



# Ciencias Agropecuarias - A

*1er Simposio Internacional de Desarrollo Tecnológico*

*Compilador  
Juan Fernando Rivera Meza*



## **Ciencias Agropecuarias - A**

1er Simposio Internacional de Desarrollo Tecnológico

Universidad Politécnica del Bicentenario

Carretera Estatal Silao-Romita Km. 2

San Juan de los Durán, Silao de la Victoria, Guanajuato, México

C.P. 36283

[www.upbicentenario.edu.mx](http://www.upbicentenario.edu.mx)

Primera edición 2014

ISBN 978-607-96471-3-1 Ciencias Agropecuarias - A

Se autoriza el uso y contenido de esta obra, siempre y cuando se cite la fuente

# ÍNDICE

Prólogo .....	4
Purificación y caracterización de un inhibidor de serín proteasas de bajo peso molecular presente en semillas de Chan ( <i>Hyptis suaveolens</i> ). .....	6
Cálculo de parámetros característicos de Glóbulos Rojos usando interferometría de corrimiento de fase en paralelo .....	11
Efecto del Vermicompost líquido en el tamaño de fresa variedad <i>San Andreas</i> producida en invernadero .....	15
<i>Soil doctor</i> : multivariable (ph, conductividad eléctrica, temperatura y humedad). .....	19
Aislamiento de una fracción proteica con actividad tipo tripsina de <i>Prostephanus truncatus</i> (Horn) (Coleóptera: Bostrichidae) .....	23

# Prólogo

El objetivo de la presente administración federal es llevar a México a su máximo potencial en un sentido amplio, además del crecimiento económico o el ingreso, factores como el desarrollo humano, la igualdad sustantiva entre mujeres y hombres, la protección de los recursos naturales, la salud, educación, participación política y seguridad, forman parte integral de la visión que se tiene para alcanzar dicho potencial como se plasma en el Plan Nacional de Desarrollo 2013 – 2018 (PND, 2013). En este ámbito se han planteado cinco metas nacionales (México en paz, México incluyente, México con educación de calidad, México prospero, México con responsabilidad social), divididas en objetivos, estrategias y líneas de acción. En la meta nacional de México con educación de calidad en el objetivo 3.5 que describe como hacer del desarrollo científico, tecnológico y la innovación pilares para el progreso económico y social sostenible. Con estas acciones se hace evidente el compromiso del gobierno federal en el apoyo al desarrollo tecnológico como una estrategia primordial en el desarrollo integral de la sociedad mexicana. En el Plan Estatal de Desarrollo del Estado de Guanajuato 2035 (PLAN 2035, 2013) se definen estrategias y proyectos para vincular la economía con el humanismo a través del conocimiento y así tener al desarrollo humano y social como eje rector del desarrollo sustentable, equilibrado y equitativo en el estado, en este plan se describen cinco dimensiones estratégicas (humana y social, administración pública y estado de derecho, economía y medio ambiente y territorio), a su vez para cada dimensión se establecen componentes con sus objetivos estratégicos y particulares definiéndose líneas de acción para estos, es así como el gobierno del estado de Guanajuato en concordancia con el plan nacional de desarrollo define sus acciones para elevar la calidad de vida de la población. Con esta visión, el estado de Guanajuato asume la importancia de la divulgación del quehacer científico como una herramienta de integración de los sectores académico, productivo y social en busca del desarrollo sustentable, equilibrado y equitativo en el estado.

Fresán-Orozco (2004) describe el extensionismo universitario como una función estratégica que articula la docencia y la investigación con los sectores económicos productivo, social y el mismo académico, esto con el objetivo de la consolidación de la misma universidad y el desarrollo de las regiones.

Sifuentes et al. (2011) describen el extensionismo universitario como la proyección de la cultura universitaria hacia la sociedad con la finalidad de contribuir al desarrollo del entorno a través de varias actividades.

Los Comités Interinstitucionales para la Evaluación de la Educación Superior (CIEES) dentro de su marco de referencia mencionan que las Instituciones de Educación Superior (IES) deben realizar actividades de difusión que comuniquen a la sociedad los valores de la cultura tecnológica a través de artículos, reportes de investigación, publicaciones periódicas, libros de texto, conferencias, exposiciones, congresos, etcétera.

La Universidad Politécnica del Bicentenario (UPB) pretende vincular a los sectores académico, productivo y social de la región del municipio de Silao de la Victoria Guanajuato a través de la realización de un Simposio Internacional de desarrollo tecnológico para discutir las acciones de desarrollo tecnológico implementadas en la región con entes de otras regiones del país y el mundo midiendo el impacto de estas acciones en el desarrollo comunitario de su zona de influencia.

*Noviembre 2014*

*Secretaría Académica*

# Purificación y caracterización de un inhibidor de serín proteasas de bajo peso molecular presente en semillas de Chan (*Hyptis suaveolens*).

Campos López Mariel<sup>1</sup>, Castro Guillen José Luis<sup>1</sup>, Carrillo Rayas María Teresa<sup>1</sup>,  
Blanco Labra Alejandro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato,  
Departamento de Biotecnología y Bioquímica, km 9.6 Libramiento norte Carretera  
Irapuato-León, C.P. 36821. Irapuato, Gto., México.

## Resumen

*Desde tiempos remotos la planta de chan, ha sido utilizada por sus propiedades nutricionales y medicinales, recientemente es calificada como un pseudocereal que ha servido como alimento para el hombre. Los estudios realizados en chan sugieren que ha desarrollado mecanismos de defensa contra organismos patógenos, entre estas defensas se encuentran los Inhibidores de Proteasas (IP's) que son muy conocidos por suprimir la actividad enzimática de organismos fitopatógenos asociados a los cultivos de chan, causando una disminución de aminoácidos necesarios para su desarrollo.*

*Los IP's son pequeñas proteínas que se encuentran distribuidas en todos los seres vivos y que representan hasta 10% de las proteínas de almacenamiento, pero también pueden ser inducidas por el ataque de insectos y microorganismos patógenos.*

*Las proteasas se encuentran presentes en todas las organismos y se clasifican de dos formas; endopeptidasas para las que hidrolizan enlaces peptídicos dentro de la cadena de polipéptido, y las*

*exopeptidasas las que hidrolizan enlaces peptídicos terminales. Así pueden ser clasificadas en: Aspártico (A), Cisteína (C), Serina (S), Treonina (T), Glutámico (G), Peptidasas y liasas de péptidos de asparagina (N), Metalopeptidasas (M) requieren un ion de metal divalente.*

*Los Inhibidores de Proteasas son las principales proteínas para controlar la actividad inhibitoria contra las plagas de insectos. Estos inhibidores pueden transferirse a otras plantas de su misma especie por entrecruzamiento y selección genética, o bien pueden expresarse en plantas diferentes, utilizando plantas transgénicas. Esto representa una interesante alternativa para la obtención de plantas más resistentes al ataque de insectos, por lo cual resulta de interés el purificar y caracterizar un nuevo IP's. En el presente trabajo, se describe la purificación y caracterización de un IP's de bajo peso molecular extraído de semillas de chan, el cual representa mayor actividad contra tripsina, y presenta un Punto Isoeléctrico de 3.49, y una Masa Molecular aparente de 2.98 kDa, y tiene un pH óptimo de 8.1.*

**Palabras clave:** Inhibidores de Proteasas, resistencia a insectos, Chan, *Hyptis suaveolens*.



## 1. Introducción

Las plantas, bajo condiciones naturales se encuentran en contacto continuo con otros organismos y además interactúan con un gran número de microorganismos potencialmente patógenos (Madriz-Ordeñana, 2002) [1], entre éstos un número elevado de agentes bióticos, con el potencial de depredar o parasitar tejidos de la planta, como los invertebrados, principalmente insectos, nematodos, microorganismos tales como hongos, bacterias y virus (Blanco-Labra y Aguirre-Mancilla, 2002) [2].

Debido a que las plantas están sujetas a una gran variedad de cambios y situaciones adversas, han desarrollado estrategias que les permiten sobreponerse a las mismas (Yamila-Mansilla, s/f) [3].

Estas complicaciones resultan un grave problema, principalmente para los agricultores, ya que el ataque de insectos es en gran parte causa de la disminución en la producción, por lo que se ha tenido que recurrir al uso intensivo de plaguicidas (Blanco-Labra y Aguirre-Mancilla, 2002 [2]; Carrillo-Gil, 2009) [4]. Sin embargo, el uso continuo de los insecticidas, puede causar muchos problemas, entre los que destacan la resistencia desarrollada por el insecto (Brun *et al.*, 1989 [5]; Bustillo-Pardey, 2006) [6].

Por otra parte, estos insecticidas son altamente tóxicos (Jaramillo *et al.*, 2006) [7], y su uso presenta severos problemas, ya que constituyen un importante agente contaminante del medio ecológico, además de que, al no ser específicos contra una clase particular de organismos y dado el grado de su toxicidad, ha generado daños al medio ambiente y a organismos superiores (Blanco-Labra y Aguirre-Mancilla, 2002) [2].

Los inhibidores de proteasas (IP's) están ampliamente distribuidos en la naturaleza y forman complejos muy estables con las enzimas correspondientes.

Hasta ahora, son relativamente escasos los estudios que se han llevado a cabo para enfrentar el manejo de las plagas y generalmente se han realizado en plantas que tienen un interés económico o alimenticio.

Por lo tanto, es muy importante extender las investigaciones en otras plantas, como es el caso de la planta de Chan (*Hyptis suaveolens*), que es una planta poco estudiada y que ha jugado un papel importante, ya que presenta buenas características alimenticias y medicinales (Vergara-Santana y Bravo-Magaña, 1992) [8], además de que ha sido ampliamente utilizada en siembras en conjunto con maíz, para disminuir el ataque de insectos.

## 2. Parte Experimental

### 2.1 Extracción

Para lograr la purificación del inhibidor HSTI se utilizó el protocolo establecido por Aguirre C. (2004) [9]. Se emplearon semillas de Chan (*Hyptis suaveolens*), previamente limpiadas; se trituró cantidad suficiente en un molino. La harina de chan obtenida fue desgrasada con una mezcla de cloroformo: metanol (2:1 v/v) en una proporción 1:4 p/v con agitación constante durante 10 min. El solvente se separó por filtración al vacío y se repitió la operación dos veces, después de este tratamiento la harina se dejó secar a temperatura ambiente en una bandeja para permitir la evaporación del solvente residual.

Luego, para realizar la extracción acuosa, a la harina desgrasada se le agrega agua desionizada con una proporción 1:20 harina: agua (p/v) con agitación constante a 4°C durante 50 min. La mezcla obtenida se centrifugó a 39200 g durante 60 min a 4°C. el precipitado se descartó y el sobrenadante fue precipitado con sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 70% de saturación; agregando la sal lentamente durante 30 min y en agitación suave durante 60 min a 4° C, después se centrifugó la mezcla durante 60 min a 4°C y se recuperó el precipitado, el cual fue suspendido en volumen pequeño de Tris-HCl 50 mM pH 8 homogeneizándolo.

Finalmente, las proteínas precipitadas fueron dializadas en una membrana de 3 kDa de exclusión, con agua desionizada. A la solución obtenida se le midió el volumen y éste se dividió en alícuotas de 4 mL para poder utilizarla posteriormente.

