

# Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços  
e Possibilidades

Manuel Simões  
(organizador)

VOL IV


 EDITORA  
ARTEMIS  
2024

# Estudos em Biociências e Biotecnologia:

Desafios, Avanços  
e Possibilidades

Manuel Simões  
(organizador)

VOL IV

 EDITORA  
ARTEMIS  
2024



O conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons Atribuição-Não-Comercial NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0). Direitos para esta edição cedidos à Editora Artemis pelos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento, desde que sejam atribuídos créditos aos autores, e sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

A responsabilidade pelo conteúdo dos artigos e seus dados, em sua forma, correção e confiabilidade é exclusiva dos autores. A Editora Artemis, em seu compromisso de manter e aperfeiçoar a qualidade e confiabilidade dos trabalhos que publica, conduz a avaliação cega pelos pares de todos manuscritos publicados, com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

<b>Editora Chefe</b>	Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira
<b>Editora Executiva</b>	M. <sup>a</sup> Viviane Carvalho Mocellin
<b>Direção de Arte</b>	M. <sup>a</sup> Bruna Bejarano
<b>Diagramação</b>	Elisangela Abreu
<b>Organizador</b>	Prof. Dr. Manuel Simões
<b>Imagem da Capa</b>	Vivilweb/123RF
<b>Bibliotecário</b>	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

#### Conselho Editorial

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ada Esther Portero Ricol, *Universidad Tecnológica de La Habana “José Antonio Echeverría”*, Cuba  
Prof. Dr. Adalberto de Paula Paranhos, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil  
Prof. Dr. Agustín Olmos Cruz, *Universidad Autónoma del Estado de México*, México  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amanda Ramalho de Freitas Brito, Universidade Federal da Paraíba, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Clara Monteverde, *Universidad de Buenos Aires*, Argentina  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Júlia Viamonte, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal  
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, *Universidad Nacional del Altiplano*, Peru  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Ester Mallmann Centenaro, Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Begoña Blandón González, *Universidad de Sevilla*, Espanha  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Pimentel, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Catarina Castro, Universidade Nova de Lisboa, Portugal  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cirila Cervera Delgado, *Universidad de Guanajuato*, México  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Neves, Universidade Aberta de Portugal  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Padovesi Fonseca, Universidade de Brasília-DF, Brasil  
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil  
Prof. Dr. David García-Martul, *Universidad Rey Juan Carlos de Madrid*, Espanha  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Deuzimar Costa Serra, Universidade Estadual do Maranhão, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Dina Maria Martins Ferreira, Universidade Estadual do Ceará, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edith Luévano-Hipólito, *Universidad Autónoma de Nuevo León*, México  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eduarda Maria Rocha Teles de Castro Coelho, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal  
Prof. Dr. Eduardo Eugênio Spers, Universidade de São Paulo (USP), Brasil  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhoras, Universidade Federal de Roraima, Brasil  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elvira Laura Hernández Carballido, *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, México



Prof.ª Dr.ª Emilas Darlene Carmen Lebus, *Universidad Nacional del Nordeste/ Universidad Tecnológica Nacional, Argentina*  
Prof.ª Dr.ª Erla Mariela Morales Morgado, *Universidad de Salamanca, Espanha*  
Prof. Dr. Ernesto Cristina, *Universidad de la República, Uruguay*  
Prof. Dr. Ernesto Ramírez-Briones, *Universidad de Guadalajara, México*  
Prof. Dr. Fernando Hitt, *Université du Québec à Montréal, Canadá*  
Prof. Dr. Gabriel Díaz Cobos, *Universitat de Barcelona, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Gabriela Gonçalves, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal  
Prof. Dr. Geoffroy Roger Pointer Malpass, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Gladys Esther Leoz, *Universidad Nacional de San Luis, Argentina*  
Prof.ª Dr.ª Glória Beatriz Álvarez, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*  
Prof. Dr. Gonçalo Poeta Fernandes, Instituto Politécnico da Guarda, Portugal  
Prof. Dr. Gustavo Adolfo Juarez, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*  
Prof. Dr. Guillermo Julián González-Pérez, *Universidad de Guadalajara, México*  
Prof. Dr. Håkan Karlsson, *University of Gothenburg, Suécia*  
Prof.ª Dr.ª Iara Lúcia Tescarollo Dias, Universidade São Francisco, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Isabel del Rosario Chiyon Carrasco, *Universidad de Piura, Peru*  
Prof.ª Dr.ª Isabel Yohena, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*  
Prof. Dr. Ivan Amaro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil  
Prof. Dr. Iván Ramon Sánchez Soto, *Universidad del Bío-Bío, Chile*  
Prof.ª Dr.ª Ivânia Maria Carneiro Vieira, Universidade Federal do Amazonas, Brasil  
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz, *University of Miami and Miami Dade College, Estados Unidos*  
Prof. Dr. Jesús Montero Martínez, *Universidad de Castilla - La Mancha, Espanha*  
Prof. Dr. João Manuel Pereira Ramalho Serrano, Universidade de Évora, Portugal  
Prof. Dr. Joaquim Júlio Almeida Júnior, UniFIMES - Centro Universitário de Mineiros, Brasil  
Prof. Dr. Jorge Ernesto Bartolucci, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*  
Prof. Dr. José Cortez Godinez, Universidad Autónoma de Baja California, México  
Prof. Dr. Juan Carlos Cancino Diaz, Instituto Politécnico Nacional, México  
Prof. Dr. Juan Carlos Mosquera Feijoo, *Universidad Politécnica de Madrid, Espanha*  
Prof. Dr. Juan Diego Parra Valencia, *Instituto Tecnológico Metropolitano de Medellín, Colômbia*  
Prof. Dr. Juan Manuel Sánchez-Yañez, *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México*  
Prof. Dr. Juan Porras Pulido, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil  
Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil  
Prof.ª Dr.ª Livia do Carmo, Universidade Federal de Goiás, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Luciane Spanhol Bordignon, Universidade de Passo Fundo, Brasil  
Prof. Dr. Luis Fernando González Beltrán, *Universidad Nacional Autónoma de México, México*  
Prof. Dr. Luis Vicente Amador Muñoz, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Macarena Esteban Ibáñez, *Universidad Pablo de Olavide, Espanha*  
Prof. Dr. Manuel Ramiro Rodriguez, *Universidad Santiago de Compostela, Espanha*  
Prof. Dr. Manuel Simões, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Portugal  
Prof.ª Dr.ª Márcia de Souza Luz Freitas, Universidade Federal de Itajubá, Brasil  
Prof. Dr. Marcos Augusto de Lima Nobre, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Brasil  
Prof. Dr. Marcos Vinicius Meiado, Universidade Federal de Sergipe, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Mar Garrido Román, *Universidad de Granada, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Margarida Márcia Fernandes Lima, Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil  
Prof.ª Dr.ª María Alejandra Arecco, *Universidad de Buenos Aires, Argentina*  
Prof.ª Dr.ª Maria Aparecida José de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Maria Carmen Pastor, *Universitat Jaume I, Espanha*





Prof.ª Dr.ª Maria da Luz Vale Dias – Universidade de Coimbra, Portugal  
Prof.ª Dr.ª Maria do Céu Caetano, Universidade Nova de Lisboa, Portugal  
Prof.ª Dr.ª Maria do Socorro Saraiva Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão, Brasil  
Prof.ª Dr.ª MªGraça Pereira, Universidade do Minho, Portugal  
Prof.ª Dr.ª Maria Gracinda Carvalho Teixeira, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil  
Prof.ª Dr.ª María Guadalupe Vega-López, *Universidad de Guadalajara, México*  
Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Pato, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal  
Prof.ª Dr.ª Maritza González Moreno, *Universidad Tecnológica de La Habana, Cuba*  
Prof.ª Dr.ª Mauriceia Silva de Paula Vieira, Universidade Federal de Lavras, Brasil  
Prof. Dr. Melchor Gómez Pérez, *Universidad del Pais Vasco, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Ninfa María Rosas-García, Centro de Biotecnología Genómica-Instituto Politécnico Nacional, México  
Prof.ª Dr.ª Odara Horta Boscolo, Universidade Federal Fluminense, Brasil  
Prof. Dr. Osbaldo Turpo-Gebera, *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Peru*  
Prof.ª Dr.ª Patrícia Vasconcelos Almeida, Universidade Federal de Lavras, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Paula Arcoverde Cavalcanti, Universidade do Estado da Bahia, Brasil  
Prof. Dr. Rodrigo Marques de Almeida Guerra, Universidade Federal do Pará, Brasil  
Prof. Dr. Saulo Cerqueira de Aguiar Soares, Universidade Federal do Piauí, Brasil  
Prof. Dr. Sérgio Bitencourt Araújo Barros, Universidade Federal do Piauí, Brasil  
Prof. Dr. Sérgio Luiz do Amaral Moretti, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Silvia Inés del Valle Navarro, *Universidad Nacional de Catamarca, Argentina*  
Prof.ª Dr.ª Solange Kazumi Sakata, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)- USP, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Stanislava Kashtanova, *Saint Petersburg State University, Russia*  
Prof.ª Dr.ª Susana Álvarez Otero – *Universidad de Oviedo, Espanha*  
Prof.ª Dr.ª Teresa Cardoso, Universidade Aberta de Portugal  
Prof.ª Dr.ª Teresa Monteiro Seixas, Universidade do Porto, Portugal  
Prof. Dr. Valter Machado da Fonseca, Universidade Federal de Viçosa, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Vanessa Bordin Viera, Universidade Federal de Campina Grande, Brasil  
Prof.ª Dr.ª Vera Lúcia Vasilévski dos Santos Araújo, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil  
Prof. Dr. Wilson Noé Garcés Aguilar, *Corporación Universitaria Autónoma del Cauca, Colômbia*  
Prof. Dr. Xosé Somoza Medina, *Universidad de León, Espanha*

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

E82 Estudos em biociências e biotecnologia [livro eletrônico] : desafios, avanços e possibilidades IV/ Organizador Manuel Simões. – Curitiba, PR: Artemis, 2024.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

Edição bilingue

ISBN 978-65-81701-33-8

DOI 10.37572/EdArt\_311024338

1. Ciências biológicas. 2. Biotecnologia. 3. Biomedicina.  
I. Simões, Manuel.

CDD 574

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422



## PREFÁCIO

O volume IV da edição “Estudos em Biociências e Biotecnologia: Desafios, Avanços e Possibilidades” disponibiliza ao leitor informação científica avançada de caráter fundamentalmente aplicado. O livro está organizado em sete capítulos que focam essencialmente em conhecimento avançado em ciências biomédicas, neurociências, parasitologia, saúde animal e em processos avançados e sustentáveis de produção alimentar.

Manuel Simões

<https://orcid.org/0000-0002-3355-4398>

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1..... 1**

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE QUERCETINA ENZIMÁTICAMENTE MODIFICADA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CÉRVIX Y DE COLON

David Alejandro Macías Martín

Iliana del Carmen Barrera Martínez

Flor Yohana Flores Hernández

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3110243381](https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243381)

### **CAPÍTULO 2..... 13**

DEVELOPMENTAL HETEROCHRONY AND ITS RELATIONSHIP WITH THE CELLULAR SENESCENCE: A NEW PERSPECTIVE ON THE ETIOLOGY OF NEURODEGENERATION

Ana Karen Ramírez- Reyes

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3110243382](https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243382)

### **CAPÍTULO 3..... 22**

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA NECROSIS RENAL Y DEL BAZO (ISKNV) DEL PEZ CEBRA EN COLONIAS DE EXPERIMENTACIÓN DE ARGENTINA

Juan Martín Laborde

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3110243383](https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243383)

### **CAPÍTULO 4..... 36**

PRESENCIA DE *ANAPLASMA MARGINALE* Y *BABESIA SPP.* EN *HAEMATOBIA IRRITANS* COLECTADAS EN NUEVO LEÓN

José Pablo Villarreal Villarreal

Pilar Elizabeth Rincón González

Jesús Jaime Hernández Escareño

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3110243384](https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243384)

### **CAPÍTULO 5..... 45**

EVALUACIÓN DE LÍNEAS ÉLITE DE MAÍZ AZUL PARA VALLES ALTOS DE MÉXICO

José Luis Arellano-Vázquez

Germán Fernando Gutiérrez-Hernández

Luis Fernando Ceja-Torres  
Martín Filiberto García Mendoza  
Estela Flores-Gómez  
Patricia Vázquez-Lozano  
Donají Ariadna Ramírez López

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3110243385](https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243385)

**CAPÍTULO 6..... 54**

EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE PROTEÍNAS DE *SPHENARIUM PURPURASCENS* EXTRAÍDAS CON ULTRASONIDO EN SALCHICHAS TIPO VIENA

Salvador Osvaldo Cruz-López  
Yenizey Merit Alvarez-Cisneros

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3110243386](https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243386)

**CAPÍTULO 7 ..... 68**

PRODUCCIÓN ARTESANAL DE PILONCILLO CON ENFOQUE SOSTENIBLE

Luisiana Fabiola Palomo González  
José Antonio de los Reyes  
Marco A. Sánchez Castillo

 [https://doi.org/10.37572/EdArt\\_3110243387](https://doi.org/10.37572/EdArt_3110243387)

**SOBRE O ORGANIZADOR ..... 118**

**ÍNDICE REMISSIVO ..... 119**



# CAPÍTULO 1

## EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE QUERCETINA ENZIMÁTICAMENTE MODIFICADA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE CÉRVIX Y DE COLON<sup>1</sup>

Data de submissão: 15/09/2024

Data de aceite: 02/10/2024

### David Alejandro Macías Martín

Maestro en Ciencias en la  
Unidad de Biotecnología  
Médica y Farmacéutica del  
Centro de Investigación y  
Asistencia en Tecnología y  
Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ)  
Guadalajara, Jalisco, México  
<https://orcid.org/0000-0002-8287-8823>

### Iliana del Carmen Barrera Martínez

Doctora en la Unidad de Biotecnología  
Industrial del Centro de  
Investigación y Asistencia en  
Tecnología y Diseño del  
Estado de Jalisco (CIATEJ)  
Zapopan, Jalisco, México  
<https://orcid.org/0000-0001-5391-6299>

### Flor Yohana Flores Hernández<sup>2</sup>

Maestra en Ciencias en la  
Unidad de Biotecnología  
Médica y Farmacéutica del  
Centro de Investigación y  
Asistencia en Tecnología y  
Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ)  
Guadalajara, Jalisco, México  
<https://orcid.org/0000-0002-4231-1195>

**RESUMEN:** Actualmente, el cáncer es una enfermedad de alta incidencia en todo el mundo y uno de los principales tratamientos para destruir las células cancerosas es la quimioterapia. Sin embargo, las células sanas también son afectadas, provocando efectos secundarios graves que reducen la calidad de vida del paciente. Varios informes se centran en la investigación de nuevas moléculas como la quercetina, un conocido agente contra el cáncer que se consume en gran medida en la dieta humana. Sin embargo, tiene una baja biodisponibilidad debido a su escasa solubilidad, productos metabólicos inactivos y su corta vida media. Por tanto, es necesario desarrollar estrategias para mejorar los efectos antineoplásicos de la quercetina evitando daños graves a las células sanas. En este trabajo evaluamos si quercetina modificada enzimáticamente (EMQuer) conserva o ejerce una mayor actividad citotóxica contra células cancerosas que contra células no tumorales. La quercetina fue sometida a reacciones enzimáticas con lacasa. El material resultante (EMQuer-4 y EMQuer-8) y la quercetina se aplicaron en cultivos de células cancerosas HeLa y Caco-2 y células no tumorales Vero a diferentes concentraciones, seguido de un ensayo por citometría de flujo utilizando un kit de viabilidad celular para determinar la citotoxicidad. Cada condición experimental se ejecutó tres veces. Los resultados sugieren que EMQuer-4 y EMQuer-8 tienen un menor efecto inhibitorio sobre las células Vero no tumorales, en comparación con la quercetina,

<sup>1</sup> Agradecimientos a Proyecto Frontera 2019CF-2095609, financiado por CONAHCYT.

<sup>2</sup> Autor correspondiente.

y que se mejora la citotoxicidad contra las células de cáncer de cérvix HeLa y de cáncer de colon Caco-2. Una mejor eficacia de EMQuer en contraste con quercetina para suprimir el crecimiento de células cancerosas podría deberse al hecho de que se espera que la modificación enzimática, como la oxidación catalizada por lacasas, mejore la biodisponibilidad de la quercetina. Son necesarios más estudios utilizando derivados en diferentes líneas celulares tumorales y modelos animales de cáncer.

**PALABRAS CLAVE:** Quercetina. Citotoxicidad. Lacasa. Células de Cáncer.

## IN VITRO CYTOTOXIC ACTIVITY OF ENZYMATICALLY MODIFIED QUERCETIN ON CERVIX UTERI AND COLON CANCER CELLS

**ABSTRACT:** Currently, cancer is a high incidence disease throughout the world and one of the main treatments to destroy cancer cells is chemotherapy. However, non-tumoral cells also get damaged or their growth turns slow, causing severe side effects that reduce patient's life quality. Several reports focus on anticancer analysis of new molecules such as quercetin, a well-known anticancer agent largely consumed in human diet. However, it has low bioavailability due to its poor solubility, inactive metabolic products and short half-life. Thus, it is necessary to develop strategies to improve quercetin anticancer effects avoiding severe damage to non-tumoral cells. In this work we evaluated whether enzymatically modified quercetin (EMQuer) preserves or exerts higher cytotoxic activity against human cancer cells than against non-tumoral cells. Quercetin was subjected to an enzymatical reaction with laccase. The resulting material (EMQuer-4 and EMQuer-8) and quercetin were applied on cultured HeLa and Caco-2 cancer cells and non-tumoral Vero cells at different concentrations for 72 h, followed by flow cytometry viability assay using the BD Cell Viability Kit to determinate cytotoxicity. Each experimental condition was run three times. The results suggest that EMQuer has lower inhibitory effect on non-tumoral Vero cells, when compared with unmodified quercetin, and cytotoxic activity against HeLa cervix cancer cells and Caco-2 colon cancer cells is improved. Better efficiency of EMQuer than unmodified quercetin on suppressing cancer cells growth might come from the fact that enzymatical modification such as laccase-catalyzed oxidation is expected to improve bioavailability of quercetin. Further studies are necessary by using derivatives on different tumoral cell lines and cancer animal models.

**KEYWORDS:** Quercetin. Cytotoxic activity. Laccase. Cancer cells.

## 1 INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, siendo la tercera en México y la sexta a nivel global (INEGI 2024). En 2021, se reportaron 19.3 millones de nuevos casos y 10 millones de muertes a nivel mundial, incluyendo 90,645 en México (OMS 2022; INEGI 2022). Se espera que para 2040 estas cifras aumenten significativamente (OMS 2023).

Existen varios tratamientos para el cáncer, una de las principales es la quimioterapia, aunque tiene desventajas debido a la resistencia que desarrollan las

células cancerosas (Xu et al., 2021). Por eso, se combinan con otros tratamientos para mejorar la efectividad (NIH 2021). En este contexto, la quercetina ha mostrado resultados prometedores en estudios recientes, inhibiendo la migración y crecimiento de células cancerosas, lo que la convierte en un potencial tratamiento (Zhaorigetu et al., 2021; Lin et al., 2017). Sin embargo, su baja biodisponibilidad es una limitante, es por ello que diversas investigaciones se enfocan en mejorar esta característica (Manzoor et al., 2021). Es por ello que la quercetina modificada enzimáticamente busca mejorar su biodisponibilidad y actividad antineoplásica (Khlopova et al., 2016; Karaki et al., 2016; Kurisawa et al., 2003). La lacasa es una enzima utilizada para obtener la quercetina modificada, actúa como oxidorreductasa que oxida un sustrato mediante la transferencia de cuatro electrones de moléculas de oxígeno diatómico originando moléculas de agua y reacciones de tipo cascada, de Diels-Alder, de oxigenación, de adición de Michael o acoplamientos oxidativos (Cardullo et al. 2022).

## 2 METODOLOGÍA

Se realizó un diseño experimental mediante triplicados de cada muestra para cada prueba, implementándose un control con quercetina estándar, en las líneas celulares de mamífero: VERO, correspondientes a células de riñón de mono verde africano (ATCC® CCL-81) como control de células sanas; y HeLa, adenocarcinoma de cérvix humano (ATCC® CRM-CCL-2) y Caco-2, adenocarcinoma colorrectal (ATCC-HTB-37). Estas se cultivaron con procedimientos recomendados por el proveedor, en ambiente controlado con medio de crecimiento D'MEM alto en glucosa (Medio Eagle modificado de Dulbecco, marca SIGMA) suplementado con 1% de antibióticos (10,000 U/ml Penicilina, 10,000 µg/ml Estreptomina, producto P4333 de la marca Sigma del lote 109323) y 10% de SFB (Suero Fetal Bovino), a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, con humedad relativa, realizando cambios de medio cada 2-3 días. Los ensayos *In vitro* se realizan cuando los cultivos alcanzan el 80% de confluencia (Campos-Silva y cols., 2018; Monsees y cols., 2005).

