y., González, DG., Noa, E., Real, M., Juárez, C., Medina MS. (2012). Niveles de aflatoxina m1 en leche cruda y pasteurizada comercializada en la zona metropolitana de Guadalajara, México. *Rev. Salud Anim.* 34(1): 40-45. <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v34n1/rsa06112.pdf>
- López, C., Ramos, L., Ramadan, S., Bulacio, L. (2003). Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control.* 14: 31-34.
- Martínez, R., Berruga Fernández, M.I., Molina Casanova., M. (2011). Incidencia de Aflatoxina M₁ en leche de ovejas Manchegas. *Sitio Argentino de Producción Animal.* 1-5. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina_leche/27-aflatoxina.pdf
- Montaño, V., Chirino, I., Gemio, R. (2007). Estudio toxicológico de presencia de aflatoxinas m1 en leche bovina recolectada del municipio de achacachi. *Bolivian Journal Of Chemistry.* 24(1) 89-93.

- Ortiz, C. (2009). Análisis de aflatoxina m1 en leche fresca de establos lecheros de arequipa. *RevInvVet Perú*. 20 (1): 139-141.
- Prado, G., Silva, M., Souza, A., Aprigio, A. (2008). Occurrence of aflatoxin M₁ in parmesan cheese consumed in Minas Gerais, Brazil. *Ciênc. agrotec*. 32(6): 1906-1911.
- Prandini A., Tansini G., Sigolo S., Filippi L., Laporta M., Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(5):984-991.
- Rahimi E., Mohammadhosseini M., Alimoradi M., Rezaei P., Arab M., Goudarzi M., Tarkesh M., Torki Z. (2012). Aflatoxin M1 in Pasteurized Milk and White Cheese in Ahvaz, Iran. *Global veterinaria*. 9(4): 384-387.
- Rahim, E., Shakerian, A., Jafariyan, M., Ebrahimi, M. and Riahi, M. (2009). Occurrence of aflatoxin M1 in raw, pasteurized and UHT milk commercialized in Esfahan and Shahre Kord, Iran. *Food Security* 1: 317-320.
- Requena, F., Saume, E., León, A. (2005). Micotoxinas: riesgos y prevención. *Zootecnia Trop*. 23(4): 57-64.
- Reyes-Velázquez, W., Martínez, P., Espinosa, V., Nathal, M., Palacios, L., Rojo, F. (2009). Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México *Técnica Pecuaria en México*. 47(2): 223-230. 20(11):1077-86.
- Reza, D., Marjan, M. (2013). Aflatoxin M1 Contamination in Dairy Products. *Journal of Science and today's world*. 2(5): 500-514. .
- Urban, G., Pérez, J., Martínez, F., Salas, J., Díaz, G., Ramírez, M., Castro G., Vega, S., Gutiérrez, R., Escobar, A. (2009). Niveles de aflatoxina m1 en quesos frescos producidos en diferentes zonas de México. *Rev Salud Anim*. 31(2): 115-121.
- Urrego, J., Díaz G. (2006). Micotoxinas y cáncer. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb*. 54(2): 109-116. <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v24n1/ibi07105.pdf>
- Zaviezo, D. (2006). Consideraciones técnicas sobre la problemática de las micotoxinas y las micotoxicosis aviares. *Ciencia y Trabajo*. 8(22): 154-158.

Pesquisaje de virus dengue y otros agentes infecciosos en donantes de sangre voluntarios. Resultados preliminares

Anyelo Durán^{1,2}

Kevin Sánchez^{3,4}

*Roxana Acosta*³

*Divar Bohórquez*³

*Enrique Durán*³

Luis Gallardo^{3,4}

*José Luengo*⁵

Nereida Valero^{1*}

RESUMEN

La transfusión sanguínea es un procedimiento de inmenso valor en la práctica médica, pero cuando se efectúa sin control adecuado puede convertirse en un medio propicio para la transmisión de infecciones. Por ello, el objetivo de este trabajo fue diagnosticar infección por virus dengue y otros agentes infecciosos en sangre de donantes voluntarios determinando su grupo sanguíneo. Se analizó la sangre de 38 donantes para determinar la proteína no estructural 1 del virus dengue (NS1)

¹Sección de Virología, Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”.

²Cátedra de Bioquímica General, Escuela de Bioanálisis.

³Estudiante de la Escuela de Medicina.

⁴Comunidad Estudiantil de Investigaciones Clínicas (C.E.I.C). Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.

⁵Instituto Hematológico de Occidente. E-mail: valero.nereida@gmail.com

y los anticuerpos IgM e IgG específicos mediante la técnica de inmunocromatografía, la detección de marcadores infecciosos se realizó por la técnica de Elisa de tercera generación y los grupos sanguíneos ABO-Rh por aglutinación. No se obtuvo positividad en las muestras analizadas a los marcadores de infecciones transmisibles por vía transfusional que se realizan rutinariamente, ni a la proteína NS1 y a los anticuerpos IgM anti-dengue; no obstante, hay que mencionar que los datos obtenidos hasta ahora son resultados preliminares.

PALABRAS CLAVE: dengue, agentes infecciosos, donantes, sangre, transfusión.

Screening of dengue virus and other infectious agents in voluntary blood donors. Preliminary results

ABSTRACT

Blood transfusion is a process of immense value in the medical practice; and is also highlighted as an important therapeutic alternative, but -when done without proper management- it can become in a propitious environment for the spread of infections. Therefore, the goal of this study was to diagnose dengue virus infection and other infectious agents in blood from voluntary donors, determining their blood group. The blood from 38 donors was analyzed to determine the nonstructural dengue virus protein 1 (NS1) and the specific IgM and IgG antibodies, using the immunochromatography technique. The detection of infectious markers was made with the third generation ELISA technique and the ABO-Rh blood groups by agglutination. None of the samples analyzed tested positive for markers of transfusion-transmissible infections that are routinely performed, nor the NS1 protein and anti-dengue IgM antibody was obtained; however, it has to be mention that the information obtained so far are just preliminary results.

KEYWORDS: dengue, infectious agents, donors, blood, transfusion.

Introducción

El dengue es una enfermedad viral, febril y aguda que causa aproximadamente 390 millones de casos al año, de los cuales 96 millones se manifiestan clínicamente (Bhatt *et al.*, 2013). Es considerada actualmente como la arbovirosis de mayor relevancia a nivel mundial en términos de morbilidad, mortalidad y afectación económica (Añez *et al.*, 2006), causada por cuatro tipos del virus dengue (DENV) descritos hasta ahora (DENV 1-4) pertenecientes al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* con el posible descubrimiento del DENV-5 aislado en un brote en 2007 procedente de sueros recolectados en actividades de vigilancia en Malasia-Borneo (Normile D, 2013). Esta enfermedad se transmite naturalmente por mosquitos del género *Aedes* (*Ae.*), pudiendo darse también la transmisión a través de transfusiones de sangre y componentes sanguíneos así como, por trasplantes de órganos sólidos que contenga la partícula infecciosa como ha sido referido (Chuang *et al.*, 2008; Allain *et al.*, 2009; Tangnararatchakit *et al.*, 2012; Stramer *et al.*, 2012; Añez y Ríos, 2013). Estos planteamientos quedan reforzados por lo descrito por Sudiro *et al.*, en 2001, quienes afirman que la sangre tomada de pacientes infectados durante la fase aguda puede mantener niveles en plasma del ARN viral en el rango de 1.055 a 1.093 copias/mL denotando la infectividad de este fluido biológico cuando se transfunde a un huésped susceptible, lo que indica la factibilidad de un donante en fase virémica o un caso asintomático de la enfermedad de poder transmitir la misma a un receptor.