### 2.2 Purificación

La alícuota de extracto fue aplicada a una columna de Sephadex G-75, la solución

amortiguadora de elusión usada, fue Bicarbonato de Amonio 0.01 M pH 7.8, con la cual fue equilibrada la columna a 4° C. La elusión se mantuvo a un flujo de 0.3 mL/min y se colectan 90 a 100 gotas por fracciones de 4 mL; a dichas fracciones se les determinó el perfil de proteína con una absorbancia a 220 nm. Se cuantificó la actividad inhibitoria, de cada una de las fracciones por el método de Schwertz y Takenaka, (1955) [10] y se determinó proteína (Método de Bradford, 1976) [11], se colectaron aquellas que presentaron actividad inhibitoria contra tripsina bovina. Estas fracciones se mezclaron y se liofilizaron.

Luego de concentrar las fracciones las cuales presentaban mayor actividad contra tripsina, se pasaron por cromatografía a través de una columna de filtración FPLC Superose 12 (Amersham) utilizando un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) modelo 1050 de Hewlett-Packard. La proteína fue eluída en buffer de Fosfato de Sodio Dibásico Anhídrido (Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>) 0.01 M pH 7, a una velocidad de flujo de 0.4 ml/min. los picos obtenidos fueron desalados y concentrados para su posterior uso.

### 2.3 Caracterización

Se caracterizó el inhibidor puro de bajo peso molecular, aquí se realizó una electroforesis bidimensional, para conocer su PI y su Masa Molecular Aparente, de acuerdo al protocolo de (Schägger, H. y G. Von-Jagow, 1987) [12] se utilizaron marcadores de peso molecular de (10 a 220kDa). Y se realizó un zimograma contra tripsina de acuerdo al protocolo establecido por (García-Carreño *et al.*, 1993) [13].

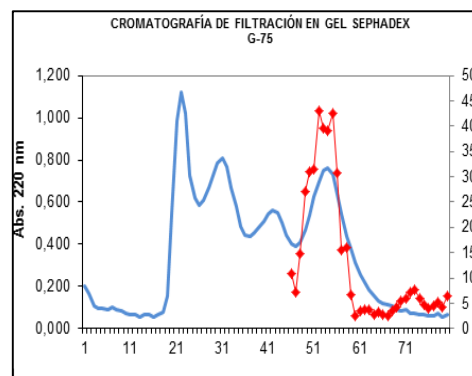
Para conocer su pH se midió su actividad a diferentes pH's, buffer de citrato-fostato 0.1M pH 7.0; Fosfato de sodio mono- / di- básico 0.1 M pH 7.5; Tris-HCl 0.1M pH8.1; Tris-HCl 0.1M pH 8.4; Tris-HCl 0.1 pH 9.0, se llevo a cabo por el método de (Schwertz y Takenaka, 1955) [10].

Para llevar a cabo la Actividad Inhibitoria con diferentes proteasas, igualmente se utilizó el protocolo antes mencionado.

## 3. Resultados

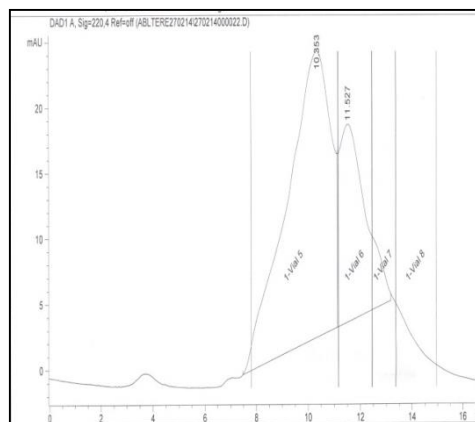
Con las metodologías anteriores, se obtuvieron los siguientes resultados:

De la primera cromatografía (G-75) se pudo obtener una fracción que contenía la actividad inhibitoria contra tripsina. Figura 1.



**Fig. 1. Cromatografía de filtración en gel.**

El pico con actividad inhibitoria se pasó por HPLC- (filtración molecular) obteniéndose 4 picos con actividad, de los cuales el inhibidor de nuestro interés fue el de más bajo peso molecular. Figura 2.



**Fig. 2. Cromatografía de HPLC- Filtración en gel.**

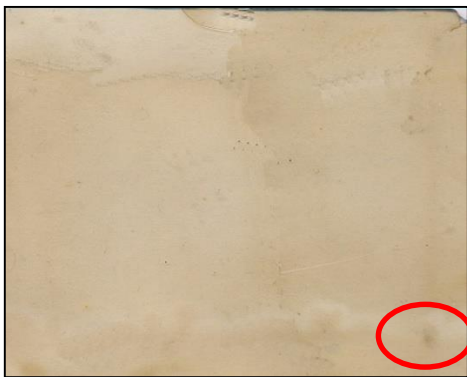
El pico de nuestro interés se analizó por electroforesis bidimensional. Como se observa en figura 3.

Por separado se corrió una zimografía donde se pudo observar una sola proteína con actividad inhibitoria contra tripsina. Como se observa en figura 3.1.



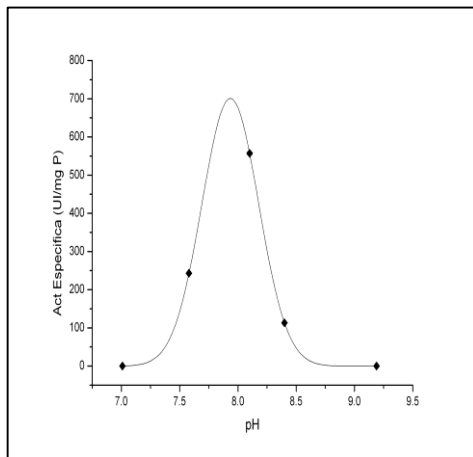


**Fig. 3. Electroforesis Bidimensional.**



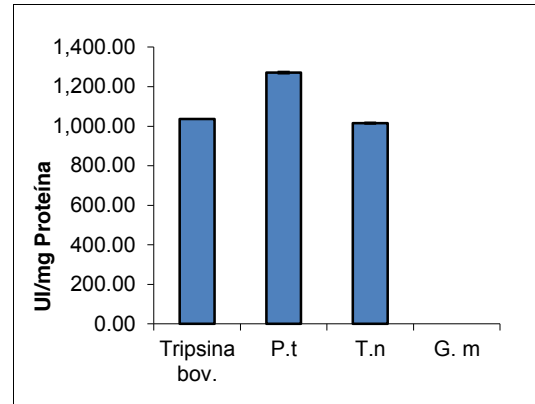
**Fig.3.1. Zimograma**

Se determino la actividad inhibitoria a diferentes pH con la finalidad de determinar el pH óptimo del inhibidor, como se observa en la figura 4.



**Fig. 4. Grafica de pH**

Actividad inhibitoria con diferentes proteasas. Se probó el inhibidor contra diferentes tipos de enzimas de mamíferos e insectos. Figura 5.



**Fig. 5 Actividad Inhibitoria con diferentes Proteasas.**

#### 4. Conclusiones

- Su pH óptimo de actividad fue de 8.1.
- Su Punto Isoeléctrico fue de 3.49
- Su Masa Molecular aparente de 2.98 kDa.
- En relación al efecto del Inhibidor sobre las Proteasas de Insectos, reconoció en forma decreciente a *P. truncatus*, *T. ni*, mientras que la proteasa de *G. mellionela* no fue inhibida. En el caso de Tripsina bovina presentó una actividad alta.

#### 5. Referencias

- [1] Madriz K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 63: 22-32, 2002.
- [2] Blanco A., Aguirre C. Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. Acta Universitaria. **12 (3)**: 3-28, 2002.
- [3] Yamila A. Estudio estructural y funcional del inhibidor de Serina-Proteasas tipo Germina presente en plantas de Trigo. Tesis de doctorado. Facultad de ciencias exactas y naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata 125 p, Sin fecha.
- [4] Carrillo L. Cistatinas de cebada: Proteínas de defensa contra artrópodos. Tesis de doctorado. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid 168 p, 2009.
- [5] Brun O, Marcillaud C, Gaudichon V, Suckling M. Endosulfan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia, Journal of Economic Entomology **82 (5)**: 1312-1316, 1989.
- [6] Bustillo A. Una revisión sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae:

- Scolytinae), en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 32 (2): 101-116, 2006.
- [7] Jaramillo J, Borgemeister C y Baker P. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. *Bulletin of Entomological Research*. 96: 223-233, 2006.
- [8] Vergara M. y Bravo F. *Memorias III Reunión Nacional Selva baja Caducifolia*. Universidad de Colima, México, 1992.
- [9] Aguirre C, Valdez S, Mendoza G, Rojo A, Blanco A. "A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae)", *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B* 138: 81-89, 2004.
- [10] Schwertz W, and Takenaka Y. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 16: 571-575, 1955.
- [11] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-252, 1976.
- [12] Schägger H, Jagow G. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 166, 368-379, 1987.
- [13] García L., Dimes E. and Haard F. Substrate-Gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry* 214: 65-69, 1993.

# Cálculo de parámetros característicos de Glóbulos Rojos usando interferometría de corrimiento de fase en paralelo

V. H. Flores Muñoz<sup>1</sup>, B. López- Ortiz<sup>2</sup>, N. I. Toto-Arellano<sup>2</sup>, A. Martínez García<sup>3</sup> y C. Carrillo-Delgado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Robótica de la Universidad Politécnica del Bicentenario, Silao, Gto., México

<sup>2</sup> Centro de Tecnologías Ópticas y Fotónicas de la Universidad Tecnológica de Tulancingo, Hgo., México

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones en Óptica A. C., León, Gto., México

## Resumen

*En este trabajo se presenta una técnica para el cálculo de la Diferencia de Camino Óptico (DCO) y el perfil de fase tridimensional de Glóbulos Rojos (GR). La propuesta está basada en un interferómetro cíclico con corrimientos de fase en paralelo; el cual genera dos interferogramas paralelos con corrimientos relativos de  $\pi/2$ , a partir de ellos es posible extraer información de la fase óptica utilizando el algoritmo de Vargas-Quiroga. Debido a su configuración, el sistema es inmune a vibraciones causadas por perturbaciones ambientales, por lo tanto puede ser implementado fuera del laboratorio. Utilizando la técnica propuesta, se presenta el perfil de fase tridimensional de los Glóbulos Rojos.*

Palabras clave: Interferometría, Glóbulos Rojos, Corrimiento paralelo de fase.

## 1. Introducción

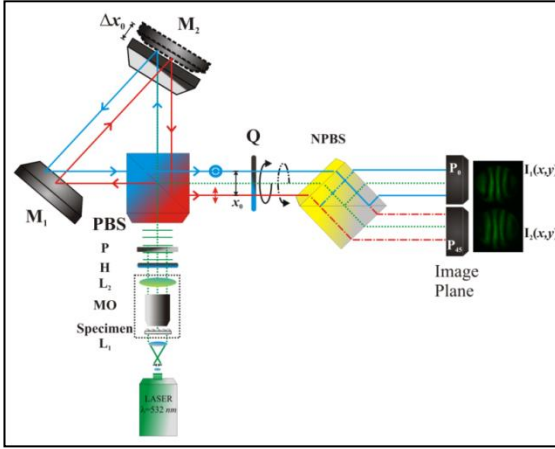
En la última década el sector biomédico ha desarrollado distintas técnicas de diagnóstico no invasivas e implementado tratamientos utilizando tecnologías láser [1,2]. Algunas muestras utilizadas tales como tejido y células son transparentes, por lo tanto, pueden ser caracterizadas como detectores holográficos o interferométricos [2] sin el uso de microscopios costosos (electrónicos o de fuerza atómica). Nuestro interés radica en el diseño de un sensor microscópico de bajo costo capaz de medir la forma y la deformación de la superficie de la muestra con respecto a una referencia ideal, o bien, una referencia de geometría conocida. En el campo biomédico, alguna variación de la forma puede ser indicador de la presencia de una enfermedad.