### 2.1 OBTENCIÓN DE QUERCETINA MODIFICADA ENZIMÁTICAMENTE

Se mezclan vigorosamente 10 mL de solución de quercetina 20 mM; 5 mL de solución de lacasa 1.6 U/mL con 5 mL de solución de quercetina 20 mM y 5 mL de solución de lacasa 0.8 U/mL con 5 mL de solución de quercetina 20 mM durante 24 h a 35°C, protegidos de la luz.

Así pues, se obtiene como control de comparación quercetina estándar (Quer), así como quercetina modificada por lacasa en concentración de 0.4 U/mL (EMQuer-4) y quercetina modificada por lacasa en concentración de 0.8 U/mL (EMQuer-8).

## 2.2 CITOTOXICIDAD POR MTT

Se preparan cantidades suficientes de soluciones y se retira el medio de cada uno de los pozos, puesto que la quercetina causa interferencia en la medición del analito; se realiza un lavado con PBS 1X a cada pocillo. Se mide la absorbancia de la solución de la prueba a la longitud de onda de 570 nm.

## 2.3 VIABILIDAD POR CITOMETRÍA DE FLUJO

El marcaje para la determinación de la viabilidad utiliza el kit de viabilidad (BD™ *Cell Viability Kit* 349483). Se llevan al citómetro de flujo BD Accuri™ C6, se utilizan los gráficos SSC-A y FSC-A (*Side SCatter* y *Foreward SCatter*) para seleccionar la población celular y marcaje con solución acuosa de yoguro de propidio [4.3 mM (1X)] (detección FL3) y con solución de anaranjado de tiazol [42 μM (1X)] en DMSO (detección FL1) para mostrar las células vivas y muertas.

## 2.4 IDENTIFICACIÓN DE CONCENTRACIONES IC<sub>50</sub>

Se realiza el análisis por función probit utilizando el método gráfico de la pendiente para estimar la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub>) al 50% de viabilidad celular y se eligen las concentraciones implementadas más próximas. Cada una de las concentraciones seleccionadas deberán de ser igualmente evaluadas en las correspondientes líneas de células sanas Vero.

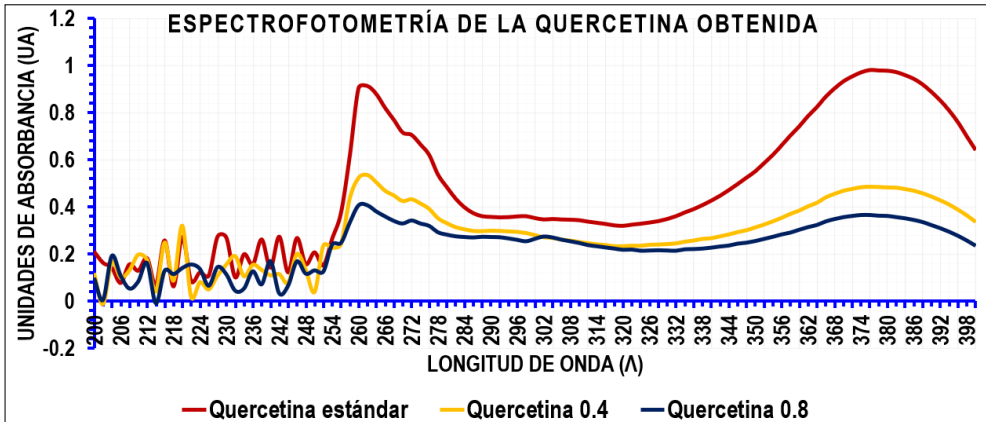
# 3 RESULTADOS

## 3.1 OBTENCIÓN DE QUERCETINA MODIFICADA ENZIMÁTICAMENTE

La quercetina se oxida al reaccionar con la lacasa tras 24 horas, cambiando su color de amarillo intenso a tonos ocre y pardo, siendo más oscuro en EMQuer-8 que en EMQuer-4. Según la figura 1, la quercetina presenta dos bandas características a longitudes de onda de 260 nm y 374 nm. Al oxidarse, la absorbancia de estas bandas disminuye, pero no aparece una nueva banda a 290 nm, como se reporta en estudios previos, lo que posiblemente se deba a la formación de una quinona conjugada.



Figura 1. Barrido espectrofotométrico de las soluciones de Quer, EMQuer-4 y EMQuer-8 elaboradas.

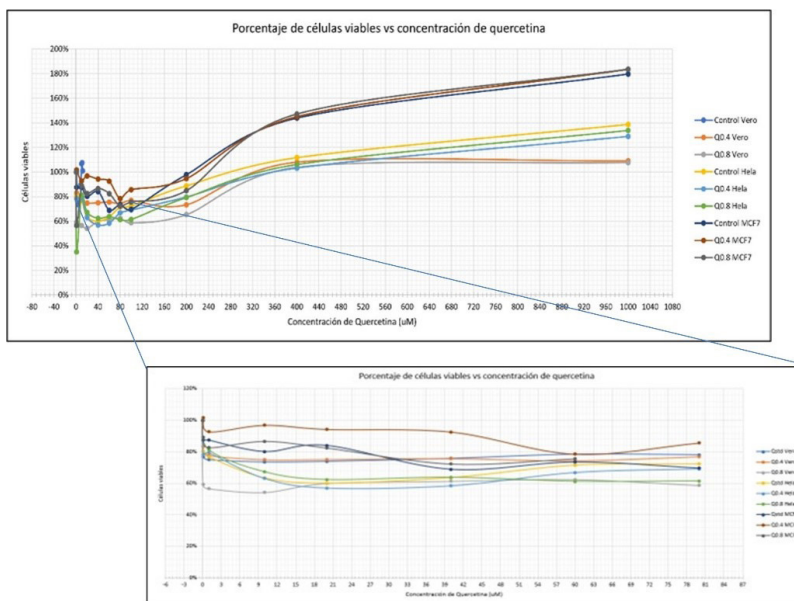


### 3.2 CITOTOXICIDAD POR MTT (3-(4,5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM BROMIDE)

Líneas celulares Vero y Hela fueron expuestas a las concentraciones de quercetina en las soluciones preparadas con medio de cultivo durante 72 h para después haber sido sometidas a la prueba de MTT en la que finalmente se mide la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

Como se muestra en la figura 3 contrariamente a lo esperado, la absorbancia en los cultivos aumenta con la concentración de quercetina, debido a su interacción con el compuesto MTT, fenómeno también observado en otros flavonoides (Peng et al., 2005). Sin embargo, a bajas concentraciones de quercetina, se notan ligeros descensos en la respuesta, lo que indica cierto grado de citotoxicidad antes de que interfiera en las mediciones a concentraciones más altas. Dado que la quercetina afecta la precisión del análisis, se decidió utilizar citometría de flujo para evaluar la viabilidad celular, permitiendo distinguir entre células vivas, muertas, y otros fragmentos.

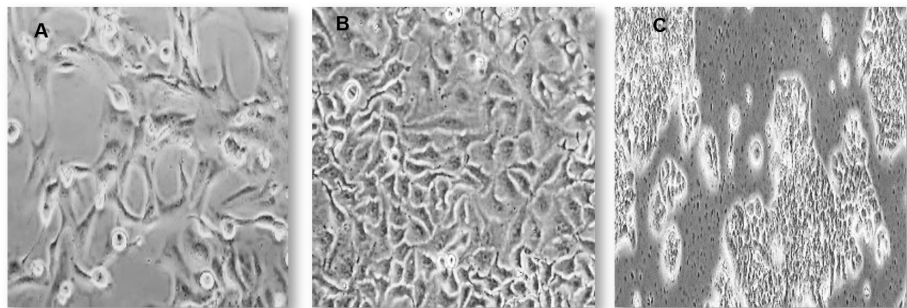
Figura 3. Se puede apreciar un incremento consistente de absorbancia nivel por nivel, sugiriendo que la biomolécula quercetina, en interacción con el compuesto MTT, produce absorbancia como lo haría el metabolito formazan a una longitud de onda de aproximadamente 570 nm.



### 3.3 VIABILIDAD POR CITOMETRÍA DE FLUJO

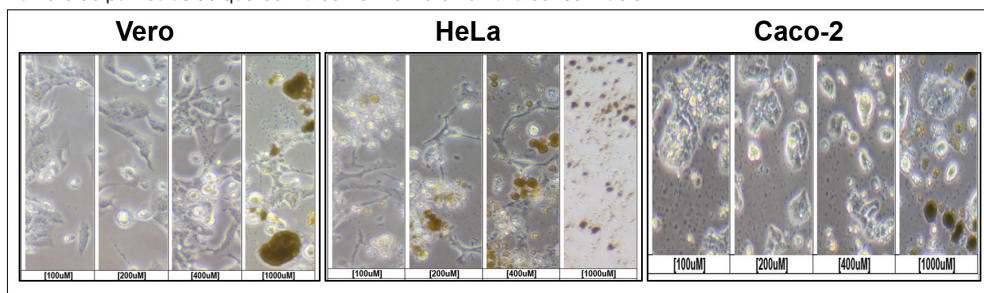
Se aplicó una solución de tratamiento de quercetina a cultivos celulares en tres placas de 12 pozos, incubadas durante 72 horas en reposo y protegidas de la luz. En la figura 4 se observan imágenes representativas de los controles celulares sin tratamiento, mostrando un cultivo de células Vero. Debido a que la quercetina es insoluble en agua, se observan precipitados finos en concentraciones de 100 μM, 200 μM, 400 μM y 1000 μM en los cultivos de células Vero, lo cual se mantuvo constante a lo largo del tratamiento. En cambio, en las células Hela (figura 5), el precipitado comenzó siendo fino y terminó aglomerándose en todas las concentraciones.

Figura 4. Fotografías representativas de los cultivos celulares implementados en las evaluaciones a un aumento de 200X. A. Células Vero (ATCC-CCL-81). B. Células Hela (ATCC-CCL-2). C. Células Caco-2 (ATCC-HTB-37).



Se observaron células Vero adheridas en todos los pozos donde fueron expuestas a diferentes concentraciones de quercetina de todos los tratamientos en el medio de cultivo, como se muestra en las figura 5 se puede apreciar cómo la confluencia celular disminuye y el detrito se incrementa conforme se aumenta la concentración de quercetina en el medio.

Figura 5. Fotografías representativas de los cultivos celulares expuestos a quercetina oxidada, a un aumento de 200X. Se observan cambios evidentes en la morfología, adhesión y proliferación. Se puede apreciar el aumento del número de partículas de quercetina conforme incrementa la concentración.



Asimismo, se observaron células HeLa adheridas en los pozos donde fueron expuestas a las concentraciones de quercetina de todos los tratamientos en el medio de cultivo, se puede apreciar cómo desde las más bajas concentraciones la confluencia celular disminuye y el detrito se incrementa conforme se aumenta la concentración de quercetina en el medio. Las células Hela se presentan muy afectadas, nivel a nivel, con morfologías cada vez más alteradas.

Se observaron células Caco-2 adheridas en los pozos donde fueron expuestas a las concentraciones de quercetina de todos los tratamientos en el medio de cultivo, se puede apreciar cómo la confluencia celular disminuye, las morfologías se alteran y el detrito se incrementa conforme se aumenta la concentración de quercetina en el medio. Posteriormente las suspensiones celulares pasaron a adquirirse en el citómetro Accuri C6.

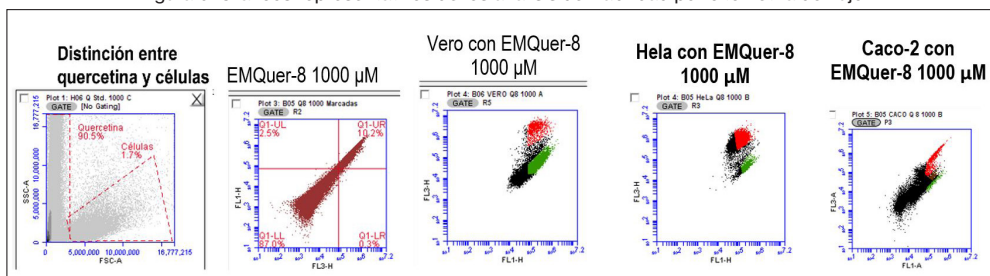
### 3.4 ADQUISICIÓN DE SOLUCIONES DE TRATAMIENTO CON QUERCETINA

Las soluciones de tratamiento con quercetina fueron adquiridas por el citómetro como blanco para visualizar y determinar las áreas de respuesta de la biomolécula a las diferentes concentraciones de prueba, obteniéndose los gráficos mostrados en la figura 6.

### 3.5 ADQUISICIÓN DE CÉLULAS Y PRUEBA DE VIABILIDAD

Como se muestra en la figura 6, se verificó que los campos de detección de las diferentes muestras no se invadieran para evitar conteos erróneos de las células evaluadas; así se aseguró que las respuestas de las células viables (color verde, positivas por naranja de tiazol) son agrupadas en un área exclusiva donde no se agrupan ni la quercetina (color marrón), ni las células alteradas y no viables (color rojo, positivas por yoduro de propidio), ni el medio de cultivo, ni el detrito. Dicha área ha sido abarcada por los controles positivos y evitada por los controles negativos.

Figura 6. Gráficos representativos de los análisis de viabilidad por citometría de flujo.



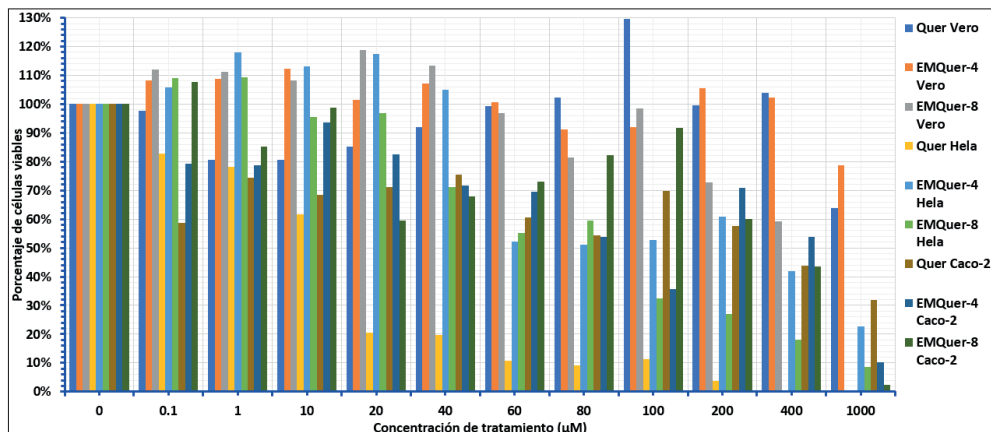
En la microscopía se observó que la línea celular Vero mantuvo un número considerable de células viables incluso a las concentraciones más altas de quercetina, con pequeñas variaciones en cada tratamiento. En cambio, la línea celular HeLa mostró una disminución progresiva en el número de células viables a medida que aumentaba la concentración de quercetina, especialmente con el tratamiento con quercetina. Ambos comportamientos se pueden apreciar en la figura 6.

El número de células viables de la línea Caco-2 disminuye de manera menos pronunciada, como se observa en la figura 6. Las agrupaciones de células viables (puntos verdes) disminuyen de tamaño con cada concentración de quercetina, especialmente con EMQuer-8. Al mismo tiempo, las agrupaciones de células no viables (puntos rojos) aumentan de tamaño con el incremento de quercetina. También se observan unidades de color negro fuera de las áreas de conteo, debido a alteraciones en la integridad celular.

La contabilización celular de las líneas Vero, Hela y Caco-2 se realizó calculando mediante el software *Microsoft Office Excel* el porcentaje de células viables respecto al control negativo correspondiente, obteniendo los gráficos mostrados en la figura 7.



Figura 7. Se puede apreciar cómo las células de las líneas HeLa y Caco-2 pierden más del 60% de su viabilidad, llegando a presentar 0% de viabilidad en HeLa con la quercetina Quer (Qstd) y un comportamiento similar de Caco-2 con la quercetina EMQuer8 (Q0.8); mientras que las células de la línea Vero se ven menos afectadas, perdiendo no más del 40% de su viabilidad.



Se puede apreciar cómo las células de las líneas HeLa y Caco-2 pierden más del 60% de su viabilidad, llegando a presentar 0% de viabilidad de HeLa con la Quer, así como de Caco-2 con la EMQuer-8; mientras que las células de la línea Vero se ven menos afectadas, perdiendo no más del 40% de su viabilidad. Los resultados encontrados arrojan los datos mostrados en la tabla 1, para las  $IC_{50}$  según el análisis probit.

Tabla 1. Concentraciones  $IC_{50}$  de las líneas celulares evaluadas. Quer: Quercetina estándar; EMQuer-4: Quercetina reaccionada con 0.4 U/mL de lacasa; EMQuer-8: Quercetina reaccionada con 0.8 U/mL de lacasa;  $IC_{50}$ : Concentración inhibitoria 50. Las concentraciones se encuentran expresadas en  $\mu M$ .

	Vero	HeLa	Caco-2
Compuesto	$IC_{50}$	$IC_{50}$	$IC_{50}$
Quer	110	50	200
EMQuer-4	290	20	100
EMQuer-8	240	20	400

Como se muestra en la tabla 1, la  $IC_{50}$  de quercetina estándar para la línea celular HeLa se encuentra muy próxima a una concentración de [20  $\mu M$ ]; resultado similar a algunos otros encontrados: [30  $\mu M$ ] según Xu y cols. y HERNI y cols. 2021; [26  $\mu M$ ] según Pani y cols. 2020, o [110  $\mu M$ ] según Eren y cols. 2021.

Asimismo, se pueden encontrar publicaciones con resultados variados para la línea celular Caco-2 como concentraciones de [50  $\mu M$ ] según Psahoulla y cols. 2007; [70  $\mu M$ ] según Volstatova y cols. 2019, o [200  $\mu M$ ] según Chabane y cols. 2009 y Gonzales y cols. 2016.

Las concentraciones inhibitorias identificadas coinciden con algunas publicaciones previas y los resultados nos muestran de manera contundente una distinción marcada en los efectos ejercidos por la quercetina entre la línea de células sanas Vero y las líneas de células cancerosas HeLa y Caco-2.