La infección por dengue tiene una fase virémica que dura de 4 a 8 días y precede al inicio de los síntomas en las personas con la enfermedad. La mayoría de los casos terminan en infecciones subclínicas o asintomáticas (Gubler *et al.*, 1981; Burke *et al.*, 1988) o cursan hacia las diversas formas clínicas de la enfermedad de mayor gravedad y potencialmente mortal (OMS, 2009; Durán *et al.*, 2012; Añez y Ríos, 2013; Durán *et al.*, 2013).

Actualmente la enfermedad es endémica en 112 países de África, América, el Mediterráneo oriental, sudeste de Asia y el Pacífico occidental donde se reportan cada año entre 50 a 100 millones de casos de dengue sin signos de alarma (DSSA) y de 25 a 500 mil casos de dengue grave (DG) (OMS, 2009). Para la semana epidemiológica 22 del año 2016 la OPS público un total de 1.679.537 casos probables con 3.212 casos de DG (OPS, 2016). En Venezuela según estadísticas del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), el DEN constituye la octava causa de consulta, reportándose un 0,37% (468 casos) para la semana epidemiológica n° 53 de 2014. El acumulado del año fue de 87.529 casos, de los cuales 0,25% correspondió a DG (221 casos), con una razón de DSSA/DG de 395:1 (MPPS, 2014). Entre 1997 y 2003, en el estado Zulia se notificó el 12,68% del total de casos de dengue del país y para el período 2005-2006, se observó una frecuencia incrementada de casos de dengue (37,68% y 52,48% respectivamente) (Reyes *et al.*, 2006).

Para el periodo 2009-2010 se registró un total de 5.822/8.279 casos que representaron un 70,32% de seropositividad general en la población analizada (Durán *et al.*, 2012).

Uno de los mecanismos de la respuesta inmunitaria del huésped durante la infección por el virus dengue es la respuesta humoral con producción de anticuerpos. Entre el tercero y el quinto día del período febril de la infección aparecen anticuerpos IgM específicos que alcanzan su pico máximo a las dos semanas. Estos niveles caen hacia la cuarta semana, hasta no ser detectables entre 2 y 3 meses después de la infección. Los títulos de IgG son detectables entre la segunda y cuarta semana permaneciendo de por vida, esta cinética de producción de anticuerpos es observada en pacientes con infección primaria mientras que en las infecciones secundarias son detectados altos títulos de IgG durante la fase aguda, los cuales se incrementan durante la segunda semana, mientras que los títulos de IgM por lo general son muy bajos en comparación con los de IgG y disminuyen rápidamente y a menudo se vuelven indetectables (Kurane y Ennis, 1997; Vázquez *et al.*, 2005). Con el transcurrir del tiempo se ha propuesto que la determinación de la proteína no estructural 1 (NS1), puede ser utilizada como indicador en la detección temprana de la infección por virus dengue (Kumarasamy *et al.*, 2007; Sekaran *et al.*, 2007). De acuerdo con estudios previos, la presencia de NS1 en el suero de humanos se puede confirmar entre los días 0-9 después del inicio de la enfermedad (Dussart *et al.*, 2006). En la actualidad, los kits comerciales para la detección de NS1 están disponibles para el diagnóstico temprano del DENV basado en la captura de ésta. Varios estudios se han llevado a cabo en muchos laboratorios alrededor del mundo con la finalidad de corroborar este hecho (Chaiyaratana *et al.*, 2009; Hang *et al.*, 2009). La NS1 está presente en todos los tipos del DENV y se consiguen altos títulos en las primeras 72 horas de la enfermedad (Bessof *et al.*, 2008). Esta es la razón de su mayor detección en sueros en fase aguda. En el estudio llevado a cabo en la región zuliana la positividad de NS1 fue de 65,79% en la población pediátrica analizada, cuyo rango de evolución se ubicó en 1 a 6 días (Durán *et al.*, 2013).

La transfusión sanguínea es un procedimiento de inmenso valor en la práctica médica, y se ha mantenido como una importante alternativa terapéutica; pero cuando se efectúa sin un control adecuado puede convertirse en un medio propicio para la transmisión de infecciones, sobre todo aquellas que se encuentran latentes en el donante. Las infecciones transmisibles por transfusión son aquellas que pueden infectar a otras personas a través de donaciones de sangre o de hemoderivados (Ríos A, 1997; Salazar M, 2003). Es por esto que se realizan pruebas de tamizaje para la detección de virus de la hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de hepatitis B (VHB), virus linfotrópico de células T humanas (HTLV), de *Trypanosoma cruzi* (chagas) y *Treponema pallidum* (sífilis). En la actualidad no se realizan pruebas para la detección de infección por arbovirus como el dengue; sin embargo, hay pocos reportes de estudios en los que se evidencia

la transmisión de éste y otros agentes virales después de transfusiones (Chuang *et al.*, 2008; Mohammed *et al.*, 2008; Linnen *et al.*, 2008; Allain *et al.*, 2009; Wilder-Smith *et al.*, 2009; Pozzetto *et al.*, 2015).

Los grupos sanguíneos representan rasgos heredados polimórficos entre individuos y poblaciones. En la actualidad, hay 34 grupos sanguíneos humanos reconocidos y cientos de antígenos y alelos. Las diferencias en la expresión del antígeno de los grupos sanguíneos pueden aumentar o disminuir la susceptibilidad del huésped a muchas infecciones. Los grupos sanguíneos pueden desempeñar un papel directo en la infección por servir como receptores y / o co-receptores para microorganismos incluyendo los virus. Además, muchos de los antígenos de grupos sanguíneos facilitan la captación intracelular, la transducción de señales o la adhesión a través de la organización de los microdominios de membrana. Algunos grupos sanguíneos pueden modificar la respuesta inmunitaria innata a la infección. Varios fenotipos distintos asociados con el aumento de la resistencia del huésped a la malaria están sobre expresados en las poblaciones que viven en zonas donde la malaria es endémica, como resultado de las presiones evolutivas. Los microorganismos también pueden estimular anticuerpos contra antígenos de grupos sanguíneos, incluyendo ABO, T, y Kell, existiendo una relación simbiótica entre la expresión del grupo sanguíneo y la maduración del microbioma gastrointestinal (Calhoun y Petz, 2001; Cavasini *et al.*, 2006; King *et al.*, 2011; Acosta *et al.*, 2014; Buranda *et al.*, 2014; Ekyalongo *et al.*, 2015; Cooling L, 2015). Los estudios sobre frecuencia de grupos sanguíneos ABO y factor Rh (Rh) en Venezuela son relativamente escasos.

En países endémicos como Singapur, el riesgo de infección por dengue sería, según un modelo matemático, de 1.625 casos de dengue por cada 10.000 transfusiones (Wilder-Smith *et al.*, 2009), contrario a los hallazgos en zonas no endémicas (Allain *et al.*, 2009). Dada la endemicidad del dengue y el poco conocimiento que se tiene en Venezuela particularmente en el estado Zulia sobre la posibilidad de adquirir infección por virus dengue a través de transfusión de sangre y o sus derivados, se realizó el presente estudio cuyos resultados preliminares se presentan, para determinar el grupo ABO-Rh, la proteína NS1, IgM e IgG anti-dengue, así como la detección de otros marcadores infecciosos en el suero de donantes voluntarios de sangre.

1. Pacientes y métodos

El estudio se realizó en 38 donantes voluntarios de sangre con un rango de edad entre 18 a 35 años, sin distingo de género y etnia, que acudieron a las jornadas convocadas y realizadas en junio del año 2012, en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, conjuntamente con el Instituto Hematológico de Occidente (IHO). Los candidatos entrevistados a la donación de sangre (45 individuos) se sometieron al proceso de selección

de rutina a través de una encuesta validada por el Programa Nacional de Bancos de Sangre del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), con preguntas cerradas y examen físico realizado por médicos hematólogos, enfermeras hemoterapistas del Instituto Hematológico de Occidente (IHO), un equipo de estudiantes de la carrera de Medicina y profesionales de la fundación de donantes de sangre Providas.