Las técnicas de corrimiento de fase son una opción viable para el análisis de muestras transparentes [1,2] en un estado estático o dinámico, sin embargo la mayoría de las de las técnicas actuales generan corrimientos de fase utilizando elementos difractivos [3] u holográficos [4], en la mayoría de los casos los componentes utilizados son difíciles de adquirir para los laboratorios, debido a esto, proponemos una técnica de corrimientos de fase por polarización que genera dos interferogramas a partir de los cuales es posible obtener la información de la fase óptica de la muestra, con esto es posible calcular la DCO y así conocer el diámetro y el grosor de los glóbulos rojos contenidos en una muestra de sangre fijada sobre un portaobjetos.

## 2. Arreglo experimental

La técnica desarrollada se basa en generar corrimientos de fase utilizando polarizadores lineales y placas retardadoras [1-4]. El sistema propuesto se muestra en la figura 1, en la entrada del arreglo se ha implementado un microscopio para poder analizar la muestra; la información del frente de onda deformado por el espécimen, es polarizada a  $45^\circ$  por el sistema H-P, el cual incide en el interferómetro cíclico el cual genera estados de polarización ortogonales, en la salida de sistema los haces pasan a través de un retardador de cuarto de onda (Q) adquiriendo estados de polarización circulares levógiros y dextrógiros los cuales generan un shearograma con estados de polarización circular cruzados [4-7]. El shearograma después es multiplexado por medio de un cubo divisor no polarizante (NPBS) generando dos shearogramas. Para obtener los corrimientos relativos de  $\pi/2$  es necesario colocar un polarizador lineal que cubra cada replica del shearograma a  $0^\circ$  y  $45^\circ$  [1-4], con

ellos es posible obtener la fase óptica utilizando el algoritmo propuesto en ref. [8].



**Fig. 1. Arreglo experimental**  $L_i$ : lentes. **MO: Objetivo de Microscopio.** **H: Placa retardadora de media onda.** **P: filtros polarizadores.**  **$M_i$ : Espejos.**  $\Delta x_0$ : Ajuste de espejos.  $x_0$ : Separación de haces.  $x_1$ : Separación de Shearogramas. **Q: Placa retardadora de cuarto de onda.**  $I_1(x,y)$ : Patrones de interferencia.

La figura 2 presenta los resultados preliminares obtenidos con la técnica propuesta. Para procesar la fase, primero se obtiene un frente de onda de referencia sin muestra, como se muestra en la figura 2(a), después el espécimen es colocado (Ver figura 2(b)) y la fase obtenida es la combinación de los frentes de onda de la muestra y la referencia.

### 3. Proceso de obtención de fase

La fase óptica es calculada utilizando el algoritmo de Vargas-Quiroga descrito en ref. [8], el cual requiere un corrimiento de fase constante entre los interferogramas, éste puede variar entre 0 y  $2\pi$ ; el algoritmo no requiere que el valor del corrimiento sea conocido. Los patrones de interferencia generados en el arreglo presentan una fase relativa de  $\pi/2$  los cuales pueden ser representados como:

$$\begin{aligned} I_1(x, y) &= A_0 + A_1 \cos[\phi(x, y)] \\ I_2(x, y) &= A_0 + A_1 \sin[\phi(x, y)] \end{aligned} \quad (1)$$

donde  $A_0$  representa la iluminación de fondo,  $A_1$  es el término de contraste y  $\phi(x, y)$  es el término de la fase óptica. Con el algoritmo utilizado es posible obtener la fase envuelta utilizando ambos interferogramas: primero, éste calcula la dirección de las franjas utilizando un método de flujo óptico para obtener el signo de la fase; después, aplica una transformada espiral para calcular la fase.

Los saltos de  $2\pi$  en la fase envuelta son resueltos con un algoritmo de desenvolvimiento de fase. Para finalizar y obtener la fase del objeto se debe retirar la fase de fondo, la cual se calcula realizando el mismo proceso a un patrón de interferencia sin objeto [9-10] y éste es sustraído a la fase experimental. Nuestro sistema, junto con este método, nos permite realizar el análisis de muestras estáticas y dinámicas.

### 4. Resultados experimentales

Para el análisis se colocó una muestra de sangre en un portaobjetos, se utilizó objetivo de microscopio con magnificación de  $M=40\times$  ( $N.A.=0.6$ ). Una de las ventajas de esta técnica es que las réplicas del shearograma no son generadas con elementos difractivos, por lo tanto, no es necesario realizar una corrección en la modulación de las franjas y además, la mayoría de los errores asociados a los elementos difractivos no están presentes. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3, en este caso se utilizó un interferómetro cíclico en su modalidad sin-shear [9-10]. La figura 3(a) muestra la reconstrucción de fase de un grupo de glóbulos rojos mientras que la figura 3(b) presenta un corte transversal de dos glóbulos rojos, dejando ver así su forma en términos de diferencia de camino óptico (DCO). Se puede apreciar que la DCO nos permite calcular el grosor de los glóbulos rojos por la forma  $OPD/\Delta n = 2.26 \mu m$  [11-13] y el diámetro promedio es de  $6 \mu m$ .

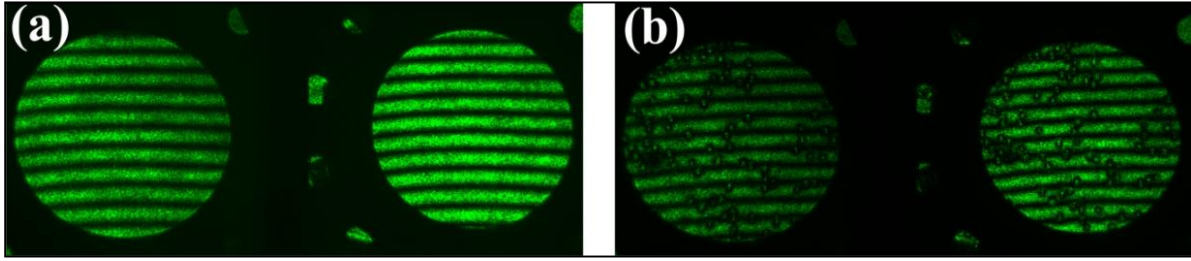


Figura 2. Resultados preliminares. (a) Frente de onda esférico de referencia. (b) Glóbulos rojos.

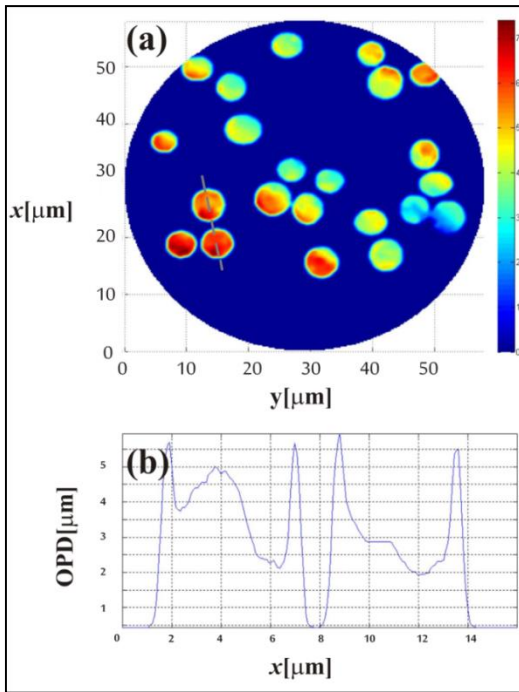


Figura 3. Cambios de fase inducidos por la muestra de sangre. (a) DCO, (b) Sección transversal de dos glóbulos rojos

## 5. Conclusiones

En este trabajo se propone una técnica de corrimiento de fase polarizado para el análisis de muestras biomédicas (Glóbulos rojos). Aunque el arreglo propuesto es de tipo interferométrico, éste puede ser fácilmente implementado fuera del laboratorio debido a que las franjas no se ven afectadas por vibraciones externas gracias a su sistema cíclico. En este caso, el corrimiento de fase es obtenido por medio de polarización. Nuestro método no es aplicable para muestras que no presentan propiedades birrefringentes, sin embargo para futuras aplicaciones, el sistema puede ser implementado para

corrimientos paralelos de cuatro pasos o bien aplicaciones en tiempo real.

## Agradecimientos

Esta investigación fue llevada a cabo en la Universidad Tecnológica de Tulancingo en colaboración con la Universidad Politécnica del Bicentenario. El autor V.H. Flores-Muñoz agradece al CONACYT por el apoyo recibido en su beca de doctorado (No. 224506).

Esta investigación forma parte del La Iniciativa de creación de la Primera Ingeniería en Óptica y Fotónica de México.

## Referencias

- [1] M. N. Morris, J. Millerd, N. Brock, J. Hayes, and B. Saif, "Dynamic Phase-Shifting Electronic Speckle Pattern Interferometer", Proc. SPIE, 5869, 58691B-1, (2005).
- [2] J. E. Millerd and J. C. Wyant. "Simultaneous phase-shifting Fizeau interferometer", U.S. Patent 7,057,738 B2 (2006).
- [3] N. I. Toto-Arellano, D. I. Serrano-García, A. Martínez-García, G. Rodríguez Zurita, and A. Montes-Pérez, "4D profile of phase objects through the use of a simultaneous phase shifting quasi-common path interferometer", Journal of Optics, 13(11), 115502 (2011).
- [4] J. E. Millerd, N. Brock, J. Hayes, M. North-Morris, M. Novak, and J. Wyant, "Pixelated phase-mask dynamic interferometer", Proc. SPIE, 5531, 304-314, (2004).
- [5] B. Barrientos-García, A. J. Moore, C. Pérez-López, L. Wang, and T. Tschudi, "Transient Deformation Measurement with Electronic Speckle Pattern Interferometry by Use of a Holographic Optical Element for Spatial Phase Stepping", Appl. Opt. 38(28), 5944-5947 (1999).
- [6] B. Barrientos-García, A. J. Moore, and C. Pérez-López, L. Wang, and T. Tschudi, "Spatial Phase-

- Stepped Interferometry Using a Holographic Optical Element*", Opt. Eng. 38(12), 2069-2074 (1999).
- [7] J. C. Wyant, "Dynamic Interferometry", Optics & Photonics News, 14(4), 36-41 (2003).
- [8] J. Vargas, J. Quiroga, C. O. S. Sorzano, J. C. Estrada, and J. M. Carazo, "Two-step interferometry by a regularized optical flow algorithm", Opt. Lett. 36(17), 3485-3487 (2011).
- [9] N. I. Toto-Arellano, G. Rodriguez-Zurita, C. Meneses-Fabian, and J. F. Vázquez-Castillo, "A single-shot phase-shifting radial-shearing interferometer", J. Opt. A: Pure Appl. Opt. 11(4), 045704 (2009).
- [10] P. Gao, B. Yao, J. Min, R. Guo, J. Zheng, T. Ye, I. Harder, V. Nercissian, and K. Mantel, "Parallel two-step phase-shifting point-diffraction interferometry for microscopy based on a pair of cube beamsplitters", Opt. Express 19(3), 1930-1935 (2011).
- [11] I. Shock, A. Barbul, P. Girshovitz, U. Nevo, R. Korenstein, and N. T. Shakeda, "Optical phase nanoscopy in red blood cells using low-coherence spectroscopy", Journal of Biomedical Optics 17(10), 101509 (2012).
- [12] H. Pham, H. Ding, N. Sobh, M. Do, S. Patel, and G. Popescu, "Off-axis quantitative phase imaging processing using CUDA: toward real-time applications", Biomed. Opt. Express 2(7), 1781-1793 (2011).
- [13] V. Mico, Z. Zalevsky, and J. García, "Common-path phase-shifting digital holographic microscopy: A way to quantitative phase imaging and superresolution", Opt. Commun. 281(17), 4273-4281 (2008).