## 4 CONCLUSIÓN

Se identificaron  $IC_{50}$  de quercetina modificada enzimáticamente en líneas celulares de cáncer de colon (EMQuer-4: 400  $\mu$ M y EMQuer-8: 200  $\mu$ M) y cérvix (EMQuer-4: 60  $\mu$ M y EMQuer-8: 80  $\mu$ M). Estas concentraciones coinciden con lo reportado previamente. Los resultados indican una disminución notable de los efectos citotóxicos de la quercetina EMQuer en las células sanas Vero, pero no en las células cancerosas HeLa y Caco-2.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Campos-Silva I., M. Palomar-Pardavé, R. Pérez Pastén-Borja, O. Kahvecioglu Feridun, D. Bravo-Bárceñas, C. López-García, R. Reyes-Helguera, Tribocorrosion and cytotoxicity of FeB-Fe2B layers on AISI 316 L steel, *Surface and Coatings Technology*, Volume 349, 2018, Pages 986-997, ISSN 0257-8972, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.05.085>

Cardullo Nunzio, Muccilli Vera & Tringali Corrado (2022) Laccase-mediated synthesis of bioactive natural products and their analogues, *RSC Chem. Biol.*, 2022,3, 614-647, <https://doi.org/10.1039/D1CB00259G>

Chabane, Y. N., Bouchard, H., & Sancey, L. (2009). Cellular uptake and cytotoxicity of flavonoids in the human colon cancer cell line Caco-2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1790(9), 870-879. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.05.001>

Eren, M., Kilic, E., & Ozturk, N. (2021). Quercetin-induced apoptosis in HeLa cells: A comprehensive study on the molecular mechanisms. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(2), 147-157. <https://doi.org/10.1002/jcb.29900>

Gonzales, C., Lima, F. S., & de Castro, M. (2016). Quercetin effects on oxidative stress and cell death in Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 93, 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.04.019>

Herni, L., Suzuki, K., & Takano, Y. (2021). Quercetin inhibits the proliferation of HeLa cells through cell cycle arrest and apoptosis induction. *Journal of Medicinal Food*, 24(8), 802-811. <https://doi.org/10.1089/jmf.2021.0011>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2022). Estadísticas de mortalidad. <https://www.inegi.org.mx/temas/mortalidad/>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2024). Mortalidad por cáncer en México. <https://www.inegi.org.mx/>

Karaki Nadine, Abdulhadi Aljawish, Catherine HµMeau, Lionel Muniglia, Jordane Jasniowski, Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, properties, and potential applications: A review, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 90, 2016, Pages 1-18, ISSN 0141-0229, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.004>

Khlupova Maria, Irina Vasil'eva, Galina Shumakovich, Olga Morozova, Vyacheslav Chertkov, Alla Shestakova, Alexander Kisin, Alexander Yaropolov, Laccase-mediated biotransformation of dihydroquercetin (taxifolin), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Volume 123, 2016, Pages 62-66, ISSN 1381-1177, <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.11.010>

Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H. and Kobayashi, S. (2003), Laccase-catalyzed Synthesis and Antioxidant Property of Poly(catechin). *Macromol. Biosci.*, 3: 758-764. <https://doi.org/10.1002/mabi.200300038>

Lin, J., Chen, Y., Cai, T., & Lee, C. (2017). Quercetin suppresses tumor growth by inhibiting the expression of heat shock protein and blocking autophagy in human breast cancer cells. *Oncology Reports*, 37(2), 928–934. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5453>

Manzoor Muhammad Faisal, Abid Hussain, Aysha Sameen, Amna Sahar, Sipper Khan, Rabia Siddique, Rana Muhammad Aadil, Bin Xu, Novel extraction, rapid assessment and bioavailability improvement of quercetin: A review, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 78, 2021, 105686, ISSN 1350-4177, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105686>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417721002285>)

Monsees T, K, Barth K, Tippelt S, Heidel K, Gorbunov A, Pompe W, Funk R, H, W: Effects of Different Titanium Alloys and Nanosize Surface Patterning on Adhesion, Differentiation, and Orientation of Osteoblast-Like Cells. *Cells Tissues Organs* 2005;180:81-95. doi: 10.1159/000086749

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2022). Global cancer statistics. <https://www.who.int/>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2023). Cancer facts and projections. <https://www.who.int/>

Pani, G., Galeotti, T., & Chiarugi, P. (2020). Quercetin-induced autophagy and apoptosis in HeLa cells: The role of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Free Radical Biology and Medicine*, 161, 153-164. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.08.004>

Pani, S., Mohapatra, S., Sahoo, A., Baral, B., Debata, P. R.. Shifting of cell cycle arrest from the S-phase to G2/M phase and downregulation of EGFR expression by phytochemical combinations in HeLa cervical cancer cells. *J Biochem Mol Toxicol*. 2022; 36:e22947. <https://doi.org/10.1002/jbt.22947>

Peng, L., Hao, Y., & Wang, Q. (2005). Flavonoids' interactions with MTT and their effect on cell viability assays. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 63(3), 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.12.002>

Psahoulla, E., Costas, M., & Paraskevi, A. (2007). Effects of quercetin on the growth and survival of human colorectal cancer cells (Caco-2). *Cancer Letters*, 258(2), 129-137. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.09.006>

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.

Timbola, A. K., Souza, C. D. de., Giacomelli, C., & Spinelli, A.. (2006). Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(J. Braz. Chem. Soc., 2006 17(1)). <https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000100020>

Volstatova, K., Mertlikova-Kaiserova, H., & Martinek, J. (2019). Differential cytotoxicity of flavonoids in Caco-2 cells: A role of metabolism. *Toxicology in Vitro*, 57, 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.02.003>

Xu, J., Cao, K., & Wu, C. (2021). Mechanistic insights into quercetin's anticancer effects on HeLa cells: A role of p53 signaling. *European Journal of Pharmacology*, 902, 174091. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174091>

Xu, W., Xie, S., Chen, X., Pan, S., Qian, H., & Zhu, X. (2021). Effects of Quercetin on the Efficacy of Various Chemotherapeutic Drugs in Cervical Cancer Cells. *Drug design, development and therapy*, 15, 577–588. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S291865>

Zhaorigetu, S., Omoigui, S., & Fang, X. (2021). Quercetin's role in cancer treatment: Mechanisms and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6531. <https://doi.org/10.3390/ijms22126531>

## CAPÍTULO 2

### DEVELOPMENTAL HETEROCHRONY AND ITS RELATIONSHIP WITH THE CELLULAR SENESCENCE: A NEW PERSPECTIVE ON THE ETIOLOGY OF NEURODEGENERATION<sup>1</sup>

Data de submissão: 07/10/2024

Data de aceite: 21/10/2024

**Ana Karen Ramírez- Reyes<sup>2</sup>**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Departamento de Biología

Celular y Fisiología

Universidad Nacional

Autónoma de México

Ciudad de México, México 04510

<https://orcid.org/0009-0008-9402-4607>

**ABSTRACT:** The prevailing neurodegeneration model proposes neuronal death as the origin of behavioral and cognitive dysfunctions. Nevertheless, some studies have shown that patients with Parkinson's and Alzheimer's disease exhibit cognitive impairment in the absence of neuronal death. These data suggest that during the initial and intermediate phases of neurodegeneration, neuronal death may not be the origin of the symptoms. An alternative mechanism to explain the dysfunction observed

<sup>1</sup> This paper is part of the productivity of the studies directed to obtain the Doctoral degree at the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. I am awarded a fellowship from Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (Fellowship No. 841642). I thank Dr. Gabriel Gutiérrez-Ospina (Universidad Nacional Autónoma de México) for helpful and critical comments on the manuscript.

<sup>2</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México 04510.

in the early stages of neurodegeneration, in neuronal death absence, is cellular senescence. A cell in a senescent state is characterized by being resistant to apoptosis, secreting pro-inflammatory factors, and favoring the decline of regenerative potential. Therefore, the accumulation of senescent cells within neuronal circuits could favor a malfunction of neighboring cells, promoting a generalized dysfunction in the central nervous system. It's known that the neurodegenerative process occurs heterochronically in the cerebral cortex, the entorhinal and motor cortices being the most affected during the early stages of this process. Interestingly, the cells that make up both cortices during adulthood are those cells that originated early during embryonic development. On the contrary, the somatosensory cortex, which isn't very sensitive to damage by neurodegeneration, is mainly made up of cells that originated in the last embryonic days. In this review, we explore the limitations of the cell death model to explain the onset of neurodegenerative processes and propose that the neurons of early embryonic origin express the senescent phenotype in advance in adulthood. In this way, the asynchronous neurodegeneration pattern of the cerebral cortex could be explained by the cellular chronoarchitecture that's established from the embryonic period to the adulthood.

**KEYWORDS:** Neurodegeneration. Neuronal death. Cellular senescence. Heterochrony. Chronoarchitecture.



# LA HETEROCRONÍA DEL DESARROLLO Y SU RELACIÓN CON LA SENESCENCIA CELULAR: UNA NUEVA PERSPECTIVA DE LA ETIOLOGÍA DE LA NEURODEGENERACIÓN

**RESUMEN:** El modelo actual de la neurodegeneración propone a la muerte neuronal como el origen de las disfunciones conductuales y cognitivas. Sin embargo, algunos estudios muestran, que pacientes con enfermedad de Parkinson o Alzheimer presentan deterioro cognitivo en ausencia de muerte neuronal. Estos datos sugieren que, durante las fases iniciales e intermedias de la neurodegeneración, la muerte neuronal podría no ser el origen de la sintomatología. Un mecanismo alterno para explicar la disfunción observada en etapas tempranas de la neurodegeneración, en ausencia de muerte neuronal, es la senescencia celular. Una célula en estado senescente se caracteriza por ser resistente a apoptosis, secretar factores proinflamatorios y favorecer el decline del potencial regenerativo. Por lo tanto, la acumulación de células senescentes en los circuitos neuronales podría favorecer un mal funcionamiento de las células vecinas, promoviendo así una disfunción generalizada en el sistema nervioso central. Es conocido que el proceso neurodegenerativo ocurre de manera heterocrónica en la corteza cerebral, siendo las cortezas entorrinal y motora las más afectadas durante las etapas tempranas de este proceso. De manera interesante, las células que integran ambas cortezas durante la etapa adulta son aquellas que se originaron de forma más temprana durante el desarrollo embrionario. Por el contrario, la corteza somatosensorial, la cual es poco sensible a daño por neurodegeneración, está integrada por células que se originaron en los últimos días embrionarios. En esta revisión, exploramos las limitaciones del modelo de muerte celular para explicar el inicio de los procesos neurodegenerativos y proponemos que las neuronas de origen embrionario temprano pueden expresar de manera anticipada el fenotipo senescente en la etapa adulta. De esta forma, el patrón de neurodegeneración asincrónico característico de las enfermedades neurodegenerativas, podría explicarse por la cronoarquitectura celular que se establece desde el periodo embrionario y hasta la etapa adulta.

**PALABRAS CLAVE:** Neurodegeneración. Muerte neuronal. Senescencia celular. Heterocronía. Cronoarquitectura.

## 1 INTRODUCTION

Neurodegeneration is characterized by a progressive deterioration of neuronal function, presumably caused by the degeneration of synapses, axons, and ultimately the death of nerve cells (Andreone et al., 2020). The loss of neuronal populations occurs in the central and peripheral nervous system, is characteristic of diseases such as Parkinson's and Alzheimer's, and leads to cognitive decline and dementia (Braak et al., 2003a; Braak et al., 2006).

Neuronal death is a process that occurs normally during development, it is highly regulated and allows to maintain the tissue homeostasis, eliminating cells that serve as transient targets, supernumerary, error-prone or defective (Buss et al., 2006; Miura, 2012;

Yamaguchi & Miura, 2015). However, it has been proposed that neuronal death in adulthood leads to functional decline, and that it is this death that underlies the progression of neurodegenerative disease (Andreone et al., 2020).

Neuronal loss, a characteristic of the neurodegenerative process, is preceded by a number of initiating mechanisms including mitochondrial dysfunction, oxidative stress, neuroinflammation, protein aggregation and failures in the proteosomal degradation system (Andreone et al., 2020). These mechanisms, which are the basis of functional and cognitive impairment associated with neurodegeneration, can occur in parallel and are presumed to lead to neuronal death.

## **2 LIMITATIONS OF CELL DEATH TO EXPLAIN THE NEURODEGENERATIVE PROCESS**

The predominant focus in research has been on describing a series of mechanisms that lead to cell death, which has been raised to explain the etiology and progression of neurodegenerative disease. However, even though the model points to neuronal death as the final manifestation of the neurodegenerative process, there is a disconnect between the initiating mechanisms and the subsequent activation of cell death (Andreone et al., 2020). While it is true that neurons face a wide variety of stimuli that can lead to death, experimental evidence suggests that the initial and intermediate stages of neurodegeneration progress in the absence of neuronal death. Here we will briefly review some of the limitations that the model of neuronal death has to explain the origin of neurodegenerative diseases and propose an alternative mechanism of the etiology of neurodegeneration.

### **2.1 NEURON LOSS DOES NOT PREDICT COGNITIVE DECLINE**

Neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's are characterized by progressive impairment of cognitive function, allegedly caused by loss and widespread dysfunction of neural cells. However, the first flaw that emanates from the cell death approach is that, in fact, the loss of neuronal populations does not predict the presence of cognitive decline and dementia. This was shown by the results obtained by West et al. (1994). When estimating the number of neurons in the hippocampus, it is observed that the subregions CA2, CA3 and dentate spin do not show a significant loss of neurons in patients with Alzheimer's, when compared with individuals of the same age without cognitive impairment or neurological disease. This evidence points out that the number of hippocampal neurons does not predict the level of cognitive impairment.

## 2.2 NEURONS OF PATIENTS WITH ADVANCED NEURODEGENERATIVE DISEASE EXPRESS ANTI-APOPTOTIC MARKERS

One of the main limitations of using cell death as a support to explain neurodegeneration is that the proposed mechanisms require short lead times for cells to die. This makes them incompatible with the slow progression of neuronal degeneration and the long clinical latency of different neurodegenerative diseases (Zhu et al., 2006). This temporal disjunction, coupled with the experimental evidence showing the expression of antiapoptotic markers in neurons of patients with neurodegenerative disease, raises doubts that cell death gives rise to the neurodegenerative process.

Jellinger & Stadelmann (2001) evaluated postmortem, hippocampal and *substantia nigra* neurons of patients with Alzheimer's and Parkinson's, respectively. In both cases, less than 1% of the cells counted were positive for active caspase 3. In contrast, almost all neurons expressed the anti-apoptotic markers Bcl-2 and Bcl-X. In agreement with these observations, Zhu et al. (2004) reported that the Bcl-w protein acts as a promoter of cellular survival in neurodegeneration. This was revealed by a series of experiments in which a significant increase in the expression of Bcl-w in pyramidal neurons of the hippocampus in patients with Alzheimer's was reported. This increase occurred in association with the formation of neurofibrillary tangles and neuritic plaques.

Taken together, these results suggest that neurons affected by protein accumulation try to survive by mobilizing a protective mechanism mediated by anti-apoptotic proteins (Zhu et al., 2004). This fact would decrease the possibility of observing neuronal death during the early and intermediate stages of the neurodegenerative process.

## 2.3 THE ACCUMULATION OF TOXIC PROTEIN AGGREGATES IS NOT ASSOCIATED WITH COGNITIVE IMPAIRMENT OR CELL DEATH MARKERS

Abnormal accumulation of toxic protein aggregates and neuronal death are the main histopathological markers of neurodegenerative diseases. However, in the case of Alzheimer's disease, it has been documented that some individuals retain cognitive function despite the presence of neurofibrillary tangles (Zolochowska et al., 2018). This evidence exposes another limitation of the current model of neurodegeneration: the main histopathological biomarker of neurodegenerative disease does not predict in all cases the presence or development of cognitive impairment. The above could be explained by evidence that most neurons containing neurofibrillary tangles are not positive for cell death markers. This was shown by the data published by de Calignon et al. (2009),

in which using a murine model of Alzheimer's it was revealed that, out of all cells with neurofibrillary tangles, only 6% die.

We can conclude that the predominant model that proposes cell death as the cause of neurodegeneration has three fundamental limitations: 1) cell death does not predict the presence of cognitive deterioration and dementia; 2) neurons with b-amyloid plaques express anti-apoptotic proteins that seem to promote cell survival; and 3) the presence of protein aggregates does not lead to cell death. In addition to these model prediction deficiencies, we must consider that the therapeutic measures proposed to date have not succeeded in solving the progression of neurodegenerative diseases. The body of evidence therefore suggests that these explanations are insufficient to provide satisfactory clarification of the scientific problem they seek to model.

### **3 CELLULAR SENESCENCE**

An alternative biological process that would unify the evidence that contradicts the mechanism of neuronal death in the neurodegeneration model is cellular senescence. Cellular senescence was described by Hayflick & Moorhead in 1961. The experiments carried out by these researchers showed that fibroblasts have a finite capacity to divide into cultures. Currently, cell senescence can be defined as a homeostatic process that reduces proliferation and helps prevent the spread of damaged cells. (Martínez-Cué & Rueda, 2020).

Different types of cells in the CNS can acquire senescent phenotype: astrocytes, oligodendrocytes, neurons and neural stem cells (Martínez-Cué & Rueda, 2020). Senescent cells are often resistant to cell death signals (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007), by expressing numerous anti-apoptotic proteins such as Bcl-2, Bcl-w and Bcl-xL (Si et al., 2021). Senescent cells express a distinctive phenotype that includes persistent DNA damage, senescence associated secretory phenotype (SASP) and changes in cellular metabolism.

### **4 THE ROLE OF CELLULAR SENESCENCE IN NEURODEGENERATIVE PROCESSES**

According to the characteristics described as part of the senescent phenotype, cells in this state could contribute to the neurodegenerative process, mainly in three ways: 1) Because senescent cells are resistant to apoptosis, senescence could promote the retention of aging neurons and/or promote the conservation of larger numbers of neurons than required in neural circuits. 2) Senescent cells are a source of pro-inflammatory and pro-oxidant stimuli, which could modify the microenvironment of the brain as well

as its structure and function. 3) Cells in senescent state could affect other cells in their environment, inducing a senescent phenotype in surrounding cells.

## 5 DEVELOPMENTAL HETEROCHRONY OF THE CEREBRAL CORTEX AND ITS CONTRIBUTION TO NEURODEGENERATION

Considering that cellular senescence has been linked to aging and neurodegeneration, and that sustained damage to DNA has been proposed as the origin of this phenotype, senescence is likely to operate as a cellular aging mechanism associated with the chronological age of cells. That is, older cells that have been subjected for longer time to different intrinsic and extrinsic environmental stress factors will be more likely to accumulate damage in their DNA, which will favor the establishment of senescent phenotype.

Bayer (1980) and Bayer & Altman (1991) studied the cytoarchitecture of murine cerebral cortex. According to their day of origin, the cells were classified into: old, cells born between embryonic day 13 and 15; intermediate age, born between embryonic days 16 and 17; and young, those cells that originated between the embryonic days 18 and 20. Analysis of neurogenic gradients indicates that somatosensory, entorhinal and motor cortices show an asynchronous organization pattern that provides a different cellular age to each cortex.

The entorhinal and motor cortices are mostly composed of old cells (40% and 51%, respectively). However, the motor cortex has twice as many new cells (12%) as the entorhinal cortex (6%). In contrast, somatosensory cortex is constituted by a low percentage of old cells (14%), and a higher percentage of new cells than observed in the entorhinal and motor cortices (29%). Therefore, the organization of cells according to their day of origin, indicate that the entorhinal cortex is older than the somatosensory and motor cortices. The motor cortex is intermediate in age and the somatosensory cortex is younger. More interesting is the fact that this differential chronoarchitecture correlates with the previously described asynchronous neurodegenerative process (Braak et al., 2003a, 2003b).

Based on neuropathological analyses performed in postmortem tissue of patients with Parkinson's and Alzheimer's disease, Braak et al. (2003a, 2003b & 2006) identified stereotyped patterns of neuronal degeneration that develop sequentially in the central and peripheral nervous systems and are consistent with clinical severity of disease. According to the progression of the same, these patterns have been classified into six stages. Speaking specifically of the cerebral cortex, neuronal degeneration begins in stage 4 with

the entorhinal cortex. In stage 6, the pathological process extends to the motor cortex and is rarely seen in the somatosensory cortex. In short, the entorhinal cortex in which neurodegenerative pathology occurs earlier is formed by chronologically older cells. On the contrary, the somatosensory cortex which rarely suffers from neuronal degeneration is formed preferably by young cells.

If we consider that old cells are more susceptible to expressing senescent phenotype due to the accumulation of damage in their DNA, those cortices formed by a greater number of old cells, will accumulate senescent cells before those cellularly younger. Therefore, the entorhinal cortex is likely to accumulate a greater number of senescent cells than motor and somatosensory cortices. Based on the evidence that the somatosensory cortex is a region not susceptible to neurodegeneration damage, and conforming with a low percentage of old cells, we propose that this region will accumulate a small number of senescent cells. Thus, the asynchronous pattern of neurodegeneration in the cerebral cortex could be explained by the cellular chronoarchitecture that is established from the embryonic period to early adulthood.

Taken to the neurodegenerative process, this fact could explain the symptomatology characteristic of the initial and intermediate stages in the absence of neuronal death, and the temporal progression of neurodegenerative processes. Cellular senescence could explain why patients with cognitive impairment and dementia do not show, in all cases, loss of neuronal populations. Cells may be present in senescent state, and not function properly in neural circuits. Cell senescence can also explain why cell death is not observable in all cases. A cell in senescent state can be counted, even if it is in a dysfunctional state. Thus, the dysfunction observed in early and intermediate stages of neurodegeneration could be explained as the result of the accumulation of dysfunctional cells in senescent state, rather than as a consequence of cell death.

## 6 CONCLUSION

Studies in patients with Parkinson's and Alzheimer's disease show that during the initial and intermediate stages of neurodegeneration, neuronal death may not be the cause of symptomatology. We alternately proposed cell senescence as a unifying mechanism that would explain the onset of neurodegenerative process in the absence of neuronal death. It is known that neurodegeneration occurs asynchronously in the cerebral cortex, with the entorhinal and motor cortices being most affected during the early stages of this process. Interestingly, the cells that make up both cortices during adulthood are those that originated earlier during embryonic development.



Taking this into account, the present review evaluated the possibility that cortical regions composed of chronologically older cell populations accumulate a greater number of senescent cells. Thus the pattern of heterocronic neurodegeneration characteristic of the cerebral cortex could be explained by the cellular chronoarchitecture that is established from the embryonic period to adulthood. Thus, this work is an approach to evaluate the possibility that the initial and intermediate stages of neurodegenerative disease are the result of the accumulation of cells in senescent state, and not a consequence of the massive loss of neuronal populations. In the future, it will be important evaluate alternative proposals that allow us to elucidate the mechanisms regulating the origin and progression of neurodegenerative processes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreone, B. J., Larhammar, M., & Lewcock, J. W. (2020). Cell Death and Neurodegeneration. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 12(2), a036434. doi:10.1101/cshperspect.a036434

Bayer S. A. (1980). Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with 3H-thymidine autoradiography. *The Journal of comparative neurology*, 190(1), 87-114. doi: 10.1002/cne.901900107

Bayer, S. A. (Shirley A., & Altman, J. (1991). *Neocortical development* / Shirley A. Bayer, Joseph Altman. Raven Press.