Los donantes seleccionados cumplieron con todos los criterios establecidos: edad entre 18-60 años, portar cédula de identidad, poseer un peso mayor a 50 kilogramos, no tener factores de riesgo como infecciones aparentes, contactos sexuales de riesgo, uso de sustancias de abuso, transfusiones recientes y tatuajes. Así mismo, las encuestas practicadas a cada donante se complementaron con los datos personales, clínicos, epidemiológicos, socio-económicos y antecedentes de vacunación a fiebre amarilla, sarampión, rubéola, varicela y hepatitis. De igual forma se solicitó el consentimiento informado y por escrito para la toma de las muestras y posterior inclusión en el estudio, cumpliendo con las normas de Helsinki para el estudio en humanos (Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, 1964). A los individuos participantes en esta investigación se les dejó en libertad de decidir sobre su participación o no en la misma; así mismo se les garantizó la confidencialidad de la información obtenida.

A cada uno de los 38 donantes se le tomó una alícuota de 6 mL de sangre periférica la cual fue colocada en tubos sin anticoagulante. Los tubos fueron centrifugados a 3.000 rpm por 15 minutos para obtener el suero, el cual se almacenó a -20°C hasta su uso. A todos estos donantes se les realizó la detección de marcadores infecciosos como el antígeno de superficie del VHB (HBsAg); anticuerpos anti antígeno del core del VHB (HBcAg); anticuerpos anti VHC; anticuerpos anti VIH-1/2; anticuerpos anti HTLV-I/II; anticuerpos anti *Treponema pallidum* y anticuerpos anti *Tripanosoma cruzi*, que son aplicados de rutina en el IHO utilizando para ello técnicas inmunoenzimáticas de tercera generación para el HBsAg y los HBcAg (sensibilidad del 100% y especificidad del 99,5%), anticuerpos anti-VHC (sensibilidad del 100% y especificidad del 99,63% al 99,8%), anticuerpos anti-VIH-1/2 (sensibilidad del 100% y especificidad del 99,92%), anticuerpos anti-HTLV-I/II (sensibilidad del 100% y especificidad del 99,92%), anticuerpos *anti-Treponema pallidum* (sensibilidad del 99,4% y especificidad del 99,8%) y anticuerpos *anti-Tripanosoma cruzi* (sensibilidad del 100% y especificidad del 98,2%), de Biokit Werfen Group®. Para la determinación del grupo sanguíneo del sistema ABO-Rh se efectuó por la técnica de aglutinación de la casa comercial (Instrumentación Científica Técnica, S.L. [I.C.T, S.L.], España). Estas pruebas fueron realizadas en su totalidad en el IHO o Banco de Sangre de Maracaibo.

Para la detección de la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG anti-dengue se utilizó la técnica de inmunocromatografía (sensibilidad del 100% y especificidad del 98,2%), de Stardard Diagnostic, Inc., Bioline, Korea,

realizada en la Sección de Virología del Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette” de la Facultad de Medicina.

Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos fueron ordenados y analizados estadísticamente mediante el programa GRAPH PAD PRISM 5.0. Los valores se expresan como proporciones, aplicando la prueba del Ji cuadrado y test exacto de Fisher con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

2. Resultados

En la Tabla 1 se pueden observar las características demográficas y epidemiológicas de la población evaluada, la cual en su mayoría estuvo conformada por donantes de sexo femenino (68,42%) y del grupo de edad entre 18 y 20 años (65,79%). En relación al grupo sanguíneo y factor Rh se constató que el 68,42% ($p < 0,0001$) resultó del tipo O Rh positivo.

En cuanto al municipio de procedencia se conoció que Maracaibo obtuvo el mayor registro ($p < 0,0001$) con el 72,98% de los donantes procedentes del estado Zulia.

De acuerdo a las encuestas realizadas a los donantes, se encontró que del total sólo el 28,95% de los sujetos refirieron tener antecedentes de infección por virus dengue; sin embargo, al evaluar la inmunidad de éstos el 63,64% (7/11) resultaron positivos para IgG anti dengue corroborándose en ellos el antecedente epidemiológico referido, en tanto que el 36,36% (4/11) resultaron seronegativos a IgG a pesar de haber notificado antecedente previo de infección por el virus. No se detectaron casos activos a ninguno de los agentes infecciosos investigados de rutina en los bancos de sangre del país (anticuerpos anti-HBcAg, HBsAg, VIH-1/2, VHC, HTLV-I/II, sífilis, Chagas) en los 38 donantes voluntarios de sangre (datos no mostrados).

TABLA 1. Caracterización demográfica y epidemiológica de los donantes de sangre voluntarios, estado Zulia, Venezuela.

Aspectos demográficos y epidemiológicos	Nº	(%)
Género		
Masculino	12	31,58
Femenino	26	68,42 ^a
Edad		
18-20 años	25	65,79
21-30 años	12	31,58
31-35 años	1	2,63
Clasificación ABO Rh		
O+	26	68,42 ^b
O-	1	2,63
B+	6	15,79
B-	0	0,0
A+	5	13,16
A-	0	0,0
AB-	0	0,0
AB+	0	0,0
Estado de procedencia		
Zulia	37	97,37
Mérida	1	2,63
Municipios del estado Zulia		
Maracaibo	27	72,98 ^c
San Francisco	5	13,51
Cabimas	2	5,41
Santa Rita	1	2,70
Mara	1	2,70
Lagunillas	1	2,70

^ap<0,002 con respecto al género masculino; ^bp<0,0001 con todos los grupos sanguíneos y factor Rh; ^cp<0,0001 con respecto al resto de los municipios del estado Zulia; N°: total de casos; %: porcentaje

En el total de las muestras analizadas no se encontró circulación sérica de la proteína NS1, ni de anticuerpos IgM anti-dengue. En relación a la IgG este isotipo se encontró en 28,95% de los donantes, mientras que el 71,05% (p<0,001) no habían sufrido la enfermedad (Tabla 2).

TABLA 2. Distribución porcentual de acuerdo a la presencia de la Proteína no estructural 1 del virus (NS1) y de los anticuerpos IgM e IgG anti-dengue.

Parámetros	N°	(%)
Estado NS1 anti-dengue		
Negativo	38	100
Positivo	0	0,0
IgM anti-dengue		
Negativo	38	100
Positivo	0	0,0
IgG anti-dengue		
Negativo	27	71,05 ^a
Positivo	11	28,95

a $p < 0,001$ con respecto a los positivos a IgG anti dengue; N°: total de casos; %: porcentaje

3. Discusión

En el presente estudio no se demostró infección activa por virus dengue en los donantes voluntarios de sangre analizados, y que resultaron serológicamente negativos a la proteína NS1 y a los anticuerpos IgM específicos a dengue. Este hallazgo difiere al reportado en una región endémica de México, en el que 2% (16/800) de los donantes presentaron anticuerpos IgM contra el virus (Rodríguez *et al.*, 2009). El resultado preliminar obtenido en esta investigación, llama la atención dado que siendo Venezuela y específicamente el estado Zulia una región endémica a esta infección, se esperaría encontrar casos activos; sin embargo, hay que destacar la limitación en cuanto al análisis de un número mayor de muestras dada las dificultades en la obtención de reactivos.