# Efecto del Vermicompost líquido en el tamaño de fresa variedad *San Andreas* producida en invernadero

Ramos García Alondra <sup>1</sup>, Mena Violante Hortencia. G. <sup>2</sup>, Angoa Pérez Valentina <sup>2</sup>, Venegas González José <sup>2</sup>, Ochoa Estrada Salvador <sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Universidad Politécnica del Bicentenario, carretera Estatal Silao - Romita Km. 2, San Juan de los Duran, Silao, Guanajuato.

<sup>2</sup> Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, CIIDIR-IPN- Michoacán-México. Justo Sierra 28, 59510, Jiquilpan, Michoacán.

## Resumen

*Una alternativa para reducir el impacto de las actividades agropecuarias es la utilización de vermicompost líquido. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del vermicompost como fertilizante líquido sobre el tamaño de la fresa (Fragaria x ananassa Duch.) variedad San Andreas, bajo condiciones de invernadero. Se aplicaron cuatro tratamientos de fertilización líquida: 1) Solución nutritiva (F), 2) Agua (A), 3) Mezcla Solución nutritiva y vermicompost líquido (F + HL), 4) Vermicompost líquido (VL). La variable evaluada para determinar el efecto del vermicompost fue el tamaño midiendo diámetro ecuatorial y polar. Los resultados obtenidos sugieren que el vermicompost líquido permite la reducción de la fertilización química favoreciendo tamaño de frutos de fresa.*

**Palabras clave:** Vermicompost, Eisenia foetida, Fertilización.

## 1. Introducción

El fruto de la planta con nombre científico (género y especie) *Fragaria x ananassa*, de la familia de las Rosáceas (Rosaceae) se consume por su sabor, aroma y color [1], la fresa es conocida aparte de sus características sensoriales atractivas por sus usos y por su contenido nutricional ya que es excelente fuente de vitamina A, B, C y E, lo que le confiere propiedades antioxidantes. La exportación de frutos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) es una fuente de divisas importante para México [2], los principales estados productores son Baja California, Michoacán y Guanajuato [3].

La tendencia en los consumidores es preferir alimentos libres de agroquímicos, inocuos y con alto valor nutricional, en especial aquellos que son consumidos en fresco, por lo que en la actualidad, la corriente de agricultura sustentable cada vez ha cobrado más valor, por lo que se han implementado estrategias alternativas para su desarrollo, las cuales han sido principalmente de tipo biológico.

En cuanto a la nutrición, la fresa requiere de altas cantidades de nutrimentos para un alto crecimiento y calidad de fruto. Consecuentemente, se han hecho esfuerzos para determinar las dosis de nutrimentos inorgánicos para cultivar fresas [4], sin embargo aún los agricultores aplican dosis superiores a 600 kg de N ha<sup>-1</sup> [5], elevando con ello el costo de producción del cultivo y provocando serios problemas de contaminación ambiental por la lixiviación del nitrógeno, principalmente de nitratos, hacia los mantos freáticos subterráneos.

El uso de sustratos orgánicos ha cobrado gran importancia por diversas razones, desde el punto de vista económico, su uso se ha fomentado por la agricultura orgánica, ya que es una respuesta a la mejora en las prácticas agrícolas [6]. Dentro de los sustratos orgánicos, sobresale el vermicompost, debido a que sus procesos de elaboración son métodos biológicos que transforman restos orgánicos de distintos materiales en un producto relativamente estable [7].

El vermicompost es el producto de una serie de transformaciones bioquímicas y microbiológicas que sufre la materia orgánica al pasar a través del tracto digestivo de las lombrices [8]. Como sustrato

permite satisfacer la demanda nutritiva de los cultivos hortícolas en invernadero y reduce significativamente el uso de fertilizantes sintéticos. Además, el vermicompost contiene sustancias activas que actúan como reguladores de crecimiento, elevan la capacidad de intercambio catiónico (CIC), tiene alto contenido de ácidos húmicos, y aumenta la capacidad de retención de humedad y la porosidad, lo que facilita la aireación, drenaje del suelo y los medios de crecimiento [9]. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del vermicompost líquido sobre el tamaño de fresa variedad San Andreas.

## 2. Materiales y métodos

El estudio se realizó en el invernadero del CIIDIR UNIDAD MICHOACÁN ubicado en Jiquilpan. Se utilizaron plantas refrigeradas de fresa calidad certificada de la variedad *San Andreas*.

Las plantas se colocaron en suelo completamente húmedo, a una distancia entre sí de 20 cm a lo largo de la hilera, obteniéndose una densidad de 10 plantas por m<sup>2</sup>. Se instaló un sistema de riego por goteo [4].

El vermicompost líquido fue obtenido de acuerdo a la metodología indicada por [10]. El vermicompost líquido se produjo de un extracto del vermicompost sólido, colocando en un recipiente de 200 litros una cuarta parte de vermicompost sólido y tres de agua. La mezcla se agitó durante 48 hrs y se dejó reposar posteriormente se separó la parte líquida y se mezcló con agua en una proporción de 30 lt de vermicompost líquido en 200 lt de agua. El vermicompost fue analizado fisicoquímicamente y microbiológicamente

Los tratamientos se distribuyeron en un diseño de parcelas divididas, cada unidad experimental estuvo compuesta por 24 bolsas. La fresa se cosechó en estado rojo según la norma [11]. A los frutos cosechados en cada corte se les determinó el tamaño midiendo el diámetro ecuatorial y polar con la finalidad de cuantificar el efecto de los tratamientos.

El tamaño se obtuvo midiendo los diámetros ecuatorial y polar en cm a cada fresa, como lo indica la norma [11]. Posteriormente se hizo una clasificación del tamaño de las fresas con base a su diámetro ecuatorial en tres clasificaciones de acuerdo a la norma [1].

Se realizó un análisis de varianza de un experimento factorial en parcelas divididas. La comparación de medias se realizó con la prueba de la diferencia mínima significativa (DMS) a un nivel de significancia estadística de  $\alpha = 0.05$ , con el paquete estadístico SAS.

## 3. Resultados

El diámetro polar de frutos como se muestra en la Fig. 1 como un estimador de calidad, dentro de la clasificación A, se observó un mayor diámetro polar con la aplicación de VL, aunque no fue estadísticamente diferente a A, tratamiento que es

Tratamiento	Diámetro polar (cm)		
	Clasificación A Ø ecuatorial ≥ 3.2 cm	Clasificación B Ø ecuatorial = 2.6 cm a 3.1 cm	Clasificación C Ø ecuatorial = 2.0 cm a 2.6 cm
F	4.9 b	4.0 a	2.9 b
A	5.0 ba	4.2 a	3.4 a
F+VL	4.8 b	4.0 a	3.2 ba
VL	5.2 a	4.2 a	3.3 ba
CV	4.38	5.35	10.06
DMS	0.29	0.29	0.43

F= Solución fertilizante, VL= vermicompost líquido, A= agua, CV= Coeficiente de variación. Medias seguidas por letras distintas indican diferencia significativa. Se presentan las medias de los tratamientos, su separación se realizó con la prueba de la diferencia mínima significativa (DMS). ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ). Nota: todos los resultados del análisis estadístico se presentan en anexos.

significativamente igual a F y F+VL. A su vez VL superó estadísticamente a F y F+VL en un 6% y 8% respectivamente.

Por otro lado, dentro de la clasificación B, se observó que no hubo efecto significativo de ninguno de los tratamientos sobre el diámetro polar. Para el caso del tamaño de los frutos de la clasificación C, el tratamiento A presentó un mejor efecto sobre esta variedad y superó a los tratamientos F, F+VL, VL en un 15%, 6%, 3% respectivamente.

**Fig. 1 Efecto del vermicompost líquido sobre el diámetro polar de frutos de fresa variedad San Andreas producida en invernadero.**

En cuanto a los frutos dentro de las clasificaciones A, B y C datos mostrados en la Fig. 2, no se encontró efecto de los tratamientos sobre el tamaño en términos de diámetro ecuatorial.

Tratamiento	Diámetro ecuatorial (cm)		
	Clasificación A	Clasificación B	Clasificación C
	Ø ecuatorial ≥ 3.2 cm	Ø ecuatorial = 2.6 cm a 3.1 cm	Ø ecuatorial = 2.0 cm a 2.6 cm
F	4.0 a	3.0 a	2.4 a
A	4.0 a	3.0 a	2.5 a
F+VL	4.0 a	3.0 a	2.4 a
VL	4.1 a	3.0 a	2.4 a
CV	2.64	1.18	3.68
DMS	0.14	0.05	0.11

F= Solución fertilizante, VL= vermicompost líquido, A= agua, CV= Coeficiente de variación. Medias seguidas por letras distintas indican diferencia significativa. Se presentan las medias de los tratamientos, su separación se realizó con la prueba de la diferencia mínima significativa (DMS). (p < 0.05, n=3). Nota: todos los resultados del análisis estadístico se presentan en anexos.

**Fig. 2. Efecto de vermicompost líquido sobre el diámetro ecuatorial de frutos de fresa variedad San Andreas producida en invernadero.**

Existen muchos trabajos en los que se ha estudiado el efecto de la aplicación de vermicompost al suelo para mejorar las propiedades físicas, químicas y biológicas así como la calidad y productividad de diversos cultivos [12]; sin embargo, pocos trabajos tratan sobre el uso agrícola de lixiviados o extractos obtenidos del vermicompost, entre ellos [13], indicaron que la aplicación foliar de lixiviados obtenidos durante el proceso de vermicomposteo, a dosis de 1ml/500 ml de agua, produjo un aumento significativo en el rendimiento y calidad de fruto de jitomate, posiblemente debido a incrementos en la absorción de N, P y K, y en la concentración de clorofila. Aunque estos lixiviados fueron bajos en nutrimentos [13], poseían una gran cantidad de ácidos húmicos, los cuales ejercieron un efecto positivo sobre el contenido de clorofila que a su vez promueve una mayor tasa fotosintética. Este uso potencial de los lixiviados de vermicompost como fertilizante se atribuye a la alta disponibilidad de nutrimentos que éste contiene [14] y ácidos húmicos [15] ya que ha sido demostrado que estos ácidos húmicos incrementan el número de raíces y así estimulan la absorción de nutrimentos, así como el crecimiento y desarrollo de la planta, actuando como fitoestimuladores.