Braak, H., de Vos, R. A., Bohl, J., & Del Tredici, K. (2006). Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neuroscience letters*, 396(1), 67-72. doi: 10.1016/j.neulet.2005.11.012

Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., & Braak, E. (2003a). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 24(2), 197-211. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00065-9

Braak, H., Rüb, U., Gai, W. P., & Del Tredici, K. (2003b). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria: 1996), 110(5), 517-536. doi: 10.1007/s00702-002-0808-2

Buss, R. R., Sun, W., & Oppenheim, R. W. (2006). Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annual review of neuroscience*, 29, 1-35. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112800

Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(9), 729-740. doi: 10.1038/nrm2233

de Calignon, A., Spire-Jones, T. L., Pitstick, R., Carlson, G. A., & Hyman, B. T. (2009). Tangle-bearing neurons survive despite disruption of membrane integrity in a mouse model of tauopathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 68(7), 757-761. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181a9fc66

Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25, 585-621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6

- Jellinger, K. A., & Stadelmann, C. (2001). Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 3(1), 31–40. doi: 10.3233/jad-2001-3106
- Martínez-Cué, C., & Rueda, N. (2020). Cellular Senescence in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 16. doi: 10.3389/fncel.2020.00016
- Miura M. (2012). Apoptotic and nonapoptotic caspase functions in animal development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(10), a008664. doi: 10.1101/cshperspect.a008664
- Si, Z., Sun, L., & Wang, X. (2021). Evidence and perspectives of cell senescence in neurodegenerative diseases. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 137, 111327. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111327
- West, M. J., Coleman, P. D., Flood, D. G., & Troncoso, J. C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* (London, England), 344(8925), 769–772. doi: 10.1016/s0140-6736(94)92338-8
- Yamaguchi, Y., & Miura, M. (2015). Programmed cell death in neurodevelopment. *Developmental cell*, 32(4), 478–490. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.019
- Zhu, X., Raina, A. K., Perry, G., & Smith, M. A. (2006). Apoptosis in Alzheimer disease: a mathematical improbability. *Current Alzheimer research*, 3(4), 393–396. <https://doi.org/10.2174/156720506778249470>
- Zhu, X., Wang, Y., Ogawa, O., Lee, H. G., Raina, A. K., Siedlak, S. L., Harris, P. L., Fujioka, H., Shimohama, S., Tabaton, M., Atwood, C. S., Petersen, R. B., Perry, G., & Smith, M. A. (2004). Neuroprotective properties of Bcl-w in Alzheimer disease. *Journal of neurochemistry*, 89(5), 1233–1240. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02416.x
- Zolochewska, O., Bjorklund, N., Woltjer, R., Wiktorowicz, J. E., & Tagliatela, G. (2018). Postsynaptic Proteome of Non-Demented Individuals with Alzheimer's Disease Neuropathology. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 65(2), 659–682. doi: 10.3233/JAD-180179

## CAPÍTULO 3

### DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA NECROSIS RENAL Y DEL BAZO (ISKNV) DEL PEZ CEBRA EN COLONIAS DE EXPERIMENTACIÓN DE ARGENTINA

Data de submissão: 01/10/2024

Data de aceite: 14/10/2024

**Juan Martín Laborde**

Laboratorio de Animales de  
Experimentación (LAE)

Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Nacional de La Plata (UNLP)  
La Plata, Buenos Aires, Argentina

**RESUMEN:** El pez cebra (*Danio rerio*) actualmente es considerado como modelo animal en ensayos de desarrollo embrionario, análisis de la función genética y mutagénesis. Sus características fisiológicas, tales como la alta fecundidad, fertilización externa y mecanismos moleculares del desarrollo del embrión similares a todos los vertebrados, permitieron que el pez cebra se haya convertido gradualmente en el modelo vertebrado inferior más utilizado luego del ratón. El virus de la necrosis renal y del bazo en el pez cebra (ISKNV) pertenece a la familia *Iridoviridae*. Este virus tiene un rango de hospedadores extremadamente amplio y causa infecciones naturales en el pez cebra produciendo enfermedad clínica, aunque

se desconoce la mortalidad. Los signos clínicos se caracterizan por letargo, pérdida de apetito, natación anormal, distensión de la cavidad celómica y, en los casos más graves, dificultad respiratoria, branquias pálidas y hemorragias petequiales en la base de las aletas. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de ISKNV en bioterios de peces cebra de nuestro país. Se analizaron 50 peces cebra adultos (1 año de edad) provenientes de 5 bioterios (10 peces de cada uno). Se tomaron muestras de tejido visceral de cada animal que fueron procesadas con un equipo comercial para extracción de ADN. Para la detección viral se utilizó una técnica de PCR directa utilizando cebadores específicos que amplifican un fragmento de 562 pb basado en la secuencia del gen principal de la proteína de la cápside (MCP). Resultaron positivas las muestras de 7 animales de uno de los bioterios estudiados. Se concluyó que la investigación por PCR resultó útil para detectar por primera vez en Argentina el ISKNV. Estos resultados indican que, debido al riesgo de infección de colonias de peces cebra, es necesario implementar técnicas sensibles, como la PCR descripta, e implementar estrictas prácticas de bioseguridad, ya que estas infecciones pueden tener un gran impacto en los peces de laboratorio e invalidar los datos experimentales en este modelo animal.

**PALABRAS CLAVE:** Iridovirus. Pez cebra. PCR.

## 1 INTRODUCCIÓN

El pez cebra, *Brachydanio rerio* (también conocido como *Danio rerio*) es utilizado como modelo de desarrollo embrionario de vertebrados, análisis de la función génica, y mutagénesis. Previo al desarrollo del modelo del pez cebra en la década de 1970, genetistas del desarrollo experimentaban con modelos de invertebrados como *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y, más recientemente, con *Caenorhabditis elegans* (nematodo) para la investigación del desarrollo embrionario temprano (Kahn, 1994).

Por su alta fecundidad y fertilización externa, el pez cebra poseía los atributos de estos modelos existentes, sin sus inconvenientes inherentes. Debido a que los mecanismos moleculares fundamentales del desarrollo de un embrión son similares para todos los vertebrados, permitió que el pez cebra, se haya convertido gradualmente en el modelo vertebrado inferior de elección. Los procesos de mutagénesis han permitido experimentar en áreas del genoma sin conocimiento previo de la función de genes específicos. Desde hace algunos años en los laboratorios, se utilizan ratones y ratas en técnicas donde se eliminan mutaciones de interés de genes conocidos para estudiar el efecto del gen en el fenotipo resultante. A través de la creación de fenotipos mutantes por medio de la mutagénesis química, las funciones de muchos genes asociados a la pigmentación, tejido muscular, cardiovascular y el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) han sido investigados extensivamente (Driever *et al.*, 1994; Postlethwait *et al.*, 1997). A principios de la década de 1970, George Streisinger (Universidad de Oregon), un genetista de fagos, identificó al pez cebra como un modelo de vertebrado. Para aislar mutaciones genéticas en pez cebra utilizó protocolos de mutagénesis. Esta línea sistemática de trabajo ha continuado en la Universidad de Oregón por varios laboratorios, que han aportado gran parte de la información, involucrando el desarrollo embrionario temprano del pez cebra. A comienzo de la década de 1990, dos laboratorios (Christiane Nusslein-Volhard del Instituto Max Planck para el Desarrollo Biología y Wolfgang Driever del Hospital General de Massachusetts), comenzaron a utilizar una metodología llamada “mutagénesis de saturación” para identificar fenotipos mutantes en el pez cebra (Kahn, 1994). En 1996, esta metodología había producido más de 2000 mutaciones en varios cientos de genes que son necesarios para el desarrollo embrionario normal (Driever *et al.*, 1996; Haffter *et al.*, 1996). En 1994, John Postlethwait. (Universidad de Oregón) publicó el primer mapa genético donde se identificaron aproximadamente 400 marcadores genéticos. Por 1996, el mapa genético del pez cebra ya había crecido para incorporar aproximadamente 1200 marcadores (Postlethwait *et al.*, 1997). El pez cebra se ha utilizado como modelo experimental en varios campos de la investigación biomédica (Streisinger

*et al.*, 1981), pero solo recientemente se utiliza principalmente como modelo en biología del desarrollo. Sin embargo, los procesos biológicos relevantes para un organismo adulto también se pueden abordar (por ejemplo, homeostasia) Jagadeeswaran & Liu, 1997. Las principales investigaciones utilizando el pez cebra se han realizado en desarrollo temprano y organogénesis, pero también en una amplia variedad de ensayos biológicos (Dietrich, 1999a, 1999b; Rubinstein, 2003; Weinstein *et al.*, 1995).

La utilidad del pez cebra como sistema modelo no depende solo en sus rasgos compartidos con otros animales y humanos, sino también en varias características que permiten una variedad de experiencias y enfoques. El pez cebra adulto es pequeño (aproximadamente 3-4 cm de largo), lo que hace posible mantener un número mayor de peces que de otros vertebrados, como pollos o ratones, en un determinado espacio. Además, el pez cebra requiere poco mantenimiento, a excepción de cambios de agua y alimentación pero estos pueden ser automatizados para facilitar la tarea. Esto hace del mismo una opción muy económica como organismo modelo. La hembra del pez cebra pone habitualmente un par de cientos de huevos, y es posible volver a cruzar los progenitores a intervalos semanales. Los grandes tamaños de las camadas son importantes para los experimentos genéticos y también al proporcionar un gran número de embriones para ensayos moleculares y bioquímicos como una población bien sincronizada en su rápido desarrollo ontogenético de solo tres días hasta llegar al estadio de alevino. Los embriones o alevinos de pez cebra se desarrollan fuera de la madre y poseen una yema que los nutre durante varios días. Esto significa que todas las etapas de desarrollo son accesibles para la experiencia, sin sacrificar a la madre, como a menudo se necesita en otras especies de vertebrados para obtener embriones que se desarrollan en el útero. Los embriones son ópticamente transparentes, que permite observar células en el embrión vivo. Los embriones de pez cebra se desarrollan muy rápidamente, y 24 horas después de la fertilización los embriones tienen una apariencia de pez con la mayoría de los sistemas de órganos ya desarrollados y funcionando. Entonces aquellos experimentos que involucran el desarrollo de un sistema orgánico específico (por ejemplo, expresión transitoria de un gen particular) es posible obtener resultados en uno o dos días a partir del inicio de desarrollo del embrión. El genoma del pez cebra es aproximadamente la mitad del tamaño del que posee un mamífero, así la generación de mapas físicos y posicionales para proyectos de clonación en el pez cebra requieren esfuerzos similares a los de un ratón. El pez cebra alcanza la madurez sexual en un tiempo relativamente corto (2-4 meses, dependiendo de la densidad de peces y la tasa de alimentación). En conjunto, estas características permiten la utilización del pez

cebra para realizar investigaciones en una variedad métodos y de factores embrionarios, moleculares y genéticos (Dietrich, 1999a, 1999b).

## 1.1 PROGRAMA DE CONTROL DE SALUD EN PECES CEBRA

Un programa de control de salud debe minimizar o eliminar el impacto de las enfermedades infecciosas en la salud animal y los resultados de la investigación, así como proteger la salud humana. Hay muchos factores a considerar cuando se diseña un programa de control de salud: tamaño y diversidad del programa de investigación, frecuencia de importación, tipo de alojamiento (diseño de las instalaciones) y manejo, uso de alimentos vivos frente a comerciales, agentes a controlar, metodologías de prueba para ser utilizado, frecuencia y costos financieros. Los programas de control de la salud bien diseñados realizarán un seguimiento de la salud de una colonia de pez cebra a lo largo del tiempo, así como también ayudarán en la identificación de los problemas de bioseguridad y cría a medida que sean visibles. La exclusión de patógenos de las colonias de pez cebra es la herramienta más poderosa para proteger la salud del pez cebra. Sin embargo, cuando se producen interrupciones en la bioseguridad, la detección de patógenos lo antes posible permite una evaluación rápida de los riesgos para la salud animal y los programas de investigación, así como una rápida acción para la biocontención (Astrofsky *et al.*, 2002).

Los programas de control de la salud de las colonias deben reflejar las necesidades de la investigación que se realiza en la institución y mostrar flexibilidad para adaptarse a las necesidades cambiantes. Por ejemplo, las investigaciones que utilicen modelos de animales inmunocomprometidos o que realicen estudios de toxicología deben excluir tantos agentes patógenos como sea posible, mientras que los patógenos oportunistas pueden considerarse aceptables para otros objetivos de investigación. Cada instalación o programa debe determinar la frecuencia de las pruebas y la lista particular de agentes de interés y debe revisar su programa de control de salud a medida que haya nueva información disponible. En general, los agentes, que pueden tener un impacto significativo en el programa de investigación, deben someterse a pruebas con más frecuencia. Los agentes que presentan menos riesgo para el programa debido a la baja prevalencia o baja patogenicidad se pueden controlar con menor frecuencia. La pérdida inesperada de peces valiosos utilizados como modelo animal en investigación debido a enfermedades, es una de las causas más frecuentes de fracasos en la investigación. Si estas pérdidas ocurren debido a una mortalidad lenta e insidiosa o por una repentina epizootia o una falla en el sistema de soporte vital, influyen en forma

negativa en la validez de los resultados, con datos estadísticos confusos y pérdida de horas de trabajo en investigación. En la actualidad existen programas de control sanitario adaptados al pez cebra que permiten una estandarización sanitaria similar a la que se desarrolla en instalaciones de roedores de experimentación. La infección es siempre el resultado de una interacción compleja del huésped, medioambiente y patógeno. Los tres factores pueden estar fuera de balance en un ambiente artificial de las instalaciones de peces de laboratorio. Uno de los objetivos principales del manejo de peces de experimentación es mantener el sistema acuático en un estado equilibrado donde el huésped y los patógenos potenciales coexisten en un entorno de laboratorio controlado. Debido a que los sistemas acuáticos son ecosistemas muy complejos, las relaciones patógeno-huésped son difíciles de acceder en el ambiente artificial de laboratorio. En consecuencia, controlar los brotes de las enfermedades puede ser una tarea difícil. En principio, los patógenos primarios pueden inducir enfermedades cuando otros factores ambientales están en equilibrio y deben distinguirse de los patógenos secundarios u oportunistas que causan enfermedades cuando otros metabólicos o factores ambientales no son óptimos. La salud deficiente en los animales es a menudo una conjunción de una o más variables ambientales marginales tales como la temperatura, pH, dureza / alcalinidad u otro elemento químico inadecuado, nutrición, exceso de bioincrustaciones o sobrecrecimiento bacteriano. La enfermedad en el medio acuático por lo general, se produce cuando los factores en un ambiente marginal encuentran el equilibrio a favor del patógeno (Kent *et al.*, 2009).

El diagnóstico de la enfermedad puede observarse como el reconocimiento del desequilibrio dentro del sistema. La prevención actúa como un amortiguador para extender los límites del sistema equilibrado. El objetivo de un tratamiento sanitario es restaurar equilibrio a un sistema interrumpido. La gestión adecuada de la salud y el control de las enfermedades dependen de la implementación efectiva de las prácticas de laboratorio como medicina preventiva, diagnóstico y tratamiento (Kent *et al.*, 2009).

Al evaluar la salud de una colonia, es importante evaluar además el comportamiento de los animales a diario y realizar evaluaciones diagnósticas de mortalidades inexplicables así como los diagnósticos rutinarios en los animales centinela (Astrofsky, 2002). Varios signos inespecíficos en apariencia anormal o de comportamiento pueden ser útiles en el diagnóstico inicial para ayudar a determinar el agente o evento causal. Es importante recordar que estos son signos clínicos inespecíficos de alguna posible enfermedad y son útiles solo para formar una lista inicial de diagnósticos diferenciales. Por lo tanto se deben implementar pruebas de diagnóstico más específicas para identificar con precisión el



agente causal respecto a la identificación de signos clínicos, diagnósticos y tratamientos disponibles para la instalación (Astrofsky, 2000; Matthews, 2001).

Aunque el pez cebra se ha convertido en un modelo de investigación importante, se sabe relativamente poco acerca de las enfermedades que afectan a esta especie cuando se mantienen en cautiverio. Muchas de los agentes que causan estas enfermedades pueden detectarse en los animales o en muestras del medio ambiente que habitan. De hecho, los problemas de salud en las colonias de investigación del pez cebra podrían poner en grave peligro muchos recursos económicos en investigación, y las instalaciones de algunos investigadores han experimentado mortalidades devastadoras y graves en sus colonias de pez cebra. Además, las infecciones persistentes, pero menos graves, han contaminado varias instalaciones. Al igual que con otros animales de laboratorio utilizados en la investigación, es imperativo realizar estudios con un pez cebra libre de enfermedades (Kent *et al.*, 2009). A diferencia de los modelos de roedores, donde hay muchas cepas certificadas libres de patógenos específicos (SPF), se ha comenzado a producir poblaciones de pez cebra de SPF acorde con una lista de agentes patógenos de los cuales deben estar ausentes en dichos animales y que deben ir acompañadas de pruebas de diagnóstico sensibles para los patógenos graves (Collymore *et al.*, 2016).

Muchos de los agentes que afectan al pez cebra y que pueden alterar los resultados en las investigaciones son patógenos primarios y / u oportunistas y que pueden causar infecciones subclínicas pero que en condiciones de estrés, técnicas de manejo deficiente y la mala calidad del agua pueden desarrollar enfermedad. Los signos de infección pueden incluir una ligera disminución en la eficiencia reproductiva, una reducción en el apetito o el crecimiento y / o un aumento en la mortalidad en las colonias. Los peces utilizados en experimentación con un status sanitario desconocido pueden ser un riesgo potencial para la salud de las personas que los utilizan y dar resultados experimentales erróneos, dificultades para la reproducibilidad de la experiencia y la utilización innecesaria de más animales para demostrar significación estadística. Por lo tanto es necesario aplicar medidas para mitigar ese riesgo y asegurar que los resultados de la investigación realizada estén libres de variables no controladas (Kent *et al.*, 2009).

## 1.2 INFECCIONES POR VIRUS DE LA NECROSIS INFECCIOSA DEL BAZO Y EL RIÑÓN

Aunque no se han reportado casos de infecciones virales de ocurrencia natural en instalaciones de investigación de pez cebra, tales infecciones probablemente ocurren, considerando lo que se sabe sobre otros peces mantenidos en cautiverio. Si ocurren infecciones virales, pueden afectar seriamente muchos tipos de investigación. La tarea de

identificar y caracterizar infecciones virales de ocurrencia natural en pez cebra es, por lo tanto, de importancia crítica. El costo potencial de infecciones virales no diagnosticadas puede estar aumentando a medida que la naturaleza de la investigación del pez cebra cambia y a medida que las instalaciones del pez cebra se vuelven más centralizadas. Aunque algunas infecciones virales en cualquier especie huésped pueden producir eventos epizooticos, alta mortalidad o signos clínicos notables, muchas infecciones virales causan solo infecciones subclínicas o de bajo grado. Además, los efectos negativos de las infecciones subclínicas en la investigación rara vez se informan. Incluso las infecciones virales inadvertidas pueden alterar el sistema inmunológico y confundir la investigación (Kent *et al.*, 2012; Baker, 1998; Crim & Riley, 2012).

En los últimos años, los megalocytivirus han atraído más atención debido a sus impactos ecológicos y económicos en los peces silvestres y cultivados. Se ha encontrado un número creciente de megalocytivirus, incluidos el virus de la necrosis infecciosa del bazo y el riñón (ISKNV) que infecta al pez mandarín, *Siniperca chuatsi*, el iridovirus de la dorada (RSIV) que infecta a la dorada, *Pagrus major* y el iridovirus de la lubina (SBIV) que infecta a la lubina, *Lateolabrax sp.* El iridovirus de la enfermedad del sueño del mero (GIV) que infecta al mero de manchas marrones. El ISKNV, agente causal de una enfermedad que causa altas tasas de mortalidad en el pez mandarín y graves daños a los cultivos de este pez en China, se considera la especie tipo de los megalocytivirus. Un virus similar al ISKNV puede infectar a la lubina de boca grande, *Micropterus salmoides* y a más de 50 peces marinos. También informaron sobre un virus aislado del bacalao Murray, *Maccullochella peelii peelii*, que tiene más del 99,9 % de identidad de secuencia con el ISKNV en genes virales clave, como la ATPasa y la proteína principal de la cápside (MCP). Nuestro informe es el primero en proporcionar evidencia de que el ISKNV puede infectar al pez cebra (*Danio rerio*, Cypriniformes) en condiciones experimentales. Al igual que otros miembros de los megalocystivirus, la infección de peces por ISKNV se caracteriza por hipertrofia celular en el bazo, el riñón, el tejido conectivo craneal y el endocardio. Se ha secuenciado todo el genoma de ISKNV. Sin embargo, debido a la ausencia de un modelo animal aplicable para el estudio de las interacciones entre el huésped y el virus, se sabe poco sobre las funciones de los genes de ISKNV (Deng *et al.*, 2000); Kunita *et al.*, 2012).