Otros estudios han reportado resultados similares e incluso inferiores, así lo refieren investigaciones realizadas en Puerto Rico donde se reportó que el ARN del virus dengue fue detectado en 1 de cada 1.000 donantes de sangre (Mohammed *et al.*, 2008). En Honduras y Brasil fueron detectados en el 0,3% (n: 2994) y 0,04% (n: 4858) de los donantes de sangre, respectivamente (Linnen *et al.*, 2008).

En Australia los brotes de dengue han aumentado en tamaño y frecuencia, a pesar de ello en el 2008 el estudio realizado en donantes por Linnen *et al.*, (2008) no detectó el agente en los donantes estudiados. Por su parte Faddy *et al.*, en 2013 usando muestras de sangre completa recopiladas durante la epidemia de dengue que azotó a ese país en 2008-2009, estimaron con sus resultados que el riesgo de un receptor a contraer infección a dengue por la transfusión de sangre y o sus derivados procedentes de un donante era de aproximadamente 1 por cada 7.146 donaciones.

En esta investigación el tipo de sangre O Rh positivo fue el más frecuente (68,42%) mientras que el A Rh negativo, B Rh negativo, AB Rh negativo y AB Rh positivo fueron infrecuentes; resultados similares fueron reportados en donantes colombianos de la población del Valle del Aburrá y en la capital de Antioquia en donde el tipo sanguíneo más común fue el O (Carmona-Fonseca J, 2006; Patiño *et al.*, 2012). De lo anterior queda en evidencia y surge con ello la necesidad de promover la donación repetitiva en aquellos individuos que presentan los tipos sanguíneos menos frecuentes para así aumentar la disponibilidad de productos sanguíneos y fortalece la convocatoria a la donación voluntaria.

De acuerdo a la OPS, se reportó 32,22% de donaciones altruistas y 67,78% por reposición en América Latina, en 2009. Según este organismo en 2010, Venezuela se ubicó en el antepenúltimo lugar registrando el segundo valor más bajo de los países de Latinoamérica y el Caribe (4%) en la donación voluntaria, después de México, con 2,75%; mientras que Cuba y Nicaragua registraron las tasas más altas 100% y 87,1% respectivamente. Para el 2011 Venezuela se ubicó en el puesto número 13 registrando un ligero ascenso (6,38%) en la donación voluntaria en comparación con el año anterior (OPS, 2013). En el estado Zulia el número de donantes aceptados para el año 2013 fue de 44.736 de los cuales el 96,30% (43.081) fueron donantes por reposición mientras que el 3,70% (1.655) correspondieron a donantes voluntarios.

La OPS reportó prevalencia para VIH de 0,23%, VHB (0,53%), VHC (0,32%), sífilis (1,81%), chagas (0,33%), HBcAg (3,12%) y HTLV-I/II (0,21%), en unidades de sangre tamizadas en Venezuela para 2011 (OPS, 2013). Estos datos son consistentes con los registrados por el Instituto Hematológico de Occidente del estado Zulia-Venezuela, donde la prevalencia global registrada fue de 5,18%, siendo la de sífilis la más elevada (2,45%) seguida de HBcAg (1,66%) continuada de HBsAg con 0,18%, VIH-1/2 (0,41%), chagas (0,19%), VHC (0,15%) y HTLV-I/II la más baja (0,13%). Patiño *et al.*, 2013 determinaron la seroprevalencia de marcadores de infecciones transmisibles por vía transfusional y encontraron como marcador más prevalente en las pruebas a sífilis (1,2%), seguido de tripanosomiasis (1,0%), VHC (0,6%), VIH (0,5%) y VHB (0,2%). Datos éstos muy similares a los reportados en este trabajo, y que están en concordancia con otros estudios realizados en América Latina donde

se da una visión más cercana de la magnitud del problema en nuestro medio. México por ejemplo, en el 2004 registró una prevalencia de 0,07% para VIH, 0,13% para VHB y 0,31% para VHC (Rivera-López *et al.*, 2004), datos similares han sido reportados en Chile y Brasil (Soza y López, 2006; Maresch *et al.*, 2008).

A pesar de que en este estudio no se detectaron casos activos a ninguno de los agentes infecciosos investigados incluyendo el dengue en la población de donantes, se destaca la presencia de anticuerpos IgG anti-dengue en el 28,95% de los donantes que negaron tener antecedentes de infección previa por dengue, lo cual pudiera sugerir portadores asintomáticos de la enfermedad entre los donantes de sangre y que potencialmente puedan transmitir la infección a sus receptores. Sin embargo, además de realizar la detección del antígeno NS1 y de los anticuerpos IgM e IgG anti-dengue, también se debe complementar el diagnóstico de laboratorio con pruebas de biología molecular para detectar la posible presencia del ARN viral, para evaluar la seguridad de la sangre en países como Venezuela y en especial en áreas donde el dengue es endémico.

El control de la propagación de los arbovirus, y su incidencia y severidad en la actualidad en áreas endémicas es esencial para predecir los riesgos de transmisión por transfusión de sangre. Es por ello que la vigilancia y la supervisión son necesarias para permitir una aplicación rápida de las medidas para mitigar el riesgo de transmisión a los receptores de sangre, incluyendo análisis de sangre y pruebas de laboratorio que ayuden con el diagnóstico temprano de la enfermedad.

Agradecimiento

Agradecemos al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad del Zulia (CONDES CC-0379-14) por el financiamiento otorgado.

Referencias

- Acosta, O. Solano, L. Escobar, J. Fernández, M. Solano, C. Fujita, R. (2014). Frequencies of blood group systems MNS, Diego, and Duffy and clinical phases of Carrion's disease in Amazonas, Peru. *Interdiscip Perspect Infect Dis*;567107.
- Añez, G y Ríos, M. (2013). Dengue in the United States of America: A Worsening Scenario?. *BioMed Research International*;1-13.
- Añez, G. Balza, R. Valero, N. Larreal, Y. (2006). Impacto económico de dengue y fiebre hemorrágica del dengue en el estado de Zulia, Venezuela, 1997-2003. *Rev Panam Salud Pública*; 19(5):314-320.

- Allain, JP. Stramer, SL. Carneiro-Proietti, AB. Martins, ML. López da Silva, SN. Ribeiro, M. Proietti, FA. Reesink, HW. (2009). Transfusión- transmitted infectious diseases. *Biologicals*; 37:71-77.
- Buranda, T. Swanson, S. Bondu, V. Schaefer, L. Maclean, J. Mo, Z. Wycoff, K. Belle, A. Hjelle, B. (2014). Equilibrium and kinetics of Sin Nombre hantavirus binding at DAF/CD55 functionalized bead surfaces. *Viruses*; 6:1091-1111.
- Bhatt, S. Gething, PW. Brady, OJ. Messina, JP. Farlow, AW. Moyes, CL. Drake, JM. Brownstein, JS. Hoen, AG. Sankoh, O. Myers, MF. George, DB. Jaenisch, T. Wint, GR. Simmons, CP. Scott, TW. Farrar, JJ. Hay, SI. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*; 496 (7446):504-507.
- Burke, DS. Nisalak, A. Johnson, DE. Scott, RM. (1988). A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg*; 38:172-180.
- Bessof, K. Delorey, M. Sun, W. Hunsperger, E. (2008). Comparison of Two Commercially Available Dengue Virus (DENV) NS1 Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using a Single Clinical Sample for Diagnosis of Acute DENV Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*; 15: 1513-1518.
- Carmona-Fonseca, J. (2006). Frecuencia de los grupos sanguíneos ABO y Rh en la población laboral del valle de Aburrá y del cercano oriente de Antioquia (Colombia). *Acta Med Colomb*; 31(1):20-30.
- Calhoun, L. Petz, LD. Erythrocyte antigens and antibodies. En: Beutler E, Coller BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U (editors). *Williams Hematology*. 6 ed. USA: McGraw-Hill; 2001: 1843-1857.
- Cavasini, CE. de Mattos, LC. Alves, RT. Couto, AA. Calvosa, VSP. Regina, C. Domingos, B. Castilho, L. Rossit, ARB. Machado, RLD. (2006). Frequencies of ABO, MNSs, and Duffy phenotypes among blood donors and malaria patients from four Brazilian Amazon areas. *Hum Biol*; 78:215-219.
- Cooling L. (2015). Blood Groups in Infection and Host Susceptibility. *Clin Microbiol*; 28(3):801-870.
- Chuang, VW. Wong, TY. Leung, YH. Ma, ES. Law, YL. Tsang, OT. Chan, KM. Tsang, IH. Que, TL. Yung, RW. Liu, SH. (2008). Review of dengue fever cases in Hong Kong during 1998 to 2005. *Hong Kong Med J*; 14:170-177.
- Chaiyaratana, W. Chuansumrit, A. Pongthanapisith, V. Tangnararatchakit, K. Lertwongrath, S. Yoksan, S. (2009). Evaluation of dengue nonstructural protein 1 antigen strip for the rapid diagnosis of patients with dengue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 64(1):83-84.
- Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. (1964). Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Recuperado de: <http://www.wma.net/es>.
- Durán, A. Valero, N. Mosquera, J. Pons, H. Torres, M. Alcocer, S. Castillo, JL. (2013). Dengue nonstructural protein-1 status is not associated to circulating levels of interleukin-17, C-reactive protein and complement in children with acute dengue. *Journal of Clinical Virology*; 56(3):283-290.
- Durán, A. Bermúdez, J. Maldonado, MB. Ochoa, E. Alcocer, S. Levy, A. Márquez, A. Bermúdez, I. Gómez, M. Gotera, J. Valero, N. (2012). Incidencia y circulación