Aunque los resultados de este trabajo concuerdan con algunos reportes anteriores en el sentido de que la aplicación líquida de vermicompost tuvo un efecto significativo en algunos parámetros de calidad de fresa, existen pocos reportes sobre el uso de extractos de vermicompost aplicados en el agua de riego como una solución nutritiva de fertilizantes que sustituya parcial o totalmente a los fertilizantes químicos utilizados en el cultivo de la fresa [4]. Es probable que estos resultados se atribuyan a la

disponibilidad de nutrimentos del vermicompost y a su posterior absorción por la planta.

Debido a que el extracto acuoso utilizado en este trabajo fue derivado del vermicompost, es probable que los efectos significativos en el tamaño de la fresa, independientemente del efecto de los nutrimentos, obedezcan por un lado a factores hormonales, sumados a un efecto indirecto, relacionado con el metabolismo de microorganismos del suelo que impactan la dinámica de absorción nutrimental del mismo y que a su vez promueven el crecimiento de la planta [15]; o por la acción indirecta de microorganismos biocontroladores [16].

Los resultados aquí presentados muestran que el uso de vermicompost líquido como un abono orgánico es una alternativa viable para la producción del cultivo de fresa, no sólo por el hecho de que puede complementar la nutrición de las plantas y estimular su desarrollo, sino por su impacto positivo sobre aspectos importantes de calidad de fruto como lo es el tamaño.

#### 4.- Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el vermicompost líquido como fertilizante favorece el tamaño respecto al diámetro polar de la fresa *San Andreas* en condiciones de invernadero, lo cual podría tener repercusiones importantes en la calidad de exportación de este producto. Los resultados igualmente permiten considerar que las soluciones nutritivas, tradicionalmente utilizadas en los sistemas de producción en invernadero, pueden ser reemplazadas por productos como el vermicompost líquido, cuyo contenido de elementos nutritivos puede satisfacer las necesidades de este cultivo.

La ventaja de utilizar Vermicompost líquido no sólo radica en el hecho de que complementa la nutrición de las plantas, sino en el impacto positivo sobre aspectos importantes de calidad de fruto como lo es el tamaño. El uso de humus líquido como un abono orgánico es una alternativa viable para la producción del cultivo de fresa, ya que presenta un gran potencial por sus efectos que tiene con el cultivo, además de sus bajos costos.

#### Referencias

- [1] Norma Oficial Mexicana NMX-FF-062-SCFI-2002. Productos alimenticios no

industrializados para consumo humano – fruta fresa (*Fragaria xananassa*, Dutch) – especificaciones y método de prueba (Cancela a la NMX-FF-062-1987). Recuperado 2 de Noviembre del 2014.

[2] Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2010. Fresa. <<http://www.siap.gob.mx/>>. Recuperado 2 de Noviembre del 2014.

[3] Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2012. Crece 400 por ciento la producción de fresa en México. Recuperado 2 de Noviembre del 2014. <<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines/2006/Paginas/2006B015.aspx>>.

[4] Vázquez G., and Méndez I. C. Fertilización nitrogenada del cultivo de la fresa en riego por goteo, en E. J.L Pimentel, Y M. M. Velázquez (eds), Innovaciones tecnológicas en el sistema producto fresa, 2009.

[5] Cárdenas N. R., Sánchez Y. J. M., Fariás R. R., y Peña C. J. J. Los aportes de nitrógeno en la agricultura. Revista Chapingo serie Horticultura. **10**: 173-178, 2004.

[6] Nieto G. A.; Murillo A. B.; Troyo-Dieguez E.; Larrinaga M. J.A.; García H. J.L. El uso de compostas como alternativa ecológica para la producción sostenible del chile (*Capsicum annum* L.) en zonas áridas. *Interciencia*. **27(8)**: 417-421, 2002.

[7] Classen V.P., Carey J.L. Regeneration of nitrogen fertility in disturbed soils using composts. *Compost Sci. & Util.* **12(2)**: 145-152, 2004.

[8] Edwards C.A., Burrows I., Fletcher K.E., and Jones B.A. The use of earthworms for composting farm wasted. En: Gasser JKR (ed). Composting of agricultural and other wastes. Els. App. Sci. Publ. London. 241 pp, 1984.

[9] Rodríguez D. N., Cano R. P., Figueroa V. U., Palomo G. A., Favela Che., Álvarez R. V.P., Márquez H. C., y Moreno R. A. Producción de

tomate en invernadero con humus de lombriz como sustrato. *Revista Fitotecnia Mexicana*. **31(3)**: 265-272, 2008.

[10] Vázquez G. G.; Flores M. R.; Ceja T. L. F. 2009. Valoración de biofertilizantes de fabricación casera en el crecimiento y producción del cultivo de la fresa. *Estudios de la Cienega*. 10-20: 142-157.

[11] Norma Oficial Mexicana NMX-FF-9-1982. Productos alimenticios no industrializados para uso humano –Fruta Fresca - Determinación de tamaño en base al diámetro ecuatorial. Recuperado 2 de Noviembre del 2014.

[12] Robledo, O.; Grosso, E.; Zoppolo, R.; Lercari, D.; Etchebehere, C. Producción de tomate y dinámica microbiológica del suelo de invernáculo al aplicar vermicompostas. *Avances en investigacion agropecuaria Robledo et al. AIA*. 14(1): 35-51. ISSN 0188789-0. 2010.

[13] Tejeda, M.; González, J.L.; Hernández, M.T.; García, C. Agricultural use of leachates obtained from two different vermicomposting processes. *Bioresource Technology*. 99: 6228–6232. 2008.

[14] Gutiérrez M., F. A.; García, R.C.; Rincon, R.; Abud A., R. M.; OLIVA, M.A.; Guillen, M. J.; Dendooven, L. Formulation of a liquid fertilizer for sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using vermicompost leachate. *Bioresource Technology*. 99:6174–6180. 2008.

[15] Atiyeh, R. M.; Lee, S.; Edwards, C. A.; Arancon, N. Q.; Metzger, J. D. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology*. 84: 7-14. 2002.

[16] Yasir-Muhammad, A.; Zubair A, A.; Seon W., K.; Cheo OK, J. Young Ryun Chung Bacterial community composition and chitinase gene diversity of vermicompost with antifungal activity. *Bioresource Technology*. 100: 4396–4403. 2009

# *Soil doctor*: multivariable (ph, conductividad eléctrica, temperatura y humedad).

Martínez Rodríguez Olga Karina<sup>1</sup>, Padierna García José Jesús<sup>1</sup>, Romero Prudencio Jehú Uziel<sup>1</sup>, Navarro González Nancy Yoselin<sup>1</sup>, Pérez Murillo Iván<sup>1</sup>, Fernández Martínez José Braulio<sup>1</sup>, Rodríguez Álvarez Rubén Darío de la Cruz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidad Politécnica del Bicentenario, Carr. Estatal Silao-Romita Km. 2, San Juan de los Durán, Silao, Guanajuato.

## Resumen

*El presente trabajo consiste en dar un énfasis en la problemática actual que enfrentamos sobre el uso eficiente de nuestros recursos naturales, dentro del sector agrícola se realizan prácticas que permiten a los agricultores obtener beneficios y rendimientos, pero esto en realidad es a un costo muy elevado debido al mal manejo de dichos recursos.*

*De esta manera, se opta por crear un dispositivo capaz de medir variables del suelo como temperatura, PH, humedad y conductividad eléctrica con el objetivo principal de conocer la influencia de las condiciones edafológicas que tienen un impacto en el rendimiento de los cultivos y así aumentar la capacidad de productividad del campo.*

*Los resultados son el prototipo del dispositivo, realizado mediante el software CAD "SolidWorks", así como el interfaz del usuario realizado mediante el software GUIDE que permite capturar, procesar y mostrar información.*

*Las conclusiones constituyen en el diseño del dispositivo el cual será de sencilla manipulación ya que toda persona podrá tomar las mediciones in situ, además obtendrá las recomendaciones de mejora de suelo de forma rápida, sin causar daño ambiental y sobre todo a bajo costo de adquisición y bajo costo de las medidas para remediar el problema en su suelo.*

**Palabras clave:** Multivariable, Dispositivo, Sugerencias, Accesible, Medio Ambiente, Innovador.

## 1. Introducción

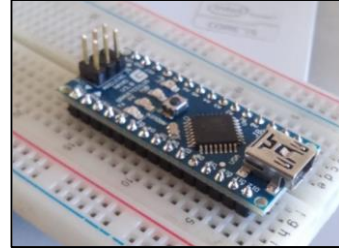
Las prácticas agrícolas como actividad primaria influyen de manera directa en el medio ambiente y por lo tanto en sus componentes principales bióticos y abióticos de manera positiva y negativa. La agricultura es el principal usuario de los recursos naturales, y contribuye al agotamiento de las aguas subterráneas, a la contaminación por agroquímicos, al desgaste de los suelos y al cambio climático mundial. La degradación de los recursos naturales mina la base de la producción agrícola futura, aumenta su vulnerabilidad ante los riesgos y causa de ese modo altas pérdidas económicas. [1]

En la actualidad existen dispositivos que funcionan como captadores de información de un proceso, transforman una magnitud física en una señal eléctrica de baja potencia o en una señal óptica denominados sensores, captadores o detectores. [2]

Estos dispositivos se han utilizado en el área agrícola para la obtención de datos que permiten conocer las condiciones de una zona de cultivo o una planta en un análisis in situ; sin embargo, la interpretación de dichos datos significa un obstáculo cuando no se cuenta con el tiempo, recursos económicos y/o conocimientos necesarios para su recolección, traducción e interpretación de forma correcta. [3]

Ahora bien, los costos y el impacto ambiental, pueden minimizarse mediante la innovación en las tecnologías para las prácticas agrícolas, especialmente mediante un sistema electrónico; compuesto por un dispositivo de medición multivariable (PH, temperatura,

conductividad eléctrica y humedad) que determine las condiciones específicas in situ de la zona bajo en la cual se llevarán a cabo las prácticas agrícolas de cultivo y producción; asociado a un software que proporcione una recomendación puntual para la corrección de factores poco favorables para el desarrollo óptimo del cultivo, acondicionamiento del suelo y recomendaciones de laboreo adecuadas. [4]



**Fig.1 Arduino nano**

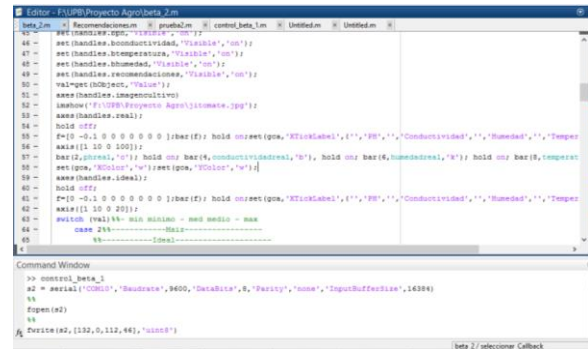
## 2. Dispositivo de medición multivariable y recomendaciones de prácticas agrícolas de adecuación de condiciones óptimas.