En nuestro país son varias las instituciones públicas y privadas que utilizan este modelo animal en sus investigaciones pero no se tiene registro de controles sanitarios en las colonias de peces por falta de laboratorios de diagnóstico que los realicen. Las técnicas diagnósticas disponibles a implementarse pueden ser reacción en cadena de

la polimerasa (PCR), cultivos bacteriológicos y exámenes directos o parasitológicos. Una combinación de estas técnicas y un examen general de los animales contribuirá a disponer de un perfil sanitario completo de la colonia de peces.

## 2 OBJETIVO DEL TRABAJO

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de ISKNV en bioterios de peces cebra de nuestro país.

## 3 MATERIALES Y METODOS

### 3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de peces se obtuvieron de instituciones públicas y privadas de nuestro país muestras (pescados) para realizar un control sanitario en los mismos. Los peces fueron sometidos a eutanasia en cada institución y luego enviados congelados (-10 °C) hasta el laboratorio (LAE) donde fueron analizados para los agentes patógenos de la tabla 3.

El procedimiento estándar al recibir a los animales consistió en realizar una anamnesis detallada mediante un cuestionario diseñado para tal fin, que debieron llenar los responsables de las instituciones involucradas. La planilla de encuesta se elaboró de acuerdo a los criterios establecidos por el programa de vigilancia de la salud de los animales y en las recomendaciones internacionales de la Consejo Internacional para la Ciencia Animal de Laboratorio (ICLAS) y la Federación Europea de Asociaciones de Ciencia Animal de Laboratorio (FELASA).

El tamaño de la muestra fue determinado por la fórmula estadística:  $A = \alpha \log \log / (1-P)$

A = tamaño muestra, P = porcentaje de animales infectados en la colonia y  $\alpha$  = límite de confianza. Siendo P = 0.25,  $\alpha$  = 0.05 y A = 10 animales, la probabilidad de detectar al menos un animal positivo en la muestra evaluada fue del 95% (Instituto de Investigación en Animales de Laboratorio) ILAR, 1976.

En base a la bibliografía consultada se implementó un control sanitario en los peces con técnicas moleculares como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante el diseño de cebadores específicos para cada agente. Se analizaron 50 peces cebra adultos (1 año de edad) provenientes de 5 bioterios (10 peces de cada uno). Se tomaron muestras de tejido visceral de cada animal que fueron procesadas con un equipo comercial para extracción de ADN. Para la detección viral se utilizó una técnica de PCR

directa utilizando cebadores específicos que amplifican un fragmento de 563 pb basado en la secuencia del gen principal de la proteína de la cápside (MCP).

### 3.2 TÉCNICA DE PCR

El ADN total fue extraído utilizando un equipo comercial para los *pooles* (Ultra Clean™, Mo Bio Bio Laboratories, Inc). Para la detección molecular se diseñó una PCR a partir de un alineamiento múltiple de secuencias del gen que codifica para una proteína específica del agente.

Para la reacción de PCR se utilizaron 5 µl de ADN molde adicionado a la mezcla de reacción (volumen final de 25 µl) constituida por 12 µl de GoTaq ADN polimerasa (Promega, Madison, WI, USA), 6,5 µl de agua libre de nucleasas y 0,75 µl de cada uno de los *primers* específicos para el virus.

Se optimizó la amplificación utilizando diferentes tiempos y temperaturas de ciclado. El protocolo final para todos los *primers* consistió en un ciclo de desnaturalización de 4 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos y un protocolo específico de amplificación.

El producto final obtenido de cada amplificación se corrió en un gel de agarosa al 1,5% a 100 V durante 45 minutos, se tiñó con SYBR Green (Invitrogen. USA) y se visualizó con un transiluminador de luz azul (Safer Image 2.0; Invitrogen. USA). Se utilizó un control positivo y, como control negativo, se colocó agua libre de nucleasas en lugar del molde de ADN).

## 4 RESULTADOS Y CONCLUSIONES

De las 5 muestras de peces (*pooles* de 10 peces en cada muestra) donde cada una se corresponde con un bioterio, resultaron positivas las muestras de 7 animales de uno de los bioterios estudiados (Figura 1), siendo 20% la prevalencia del virus en relación al ensayo.

Aproximadamente el 80% de todos los animales utilizados en la investigación son roedores, en comparación con el 10% que son acuáticos. En relación al uso más extenso de los roedores como animales de laboratorio, es necesario comparar los dos grupos animales con respecto a las enfermedades infecciosas. Se ha reconocido a lo largo de los años que utilizar ratones libres de patógenos (SPF) en investigaciones es importante para minimizar variables en los resultados y generar resultados precisos. Aunque algunos investigadores se resisten, este concepto se está aceptando gradualmente por biomédicos de animales acuáticos de laboratorio que usan el pez cebrá como modelo animal. El impacto en los resultados de la investigación, incluso para las enfermedades

más comunes encontradas en bioerios de pez cebra, no se conoce o describe bien como ocurre en los roedores de experimentación. La preocupación por las enfermedades infecciosas en los peces de experimentación está aumentando a medida que los recursos en las instituciones de investigación se están centralizando, donde la ruptura de barreras de bioseguridad podrían conducir a una rápida propagación de patógenos. Además de las enfermedades agudas que causan morbilidad y mortalidad severas, las condiciones crónicas subyacentes que causan infecciones de bajo grado o subclínicas pueden alterar los resultados de la investigación. Mientras que la aparición de enfermedades subyacentes que causan bajas mortalidades puede ser aceptable para la acuicultura de producción (peces comestibles) o con peces ornamentales, deben evitarse en aquellos (como con cualquier animal de laboratorio) utilizados en la investigación. Los peces ornamentales que se comercializan generalmente se crían en estanques al aire libre y, a menudo, se infectan con una variedad de patógenos y parásitos. Si bien estos a menudo no causan enfermedades clínicas, como se mencionó anteriormente, estas infecciones deben evitarse si los peces se usan para la investigación. Por lo tanto, las estrategias de cuarentena para los peces destinados a la investigación son más complejas que las recomendadas para los peces destinados a un acuario doméstico o público. El estado de salud en la acuicultura de peces destinados a la alimentación también difiere del de los peces de investigación. Las infecciones subclínicas que no afectan la mortalidad y la conversión alimenticia pueden ser aceptables cuando el punto final es la producción de carne, pero deben evitarse, cuando sea posible, en animales de investigación, ya que pueden interferir en los experimentos y resultados. Por ejemplo, un punto final importante en la salud del pez cebra es la fecundidad. Debe evitarse un microorganismo que causó la reducción de la fecundidad incluso si no es patógeno (Kent *et al.*, 2009).

En este trabajo se observó el hallazgo del ISKN en las colonias de peces cebra de nuestro país como también la eficiencia de la metodología utilizada en la detección de las infecciones por este agente.

El peligro de infección es escaso en condiciones normales pero la implementación de barreras de bioseguridad (monitoreo constante de los parámetros de agua, esterilización de materiales, remoción de detritus, cuarentena, eliminación de los peces afectados, etc) y prácticas de manejo de acorde a las normativas internacionales es condición necesaria para evitar el ingreso y propagación de este organismo (Laborde & Milocco, 2008).

El estrés en la producción de peces de experimentación a menudo está implicado en enfermedades infecciosas en los bioerios y es un estado fisiológico adaptativo y dinámico que ocurre después de que un organismo percibe una amenaza e intenta

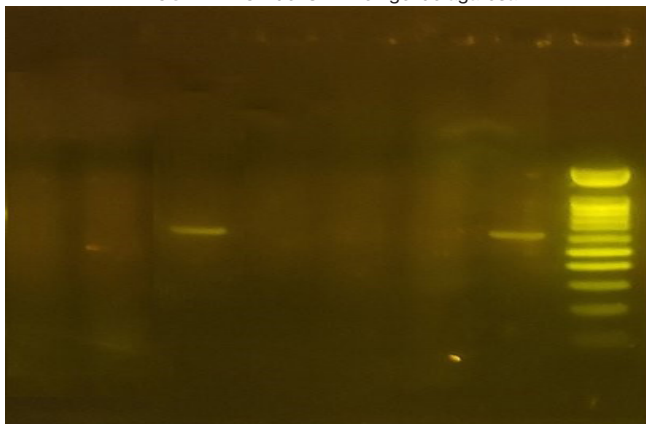
restablecer el equilibrio fisiológico. El estrés crónico y la elevación del cortisol generalmente son inadaptados, lo que resulta en la supresión inmune y una mayor susceptibilidad a las enfermedades infecciosas siendo el cortisol generalmente un indicador de estrés crónico y agudo en los peces. Además, se ha demostrado que el estrés reduce el crecimiento y la aptitud reproductiva de los peces. En condiciones de estrés crónico y elevación de cortisol, la supresión inmune es típica y a menudo contribuye a una mayor prevalencia y morbilidad de las enfermedades en las poblaciones de peces. Se han descrito aumento en el cortisol en peces cebra después del hacinamiento crónico o el estrés de manejo agudo (Mathews, 2001; Ramsay *et al.*, 2009).

El impacto en los resultados de una investigación, incluso para las enfermedades más comunes encontradas en instalaciones o bioterios de pez cebra, no se conoce o describe bien. Por ejemplo, es posible especular que *Pseudoloma neurofilia*, un patógeno primario que infecta el cerebro, la médula espinal y el músculo del pez cebra, podría afectar los estudios que involucran el desarrollo de fenotipos, pruebas de desarrollo de neurotoxicidad, muerte celular específica del cerebro, investigación conductual y desarrollo musculo esquelético. También se conoce que la micobacteriosis, causa nódulos en varios órganos internos y puede conducir a nefritis granulomatosa, hepatitis que podrían afectar la función renal y hepática, el sistema inmunitario y la expresión de enfermedades en peces genéticamente modificados. El control de virus de rutina en roedores de laboratorio, estos métodos generalmente se realizan como ensayos de anticuerpos con antígenos conocidos para delinear la especificidad de la cepa y, por lo tanto, la etiología de la respuesta del anticuerpo viral. Además de la falta de información sobre virus potencialmente importantes en la mayoría de los peces de laboratorio, rara vez se utilizan pruebas serológicas para detectar virus en peces en general. La disponibilidad de ratones libres de patógenos específicos (SPF) es por lo tanto una piedra angular en la investigación y mientras que los salmónidos SPF son accesibles, este concepto se ha adoptado recientemente para el pez cebra. Debido a que muchos patógenos acuáticos u organismos oportunistas colonizan las biopelículas en los filtros biológicos, en acuarios y tuberías, entonces el estado actual del conocimiento sobre las mejores prácticas de cría y los diseños de sistemas es posible deba ser reevaluado para mantener los peces SPF en sistemas cerrados de recirculación de agua para mantener peces cebra. La confirmación de que un pez es definitivamente SPF se basa en el supuesto de que la prueba de diagnóstico es 100% sensible. Además, como la mayoría de las pruebas de diagnóstico para peces requieren muestras de animales a sacrificar, la designación de una colonia para ser considerada SPF se basa en el número de peces muestreados (Kent *et al.*, 2009).

En este trabajo fue posible adecuar una metodología molecular para realizar controles sanitarios en peces cebra. Y en la técnica de PCR desarrollada se concluyó que resulta ser una metodología eficiente en la detección de infecciones por patógenos, como así también se informó por medio de la misma, porcentajes de muestras con resultados positivos de dicho agente en los bioterios de peces cebra de Argentina

Hasta el momento estos controles no se habían implementado en nuestro país para los agentes patógenos en pez cebra, por lo que los conocimientos obtenidos a través de este trabajo otorgan una ventaja para posteriores estudios tanto en el control sanitario de esta especie como en otras de peces que posean infecciones producidas por el ISKN. Como proyección, este estudio deja los cimientos para posteriores investigaciones sobre control sanitario de agentes patógenos que afectan el pez cebra siendo esto fundamental para plantear a futuro soluciones de manejo y control sanitario en bioterios de peces de experimentación como poseer indicadores tempranos de la presencia de infecciones y tratamientos que permitan contener y/o erradicar patógenos de las colonias de peces utilizados en experimentación.

FIGURA 1. PCR de ISKNV en gel de agarosa.



**Columna N° 3:** muestra positivas para ISKNV (563 pb);

**Columna N° 1, 2, 4 y 5:** muestras negativas;

**Columna N° 6:** control negativo;

**Columna N° 7:** control positivo;

**Columna N° 8:** Marcador Molecular (Biodynamics). Tinción con SYBRGreen.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Astrofsky, K.M., C.M. Harper, A.B. Rogers, and J.G. Fox. 2002. Diagnostic techniques for clinical investigation of laboratory zebrafish. *Lab Animal* 31: (3): 41- 45.
2. Astrofsky, K.M., M.D. Schrenzel, R.A. Bullis, R.M. Smolowitz, and J.G. Fox. 2000. Diagnosis and management of atypical *Mycobacterium* spp. Infections in established laboratory zebrafish (*Brachydanio rerio*) facilities. *Comp. Med.* 50:666-672.



3. Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:231–26.
4. Collymore C., Crimm J., Lieggi G. Recommendations for Health Monitoring and Reporting for Zebrafish Research Facilities. Volume 13, Supplement 1, 2016.
5. Crim MJ, Riley LK. Viral diseases in zebrafish: what is known and unknown. *ILAR J.* 2012;53(2):135-43. doi: 10.1093/ilar.53.2.135.
6. Deng Min, D. M., He JianGuo, H. J., Zuo Tao, Z. T., Weng ShaoPing, W. S., Zeng Kang, Z. K., Lu Ling, L. L., ... & Long QingXin, L. Q. (2000). Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) from *Siniperca chuatsi*: development of a PCR detection method and new evidence of iridovirus.
7. Dietrich, H. W., Westerfield, M., and Zon, L. T. (1999a). The zebrafish: Biology. In "Methods in Cell Biology" (L. Wolson and P. Matsudaira, ed.), Vol. 59. Academic Press, San Diego.
8. Dietrich, H. W., Westerfield, M., and Zon, L. T. (1999b). The zebrafish: Genetics and genomics. In "Methods in Cell Biology" (L. Wolson and P. Matsudaira, ed.), Vol. 59. Academic Press, San Diego.
9. Driever, W., Stemple, D., Schier, A., and Solnica-Kriezel, L. (1994). Zebrafish: Genetic tools for studying vertebrate development. *Trends Genet.* 10, 152-159.
10. Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. E, Neuhaus, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, E, Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., and Boggs, C. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123, 37-46.
11. Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane D. A., Odenthal, J., van Eeden, E J., Jiang, Y. J., Heisenberg, C. P., Kelsh, R. N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., and Nusslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 1-36.
12. Jagadeeswaran, P., and Liu, Y. C. (1997). A hemophilia model in zebrafish: Analysis of hemostasis. *Blood Cells Mol. Dis.* 23, 52-57.
13. Kahn, P. (1994). Zebrafish hit the big time. *Science* 264, 904-905.
14. Kent, M.L., S.W. Feist. C. Harper, S. Hoogstraten-Miller, J.M. Law, J.M. Sanchez-Morgado, R.L. Tanguay, G.E. Sanders, J.M. Spitsbergen, and C.M. Whipps. 2009. Recommendations for control of pathogens and infectious diseases in fish research facilities. *Comp. Biochem. Physiol Part C (Toxicol. Pharmacol.)* 149: 240-248.
15. Kent ML, Harper C, Wolf JC. Documented and potential research impacts of subclinical diseases in zebrafish. *ILAR J.* 2012;53:126–134.
16. Kurita, J.; Nakajima, K. Megalocytiviruses. *Viruses* **2012**, *4*, 521-538. <https://doi.org/10.3390/v4040521>
17. Laborde J, Milocco S. Temas de zoonosis IV. Zoonosis en peces de experimentación. 1º Edición. junio 2008. ISBN: 987-97038-3-0. 49:439-445.
18. Matthews, J.L., A.M.V. Brown, K. Larison, J.K. Bishop-Stewart, J.K., P. Rogers, and M.L. Kent. 2001. *Pseudoloma neurophilia* n.g., n.sp., a new genus and species of Microsporidia from the central nervous system of the zebrafish (*Danio rerio*). *J. Euk. Microbiol.* 48:229-235.

19. Postlethwait, J. H., and Talbot, J. (1997). Zebrafish genomics: From mutants to genes.
20. Ramsay, J.M., Watral, V., Schreck, C.B., Kent, M.L. 2009. *Pseudoloma neurophilia* (Microsporidia) infections in zebrafish (*Danio rerio*): Effects of stress on survival, growth and reproduction. Dis. Aquat. Org. (in press).
21. Rubinstein AL. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. Curr Opin Drug Discov Devel. 2003;6:218–223.
22. Weinstein, B.M., Stempel, D.L., Driever, W., & Fishman, M.C. (1995). Gridlock, A localized, heritable defect of vascular patterning in zebrafish. Nat. Medicine. 1, 1143-1147.

# CAPÍTULO 4

## PRESENCIA DE *ANAPLASMA MARGINALE* Y *BABESIA SPP.* EN *HAEMATOBIA IRRITANS* COLECTADAS EN NUEVO LEÓN

Data de submissão: 15/09/2024

Data de aceite: 02/10/2024

### José Pablo Villarreal Villarreal

Facultad de Medicina Veterinaria y  
Zootecnia de la Universidad  
Autónoma de Nuevo León  
Laboratorio Multidisciplinario  
de Investigación  
General Escobedo, Nuevo León, México  
<https://orcid.org/0000-0002-6236-1173>

### Pilar Elizabeth Rincón González

Facultad de Medicina Veterinaria y  
Zootecnia de la Universidad  
Autónoma de Nuevo León  
Laboratorio Multidisciplinario  
de Investigación  
General Escobedo, Nuevo León, México

### Jesús Jaime Hernández Escareño

Facultad de Medicina Veterinaria y  
Zootecnia de la Universidad  
Autónoma de Nuevo León  
Laboratorio de Microbiología  
General Escobedo, Nuevo León, México  
<https://orcid.org/0000-0003-1675-2082>

**RESUMEN:** La mosca de los cuernos *Haematobia irritans*, tiene un gran impacto

económico en la ganadería nacional y juega un papel importante en la transmisión mecánica de hemoparásitos. Los antecedentes que se tienen de la presencia de *Anaplasma marginale* y *Babesia spp.*, en esta mosca son escasos. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de estos patógenos en diferentes poblaciones de *H. irritans* en bovinos de carne del estado de Nuevo León. Se colectó un total de 170 moscas *H. irritans* adultas y de sexo indiferente con una red entomológica, distribuidas en cinco poblaciones, una por cada municipio. Se obtuvieron las muestras de ADN mediante el método de fenol cloroformo y se elaboraron pools de 15 µL cada uno a partir de cinco muestras distintas, dando siete pools por rancho para el municipio de Linares, siete para Montemorelos, siete para General Bravo, cinco para Marín y ocho para Dr. Coss. Posteriormente, fueron procesadas mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para la detección de *A. marginale* y *Babesia spp.* Para *Babesia spp.*, de las siete muestras procesadas del rancho del municipio de Linares, cuatro amplificaron (positivas), mientras que para Montemorelos de siete muestras solo una resultó positiva. En tanto para los municipios de Dr. Coss, Marín y General Bravo, de cuatro, cinco y siete muestras respectivamente, todas resultaron positivas. Para *A. marginale* únicamente se obtuvieron resultados positivos en el municipio de Marín. Cabe destacar la presencia de *Babesia spp.*, en las poblaciones colectadas

de *H. irritans*, pudiendo jugar un papel importante en la diseminación de la babesiosis bovina en el estado de Nuevo León.