- del virus dengue en el Estado Zulia, Venezuela (2009-2010). *Revista Ciencia*; 20(1):22-32.
- Durán, A. Ochoa, E. Alcocer, S. Gómez, M. Millano, M. Martínez, O. Maldonado, M. Valero, N. (2013). Frecuencia de signos y síntomas gastrointestinales del dengue. Análisis de una cohorte de 1484 pacientes. *Invest Clin*; 54(3):257-269.
- Dussart, P. Labeau, B. Lagathu, G. Louis, P. Nunes, MR. Rodríguez, S. Storck, C. Cesaire, R. Morvan, J. Flamand, M. Baril, L. (2006). Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol*; 13: 1185-1189.
- Ekyalongo, RC. Nakayama, H. Kina, K. Kaga, N. Iwabuchi, K. (2015). Organization and functions of glycolipid-enriched microdomains in phagocytes. *Biochim Biophys Acta*; 1851:90-97.
- Hang, VT. Nguyet, NM. Trung, DT. Tricou, V. Yoksan, S. Dung, N. Ngoc, T. Hiem, T. Farrar, J. Wills, B. Simmons, C. (2009). Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses. *PLoS Negl Trop Dis*; 3: e360.
- Faddy, HM. Seed, CR. Fryk, JJ. Hyland, CA. Ritchie, SA. Taylor, CT. Van Der, KL. Flower, RL. McBride, WJ. (2013). Implications of dengue outbreaks for blood supply, Australia. *Emerg Infect Dis*; 19(5):787-789.
- Gubler, DJ. Suharyono, W. Tan, R. Abidin, M. Sie, A. (1981). Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection. *Bull World Health Organ*; 59:623-630.
- Kurane, I. Ennis, FA. (1997). Immunopathogenesis of dengue virus infections. En: Gubler, DJ. Kuno, G. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CAB International; 273-290.
- Kumarasamy, V. Wahab, AH. Chua, SK. Hassan, Z. Chem, YK. Mohamad, M. Chua, K. (2007). Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *J Virol Methods*; 140: 75-79.
- King, LC. Adams, JH. Xianli, J. Grimberg, BT. McHenry, AM. Greenberg, LJ. Siddiqui, A. Howes, RE. da Silva-Nunes, M. Ferreira, MU. Zimmerman, PA. (2011). Fya/Fyb antigen polymorphism in human erythrocyte Duffy antigen affects susceptibility to *Plasmodium vivax* malaria. *Proc Natl Acad Sci*; 108:20113-20118.
- Linnen, JM. Vinelli, E. Sabino, EC. Tobler, LH. Hyland, C. Lee, TH. Kolk, DP. Broulik, AS. Collins, CS. Lanciotti, RS. Busch, MP. (2008). Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil, and Australia. *Transfusion*; 48:1355-1362.
- Maresch, C. Schluter, PJ. Wilson, AD. Sleight, A. (2008). Residual infectious disease risk in screened blood transfusion from a high-prevalence population: Santa Catarina, Brazil. *Transfusion*; 48(2):273-281.
- Mohammed, H. Linnen, JM. Muñoz-Jordán, JL. Tomashek, K. Foster, G. Broulik, AS. Petersen, L. Stramer, SL. (2008). Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. *Transfusion*; 48:1348-1354.
- Normile, D. (2013). Surprising New Dengue Virus Throws A Spanner in Disease Control Efforts. *Science*; 342:415.

- Organización Panamericana de la Salud. (2010). Suministro de Sangre para Transfusiones en los Países del Caribe y de Latinoamérica 2006, 2007, 2008 y 2009: avance desde 2005 del Plan Regional de Seguridad Transfusional. Washington (DC); 2010:1-170. Recuperado de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1466%3Adocumentos-tuocnicos-y-publicaciones&catid=1163%3Ahssblood-services-&Itemid=2163&lang=es
- Organización Panamericana de la Salud. (2013). Suministro de sangre para transfusiones en los países de Latinoamérica y del Caribe 2010 y 2011. Washington (DC):1-182. Recuperado de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1466%3Adocumentos-tuocnicos-y-publicaciones&catid=1163%3Ahssblood-services-&Itemid=2163&lang=es
- Organización Panamericana de la Salud. (2016). Recuperado de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=3274&Itemid=40734&lang=es
- Patiño, J. Cortés, M. Cardona, J. (2012). Seroprevalencia de marcadores de infecciones transmisibles por vía transfusional en banco de sangre de Colombia. *Rev Saúde Pública*; 46(6):950-959.
- Pozzetto, B. Memmi, M. Garraud, O. (2015). Is transfusion-transmitted dengue fever a potential public health threat? *World Journal of Virology*; 4(2): 113-123.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS) (2014). Boletín Epidemiológico Semanal N° 53. 1-28. Recuperado de: http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=43:ano2014&Itemid=915
- Reyes, I. Valero, N. Larreal, Y. Maldonado, M. Arias, J. (2006). Situación Epidemiológica del virus Dengue en el estado Zulia. XXX Jornadas Venezolanas de Microbiología Coro - Falcón. "Nicole Richard - Yegres y Francisco Yegres. Coro - Venezuela.
- Ríos, A. (1997). Infecciones transmitidas por la sangre y sus derivados. *Antibiot e Infec*; 4(4):5-13.
- Rivera-López, MRF. Zavala-Méndez, C. Arenas-Esqueda, A. (2004). Prevalencia de seropositividad para VIH, hepatitis B y C en donadores de sangre. *Gac Med Mex*; 140(6):657-660.
- Rodríguez, D. Garza-Rodríguez, M. Chavarria, AM. Ramos-Jiménez, J. Rivera, MA. Taméz, RC. Farfan-Ale, J. Rivas-Estilla, AM. (2009). Dengue virus antibodies in blood donors from an endemic area. *Transfus Med*; 19:125-133.
- Salazar, M. (2003). Guías para la transfusión de sangre y sus componentes. *Rev Panam Salud Pública*; 13(2):183-190.
- Sudiro, TM. Zivny, J. Ishiko, H. Green, S. Vaughn, DW. Kalayanarooj, S. Nisalak, A. Norman, JE. Ennis, FA. Rothman, AL. (2001). Analysis of plasma viral RNA levels during acute dengue virus infection using quantitative competitor reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol*; 63:29-34.
- Soza-R, A. López-Lastra, M. (2006). Hepatitis C en Chile: Magnitud del problema. *Rev Med Chil*; 134(6):777-788.
- Stramer, S. Linnen, J. Carrick, J. Foster, G. Krysztof, D. Zou, S. Dodd, R. Tirado-Marrero, L. Hunsperger, E. Santiago, G. Muñoz-Jordan, J. Tomashek, K. (2012). Dengue viremia in blood donors identified by RNA and detection of dengue