La problemática sobre el uso eficiente de nuestros recursos naturales es un tema que compete en especial al sector agroalimentario ya que dentro de este se realizan prácticas que permite a los agricultores obtener grandes beneficios y rendimientos, pero esto en realidad es a un costo muy elevado debido al mal manejo de dichos recursos, la sociedad esta consiente de este daño, es por esta razón que se lanzan al mercado alternativas para la medición de parámetros productivos como pH, temperatura, conductividad eléctrica y humedad del suelo; cada una de estas variables recae sobre los cultivos tomando en cuenta que son indispensables para el óptimo crecimiento y desarrollo de los mismos. La gran problemática a la que se enfrentan los agricultores es el alto costo y la poca interpretación de estos datos y sus medidas para remediar y obtener dichos beneficios sin un impacto negativo en los recursos agua, tierra y aire, en consecuencia no representan una oportunidad para el sector agropecuario de bajo poder adquisitivo.

### 2.1 Elementos que conforman el dispositivo

En la figura 1 se muestra el dispositivo denominado arduino, el cual es una tarjeta programable de bajo costo, flexible al disponer de un lenguaje de programación práctico y fácil de manejar. El propósito de utilizar arduino es poder recopilar información de manera rápida y sencilla a partir de diversos sensores, subir la información obtenida a una base de datos en una computadora y utilizar un software que sea fácil de utilizar por cualquier tipo usuario experto e inexperto que le ayude a comprender la información procesada.

La figura 2, muestra la Interfaz de usuario (GUI)/ Software: La función del programa desarrollado es capturar, procesar y mostrar información para que el usuario pueda ver de manera práctica los resultados del estudio del campo. La comparación de los datos censados por Arduino, y los pre-cargados en el software generan estadísticas que sirven como base para mostrar las recomendaciones necesarias para el mejor aprovechamiento de la tierra.



**Fig. 2. Código de programación para el software de Matlab.**

Prototipo en Solid Works: Solid Works es un software de diseño para generar piezas de trabajo virtuales y hacer el estudio físico en diferentes condiciones, tener una visualización del modelo antes de ser manufacturado, teniendo en cuenta cada detalle del diseño final, permitiendo modificaciones rápidas, evitando errores y ahorrando tiempo. El diseño del prototipo se basa en la necesidad de una rápida y fácil aplicación al suelo que se desea estudiar, incluye los sensores que se utilizarán, los circuitos y conexiones necesarias para su funcionamiento.

### 2.2 Operación de Soil Doctor

Para efectuar la medición de los parámetros del terreno a estudiar es necesario considerar los siguientes pasos:



- 1.- Encender el dispositivo.
- 2.- Seleccionar cultivo y tipo de tierra.
- 3.- Introducir el dispositivo en la tierra hasta la profundidad adecuada.
- 4.- Presionar botón “Realizar medición”.
- 5.- Esperar de 10 a 15 segundos y leer las recomendaciones mostradas en la pantalla.
- 6.- Para tomar el registro de las mediciones, introducir una memoria USB a la tarjeta Arduino y presionar el botón “Guardar mediciones en USB”.



Fig.3 Procedimiento para la medición de Parámetros

### 2.3 Recomendaciones de *Soil Doctor*

**Recomendaciones de Humedad:** para el manejo de deficiencia de humedad se recomienda: La incorporación de materia orgánica. La siembra de los cultivos en forma equidistante En suelos permeables arenosos, es preferible introducir cultivos de enraizamiento profundo. La aplicación de fertilizantes fosfatados por lo general promueve el desarrollo de las raíces y por lo tanto la absorción de agua por el cultivo. Para el manejo de exceso de humedad se recomienda: Realizar sistemas de drenaje subterráneo y sistema de drenaje superficial.

**Recomendaciones para conductividad eléctrica:** La aplicación de la siguiente fórmula para la corrección de las condiciones del suelo, mediante un riego pesado:

$$NL = \frac{CE_{\text{agua riego}}}{CE_e} \times 100$$

NL= Lamina de riego (L).

CE<sub>agua de riego</sub>= Conductividad eléctrica del agua de riego dS/m.

CE<sub>e</sub>= Conductividad eléctrica medida por *Soil Doctor*.dS/m.

**Recomendaciones para pH:** uso de cantidades específicas de cal muerta que será determinada por medio del dispositivo *Soil Doctor* en dosis por hectárea en caso de problemas de alcalinidad al igual que con la acidez se debe trabajar con el yeso como compuesto químico, debido a que realiza funciones químicas adecuadas para amortiguar el pH y establecer un rango óptimo para el cultivo.

**Recomendaciones para temperatura:** Al utilizar el dispositivo *Soil Doctor* se obtendrán los rangos de temperatura de los cultivos programados, sugiriendo dar riegos pesados, ligeros o la suspensión de ellos.

### 3. Análisis de resultados.

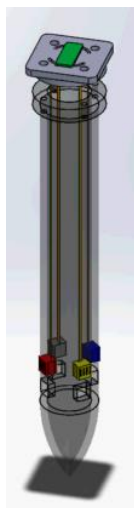
El programa que se estará trabajando será por medio del lenguaje de programación de MATLAB, el cual se basa en el procesamiento de datos y diferentes operaciones matemáticas, cuenta con un gran potencial de procesamiento y además se utiliza por su gran rapidez y solución de operaciones.

En la figura 4 se puede observar, la interfaz gráfica del sistema implementado por MATLAB. En ella podemos seleccionar el tipo de cultivo con la que se encuentra trabajando, en ello se colocaron algunos de los más comunes en el estado de Guanajuato, como: maíz, trigo, cebada, cebolla, zanahoria, sorgo, fresa, avena, calabaza, chile, frijol. De la misma manera podemos observar las gráficas comparativas de las mediciones realizadas por *Soil Doctor* contra los valores óptimos para cada cultivo.



Fig.4 Interfaz de usuario de *Soil Doctor*

La figura 5 muestra el diseño del prototipo en el que se basa la necesidad de una rápida y fácil aplicación del dispositivo al suelo que se desea estudiar para evitar complicaciones al momento de estar tomando las mediciones de los parámetros in situ trabajando con el estudio en campo.



**Fig.5 Ensamblaje, que permita una correcta penetración al suelo.**

#### 4. Conclusiones

El dispositivo tiene la finalidad de ser usado de una forma fácil y rápida por toda persona perteneciente o no al sector primario brindándole a ésta la capacidad para realizar mediciones in situ mostrando recomendaciones de mejora del suelo de forma inmediata de tal manera que no haya efectos negativos hacia con el medio ambiente.

*Soil Doctor* tiene como visión futura medir todas las variables de mayor importancia para el sector primario manteniendo su calidad y objetivo principal de brindar recomendaciones de mejora de suelos y recuperar y conservar el medio ambiente para lograr una mejor calidad de vida.

#### Referencias

[1] The World bank Informe sobre el desarrollo mundial, (2008), La agricultura y el medio ambiente, Recuperado 10 de septiembre del 2014, <http://siteresources.worldbank.org/INTWDR>

S/Resources/4773651327599046334/83946791327608078139/8395545-1327610544368/04\_ambiente.pdf

[2] Introducción de conceptos básicos el medio ambiente y la estadística,(2009), Construcción de indicadores ambientales en los países de América Latina, Recuperado 16 septiembre del 2014, [http://www.cepal.org/deype/noticias/noticias/2/37052/2009\\_09\\_ma\\_id\\_37052\\_sabalian\\_cristina\\_ppt.pdf](http://www.cepal.org/deype/noticias/noticias/2/37052/2009_09_ma_id_37052_sabalian_cristina_ppt.pdf)

[3] Rojano, A. Producción agrícola controlada, Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias. 2004, Vol. 13 Issue 2, p1-9. 9p

[4]Vásquez R, Dávila D. Efecto de la humedad, temperatura y ph del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio, Ecología Aplicada. 2008, Vol. 7 Issue 1/2, p123-130. 7p. 4 Charts, 3 Graphs

# Aislamiento de una fracción proteica con actividad tipo tripsina de *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleóptera: Bostrichidae)

Urbietta Rojas José Antonio <sup>[1]</sup>, Castro Guillen José Luis <sup>[1]</sup>, Blanco Labra Alejandro <sup>[1]</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, Dpto. de Biotecnología y Bioquímica, Km 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato – León, C.P. 3682. Irapuato Gto., México.

## Resumen

*Prostephanus truncatus* (Horn), es uno de los coleópteros de la familia de los Bostrichidae que causa grandes pérdidas en los cultivos del maíz y yuca seca. Dentro de las enzimas digestivas que este insecto posee, están las serín peptidasas, las cuales pueden ser un punto clave para controlar a esta plaga. Para estudiar y lograr una mejor comprensión de las proteínas digestivas del devorador mayor de los granos, en este trabajo se purificó parcialmente una fracción proteica en la cual se detectaron enzimas con actividad tipo tripsina, propias de este gorgojo. Una vez que se obtuvo la primera pastilla del precipitado de un extracto crudo del insecto, se prosiguió a una diálisis para retirar el exceso de sales. Posteriormente, se usó una cromatografía de exclusión molecular para separar proteínas por tamaños y después medir su concentración y actividad proteolítica con un espectrofotómetro. Además de lograr el aislamiento de una fracción proteica de enzimas digestivas con actividad tipo tripsina provenientes del gorgojo del maíz, también se probaron algunos inhibidores de peptidasas (IP's) contra estas enzimas y se detectó la formación de complejos activos enzima – inhibidor que no se habían reportado con anterioridad para este tipo de moléculas provenientes del *P. truncatus*.

Palabras clave: *Prostephanus truncatus*, plaga del maíz, inhibidores de peptidasas (IP's).

## 1. Introducción

La constante interacción que se da entre las plantas con los insectos ha transformado el ecosistema, convirtiéndolas en un recurso indispensable principalmente para los consumidores herbívoros. Las plantas proporcionan refugio al insecto y a cambio estas las polinizan y defienden, pero en algunos casos se vuelven una plaga ocasionando daños e inclusive terminan con la vida de la planta (Mello y Silva-Filho, 2002) [1].

Antropológicamente un insecto se puede convertir en plaga, cuando éste ocasiona daños al hombre, a sus cultivos, animales o a sus propiedades. En la agricultura se clasifica como plaga cuando causa daño directo a los productos que se pueden cosechar, o un daño indirecto al portar enfermedades, tanto para sus cultivos como para el ganado (Dent, 2000) [2].

Para reducir este ataque, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de defensa que incluyen barreras químicas y físicas; tal es el caso de la inducción de proteínas defensivas (Haruta et al., 2001) [3], compuestos volátiles que atraen a los predadores de los insectos herbívoros (Birkett et al., 2000) [4], o la acumulación de metabolitos secundarios (Kliebenstein et al., 2001) [5]. En paralelo, los insectos han desarrollado estrategias para superar estos obstáculos por ejemplo el secuestro de los venenos (Nishida, 2002) [6].

El ataque constante de insectos y de patógenos sobre las plantas y granos almacenados, produce pérdidas muy elevadas para los agricultores quienes recurren al uso intensivo de pesticidas los cuales presentan problemas a la ecología debido a que su toxicidad abarca una amplia variedad de organismos. Es por ello la necesidad de estudiar mecanismos alternos que nos permitan generar plantas con mayor resistencia al ataque de insectos y de patógenos, buscando mecanismos naturales que tengan una elevada selectividad y que además, en las condiciones en las que el producto se ingiere, no presenten toxicidad contra los humanos o animales (Blanco-Labra y Aguirre-Mancilla, 2002) [7].