**PALABRAS CLAVE:** ADN. PCR. Fenol cloroformo.

## PRESENCE OF *ANAPLASMA MARGINALE* AND *BABESIA SPP.* IN *HAEMATOBIA IRRITANS* COLLECTED IN NUEVO LEÓN

**ABSTRACT:** The horn fly *Haematobia irritans*, has a high economic impact in national livestock and plays an important role in the mechanical transmission of hemoparasites. Now a day, the studies about the presence of *Anaplasma marginale* and *Babesia spp.*, in this fly are scarce. The aim of this study was to determine the presence of these pathogens in different populations of *H. irritans* from beef cattle of the state of Nuevo León. A total of 170 adult flies of indifferent sex were collected with an entomological net, distributed in five populations, one per city council. The DNA was obtained by the phenol chloroform technique, pools of 15 µL were made, each pool from five different samples, giving a total of seven pools from the city council of Linares, seven from Montemorelos, seven from General Bravo, five from Marín, and eight from Dr. Coss. Each pool was processed by PCR (Polymerase Chain Reaction) to detect *A. marginale* and *Babesia spp.* For *Babesia spp.*, of the seven samples processed from Linares, four were amplified (positives), meanwhile from the seven samples of Montemorelos, just one was amplified. All the samples of Dr. Coss, Marín, and General Bravo resulted in positives. Regarding *A. marginale*, only the city council of Marín had positive results. It's important to highlight the presence of *Babesia spp.*, in the *H. irritans* collected populations, where it could be playing an important role in the dissemination of bovine babesiosis in the state of Nuevo León.

**KEYWORDS:** DNA. PCR and Phenol chloroform.

### 1 INTRODUCCIÓN

Las moscas son insectos que están clasificados dentro del orden de los dípteros (OMS, 1962). En la familia muscidae, se encuentra la especie *Haematobia irritans*, también llamada mosca de los cuernos de gran importancia económica dentro de la pecuaria (Coto, 1998). Esto se debe al estrés que causa sobre el animal, reflejado en una baja producción de leche o carne según sea su propósito (Byfort et al., 1992). Alcanzando por año los 730 millones de dólares en Estados Unidos (Mancebo, 2001) y hasta un billón de dólares en toda América (Fuentes et al., 2016).

En México las infestaciones de esta especie varían de acuerdo con las condiciones climáticas (Alonso et al, 2007). Alcanzando infestaciones superiores a 200 especímenes por animales (Almazán et al., 2001), lo que resulta en pérdidas económicas anuales superiores a los 231 millones de dólares a nivel nacional (Rodríguez et al., 2017)

Debido a su hematofagia *H. irritans* juega un papel en la transmisión mecánica de hemoparásitos (Bautista et al., 2018). Actualmente existen pocos estudios sobre la tasa de infección de *Anaplasma marginale* y *Babesia spp.*, en esta especie, ya que se le

da mas crédito a la garrapata como principal vector de ambos patógenos. Es importante mencionar que tanto *A. marginale* como *Babesia* spp. son de suma importancia en el sector agropecuario, ya que ambas causan pérdidas económicas de hasta poco más de 10 billones de dólares a nivel mundial (Bautista et al., 2018; Lew-Tabor et al., 2016).

Por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de *A. marginale* y *Babesia* spp en dichas moscas.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo fue desarrollado en los laboratorios de Microbiología, Genética, Virología y Una Sola Salud de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### 2.1 SITIO DE MUESTREO

Para la realización de este estudio, se colectaron poblaciones de moscas *H. irritans* presentes en ranchos de productores de bovinos de carne, ubicados en cuatro municipios del estado de Nuevo León; un rancho en Montemorelos, uno en General Bravo, uno en Linares y uno en Marín.

### 2.2 COLECTA DE ESPECÍMENES Y TAMAÑO DE MUESTRA

El tamaño de muestra se calculó mediante la plataforma WinEpi.net, considerando un nivel de confianza del 95%, en una población desconocida con una prevalencia mínima esperada del 50%.

La recolección de especímenes se realizó por la mañana y en horas de la tarde, aprovechando los hábitos alimenticios, colectando directamente del cuerpo del animal con apoyo de una red entomológica, específicamente sobre las zonas: dorsal, ventral y en las extremidades. En cada uno de los ranchos fueron colectados *H. irritans* adultas de sexo indistinto; 35 especímenes de Linares, 35 de Montemorelos, 35 de General Bravo y 25 de Marín, dando un total de 130 moscas. Una vez colectadas se transportaron en frascos con etanol al 70% previamente rotulados para su posterior identificación.

### 2.3 IDENTIFICACIÓN DE MOSCAS

Las moscas colectadas, se identificaron de acuerdo con las características morfológicas descritas por Harwood y James, (1987). Esto se realizó, mediante su observación bajo un estereoscopio Carl Zeiss™ Stemi™ DV4 en el laboratorio de Una Sola Salud de la FMVZ-U.A.N.L

Figura 1. Fase adulta *H. irritans*.



#### 2.4. EXTRACCIÓN DEL ADN (ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO)

Se realizó en el laboratorio de Microbiología de la FMVZ-U.A.N.L. La extracción se llevó a cabo de manera individual por espécimen. Las muestras se maceraron en un mortero estéril, con 500  $\mu$ L de buffer de lisis. El material obtenido de esta maceración se colocó en un tubo Eppendorf y se incubó en un Termoblock (AccuBlock Labnet International Inc.) a 65°C durante una hora, homogenizando la muestra cada 15 minutos en un vortex (VX-100 Lab Vortex Mixer Labnet International Inc.), después se le añadieron 500  $\mu$ L de Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (49.5:49.5:1) y posteriormente se colocaron en una centrifuga (Centrifuge 5430 Eppendorf) a 14,000 rpm por 15 min. El sobrenadante resultante, se colocó en un tubo Eppendorf nuevo, se realizaron dos lavados con 500  $\mu$ L de alcohol isoamílico (27:1) y se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm, recogiendo nuevamente el sobrenadante resultante, al cual se le agregaron 65  $\mu$ L de Acetato de sodio (NaOAc) y 75  $\mu$ L de Cloruro de sodio (NaCl), se agitó suavemente por inversión y posteriormente se mantuvo la muestra a -20°C durante 24 horas. Trascorrido este tiempo, se centrifugó de nuevo durante 10 min a 14,000 rpm, se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo, al cual se le añadieron 270  $\mu$ L de isopropanol y se dejó por 10 min a -20°C, finalizado este tiempo, las muestras fueron centrifugadas una vez más a 14,000 rpm, eliminando nuevamente el sobrenadante por decantación y resuspendiendo el pellet en 500  $\mu$ L de etanol al 80%, se centrifugó nuevamente por 5 min a 14,000 rpm, repitiendo la decantación y finalmente se incubó a 37°C, secando completamente el etanol. Una vez seco, se agregaron 20  $\mu$ L de buffer TE para la conservación del ADN a -20°C.

## 2.5 ELABORACIÓN DE POOLS

Obtenidas las muestras de ADN, se elaboraron pools de 15 µL, cada uno a partir de cinco moscas (3 µL por mosca), dando un total de siete pools para el municipio de Linares, siete para el de Montemorelos, siete para el de General Bravo y cinco para el de Marín.

## 2.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las muestras de ADN, se amplificaron por PCR punto final, en un volumen de reacción final de 10 µL para *A. marginale* y *Babesia* spp (Tabla 1).

Tabla 1. Componentes de la reacción de PCR.

Componentes	Volumen
Máster Mix	5 µL
Primer F	0.5 µL
Primer R	0.5 µL
H <sub>2</sub> O	3 µL
ADN	1.0 µL
Volumen Final	10 µL

Los primers utilizados para *A. marginale*, son los reportados por Bilgic y colaboradores (2013), que amplifican el gen de la Proteína de Superficie Principal (MSP1) a 265 pb y para *Babesia* spp., se diseñaron primers para el gen 18 S ribosomal, que amplifican a 220 pb (Tabla 2).

Tabla 2. Primers utilizados para las ampliificaciones.

Primers	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Fragmento
<b><i>A. marginale</i></b>		
<i>Anaplasma F</i>	GCTCTAGCAGGTTATGCGTC	265 pb
<i>Anaplasma R</i>	CTGCTTGGGAGAATGCACCT	
<b><i>Babesia</i> spp</b>		
BB1	GGTAACGGGGAATTAGGGTTTCGAT	220 pb
BB2	CGCTATTGGAGCTGGAATTACCG	

El proceso de ampliificación se llevó a cabo en un termociclador T100 (Thermal Cycler Bio-Rad), bajo el protocolo descrito en la Tabla 3 para *A. marginale*, utilizando como control positivo una cepa proporcionada por el Dr. Sergio D. Rodríguez, coordinador de la Unidad de Anaplasmosis (CENID-PAVET, INIFAP) y para *Babesia* spp., se utilizó



el protocolo de amplificación descrito en la misma tabla, utilizando un control positivo de una cepa proporcionada por el Dr. Jaime Hernández Escareño del Laboratorio de Microbiología de la FMVZ-UANL.

Tabla 3. Protocolos de amplificación para *A. marginale* y *Babesia* spp.

Condiciones de PCR para <i>A. marginale</i> .			
Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	1 min	1 ciclo inicial
Desnaturalización	95°C		
Alineamiento	53°C	1 min	30 ciclos
Extensión	72°C		
Extensión final	72°C	10 min	1 ciclo final
Condiciones de PCR para <i>Babesia</i> spp.			
Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	1 min	1 ciclo inicial
Desnaturalización	94°C		
Alineamiento	58.2°C	1 min	30 ciclos
Extensión	72°C		
Extensión final	72°C	10 min	1 ciclo final

## 2.7 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Los fragmentos amplificados, se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% en Tampón TBE (Tris-Borato EDTA) (0.09 M Tris, 0:09 M ácido Bórico y 2 MM de EDTA, pH 8.3) a 90 voltios, usando “GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain”, en agua, bajo irradiación de UV en el Axygen® Gel Documentation Systems.

## 3 RESULTADOS

Los datos de presencia/ausencia de microorganismos, fueron presentados mediante porcentajes de frecuencia (Tabla 4)

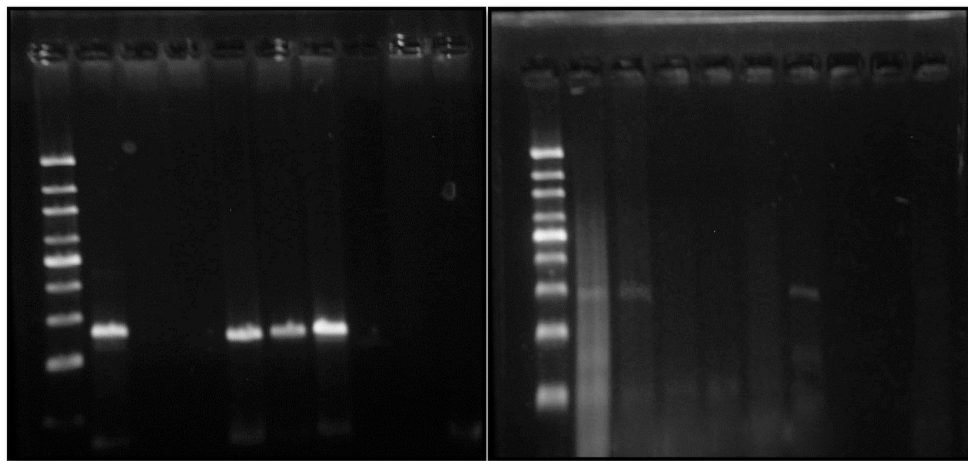
Tabla 4. Resultados de las frecuencias de *Babesia* spp., y *A. marginale*.

Población	<i>A. marginale</i>	<i>Babesia</i>
	Positivos % TM	Positivo % TM
Linares	0 (0/7)	29 (2/7)

Montemorelos	0 (0/7)	14 (1/7)
Gral. Bravo	0 (0/7)	100 (7/7)
Marín	40 (2/5)	100 (5/5)

TM: Tamaño de muestra.

Figura 2. Gel correspondiente a las PCR de *Babesia* spp. y *A. marginale*.



La primera imagen, corresponde al municipio de Linares para la detección de *Babesia* spp., el primer carril concierne al marcador de peso molecular, el carril 2 al control positivo y los carriles 5, 6 y 7 a tres muestras positivas, siendo estas la 3,4 y 5. La segunda imagen corresponde al municipio de Marín, para la detección de *A. marginale*, el primer carril pertenece al marcador del peso molecular, el carril 2 al control positivo y los carriles 3 y 7 a dos muestras positivas, siendo estas la 1 y 5. En ambos casos el carril 10 corresponde al control negativo.

#### 4 DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados mostrados en este estudio (Tabla 4), se puede observar la presencia de *Babesia* spp. en las poblaciones de mosca estudiadas de Linares y Montemorelos con un 29% y 14% respectivamente, similares a los encontrados en el estudio realizado por Ferreira et al., en 2019, donde demostraron la presencia de *Babesia bovis* en dos poblaciones de moscas *H. irritans* en la región de la amazona oriental en Brazil, con un 9.3% (22/366) de muestras positivas.

Por otro lado, las poblaciones de General Bravo y Marín presentaron un 100% de positividad.

Es importante mencionar que, al momento de la colecta de las diferentes poblaciones, el rancho de Montemorelos contaba con muy poca infestación de garrapata, mientras que los ranchos de Linares, Marín y General Bravo, presentaban altas infestaciones, además de que contaban con un historial de presencia de babesiosis, lo que puede indicar una relación en la presencia de *Babesia* spp., en la mosca, debido a su hematofagia en bovinos infestados por garrapata y poder actuar como vector mecánico de dicho patógeno, sin embargo, no existen estudios de la detección de *Babesia* spp., en moscas *H. irritans* en México, siendo este el primer estudio en determinar la presencia de este hemoparásito en esta mosca a nivel nacional

En la detección de *Anaplasma marginale* (Tabla 4), solo la población del municipio de Marín resultó positiva con un 40% (2/5). En el mismo estudio realizado por Ferreira et al., en 2019, se reportó un 11.4% (27/236) de moscas positivas a *A. marginale*. En México, solo existe un reporte de *A. marginale* en moscas hematófagas, específicamente en la especie *S. calcitrans* (mosca de los establos) siendo este en Aguascalientes, donde se reporta un 16.66% de moscas positivas (Bautista et al., 2018).

## 5 CONCLUSIÓN

En todas las poblaciones analizadas de *H. irritans*, se ve una mayor tasa de infección en la frecuencia con *Babesia* spp., en comparación con *A. marginale*. En base a lo anterior, es importante llevar a cabo una adecuada aplicación de tratamientos para el control de *H. irritans*. El organofosforado aún presenta efecto, sin embargo, este debe rotarse con otros métodos de control, con el fin de evitar poblaciones resistentes que pudieran participar mecánicamente en la propagación de hemoparásitos como *A. marginale* y *Babesia* spp.

## BIBLIOGRAFIA

Almazán García C., Castillo Salas S., Loredó Osti J., García Vázquez Z., Ramírez Valverde R., Bermúdez Villanueva L. (2001). Dinámica poblacional de *Haematobia irritans* en un hato de bovinos de Soto la Marina, Tamaulipas. *Veterinaria México*; 32 (2): 149-152.

Alonso Díaz M. A., Acosta Rodríguez R., Maldonado Siman E., Ramírez Valverde R., Bermúdez Villanueva L. (2007). Dinámica poblacional de *Haematobia irritans* en bovinos del trópico mexicano. *Revista. Científica FCV-LUZ*; 17 (4): 330-334.

Bautista, C. R., Rodríguez, T., Rojas, C., Lira, J. J., Álvarez, J. A. y Polanco, D. (2018). Molecular detection of *Anaplasma marginale* in stable flies *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) feeding on a tick-free bovine herd. *Veterinaria México*, 5(1), 1-7. <http://dx.doi.org/10.21753/vmoa.5.1.436>.

Byford, R. L. y Craig M. E. (1992). A review of ectoparasites and their effect on cattle production. *Journal of Animal Science*, 70 (2) 597-602. <https://doi.org/10.2527/1992.702597x>.

Coto, D. (1998). Estados inmaduros de insectos de las órdenes Ocoleoptera, Diptera y Lepidóptera: Manual de reconocimiento. (No 27). pp. 89. <https://repositorio.biblioteca>

Ferreira Tássia, A. A. (2019). Diagnóstico molecular e taxas de infecção de *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* em rebanhos bovinos e artrópodes parasitas na Amazonia [Tesis de Maestría]. Universidad de Federal Rural da Amazônia.

Fuentes, A., Hernández, Y., Quintana, D., Rodríguez, R. y Méndez, L. (2016). Dinámica poblacional de la mosca *Haematobia irritans* (Linnaeus 1758) (Diptera: Muscidae) en Cuba. *Revista Salud Animal*. (Vol 38 No 3) 137-141.

Harwood, R. F. y James, M. T. (1987). Entomología Médica y Veterinaria. (1er ed.). Limusa.

Lew-Tabor A. E., Rodríguez Valle M. (2016). A review of reverse vaccinology approaches for the development of vaccines against ticks and tick-borne diseases. *Ticks Tick Borne Dis*; (7): 573–585.

Mancebo, O.A., Monzón, C. M., Bulman, G. M. (2001). *Haematobia irritans*; una actualización a diez años de su introducción en Argentina. *Veterinaria Argentina*. 18, (171), 34-46 18, (172), 119-135. <http://www.produccion-animal.com.ar/>.

Organización Mundial de la Salud. (1962). Moscas de importancia para la salud pública y su control (No 61). <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/1344/42163.pdf?se>.

Rodríguez, R. I., Grisi, L., Pérez, A. A., Silva, H., Torres, J. F. J., Fragoso, H., Romero, D., Rosario, R., Saldiema, F. y García, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 8(1), 61-74. <http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>.

# CAPÍTULO 5

## EVALUACIÓN DE LÍNEAS ÉLITE DE MAÍZ AZUL PARA VALLES ALTOS DE MÉXICO<sup>1</sup>

Data de submissão: 08/10/2024

Data de aceite: 25/10/2024

### **José Luis Arellano-Vázquez**

Instituto Nacional de Investigaciones  
Forestales, Agrícolas y Pecuarias  
Campo Experimental Valle de México  
C. P. 56250. Coatlinchán  
Estado de México, México  
<https://orcid.org/0000-0002-2231-2940>

### **Germán Fernando Gutiérrez-Hernández**

Instituto Politécnico Nacional  
Unidad Profesional  
Interdisciplinaria de Biotecnología  
Av. Acueducto s/n.  
La Laguna Ticomán. C. P. 07340  
Ciudad de México, México  
<https://orcid.org/0000-0003-3312-3747>

### **Luis Fernando Ceja-Torres**

Instituto Politécnico Nacional  
Centro Interdisciplinario de  
Investigación para el Desarrollo  
Integral Regional Unidad Michoacán  
Justo Sierra 28. C. P. 59510  
Jiquilpan, Michoacán, México  
<https://orcid.org/0000-0002-8397-0701>

### **Martín Filiberto García Mendoza**

Instituto Politécnico Nacional  
Unidad Profesional  
Interdisciplinaria de Biotecnología  
Av. Acueducto s/n.  
La Laguna Ticomán. C. P. 07340  
Ciudad de México, México

### **Estela Flores-Gómez**

Instituto Politécnico Nacional  
Unidad Profesional  
Interdisciplinaria de Biotecnología  
Av. Acueducto s/n.  
La Laguna Ticomán. C. P. 07340  
Ciudad de México, México  
<https://orcid.org/0000-0002-4634-455X>

### **Patricia Vázquez-Lozano**

Instituto Politécnico Nacional  
Unidad Profesional  
Interdisciplinaria de Biotecnología  
Av. Acueducto s/n.  
La Laguna Ticomán. C. P. 07340  
Ciudad de México, México  
<https://orcid.org/0000-0002-5945-6307>

### **Donají Ariadna Ramírez López**

Instituto Politécnico Nacional  
Unidad Profesional  
Interdisciplinaria de Biotecnología  
Av. Acueducto s/n.  
La Laguna Ticomán. C. P. 07340  
Ciudad de México, México  
<https://orcid.org/0009-0007-9033-0116>

<sup>1</sup> Derivado parcialmente del artículo: <https://doi.org/10.3390/plants12223861>

**RESUMEN:** En los Valles Altos Centrales de México hay un déficit en la producción de grano de maíz azul, siendo necesario incrementar significativamente la productividad de este cultivo. El Programa de Maíz Azul del Campo Experimental Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias implementó la estrategia de desarrollar híbridos de maíz azul con atributos superiores de rendimiento y características agronómicas y de planta y grano. El objetivo del presente estudio fue evaluar diez líneas endogámicas de maíz azul, en términos de sus aptitudes combinatorias general (ACG) y específica (ACE) para rendimiento, así como por sus características agronómicas y de planta y grano. Se realizaron los cruzamientos dialélicos en sentido directo de acuerdo con el método 1 modelo 1 de Griffing. Hubo diferencias ( $p \leq 0.01$ ) en los efectos de ACG y ACE. Para ACG, destacaron las líneas L1, L4, L6 y L9, con valores significativos de 3.4, 2.9, 2.9 y 3.1, respectivamente; mientras que, para ACE los híbridos superiores fueron L4  $\times$  L10, L2  $\times$  L10, L1  $\times$  L10, L7  $\times$  L8 y L2  $\times$  L6, con valores de 3.0, 2.5, 2.3, 2.3 y 2.2, y rendimientos de 11.2, 10.2, 10.4, 10.4 y 10.5 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Se detectaron magnitudes considerables de ACG y ACE, por lo que se concluye que hubo efectos genéticos favorables, tanto aditivos como de dominancia, para dar soporte a la formación de híbridos de alto rendimiento y características óptimas de planta, grano y color azul del grano. Con las líneas evaluadas se formaron y liberaron cuatro híbridos de maíz de grano azul (Vampiro H 10, Vampiro H 12, Drácula H 13 y Chimpancé H 14) con rendimientos altos, resistentes al acame, con grano con textura de semicristalina a cristalina y de ciclo precoz o intermedio; además de producir granos de color azul intenso.