- transfusion transmission during the 2007 dengue outbreak in Puerto Rico. *Transfusion*; 52(8):1657-1666.
- Sekaran, SD, Ew, CL, Kantesh, BM, Appana, R, Subramaniam, G. (2007). Evaluation of a dengue NS1 capture ELISA assay for the rapid detection of dengue. *J Infect Developing Countries*; 1: 182-188.
- Tangnararatchakit, K, Tirapanich, W, Tapaneya-Olarn, W, Sumethkul, V, Sirachainan, N, Watcharananan, S, Leenanupunth, C, Yoksan, S, Chuansumrit, A. (2012). Severe Nonfebrile Dengue Infection in an Adolescent After Postoperative Kidney Transplantation: A Case Report. *Transplantation Proceedings*; 44(1):303-306.
- Vázquez, S, Pérez, AB, Ruiz, D, Rodríguez, R, Pupo, M, Calzada, N, González, L, González, D, Castro, O, Serrano, T, Guzmán, MG. (2005). Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *J Clin Virol*; 33(2):132-137.
- Wilder-Smith, A, Chen, LH, Massad, E, Wilson, ME. (2009). Threat of dengue to blood safety in dengue-endemic countries. *Emerg Infect Dis*; 15:8-11.
- World Health Organization (OMS) (2009). *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. New edition. Geneva, Switzerland: Recuperado de: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789995479213_spa.pdf.
- Young, PR, Hilditch, PA, Bletchly, C, Halloran, W. (2000). An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol*; 38:1053-1057.

La ovariectomía y el advenimiento de la cirugía abdominal en Venezuela

*Édixon Ochoa**

Introducción

El 31 de agosto de 1874, el Dr. Francisco Eugenio Bustamante (Coro, 6/9/1839 - Maracaibo, 30/12/1921), médico, profesor universitario, político, parlamentario, escritor y diplomático, practicó en Maracaibo la primera ovariectomía realizada en el país. El motivo de aquella intervención: un quiste ovárico voluminoso que aquejaba a la Sra. Adelina Wagner. Aquella “*barbaridad quirúrgica*”, como la llamara el Dr. Ángel Martínez Sanz, presente al momento de la operación y opuesto a su práctica, aconteció durante los períodos postvargasiano de la Medicina Nacional (1854 - 1889) y preuniversitario de la Medicina Regional (1499 - 1891), y consagró a Bustamante como el Fundador de la Cirugía Abdominal en Venezuela.

En aquella proeza quirúrgica, inédita en el ámbito regional y nacional, Bustamante fue asistido por galenos tan notables como él y de significativa recordación y trayectoria en el estado Zulia: Manuel Dagnino (1834 - 1901), médico y escritor (historiógrafo, filósofo, biógrafo, narrador, ensayista, dramaturgo y autor científico); Temístocles N. Vaamonde (Maracaibo, 14/12/1857 - Ídem, 26/3/1907), médico, docente y periodista; Guillermo Quintero Luzardo (Maracaibo, 3/11/1868 - Ídem, 1/6/1930), médico, profesor universitario, parlamentario y escritor (poeta, dramaturgo, orador y autor científico); Venancio José Hernández (Maracaibo, 18/5/1867 - Ídem, 15/8/1945), médico, profesor universitario, escritor (autor científico y ensayista); Rafael López Baralt (Maracaibo, 18/3/1852 - Ídem, 8/7/1918), médico, político y escritor (poeta, orador, historiador y autor científico); y

* Academia de Historia del Estado Zulia- Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.
edixon.ochoa2000@gmail.com

José de Jesús Olivares (Distrito Miranda, 3/3/1849 - Maracaibo, 30/7/1908), médico y profesor universitario.

El histórico acontecimiento fue descrito y reseñado en dos artículos. El primero, publicado en 1884, pertenece al Dr. Temístocles N. Vaamonde, copartícipe del hecho quirúrgico. El segundo, fechado en 24 de marzo de 1894, tiene por autor a A.V. Barroso y apareció publicado en el ejemplar N° 35 del periódico "La Libertad" de Maracaibo, edición correspondiente al 27 de marzo de 1894. Este último, dada la pormenorizada narración tanto de la intervención quirúrgica ejecutada por Bustamante como de sus antecedentes históricos, es el que se transcribe a continuación, preservando su ortografía original y salvando la ilegibilidad de algunos de sus párrafos perceptible en el microfilme:

OVARIOTOMÍA

A mi distinguido compañero y amigo Sr. Dr. M. Iturbe:

I

Porque sabemos cuánto nos interesa á las ciencias la disquisición de hechos tan notables como éste, nos ocupamos de describir someramente la ovariotomía que, con el más completo éxito feliz, practicó ayer en la capital el doctor Francisco E. Bustamante, príncipe de la Cirugía en la América Meridional.

Queremos únicamente exponer los detalles de tan interesante trabajo quirúrgico los cuales perseguimos en el teatro anatómico mismo con todo el interés debido sólo porque lo consideramos provechoso a los amantes de la ciencia, quedando desde luego nosotros excusados de lo que, literariamente estimado, debe carecer este artículo, máxime cuando hemos de hablar de una de las más hermosas conquistas de la Medicina operatoria.

Nacida la ovariotomía en 1701 del cerebro creador de Hustom, sin previa deliberación, como dice Malgaigne, en 1808 el célebre cirujano americano Mac Dowel practicola por vez primera como un hecho científico de los más trascendentales al progreso de la patología quirúrgica. Después Chrysmar, en Alemania, Lizars y Spencer Wells, dándole todo el poderoso impulso de su ingenio, en Inglaterra, Krassowski en Rusia, Woyer Kowski, Maisovneuve, Jobber, Nelaton, Pean y Koebele en Francia, todos prácticos eminentes que la ejecutaron para glorificación de sus nombres ilustres. Y cosa notable, fue al señor doctor F. E. Bustamante en 1874 a quien tocó la singular satisfacción de ejecutarla el primero en Venezuela con éxito admirable, precisamente en momentos en que en la capital del mundo científico el ilustre Pean añadía con

la misma operación un nuevo laurel á la corona de sus triunfos; y para mayor encumbramiento á nuestro ilustrado y distinguido compatriota sólo á Pean, para aquella época, era dable en París practicar con éxito la ovariectomía, y en Strasburgos al sabio Koeberle. Tan hábil y afortunado como Spencer, con la serenidad y tino de un Nelaton, se dice con razón que la cuchilla en manos del Sr. doctor Bustamante es un elemento preciso que arrebató diariamente muchas vidas a la muerte, como lleva la luz á muchos ojos.

II

La enferma Adelina Wagner es una mujer de alta talla, oriunda de la isla de Aruba, madre de siete hijos y como de 46 años. La operación se practicó en una quinta situada á orillas del lago y al norte de esta ciudad.