Una de las alternativas para combatir el ataque del gorgojo en granos de almacén, es el uso de los IP's que son proteínas provenientes de los diferentes tipos de tejidos de las plantas, capaces de inhibir la actividad proteolítica de una peptidasa. Los IP's se encuentran distribuidos en todos los seres vivos y representan hasta 10% de las proteínas de almacenamiento, pero también pueden ser inducidas por el ataque de insectos y microorganismos patógenos. (Bode y Huber, 1992) [8].

Las peptidasas son enzimas que hidrolizan de forma específica los enlaces peptídico de las proteínas ingeridas por *Prostephanus truncatus* y además participan en todos los procesos celulares como moléculas de control (Neurath, 1984) [9]. Las serín peptidasas **fig. 1**, son aquellas que tienen en el sitio activo el aminoácido serina, que es esencial para que se lleve a cabo la actividad catalítica (Blow et al., 1969) [10]. Las serín peptidasas tipo tripsina reportadas en insectos pesan entre 20 y 35 KDa con pH óptimo variable de 8 a 10 y se les identifica con el sustrato benzoil-Arg-p-nitroanilida (Bz-R-pNA) o el benzoil-arg-4-metilcumarina (BRMCA) (Craik et al., 1985) [11].

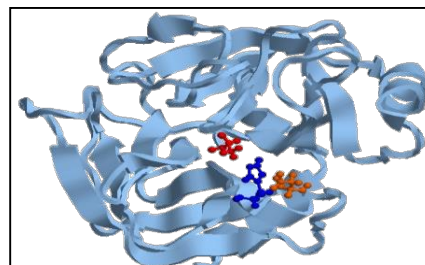


Fig. 1. Representación tridimensional de la tripsina bovina (1UTN). Se indica en rojo la serina 195, Azul histidina 57 y naranja aspártico102.

## 2. Parte experimental

### 2.1. Extracción de proteínas de *Prostephanus truncatus*

Las proteínas de este coleóptero fueron extraídas de acuerdo al protocolo establecido por Aguirre y col. (2009) [12]. Los insectos adultos de *Prostephanus truncatus* se reprodujeron dentro de semillas de maíz de la variedad Cacahuazintle; las larvas fueron extraídas tamizando el maíz infestado y se utilizaron fueron las del tercer estadio de desarrollo. La extracción se trabajó a 4 °C.

Se obtuvieron 14.9 gr de larvas de *P. truncatus* en instar larval y se molieron con 59.60 ml de buffer Tris – HCl 0.1 M, pH 8; en una relación 1:4 (p/v) dentro de un mortero.

Se recuperaron las larvas maceradas junto con el buffer de extracción en tubos falcon, las cuales fueron centrifugadas a 18 000 rpm durante 60 min, descartando la primer pastilla formada y obteniendo 60 ml de sobrenadante. Posteriormente el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio  $[(NH_4)_2SO_4]$  al 30 % de saturación (P30), durante 60 min; seguida de una centrifugación a 18 000 rpm durante 15 min rescatando 52 ml de sobrenadante. Al sobrenadante obtenido se le realizó una segunda precipitación al 70 % de saturación (P70) con  $[(NH_4)_2SO_4]$  durante 60 min seguida de una centrifugación a 18 000 rpm durante 15 min, se separaron 59 ml de sobrenadante y se rescató la pastilla para ser dializada. Al término de cada centrifugación se guardó una alícuota de 1 mL tanto de pastillas como de sobrenadante para análisis posteriores.

La pastilla de la última precipitación fue re-suspendida con buffer Tris – HCl 0.01 M, pH 8 y se dializó utilizando una membrana de 10 KDa de exclusión molecular, la cual fue sellada en los extremos y puesta a girar en agua des ionizada con agitadores magnéticos y para lograr esto, la membrana se ató a un flotador. Se hicieron varios cambios de agua hasta alcanzar una conductividad eléctrica de 1 mOhms. Una vez alcanzada tal conductividad, se extrajo la proteína del P70 de la membrana; se almacenó en 2 alícuotas de 4 ml y 1 alícuota de 3 ml (12 ml en total) y se refrigeró a -70 °C hasta su uso.

### 2.3. Cromatografía de exclusión molecular

Las alícuotas resultantes de la diálisis anterior P70 (12 ml), se introdujeron dentro de una columna de cromatografía de exclusión molecular (CEM); que contiene la resina Sephadex G75.

Una vez filtrada la muestra en CEM, se continuó con la medición de la absorbancia a cada fracción obtenida del P70 a una longitud de onda de 280 nm en espectrofotómetro BECKMAN. En una placa de 96 pozos se colocaron de cada fracción proveniente de P70 20 µl, 90 µl de buffer Tris-HCl 0.01 M, pH8 más 10 µl de Bz-R-*p*NA como sustrato y se midió absorbancia de la reacción enzimática a 405 nm en espectrofotómetro BIO RAD Benchmark Plus.

### 2.4. Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína, se determinó por medio del ensayo de Bradford utilizando albúmina de suero bovino (ASB) como estándar (Bradford, 1976). Para ambos casos, se tomaron en cuenta las alícuotas de 1 ml recolectadas durante la extracción de proteína de *P. truncatus* para ser diluidas y trabajar en base a estas diluciones. Como primer paso, en una placa de 96 pocillos; se depositaron 10 µl de proteína de cada dilución, y se agregaron 200 µl de una solución de trabajo de Bradford para cada muestra por triplicado. Se midió su absorbancia a 595 nm durante 5 min. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a realizar los cálculos necesarios con el programa de Microsoft Excel 2007 para obtener las cantidades de proteína estimada.

### 2.5. Medición de la actividad tipo tripsina

La actividad proteolítica de las tripsinas en placa, fue medida en un ensayo multi-reacción

de acuerdo al protocolo de Erlanger y col. (1961), con algunas modificaciones, usando diluciones. El volumen total de este experimento por pozo fue de 120 µl. Para esto, se usó el sustrato Bz-R-*p*NA a una concentración de 0.01 M. Así mismo, la reacción se monitoreó a 405 nm, misma que iniciaba al agregar el sustrato Bz- R-

### 2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se prepararon dos geles de poliacrilamida para la separación por electroforesis, en condiciones semidesnaturalizantes usando dodecil – sulfato sódico (SDS - PAGE), bajo el sistema Laemmli (1970). El gel separador fue del 10 % y el concentrador del 4%. La corrida de la electroforesis se llevó a 120 Volts (V); iniciando con un periodo de 30 minutos a 70 V, posterior a esto se fue aumentando el voltaje hasta llegar a 120 V en un tiempo total de 3 hrs; para esto, se montaron los geles en la cámara electroforética con un buffer de corrida. Se utilizaron 10 µl de marcador de peso molecular, 30 µg de EC, S30, P30, S70, P70, y CEM 1 y 2 (todo en cuarto frío a 4 °C). Finalmente distribuidas las muestras en el mismo orden para ambos geles, se corrió la electroforesis.

Al finalizar, se fijaron las proteínas con una solución de metanol; ácido acético 40:10 (v/v) durante 30 minutos, para después ser teñidos con una solución de tinción azul de coomassie durante toda la noche. Se retiró el azul de coomassie y se añadió la misma solución que se usó anteriormente para fijar proteína con la cual fue desteñido el gel hasta la aparición de bandas azules definidas de proteína y el gel fue secado al vacío utilizando “celofán dulce”.

### 2.7. Análisis post-electroforético de la actividad tipo tripsina

Se determinó la actividad proteolítica tipo tripsina en zimograma, con el sustrato (Bz-R-*p*NA), basado en los protocolos de Ohlsson *et al.* (1986) [13] y Vinokurov *et al.* (2005 [14]), para lo anterior se usó el segundo gel separador que se equilibró lavándolo consecutivamente con el buffer Tris-HCl, pH 8 y a la vez se eliminaron los residuos de SDS en este proceso. Los lavados se realizaron durante un periodo de 40 min. De manera paralela, una membrana de nitrocelulosa que se cortó al tamaño del gel; se sumergió en la solución del sustrato y se sometió a agitación constante durante 40 minutos. Finalizando los

lavados del gel, se eliminó el excedente del buffer de la superficie del gel. La membrana fue sobrepuesta a éste y puestos en incubación durante 2 hrs a 37 °C en un recipiente cerrado herméticamente. Al transcurrir el tiempo, se apreció una coloración amarilla en la membrana de nitrocelulosa, por lo que se separó del gel y a la membrana se le dio un tratamiento de tres lavados en agitación lenta de 5 minutos cada uno. El primero con nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>, PM: 69) al 0.1% en HCl 1M, el segundo con sulfamato de amonio (NH<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, PM: 114.12) al 0.5% en HCl 1M y el tercero fue con N-(1-naftil) etilendiamina (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub> · 2HCl, PM: 259.18) al 0.05% en etanol al 47.5% hasta la aparición de franjas de color rosa en la membrana.

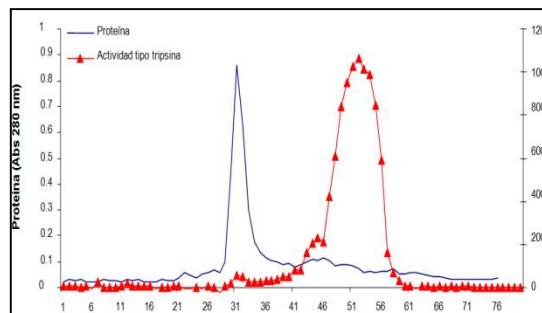
### 2.8. Efecto de los inhibidores de peptidasas sobre la actividad tipo tripsina

Se trabajó con 5 µl de inhibidor contra 10 µl de la fracción proteica con actividad tipo tripsina. Para el análisis, se prepararon tres complejos enzima – inhibidor (Tripsina – SKTI, Tripsina – TBPI y Tripsina - SBBI), estos se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 15 minutos. Los complejos se cargaron en un gel de poliacrilamida con sus respectivos controles basándose en los protocolos de Ohlsson *et al.* (1986) [13] y Vinokurov *et al.* (2005) [14]. Se corrió en electroforesis y al termino de esta última se repitió el procedimiento del apartado 2.7.

## 3. Resultados y discusiones

La cromatografía de exclusión molecular **fig. 2**, mostró un pico principal de concentración de proteína de la fracción 28 – 37 (línea azul) a una absorbancia de 280 nm, pero también se detectó concentración de proteína de la fracción 41 – 58.

Cuando se midió la actividad proteolítica a 405 nm con el sustrato Bz – R- pNA, se observa un pico de actividad de las tripsinas (línea roja), que se desfasa del pico principal de proteína y pertenece a la fracción 41 – 58. Esto da como resultado una buena separación proteica. Se puede decir lo anterior, puesto que el pico de actividad proteolítica obtenido a 405 nm; no coincide con el pico principal que aparece a 280 nm, lo cual coincide con lo descrito por Aguirre en el 2005 [15], quien trabajó con quimotripsina que es una proteína que se localiza en el pico principal de las fracciones provenientes de CEM.