**PALABRAS CLAVE:** *Zea mays* L., Endogamia. Hibridación. Maíz pigmentado.

## EVALUATION OF ELITE LINES OF BLUE CORN FOR HIGH VALLEYS OF MEXICO

**ABSTRACT:** In the Highland Valleys of Mexico, there is a deficit in the production of blue corn grain, making it necessary to increase the productivity of this crop significantly. The Blue Corn Program of the Valle de México Experimental Field of the National Institute of Forestry, Agriculture, and Livestock Research implemented the strategy of developing blue corn hybrids with superior yield attributes and agronomic, plant, and grain characteristics. The objective of the present study was to evaluate ten inbred lines of blue corn, in terms of their general (GCA) and specific (SCA) combining abilities for yield, as well as for their agronomic, plant, and grain characteristics. Direct diallel crosses were performed according to Griffing's 1 model 1 method. There were differences ( $p \leq 0.01$ ) in the effects of GCA and SCA. For GCA, the L1, L4, L6, and L9 lines stood out, with significant values of 3.4, 2.9, 2.9, and 3.1, respectively; while, for SCA the superior hybrids were L4  $\times$  L10, L2  $\times$  L10, L1  $\times$  L10, L7  $\times$  L8 and L2  $\times$  L6, with values of 3.0, 2.5, 2.3, 2.3 and 2.2, and yields of 11.2, 10.2, 10.4, 10.4 and 10.5 t ha<sup>-1</sup>, respectively. Considerable magnitudes of GCA and SCA were detected, so it is concluded that there were favorable genetic effects, both additive and dominance, to support the formation of high-yielding hybrids with optimal plant, grain, and blue grain color characteristics. Four blue-grain corn hybrids (Vampiro H 10, Vampiro H 12, Drácula H 13, and Chimpancé H 14) were developed and released from the evaluated lines. They were high-yielding, resistant to lodging, had a semi-crystalline to crystalline grain texture and an early or intermediate cycle; in addition to producing intense blue grains.

**KEYWORDS:** *Zea mays* L., Inbreeding. Hybridization. pigmented corn.

## 1 INTRODUCCIÓN

En el Altiplano Central de México, cuyas altitudes oscilan entre 2200 y 2800 msnm, existen numerosas variantes de maíz de grano pigmentado (rojo, amarillo y azul). En particular, ha destacado el de color azul por ser el ingrediente esencial de multitud de platillos cotidianos en la dieta de los mexicanos, tales como tortillas, tamales, sopes y tlacoyos, entre otros.

Se han reportado recientemente cualidades nutraceuticas, medicinales, dermatológicas y de cosmetología para los maíces azules, porque poseen antocianinas, pigmentos vegetales que les proveen su color de grano y que, al propio tiempo, les confieren propiedades de diversa índole, muchas de ellas todavía por estudiar, tales como anticancerígenas, reductoras de lípidos, antidiabéticas, antiinflamatorias, antimicrobianas y antioxidantes (Shah *et al.*, 2016; Damián-Medina *et al.*, 2020). Por lo anterior, se ha incrementado notablemente la demanda de este alimento.

En el contexto anterior, existe actualmente un déficit en la producción de grano de maíz azul, por lo que es necesario incrementar de manera significativa la productividad de esta especie para satisfacer su demanda creciente. Para ello, en el Programa de Maíz Azul del Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) se implementó la estrategia de desarrollar híbridos de maíz azul con adaptación al altiplano mexicano, cuya siembra sea una opción ventajosa para reducir el desabasto de este importante cultivo.

Las variedades criollas de maíz azul de los Valles Altos de México expresan rendimientos medios de 1.9 t ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2022), los cuales se pueden superar mediante el cultivo de híbridos (Lee *et al.*, 2007; McRobert *et al.*, 2014) de rendimiento alto, resistentes al acame, con grano con textura de semicristalina a cristalina y de ciclo precoz o intermedio; además de producir granos de color azul intenso y conformados a partir del germoplasma de la región de interés (Arellano-Vázquez *et al.*, 2014).

El proceso de formación de híbridos inicia con la identificación y evaluación de criollos regionales sobresalientes (los cuales son poblaciones de amplia base genética), a partir de los cuales se derivan líneas endogámicas (ya de base genética estrecha pero muy selecta) que se van depurando genéticamente y seleccionando a través de autofecundaciones sucesivas (Singh, 1987). Posteriormente, a las líneas que resultan elegidas por sus características morfológicas, fisiológicas y agronómicas, se les evalúan dos cualidades fundamentales para el proceso de hibridación: la aptitud combinatoria general y la aptitud combinatoria específica; en el primer caso se establece el

comportamiento promedio de una línea en sus combinaciones híbridas y, en el segundo, se evalúa respuesta de los híbridos con respecto al promedio de las líneas que los forman (Arellano-Vázquez *et al.*, 2023<sup>a</sup>).

El objetivo del presente estudio fue evaluar diez líneas endogámicas de maíz azul, en términos de sus aptitudes combinatorias general y específica para rendimiento, así como por características agronómicas y de planta y grano.

Es escasa la información disponible sobre el proceso de hibridación en maíces azules y en particular sobre las características de las aptitudes combinatorias general y específica de las líneas, con base en las cuales sea factible desarrollar híbridos comerciales en un programa de mejoramiento; por lo que con el presente estudio se pretende contribuir a un conocimiento detallado, concreto y aplicable del potencial genotécnico de las líneas endogámicas élite que se reportan.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 GENOTIPOS

Se utilizaron 10 líneas endogámicas élite de maíz azul generadas por el Programa de Mejoramiento Genético de Maíz Azul del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Las líneas tuvieron cinco generaciones de autofecundación (92% de endogamia) y selección *per se*. El bagaje genético de las líneas bajo estudio incluyó variedades de la raza “Chalqueño”, utilizadas como fuentes de rendimiento y color azul intenso de la capa de aleurona del grano, y de la raza “Bolita”, empleadas por su tipo de planta baja, resistencia al acame de planta y textura semicristalina del grano de color azul-morado (Cuadro 1). La introgresión de germoplasma exótico de la raza “Bolita”, de origen geográfico semitropical seco, al germoplasma de la raza “Chalqueño” de origen templado frío, constituyó un enfoque de este estudio para incrementar las diferencias genéticas entre las poblaciones y conseguir mayor respuesta heterótica, estrategia propuesta por Ron y Hallauer (1997).

### 2.2 VARIABLES EVALUADAS

Floración masculina, intervalo (d) del riego de germinación a cuando el 50% de las plantas mostraron dispersión de polen. Floración femenina, intervalo (d) del riego de germinación a cuando el 50% de las plantas mostraron emisión de estigmas. Altura de planta, distancia (cm) de la base de la planta al inicio de la espiga (inflorescencia masculina). Rendimiento de grano (REND, ton ha<sup>-1</sup>), se calculó por el peso de las mazorcas



cosechadas por parcela experimental y se ajustó al 80% de contenido de grano en las mazorcas y a 14% de contenido de humedad. Peso hectolítrico ( $\text{kg hL}^{-1}$ ), se determinó de acuerdo con (Salinas-Moreno y Arellano-Vázquez, 1989). Color de grano (COLOR), se empleó la escala visual (arbitraria) de 5 a 10; en donde 5 y 6 correspondieron a morado, 7 y 8 a azul oscuro y 9 y 10 a color negro.

### 2.3 DISEÑOS GENÉTICO Y EXPERIMENTAL Y PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO DE DATOS

En los experimentos de campo se utilizó un diseño látice simple 10 x 10 con dos repeticiones, en él se incluyeron las cruzas directas, las indirectas (que no se mencionan en este documento) y las diez líneas parentales que se evaluaron.

Se realizaron los cruzamientos dialélicos en sentido directo y recíproco, y se analizaron estadísticamente, de acuerdo con el método 1 modelo 1 de Griffing (1956), para determinar los efectos de aptitud combinatoria general y aptitud combinatoria específica.

Para el procesamiento estadístico de los datos experimentales se empleó el protocolo propuesto por Zhang y Kang (2003); por último, los datos así organizados, se procesaron mediante el programa estadístico (SAS, 2002).

## 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las diez líneas endogámicas tuvieron un periodo de siembra a floración de 85 a 92 d, altura de planta de 155 a 175 cm y variaron también en el color y la textura de grano (Cuadro 1). El porte de planta de estas líneas fue adecuado considerando que el arquetipo de planta óptimo para la región de los Valles Altos Centrales de México no debe ser demasiado alto para evitar el acame. En el mismo sentido, su nivel de precocidad les permitirá madurar el grano antes de la presencia de las heladas tempranas que son muy frecuentes en esa región (2200–2800 msnm), que abarca los estados de México, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y Ciudad de México.

Atendiendo a la textura de grano, fue muy acertado que la mayoría de las líneas sean del tipo semicristalino (Cuadro 1) y con pesos hectolítricos altos (Cuadro 2), puesto que son más densas que las harinosas, por lo que su rendimiento unitario es mayor y son menos susceptibles a plagas de almacén.

Cuadro 1. Genealogía, días a floración femenina (d), altura de planta (cm) y caracteres del grano de líneas endogámicas de maíz azul de los Valles Altos Centrales de México.

Línea	Genealogía	Floración Femenina	Altura de Planta	COLOR (grano)	Endospermo
L1	BXCC-8-7-1-2-1	85	155	Morado	Semicristalino
L2	BXCC-3-1-3-6-4	85	165	Azul	Semicristalino
L3	BXCC-3-1-3-2-1	85	165	Morado	Semicristalino
L4	BXCC-3-8-3-4-2	85	160	Azul	Harinoso
L5	BXCC-2-1-5-2-6	85	155	Azul	Harinoso
L6	NXOAX-168-2-1-2-2	92	170	Azul	Harinoso
L7	NXOAX-51-1-1-2-1	90	170	Azul	Harinoso
L8	NXOAX-46-1-1-1-1	90	175	Azul	Semicristalino
L9	NXOAX-28-2-3-4-2	88	175	Azul	Semicristalino
L10	NXOAX-19-5-1-1-2	88	175	Azul	Semicristalino

Cuadro 2. Efectos de Aptitud Combinatoria General (ACG), rendimiento (REND, t ha<sup>-1</sup>) y características de planta y grano de líneas de maíz azul de los Valles Altos Centrales de México.

Línea	ACG	REND (t ha <sup>-1</sup> )	Floración masculina (d)	Altura de planta (cm)	Peso hectolítrico (kg hL <sup>-1</sup> )
L1	3.46 **	1.6a	93b	155c	70a
L2	2.80 **	1.2a	92c	170b	70a
L3	1.61 **	1.4a	93b	160c	69a
L4	2.98 **	2.4a	93b	180a	71a
L5	2.45 **	2.5a	95b	150c	69a
L6	2.90 **	1.5a	99a	180a	70a
L7	2.47 **	1.2a	94b	140d	68a
L8	2.38 **	1.7a	96a	180a	68a
L9	3.13 **	2.0a	93b	180a	68a
L10	-2.00 **	2.4a	95b	180a	69a
Error estándar	0.857				
Tukey (p≤0.05)		1.95	3.0	6.0	12

\*\*=Altamente significativo (p≤0.01). En columnas, letras distintas indicaron diferencias significativas (p≤0.05).

Los efectos de ACG (Cuadro 2) fueron significativos (p≤0.01) para todas las líneas; sin embargo, en L10 fueron negativos. Se alcanzaron valores (de 1.61 a 3.46) que se estiman óptimos dado que se trató de líneas derivadas de poblaciones criollas, las cuales son de amplia base genética. Las líneas sobresalientes fueron L1, L4, L6 y L9, con ACG de 3.46, 2.98, 2.90 y 3.13, respectivamente; esto denotó la mejor expresión de efectos aditivos; no obstante, esto no se asoció con los rendimientos más altos obtenidos.

De acuerdo con los datos agronómicos de planta y grano, las líneas se consideraron de ciclo intermedio, porte medio y con grano de textura de harinosa a cristalina.

Cuadro 3. Efectos de Aptitud Combinatoria Específica para rendimiento de grano de líneas de maíz azul de los Valles Altos Centrales de México.

Líneas										
$\varphi \setminus \sigma$	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10
L1		1.2 **	1.0 **	-1.0 **	2.0 **	1.3 **	0.8 *	0.7	0.8 *	2.3 **
L2			-2.6 *	1.4 **	-0.5	2.2 **	0.9 *	1.1 **	1.9 **	2.5 **
L3				0.5	-0.3	-0.5	1.9 **	-0.04	0.8 *	-1.3 *
L4					1.2 **	0.9 **	-0.1	-0.02	1.4 **	3.0 **
L5						1.2 **	1.4	0.0	0.9 *	1.1 **
L6							1.0 **	0.4	0.3	1.8 **
L7								2.3 **	0.4	-0.3
L8									0.4	1.7 **
L9										1.5 **
L10										

\*=Significativo ( $p \leq 0.05$ ), \*\*=Altamente significativo ( $p \leq 0.01$ ). Error estándar=1.03.

Respecto a los efectos de ACE (Cuadro 3), hubo diferencias estadísticas en la mayoría de las cruzas directas. Las cruzas entre L1, L2, L4, L6, L8 y L9 y la L10, se asociaron significativamente con los valores superiores de ACE (2.3, 2.5, 3.0, 1.8, 1.7 y 1.5, respectivamente). En el mismo sentido, las cruzas de L1, L2, L3, L4 y L5 con L9 también fueron significativas y alcanzaron valores de 0.8 a 1.9.

En coincidencia con varios autores (Machida *et al.*, 2010; Gudeta *et al.* 2015), el desempeño de los híbridos evaluados se basó en los efectos de dominancia. Así también, los valores altos y significativos de la ACG expresados por las líneas denotaron efectos aditivos favorables en sus combinaciones híbridas; además, los valores significativos de ACE fundamentan el hecho de constituir un patrón heterótico favorable para formar híbridos (Barata y Carena, 2006).

Este último señalamiento se concretó en el Programa de Mejoramiento Genético de Maíz Azul del CEVAMEX, INIFAP durante el año de 2023 con la liberación comercial de cuatro híbridos con adaptación a los Valles Altos Centrales de México, denominados Vampiro H 10, Vampiro H 12, Drácula H 13 y Chimpancé H 14 (Arellano-Vázquez *et al.*, 2023<sup>b</sup>; Arellano-Vázquez *et al.*, 2023<sup>c</sup>; Arellano-Vázquez *et al.*, 2023<sup>d</sup>).

## 4 CONCLUSIONES

Las diez líneas endogámicas expresaron características favorables, en términos de precocidad, altura de planta y color y textura de grano.

Hubo efectos genéticos favorables, tanto aditivos como de dominancia, para formar híbridos de alto rendimiento y características óptimas de planta, grano y color azul del grano. Esto se concretó con liberación de cuatro híbridos de maíz de grano azul (Vampiro H 10, Vampiro H 12, Drácula H 13 y Chimpancé H 14) con rendimientos altos, resistentes al acame, con grano con textura de semicristalina a cristalina y de ciclo precoz o intermedio; además de producir granos de color azul intenso.

## BIBLIOGRAFÍA

Arellano-Vázquez, J.L.; Gutiérrez-Hernández, G.F.; Ceja-Torres, L.F.; Flores-Gómez, E.; García-Ramírez, E. Quiroz-Figueroa, F.R.; Vázquez-Lozano, P. 2023<sup>a</sup>. Combining ability and reciprocal effects for the yield of elite blue corn lines from the Central Highlands of Mexico. *Plants*, 12, 3861. ISSN impreso 2223-7747. ISSN digital: 2594-0252. <https://doi.org/10.3390/plants12223861>.

Arellano-Vázquez, J.L.; Gutiérrez-Hernández, G.F.; Rojas-Martínez, I.; Fernández-Sosa, R. 2023<sup>b</sup>. Híbridos de maíz azul para localidades de alto, mediano y bajo potencial productivo del altiplano central de México. XIII Reunión Nacional de Investigación Agrícola. Memoria. Chihuahua, Chih. México. pp. 526-528.

Arellano-Vázquez, J.L.; Gutiérrez-Hernández, G.F.; Rojas-Martínez, I.; Fernández-Sosa, R. 2023<sup>c</sup>. Vampiro H 12 híbrido de maíz azul madurez intermedia grano semicristalino para áreas de temporal y riego del altiplano central de México. XIII Reunión Nacional de Investigación Agrícola. Memoria. Chihuahua, Chih. México. pp. 529-531.

Arellano-Vázquez, J.L.; Rojas-Martínez, I.; Fernández-Sosa, R. 2023<sup>d</sup>. Vampiro H 10 híbrido de maíz azul madurez intermedia grano harinoso para áreas de temporal y riego del altiplano central de México. XIII Reunión Nacional de Investigación Agrícola. Memoria. Chihuahua, Chih. México. pp. 745-748.

Arellano-Vázquez, J.L.; Rojas-Martínez, I.; Gutiérrez-Hernández, G.F. 2014. Variedades de maíz azul Chalqueño seleccionadas por múltiples caracteres y estabilidad del rendimiento. *Rev Mex Cienc Agríc* 5. 1469-1480. DOI: 10.293 12/remexca.v5i8.828.

Barata, C.; Carena, M.J. 2006. Classification of North Dakota maize inbred lines into heterotic groups based on molecular and testcross data. *Euphytica*, 151: 201-208.

Damián-Medina, K.; Salinas-Moreno, Y.; Milenkovic, D.; Figueroa-Yáñez, L.; Marino-Marmolejo, E.; Higuera-Ciapara, I.; Vallejo-Cardona, A.; Lugo-Cervantes, E. 2020. *In silico* analysis of antidiabetic potential of phenolic compounds from blue corn (*Zea mays* L.) and black bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Heliyon* 6, e03632. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03632>.

Griffing, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation with to diallel crossing systems. *Aust J Biol Sci* 9, 463-493. <https://doi.org/10.1071/BI9560463>.

Gudeta, N.G.; Dagne, W.G.; Habtamu, Z.U. 2015. Heterosis and combining ability of highland quality protein maize inbred lines. *Maydica*, 60, 1-12.

- Lee, E.A.; Tollenaar, M. 2007. Physiological basis of successful breeding strategy for maize grain yield. *Crop Sci*, 47. S202-S215.
- Machida, L.; Derera, J.; Tongoona, P.; Macrobert, J. 2010. Combining ability and reciprocal cross effects of elite, protein maize inbred lines in subtropical environments. *Crop Sci*, 50, 1708–1717. <https://doi.org/10.2135/cropsci2009.09.0538>.
- MacRobert, J.F.; Sentimela, P.S.; Gethi, J.; Worku, M. 2014. Manual de producción de semilla de maíz híbrido. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. CIMMYT, México, D.F., 37 p. Available online: <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/16849/57179.pdf> (consultado 9 Diciembre 2023).
- Ron-Parra, J.; Hallauer, A.R. 1996. Utilization of exotic maize germplasm. *Plant Breed Rev* 14, 165–187. <https://doi.org/10.1002/9780470650073.ch6>.
- Salinas-Moreno, Y.; Arellano-Vázquez, J.L. 1989. Calidad nixtamalera y tortillera de híbridos de maíz con diferente tipo de endospermo. *Rev Fitotec Mex* 12, 129–135.
- SAS (Statistical Analysis System). 2002. SAS/STAT Ver. 9; SAS Inst. Inc.: Cary, NC, USA.
- Shah, T.R.; Prasad, K.; Kumar, P. 2016. Maize a potential source of human nutrition and health: A review. *Cogent Food Agric* 2, 1166995. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1166995>.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Anuario estadístico de la producción agrícola. Servicio de información agroalimentaria y pesquera, agricultura. Ciudad de México, México. Available online: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola> (Consultado el 3 de Agosto 2023).
- Singh, J. 1987. Field manual of maize breeding procedures. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): Rome, Italy. 209 p.
- Zhang, Y.; Kang, M.S. 2003. Diallel-SAS: A program for Griffing's diallel methods. In *Handbook of Formulas and Software for Plant Geneticists and Breeders*. Kang, M.S., ed.; Food Products Press: New York, NY, USA. pp. 1–19.