A las nueve de la mañana del día de ayer, el gran cirujano tenía metódicamente dispuesto todo el aparato con la más rigurosa asepsia y antisepsia; un cuarto de hora después la enferma se colocó en decúbito supino en la mesa operatoria, que tiene dos metros de longitud, por 084 cms. de ancho y otros tantos de altura aproximadamente ().*

El señor doctor Manuel Dagnino pulsaba la radial izquierda; y el señor doctor T. Vaamonde, situado a la derecha de la operada empezó a anestesia general con cloroformo, la cual fue completa después (...) inyección dérmica de morfina.

Eran entonces las 10 y 18: el gran cirujano sentóse entre las piernas de la operada, que semiflejadas descansaban sobre dos sillas, limitó el campo operatorio como lo previene la técnica del caso con cuatro compresas empapadas en solución antiséptica caliente renovándolas durante la operación, seguramente para alcanzar el mayor relajamiento de los tejidos.

A la derecha del operador el señor doctor G. Quintero L., ocupado de los instrumentos; á la izquierda el doctor V. Hernández, á uno y otro lado de las partes externas y medias de la paciente, los señores doctores R. López Baralt y Jesús Olivares, todos en traje de anfiteatro.

A las 10 y 20 minutos el doctor López con el pulgar derecho sobre el anillo umbilical de la enferma lo elevó ligeramente, y el diestro cirujano que aparecía entonces como iluminado por todos los resplandores del saber, y sostenido por las fuerzas de su vigoroso intelecto con ánimo sereno hundió lentamente la cuchilla, en primera posición, a 2 ½ centímetros por debajo del ombligo, deslizándolo a lo largo de la línea alba para terminar á 2 centímetros sobre la arcada pubiana. Incindida la piel, cayó sobre el

() En los tres días precedentes la enferma se dio baños antisépticos; y durante la anestesia y en la operación se le lavaba la región con solución fénica.*

tegido celular dividiéndolo á pequeños golpes de bisturí con la más notable limpieza y sin producir la menor cola. Los doctores López y Olivares aplicaron sus manos á los lados de la herida y el cirujano dividió inmediatamente la aponeurosis media para caer sobre las fibras de los rectos abdominales; separado ese plano muscular incindió la gran serosa practicando en ella sobre una sonda granulada un largo corte del uno al otro extremo de las primeras incisiones.

Terminado este primer tiempo operatorio el neoplasma quedó de manifiesto; el cirujano introdujo entonces su diestra de plano en la escavación abdominal rasando la cara superior del quiste para enuclearlo y desprenderlo de sus adherencias; trajo al exterior dos largas y gruesas bridas que, ligadas, seccionó; hundió en seguida el trocar Koeberle en la pared anterior del quiste y le sustrajo gran cantidad de un líquido opalino, viscoso y gelatiniforme de bastante densidad; después aplicó fuertemente á sus paredes dos pinzas fórceps (de Charre), las cuales agarró como se hace para una extracción del feto, y obrando por suaves tracciones acompañadas de pausados movimientos de lateralidad y circunducción, trató de atraerlo al exterior; pero era tal el volumen del quiste aprisionado, que el inteligente operador vióse obligado a prolongar la incisión por un solo golpe de tigras hasta el nivel del hueco umbilical; a eliminar nueva cantidad de líquido patológico, y por unas segundas tracciones hizo entonces en breves instantes la completa extirpación del tumor. Eran las 10 y 46 minutos.

Acto continuo ligó con catgut el grueso pedículo a que quedaba unido seccionándolo á centímetro y medio por fuera de los bordes de la herida. Los doctores López y Olivares con la INTELIGENTE aplicación de sus manos sostenían las vísceras y recogían las pocas gotas de sangre que se exhalaban de aquellas paredes cruentas. Inmediatamente se ocupó del cirujano en la limpieza conveniente de la cavidad y de los bordes de los tejidos divididos aplicando 4 ó 6 pinzas de Pean á la luz de algunos pequeños vasos, cohibido el más ligero derrame hizo la sutura peritoneal que estuvo terminada a las 11 y 10 minutos. Seguidamente dio las ligaduras correspondientes con catgut, limpió de nuevo los bordes con unas compresas esponjas yodoformadas y procedió al segundo plano sutural a puntos pasados en los músculos rectos. Luego hizo la sutura de la piel con hilos de plata (6 a 8 puntos) é imitando el proceder de Spencerwells dejó el pedículo al exterior, tocó con solución félica concentrada su punto de sección aplicando á su extremidad libre el clamp de Nelaton y Braker - Broorn; espolvoreó yodoformo en la línea cruenta; cubrióla con gasa yodoformada y algodones antisépticos y puso el vendaje terminal; golpeó luego cariñosamente las mejillas á la operada que abrió sus ojos sonreída, y terminó la grave operación siendo entonces las 11 y 48 a. m.

Hemos de observar que la anestesia se hizo con todas las prescripciones de la ciencia, sin que en ninguno de sus periodos, hasta el de Chassaignac,

apareciera el más ligero accidente, no embargante haber resistido fisiológicamente la enferma á su acción por espacio de más de media hora. Durante la operación el pulso se mantuvo siempre lleno y regular; la sangre derramada no pasó de 1 ½ onzas; y por último que 24 horas después el estado de la enferma es de lo más satisfactorio.

El líquido patológico extraído del quiste alcanza á más de 30 litros; y el tumor, unilocular, que ya ostentaba como ramificaciones capilares en sus paredes, pesa en conjunto 40 libras.

Nueva gloria que alcanza el señor doctor Bustamante, y nuevo timbre conque honra á su patria y á la ciencia!

III

Para terminar. Ninguna pretensión de vanidad ha guiado nuestra pluma. A otras de probada competencia y corrección en el decir tocará el elogio merecido de aquella operación que apenas hemos descrito con la desnudez de la verdad más severa; por lo que, lo repetimos, sabemos que lejos de estos centros de estudios hay muchos, como nosotros amantes fervorosos de la ciencia de Hipócrates y de Galeno, que aprovecharán este trabajo, hu(...) de suyo siquiera para formar idea más clara y precisa del manual operatorio de la ovariectomía.

Habíamos es(...)lo que precede el primero del actual (...), día siguiente al de la operación, pero circunstancias ajenas a nuestro deseo impidieron su publicidad, la hacemos hoy de(...) de poder decir que acabamos de visitar a la operada a quien encontramos cas(...) completamente buena, sin presentar la menor (...)tracción cicatricial en el abdomen; y de(...)a en la cama por no haberse desprendido completamente el clamp. En los primeros días de su asistencia la enferma presentó una ligera reacción febril, sin que llegara a observarse el más leve síntoma de peritonitis.

A.V. BARROSO

Maracaibo, Marzo 24 de 1894

Referencias

Fuentes bibliográficas

1. Bermúdez Arias, Fernando; Santana Márquez, Heberto (1996). *Historia de los Estudios Médicos en el Zulia. Del Colegio Seminario a LUZ*(1ª edición). Maracaibo, Venezuela: EDILUZ.

2. Besson, Juan (1993). *Historia del Zulia*. (3ª edición, 4 vols.). Maracaibo, Venezuela: Gobernación del estado Zulia, Secretaría de Educación, Fondo Editorial “Dr. Raimundo Andueza Palacio”.
3. Briceño Romero, Gabriel (1966). *El estado Zulia y sus Médicos Nativos hasta 1950*(1ª edición). Barcelona, España: LEO Ediciones.
4. Hernández, Luis G.; Parra, Jesús A. (1998). *Diccionario General del Zulia*. (1ª edición, 2 vols.). Maracaibo, Venezuela: Ediciones del Banco Occidental de Descuento (B.O.D.).