**Fig. 2. Cromatografía de exclusión molecular del extracto de *Prostephanus truncatus*.**

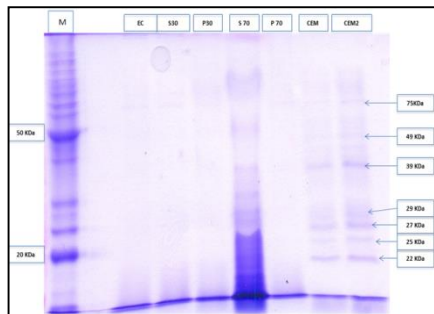
las concentraciones aproximadas obtenidas de proteínas hechas con Bradford fueron de 119.9 mg como proteína total y terminó con 3.9 mg, entonces se observa que la actividad total con respecto a la proteína total fue decayendo de 108,000 UA total a 31,602 UA total y la actividad específica se incrementó notablemente de 900.6 UA / mg de proteína a 8,095 UA/ mg de la proteína total; representando así un 29 % de rendimiento con nueve veces de purificación, lo cual se asemeja con los resultados obtenidos por Aguirre y col. 2005, considerando que trabajó con una cantidad diferente de la misma enzima de *P. truncatus*, tal cantidad fue de 138.74 mg total; rescatando en CEM 28.4 mg de proteína total, 979600 UA total, 34478 UA específica, con un rendimiento del 75.6 % y 3.70 veces de purificación.

### 3.1. Análisis electroforético de la fracción proteica de *P. truncatus*

En la **fig. 3** se puede ver un SDS – PAGE que se realizó para identificar las bandas de proteínas provenientes del insecto *P. truncatus*. Las muestras fueron colocadas de izquierda a derecha. En el primer carril se muestran los marcadores de peso molecular (M), extracto crudo (EC), sobrenadante al 30 % (S30), precipitado al 30 % (P30), sobrenadante al 70 % (S70), precipitado al 70 % (P70) y cromatografía de exclusión molecular (CEM). Como se puede observar, aparecen bandas de proteína con pesos moleculares de 22, 25, 27, 29, 39, 49 y 75 KDa (pesos moleculares aparentes en base a un perfil de concentración conocida de los marcadores de peso molecular de marca comercial). Las bandas fueron muy tenues en los carriles de EC, S30, P30, S70 y P70, pero en el carril de CEM las bandas están más marcadas y sin embargo son las mismas. Esto probablemente sea porque al inicio



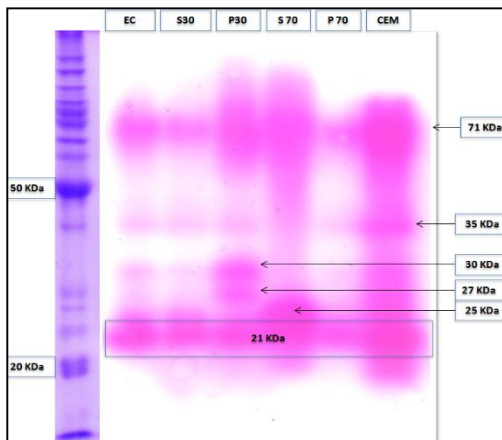
las muestras son más impuras y posterior a la CEM, las proteínas restantes; se alcanzan a percibir con mayor facilidad.



**Fig. 3. SDS PAGE**

### 33.2. Zimograma con el sustrato Bz – R – pNA para detección de tripsinas

En la fig. 4, se observa el zimograma realizado donde las muestras están organizadas de la misma forma que en el SDS – PAGE (M, EC, S30, P30, S70, P70 y CEM), véase cómo en el EC aparecen manchas con actividad proteolítica tipo tripsina pero conforme se avanza hacia la derecha en los pasos de purificación, estas manchas de actividad se vuelven más intensas en P30, S70 y aún más en CEM. Las zonas de actividad detectadas fueron de 21, 25, 27, 30, 35 y 71 KDa (pesos aparentes en base a un perfil conocido de proteínas de marca comercial que es el M), lo cual es semejante a lo obtenido por Castro y col. en el 2009, quienes detectaron que las tripsinas de *P. truncatus* son de peso molecular que oscilan entre 23 y 198 KDa.

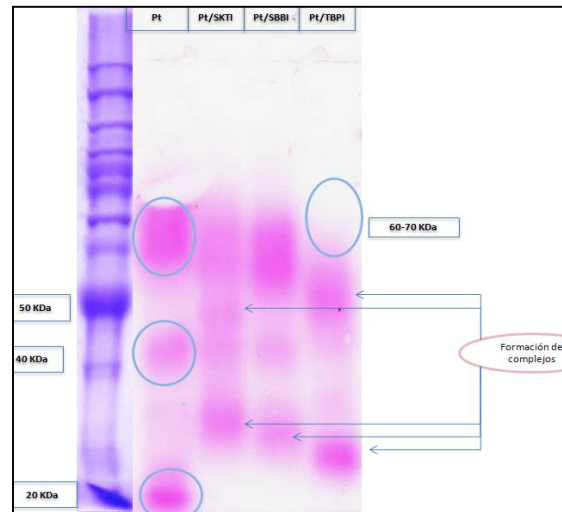


**Fig. 4. Zimograma de actividad**

### 3.3. Efecto de los inhibidores SKTI, SBBI y TBPI en una fracción de proteína con actividad tipo tripsina

Como parte complementaria de este trabajo, se probaron algunos inhibidores sobre las tripsinas de *P. truncatus* con la finalidad de ver su comportamiento al aplicar el sustrato Bz-R-pNA en un zimograma de inhibición. En la **fig. 5.**, se puede observar la formación de complejos peptidasa-inhibidor que muestran actividad proteolítica. Por ejemplo en el complejo Pt/TBPI se observa la aparición de unas bandas a 50 kDa y 25 kDa que no se encuentran en la fracción del control de Pt, lo que nos hace suponer la aparente unión del inhibidor con la serin peptidasa de 20 y 40 kDa, lo cual es parecido a lo reportado por Roldan, 2013 [17]; que identificó a una quimotripsina de *P. truncatus* de 34 KDa unida al TBPI de 8KDa como complejo activo.

No obstante, se observa que no hay ningún complejo mayor a 70 kDa que nos haga suponer la posible conjugación de la peptidasa de 60-70 kDa con el inhibidor, pensando en una inhibición de esta peptidasa, tal como lo indica Castro en 2009 [16]. El trabajo con SKTI y TBPI, siendo éste último el más efectivo contra la actividad tipo tripsina porque con 27.56 ng de inhibidor pudo lograr la inhibición de la actividad proteolítica al 50% siendo de 2 µg la enzima contra la que se probaron tales inhibidores.



**Fig. 5. Zimograma de inhibición**

Además demostró que éstos no funcionan contra quimotripsinas.

#### 4. Conclusiones

- ~ Se logró aislar parcialmente una fracción proteica con actividad tipo tripsina del insecto *P. truncatus*.
- ~ Se identificó la formación de tres complejos activos enzima – inhibidor.
- ~ Debido a que la cantidad del inhibidor fue menor a la cantidad de enzima, no se puede asegurar que hay inhibición.
- ~ Los inhibidores de peptidasas de plantas pueden ser una alternativa como control biológico para el *P. truncatus*.

#### 5. Referencias

- [1] Mello M. y Silva M. “Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms” *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14:71-81. 2002.
- [2] Dent, D., “Insect Pest Management” CAB International Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK Segunda Edición.. pp. 1-3. 2000.
- [3] Haruta M., Major I., Christopher M., Patton J., Constabel C. P., A “Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory” *Plant Molecular Biology* 46: 347-359. 2001.
- [4] Birkett M., Campbell C., Chamberlain K., Guerrieri E., Hick A., Martin J., Matthes M., Napier J., Pettersson J., Pickett J., Poppy G., Pow E., Pye B., Smart L., Wadhams G., Wadhams L., Woodcock C. M., “New roles for cisjasmone as an insect semiochemical and in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*” (USA) 97:9329-9334. 2000.
- [5] Kliebenstein D., Kroymann J., Brown P., Figuth A., Pedersen D., Gershenzon J., Mitchell-Olds T., “Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation” *Plant Physiology* 126: 811-825. 2001.
- [6] Nishida R., “Sequestration of defensive substances from plants by lepidoptera”. *Annual Review of Entomology* 47:57-92. 2002.
- [7] Blanco A. y Aguirre C., “Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas” *Acta Universitaria*, septiembre-diciembre, vol. 12, número 003 Universidad de Guanajuato Guanajuato, México. pp. 7. 2002.
- [8] Bode, W., Huber, R., “Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases”. *European Journal of Biochemistry*. 204: 433-451. 1992.
- [9] Neurath, H., “Evolution of proteolytic enzymes”. *Science*. 224, 350-357. 1984.
- [10] Blow, D., Birktoft, J., Hartley, B., “Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin”. *Nature*. 221, 337-340. 1969.
- [11] Craik, C., Largman, C., Fletcher, T., Rocznik, S., Barr, P., Fletterick, R., Rutter, W., “Redesigning trypsin: Alteration of substrate specificity”. *Science*, 228(4697), 291-297. 1985.
- [12] Aguirre, C., Castro, J., Contreras, L., Mendiola E., González, L., Blanco, A., “Partial characterization of a chymotrypsin-like protease in the larger grain borer (*Prostephanus truncatus* (Horn) in relation to activity of *Hyptis suaveolens* (L.) trypsin inhibitor”. *Journal of Stored Products Research*. 45, 133-138. 2009.
- [13] Ohlsson, B., Weström, B., Karlsson, B., “Enzymoblotting: A method for localizing proteinases and their zymogens using para-nitroanilide substrates after agarose gel electrophoresis and transfer to nitrocellulose”. *Analytical Biochemistry*. 152(2), 239-244. 1986.
- [14] Vinokurov, K., Oppert, B., Elpidina, E., “An overlay technique for postelectrophoretic analysis of proteinase spectra in complex mixtures using p-nitroanilide substrates”. *Analytical Biochemistry*. 337, 164-166. 2005.
- [15] Aguirre, C., “Caracterización del inhibidor de proteasas de chan (*Hyptis suaveolens* L.) y purificación y caracterización de dos enzimas intestinales del insecto *Prostephanus truncatus* Horn, sensibles al inhibidor”. Tesis de doctorado. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Irapuato. Irapuato, Guanajuato, México. 2005.
- [16] Aguirre, C., Castro, J., Contreras, L., Mendiola, E., González, L., Blanco, A., “Partial characterization of a chymotrypsin-like protease in the larger grain borer (*Prostephanus truncatus* (Horn) in relation to activity of *Hyptis suaveolens*

(L.) trypsin inhibitor”. Journal of Stored Products Research. 45, 133-138. 2009.

[17] Roldan, O., Blanco, A., González, L, Winker, R., “Caracterización Molecular de un Complejo

Enzima-Inhibidor Activo Formado Entre Quimotripsina Bovina Y TBPI”. 29 - 30. 2013.



## **Ciencias Agropecuarias - A**

1er Simposio Internacional de Desarrollo Tecnológico

Universidad Politécnica del Bicentenario

Carretera Estatal Silao-Romita Km. 2

San Juan de los Durán, Silao de la Victoria, Guanajuato, México

C.P. 36283

[www.upbicentenario.edu.mx](http://www.upbicentenario.edu.mx)

Obra terminada el 28 de Noviembre de 2014



Ciencias Agropecuarias - A

ISBN: 978-607-96471-3-1