Fuentes hemerográficas

1. Periódico *La Libertad*. Maracaibo.
 - N° 35: 27 de marzo de 1894.

Normas para la presentación de trabajos

1. Principios de la Revista

La REVISTA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA es un órgano científico de difusión de trabajos parciales o definitivos de investigadores y/o equipos de investigación nacionales y extranjeros. Su naturaleza es multidisciplinaria e interdisciplinaria, por ello su temática se divide en tres grandes ejes: a. *ciencias sociales y arte*; b. *ciencias del agro, ingeniería y tecnología*; c. *ciencias exactas, naturales y de la salud*. Su publicación es cuatrimestral. Cada número, de los tres del año, se corresponde con uno de los tres ejes temáticos. La *Revista de la Universidad del Zulia*, por su carácter histórico y patrimonial, está adscrita a la CÁTEDRA LIBRE HISTORIA DE LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA.

2. Métodos de Envío y de Evaluación de los Trabajos

Los autores interesados en publicar su trabajo en la *Revista de la Universidad del Zulia* deberán remitir tres copias del mismo sin identificación en sobre cerrado a la siguiente dirección: Avenida Guajira, Fundadesarrollo, planta baja de la Sede Rectoral de La Universidad del Zulia. Este sobre debe estar acompañado de otro, el cual contendrá el original del trabajo con la identificación del autor o autores, indicando: nombre, apellido, institución que representa (universidad, instituto, centro de investigación, fundación), correo electrónico. Así mismo en este sobre se presentará una comunicación escrita firmada por todos los autores y dirigida al Director de la Revista. En esta comunicación se manifestará el interés de los autores de proponer su trabajo para la publicación en la *Revista de la Universidad del Zulia*, previa evaluación del Comité de Arbitraje. Se agregará también a este sobre una síntesis curricular de cada autor con una extensión no mayor de diez (10) líneas. También se podrá presentar el trabajo

dirigiéndolo a los siguientes correos electrónicos: revistadeluz@gmail.com; revistauniversidaddelzulia@gmail.com. El currículum de los autores se enviará en archivo adjunto, distinto al que contendrá el trabajo. Los artículos propuestos para esta revista deben ser inéditos y no deben haber sido propuestos simultáneamente a otras publicaciones. Todos los trabajos serán evaluados por parte de un Comité de Árbitros-Especialistas de reconocido prestigio, seleccionado por el Comité Editorial de la Revista. La evaluación de los Árbitros se realizará mediante el procedimiento conocido como par de ciegos: los árbitros y los autores no conocerán sus identidades respectivas. Los criterios de Evaluación son los siguientes:

- a. Criterios formales o de presentación: 1) originalidad, pertinencia y adecuada extensión del título; 2) claridad y coherencia del discurso; 3) adecuada elaboración del resumen; 4) organización interna del texto; 5) todos los demás criterios establecidos en la presente normativa.
- b. Criterios de contenido: 1) dominio de conocimiento evidenciado; 2) rigurosidad científica; 3) fundamentación teórica y metodológica; 4) actualidad y relevancia de las fuentes consultadas; 5) aportes al conocimiento existente.

Al recibirse la respuesta del Comité de Árbitros designado se informará a los autores por correo electrónico la decisión correspondiente; en caso de ser aceptado el trabajo deberá remitirse por correo electrónico la versión digital del mismo.

3. Presentación de los trabajos

Los trabajos deben presentar un resumen de 150 palabras como máximo y hasta cinco palabras claves; tanto el resumen como las palabras claves estarán en español e inglés. Igualmente el título y el subtítulo del trabajo serán presentados también en español e inglés. La extensión máxima del trabajo será de veinte (20) páginas, y diez (10) como extensión mínima. Todos los trabajos serán presentados en hoja tipo carta, impresos por una sola cara, con numeración continua y con márgenes de tres (3) centímetros a cada lado. El texto se presentará a espacio y medio, en fuente Times New Roman, tamaño 12.

4. Cuerpo del artículo

Se dividirá en Introducción, Desarrollo y Conclusiones (o Consideraciones Finales, según sea el caso). La introducción incluirá el propósito u objetivo general perseguido. El Desarrollo se organizará en secciones y subsecciones debidamente identificadas con subtítulos numerados completamente en arábigos de acuerdo al sistema decimal, respondiendo a una sucesión continua y utilizando un punto para separar los niveles de división. La Introducción y Conclusión están exceptuadas de esta numeración. Las fechas y horas se expresarán numéricamente. En caso de existir ilustraciones (gráficos, mapas, fotos) debe hacerse referencia a los mismos en el texto. Estas ilustraciones serán contadas dentro de la extensión máxima del artículo. Las notas explicativas o aclaratorias deben reducirse al mínimo necesario y colocarse al pie de páginas debidamente señalizadas. Los materiales complementarios se recogerán en anexos, los cuales se identificarán con una letra y un título y se colocarán después de la bibliografía. Los anexos serán contados también dentro de la extensión máxima del artículo.

5. Citado

El citado se realizará en el texto utilizando la modalidad autor-fecha, establecido en el *Reglamento para la presentación de trabajos en la Universidad del Zulia*, indicando, en caso de ser cita textual, apellido(s) del autor, seguido de coma, año de publicación de la obra, seguido de dos puntos y el (los) número(s) de la(s) página(s), por ejemplo: de acuerdo a Rincón (1998: 45) o (Rincón, 1998: 45); si no es cita textual sino una paráfrasis no se indicará el número de página, ejemplo: de acuerdo a Rincón (1998) o (Rincón, 1998). Si hay varias obras del mismo autor publicadas en el mismo año, se ordenarán literalmente en orden alfabético; por ejemplo, (Rincón, 2008a: 12), (Rincón, 2008b: 24). Si son dos autores, se colocarán solamente el primer apellido de cada uno, por ejemplo: Según Morales y Fleires (2008: 90) o (Morales y Fleires, 2008: 90), siguiendo el mismo criterio explicado anteriormente para las citas textuales y las paráfrasis. En caso de ser tres autores o más se colocará el apellido del autor principal seguido de "et al", ejemplo: (Rincón et al., 2008: 45). Deben evitarse, en lo posible, citas de trabajos no publicados o en imprenta, también referencias a comunicaciones y documentos privados de difusión limitada, a no

ser que sea estrictamente necesario. En caso de fuentes documentales, electrónicas u otras que por su naturaleza resulten inviables o complejas para la adopción del citado autor-fecha, sugerido en estas normas, puede recurrirse u optarse por el citado al pie de página.

6. Referencias bibliográficas

Las referencias (bibliográficas, hemerográficas, orales y/o documentales) se presentarán al final del texto, según lo establecido en el *Reglamento para la presentación de trabajos en la Universidad del Zulia*. El orden de las referencias es alfabético por apellido. Las diferentes obras de un mismo autor se organizarán cronológicamente, en orden ascendente, y si son dos obras o más de un mismo autor y año, se mantendrá el estricto orden alfabético por título.

Instrumento de Evaluación del Árbitro

I.- Criterios formales o de presentación

CRITERIOS DE EVALUACIÓN	EXCELENTE	MUY BUENO	BUENO	REGULAR	DEFICIENTE	OBSERVACIONES
Originalidad, pertinencia y adecuada extensión del título.						
Claridad y coherencia del discurso.						
Adecuada elaboración del resumen: contiene abstract y palabras claves; indica objetivo, metodología y resultados.						
Organización interna del texto.						

II. - Criterios de contenido

CRITERIOS DE EVALUACIÓN	EXCELENTE	MUY BUENO	BUENO	REGULAR	DEFICIENTE	OBSERVACIONES
Dominio de conocimiento evidenciado.						
Rigurosidad científica.						
Fundamentación teórica y metodológica.						
Actualidad y relevancia de las fuentes consultadas.						
Aportes al conocimiento existente.						