# CAPÍTULO 6

## EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE PROTEÍNAS DE *SPHENARIUM PURPURASCENS* EXTRAÍDAS CON ULTRASONIDO EN SALCHICHAS TIPO VIENA

Data de submissão: 14/09/2024

Data de aceite: 02/10/2024

### Salvador Osvaldo Cruz-López

Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa

Departamento de Biotecnología  
Ciudad de México, México

<https://orcid.org/0000-0001-7099-4491>

### Yenizey Merit Alvarez-Cisneros

Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa

Departamento de Biotecnología  
Ciudad de México, México

<https://orcid.org/0000-0003-0201-4249>

**RESUMEN:** En México se han registrado alrededor de 549 especies de insectos comestibles y en las comunidades rurales se utilizan como fuente de alimentación, uno de los insectos más abundante es el chapulín (*Sphenarium purpurascens*), el cual es considerado una fuente de alimento con alto valor nutricional. Las proteínas de insectos han ganado relevancia debido a su

alto potencial como aditivos alimentarios y extensores cárnicos en la industria alimentaria. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto en las propiedades fisicoquímicas de salchichas tipo Viena adicionadas con proteína soluble de chapulín extraída con un método combinado de alcalinización-ultrasonido. El extracto de proteína soluble fue obtenido en condiciones de alcalinización pH 8, asistido con un ultrasonido piezoeléctrico a 20 kHz con 99% de amplitud. Se prepararon diferentes formulaciones con diferentes sustituciones de carne (0%, 5%, 10% y 15%). En todas las formulaciones se evaluó la reología, estabilidad de la emulsión, pérdida de peso por cocción y el contenido de proteína total. Finalmente se realizó una evaluación sensorial con consumidores con una prueba de agrado general. El método de alcalinización-ultrasonido piezoeléctrico mejoró la solubilidad y las propiedades tecnofuncionales de la proteína soluble de chapulín al ser adicionada en salchichas a niveles máximos del 10% de sustitución de carne. La evaluación sensorial indicó que la formulación con 5% de sustitución de carne exhibió la misma aceptabilidad que la formulación control. De acuerdo con los resultados, la proteína soluble obtenida por alcalinización-ultrasonido podría utilizarse como extensor cárnico.

**PALABRAS CLAVE:** *Sphenarium purpurascens*. Ultrasonido. Salchichas. Evaluación sensorial. Proteína de insecto.

## EFFECT OF INCORPORATING *SPHENARIUM PURPURASCENS* PROTEIN EXTRACTS USING ULTRASOUND INTO VIENNA-TYPE SAUSAGES

**ABSTRACT:** In Mexico, around 549 species of edible insects have been recorded, and in rural communities, they are a food source; one of the most abundant insects is the grasshopper (*Sphenarium purpurascens*), a food source with high nutritional value. Insect proteins have gained relevance due to their high potential as food additives and meat extenders in the food industry. This study aimed to evaluate the effect on the physicochemical properties of Vienna sausages added with soluble grasshopper protein extracted with a combined alkalization-ultrasound method. The soluble protein extract was obtained under pH 8 alkalization conditions, assisted with a piezoelectric ultrasound at 20 kHz with 99% amplitude. The soluble protein extract was obtained under pH 8 alkalization conditions, assisted with a piezoelectric ultrasound at 20 kHz with 99% amplitude. Different formulations were prepared with meat substitutions (0%, 5%, 10%, and 15%). Rheology, emulsion stability, weight loss by cooking, and total protein content were evaluated in all formulations. Finally, a sensory evaluation was carried out with consumers using a general liking test. The piezoelectric alkalization-ultrasound method improved the solubility and techno-functional properties of soluble grasshopper protein when added to sausages at maximum levels of 10% meat substitution. Sensory evaluation indicated that the 5% meat substitution formulation exhibited the same acceptability as the control formulation. According to the results, the soluble protein obtained by alkalization-ultrasound could be used as a meat extender.

**KEYWORDS:** *Sphenarium purpurascens*. Ultrasound. Sausages. Sensory evaluation. Insect protein.

### 1 INTRODUCCIÓN

Los productos cárnicos son todos aquellos que están elaborados a partir de carne y/o vísceras comestibles de animales de abasto (aves, puerco, res). Son sistemas complejos que están formados por varios componentes, en el que se incluyen proteínas, grasas, carbohidratos y sales minerales; los cuales, por sus propiedades tecnológicas, contribuyen a las características finales del producto, tales como apariencia, tamaño, textura, consistencia, viscosidad y palatabilidad (Apango, 2013). Las proteínas son biomoléculas formadas de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, son esenciales en la dieta humana y presentan propiedades tecno-funcionales que les permite ser incorporadas como hidrocoloides en productos procesados para mejorar sus características organolépticas y en algunos casos reducir costos (Chel-Guerrero y col., 2003). Las propiedades tecno-funcionales han sido definidas como cualquier propiedad fisicoquímica de las proteínas, que afecta el comportamiento y las características de los alimentos en los cuales se encuentran o son agregadas y que contribuyen a la calidad final del producto (Fennema, 1996).

Las proteínas cárnicas presentan propiedades tecno-funcionales como capacidad de hidratación, emulsificación y gelificación que permiten en conjunto obtener un producto con características fisicoquímicas y sensoriales aceptables (Hui y Col., 2006).

## 1.1 LOS INSECTOS COMO FUENTE DE PROTEÍNA

Algunos autores indican que los insectos comestibles pueden incorporarse a los alimentos en forma de harina (insectos enteros pulverizados) o como extracto proteico soluble (Kim y col., 2019; Mishyna y col., 2019). Las cuales son una estrategia para aumentar la aceptación de los insectos que se incorporan a alimentos como salchichas, barras de proteína, paté de cerdo, pan y pastas (Mishyna y col., 2021; Smarzyński y col., 2019; van Huis, 2020).

El orden Orthoptera posee altas concentraciones de proteína; sin embargo, su digestibilidad varía entre especies debido al alto contenido de quitina del exoesqueleto, lo que los vuelve indigeribles para los humanos (Van Huis, 2016). Una forma de eliminar la quitina es extraer la proteína pulverizando el insecto completo. Los principales métodos utilizados son la extracción alcalina, la precipitación isoelectrica y el ultrasonido (Choi y col., 2017a; Kim y col., 2019; Mishyna y col., 2019; Udomsil y col., 2019; Yi y col., 2013). Mishyna y col. (2019) extrajeron proteína soluble de saltamontes (*Schistocerca gregaria*) y abejas (*Apis mellifera*) con un proceso de desgrasado y alcalinización asistido por ultrasonido obteniendo rendimientos promedio de 56% de ambos insectos. Choi y col. (2017a) obtuvieron rendimientos de 35% a 94% en la extracción de proteínas con ultrasonido a partir de gusanos de la harina desgrasados (*Tenebrio molitor*), grillos adultos (*Gryllus bimaculatus*) y pupas de gusanos de seda (*Bombyx mori*). Las metodologías propuestas para la extracción de proteínas de cada insecto son particulares a cada especie y región geográfica dependiendo de la estructura y funcionalidad de las proteínas (Kim y col., 2019).

## 1.2 INSECTOS COMO EXTENSORES CÁRNICOS

Los extensores tienen el objetivo de sustituir parte de la carne ofreciendo aporte proteico y funcional (Andújar, y col. 2000) y se utilizan en la industria con la finalidad de reducir los costos de producción en la formulación de productos cárnicos. Los extensores cárnicos tienen propiedades funcionales, tales como la retención de agua, la emulsificación de grasas y la gelificación, importantes desde el punto de vista tecnológico (Hleap, y col. 2015).



Los extensores también son llamados ingredientes no cárnicos de alto valor proteico, un ejemplo son las proteínas de insectos (Cruz-López y col., 2022a). Algunos ortópteros, como, *Grylodes sigillatus*, *Locusta migratoris*, *S. gregaria*, *Acheta domesticus* y *Sphenarium purpurances* han demostrado tener propiedades tecno-funcionales (Jantzen da Silva Lucas y col., 2020; Mishyna y col., 2019; Torruco-Uco y col., 2019). Debido a la funcionalidad que han demostrado estos insectos, algunos autores han utilizado harinas de insectos para sustituir una porción de carne en formulaciones como salchichas. Las larvas de *Tenebrio molitor* y las pupas de gusanos de seda, produjeron un mayor contenido de proteínas y minerales, así como un mayor rendimiento de cocción, y mayor dureza (Kim y col., 2016). Ju-Hye y col. (2019), reemplazaron de 10 a 60% de carne de cerdo con la adición de gusanos en la elaboración de hamburguesas. Otros investigadores han utilizado el insecto entero en forma de harina, como el grillo doméstico *A. domesticus* (Kim y col., 2017), las pupas del gusano de seda *B. mori* (Park y col., 2017) y las larvas del supergusano *Zophobas morio* (Scholliers y col., 2020).

Los insectos comestibles poseen las propiedades tecno-funcionales necesarias para ser utilizados como extensor para su incorporación en productos cárnicos, lo que podría contribuir a reducir la neofobia (Pintado y col., 2020).

La proteína de *Sphenarium purpurascens* puede ser una alternativa de bajo costo al uso de extensores ya que se considera una plaga en los cultivos de maíz y podría ser utilizada como ingrediente para productos de valor agregado.

### 1.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE ASISTIDA POR ULTRASONIDO

La extracción asistida por ultrasonido se usa para extraer compuestos bioactivos. El ultrasonido se propaga a través de una serie de ondas sonoras de alta frecuencia, de compresión y expansión inducidas en el medio que se emplea. Por encima de un umbral de intensidad, el ciclo de expansión puede romper la cohesión de un líquido y crear burbujas, efecto que se conoce como cavitación (Lepoint and Lepoint-Mullie, 1998). Durante la fase de expansión, pequeñas cantidades de vapor del medio entran en las cavidades y estas burbujas de gas atrapadas en el líquido crecen desde un tamaño inicial sub-micrónico hasta unas décimas de micrones hasta volverse inestables. La ruptura ocurre en un muy corto periodo de tiempo aproximadamente de 6 a 10 segundos. En el intervalo de frecuencia de 20-50 kHz, suficiente para conducir a un intenso calentamiento en la burbuja residual, el cual puede llegar a temperaturas de al menos 5000 K y presiones de hasta 1200 bar (Lepoint-Mullie y col., 1996). Ciertos beneficios en términos de penetración del disolvente surgen del uso de ultrasonido en

componentes de los alimentos, incluyendo la intensificación de transferencia de masa y efectos capilares. La extracción también podría mejorarse debido al colapso de las burbujas formadas por el efecto de cavitación. La tasa de extracción y el rendimiento pueden mejorarse mediante la combinación óptima de variables de ultrasonidos, como la intensidad y tiempo (Corona-Jiménez y col., 2016).

El ultrasonido es generado por una corriente eléctrica que se transforma mediante transductores, los más empleados son: baños ultrasónicos y piezoeléctricos, estos últimos transductores son los más empleados para la generación de sonido y tienen cerca del 95% de eficiencia y pueden operar en todo el intervalo ultrasónico (Arzeni, 2014).

Los ultrasonidos contribuyen a una mejora en las extracciones de proteínas debido a que los procedimientos de extracción suelen comprender una fase de calentamiento y/o agitación, lo que puede ser sustituido con ultrasonido, ya que la energía generada con el colapso de las burbujas de cavitación favorece la penetración del solvente, a la vez que incrementa la temperatura de la muestra y provoca una constante agitación, y por tanto el intercambio de materia se ve favorecido (Li, y col., 2004).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto en las propiedades fisicoquímicas de salchichas tipo Viena adicionadas con proteína soluble de chapulín extraída con un método combinado de alcalinización-ultrasonido.

## 2 DIAGRAMA GENERAL DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA Y ELABORACIÓN DE SALCHICHAS TIPO VIENA

Figura 1. Metodología general del trabajo de investigación (La metodología completa pueden visualizarse de acuerdo a Cruz-Lopez y col., 2022b).



### 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 PORCENTAJE DE GRASA Y PROTEÍNA EN HARINA DE CHAPULÍN

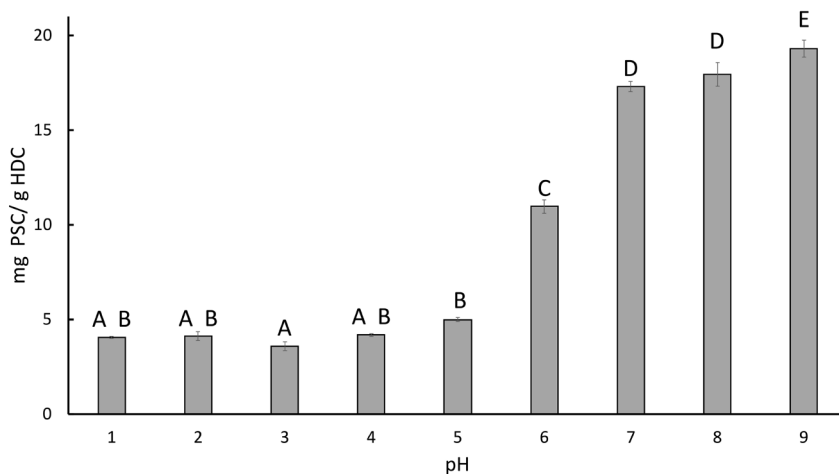
El mayor porcentaje de grasa se obtuvo después de 24 h ( $13.67 \pm 1.41$ ) de tratamiento con hexano y va disminuyendo a las 48 y 72 h ( $5.67 \pm 0.47$  y  $2.33 \pm 0.47$ , respectivamente). El análisis estadístico indica que no hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las 48 y 72 horas. El contenido de grasa total en la harina de chapulín fue de  $21.67 \pm 0.47\%$ , y es comparable a otros insectos como Chinche Gigante Xamuis (*Thasus gigas*) ( $20.05 \pm 2.5$ ) y la Avispa Seguidora (*Brachygastra azteca*) ( $21.65 \pm 1.1$ ) y un contenido de grasa menor comparado con el gusanillo *Phasus triangularis* ( $62.20 \pm 2.8$ ), la avispa *Polistes instabilis* ( $61.38 \pm 1.4$ ) y el gusano blanco de maguey *Acentrocneme hesperiaris* ( $58.92 \pm 3.5$ ) (Ramos-Elorduy y col., 2002). La harina de chapulín presentó un contenido de proteína total utilizando el factor  $N_{\text{Kjeldahl}}$  4.5 de  $39.39 \pm 0.84\%$ , los cuales son mayores a la proteína presente en carne de res, pollo y pescado (18-23%) (Yi y col., 2017). Por otra parte, el contenido de proteína es menor, en comparación con otros saltamontes como *Schistocerca spp.*, *Melanoplus femurrubrum*, *S. histrio* (Melo Ruiz y col., 2015). Sin embargo, el contenido de proteína reportado está dentro del intervalo reportado en insectos (13 a 77%), estas diferencias se deben al tipo de especie, hábitat, edad, dieta, estación, edad, género, procesamiento (De Carvalho y col., 2020; Kouřimská y Adámková, 2016) y el factor  $N_{\text{Kjeldahl}}$  utilizado el cual varía de 4.67 a 5.62 (Janssen y col., 2017). Para el orden Orthoptera, el factor  $N_{\text{Kjeldahl}}$  recomendado es de 4.5 con base en el análisis de aminoácidos presentes en estos insectos (Mishyna y col., 2019). Sin embargo, algunos autores señalan que la variación de proteína se debe a la concentración de nitrógeno no proteico en su estructura, como es el caso de los productos de excreción en el tracto intestinal (amoníaco) y la quitina que forma parte del exoesqueleto en proporciones de 5.3 a 6.6% (Janssen y col., 2017). Asimismo, los Ortópteros son considerados una fuente de proteínas alternativa, entre los cuales encontramos la langosta del desierto *S. gregaria*, las ninfas de la langosta migratoria *L. migratoris*, los grillos *Acheta domesticus* y los saltamontes, *Schistocerca spp.* y *Shpenarium histrio* (Melo Ruiz y col., 2015; Mishyna y col., 2019; Udomsil y col., 2019).

#### 3.2 EFECTO DEL PH EN LA SOLUBILIDAD DE PROTEÍNAS

La solubilidad de las proteínas está influenciada por la estructura de sus moléculas y la proporción de grupos polares y no polares, lo que hace que el pH sea un parámetro importante para cambiar la solubilidad de las proteínas (Jeong y col., 2021).

En la Figura 2 se muestra el perfil de solubilidad de las proteínas presentes en la harina desengrasada de chapulín, en la cual se observa que la solubilidad de las proteínas aumenta significativamente a valores de pH que oscilan entre 7,0 y 9,0, alcanzando una solubilidad máxima a pH 9,0 ( $19,33 \pm 0,45$  mg PSC/g HDC). Estos resultados son similares a los reportados en pH alcalinos entre 10,0 y 12,0 para solubilizar proteínas de insectos con altos rendimientos (Bußler y col., 2016; Mishyna y col., 2019; Udomsil y col., 2019; Yi y col., 2016; Zhao y col., 2016). Mientras tanto, a un pH entre 7,0 y 8,0 no se encontró diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en el contenido de proteína soluble. En condiciones ácidas (pH 1,0–5,0), se lograron concentraciones de proteína soluble bajas, siendo pH 3,0 el que presentó el valor más bajo ( $3,61 \pm 0,23$  mg PSC/g HDC), sin embargo, no se observan diferencias significativas. Estos resultados son similares a los reportados en otros insectos, que en condiciones ácidas disminuyen la solubilidad de sus proteínas, como se reportó para pupas de gusanos de seda *B. mori* (Kim y col., 2016); grillos *G. bimaculatus* y *A. domesticus* (Udomsil y col., 2019), saltamontes *S. gregaria*; abejas occidentales *A. mellifera* (Mishyna y col., 2019).

Figura 2. Efecto del pH en la solubilidad de la harina desengrasada de chapulín (HDC). Cada valor se expresa como la media ( $n=3$ )  $\pm$  la desviación estándar. A-E Letras diferentes mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). PSC (Proteína soluble de chapulín).

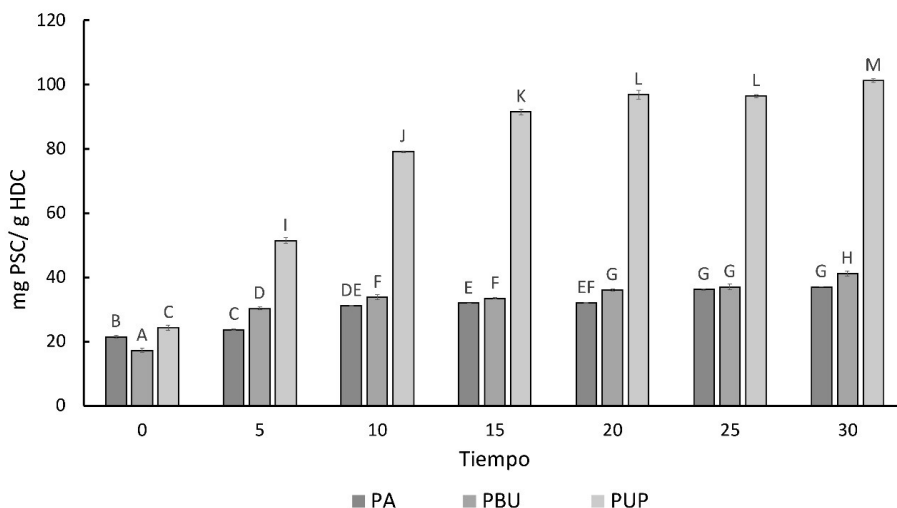


### 3.3 COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE DE CHAPULÍN

En la figura 3 se observan diferencias significativas entre diferentes métodos de extracción: proteína extraída por alcalinización (PA), proteína extraída por baño ultrasónico (PBU) y proteína extraída por ultrasonido piezoeléctrico (PUP). De

acuerdo con los resultados, PUP presentó las concentraciones más altas y el mejor rendimiento (60%) de proteína soluble en todos los tiempos de extracción, además es significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) con PA y PBU. Algunos autores indican que la extracción con ultrasonido permite mejorar las propiedades tecno-funcionales de las proteínas (solubilidad, capacidad y estabilidad de emulsión y los métodos de extracción) (Jambrak y col., 2009), y aumentan los rendimientos de extracción en insectos como larvas de gusano (*T. molitor*), grillo de campo adultos (*G. bimaculatus*) y pupas de gusanos de seda (*B. mori*) (Choi y col., 2017a).

Figura 3. Comparación de métodos de extracción de proteína soluble de chapulín (PSC) a diferentes tiempos de extracción. Cada valor se expresa como la media ( $n=3$ )  $\pm$  la desviación estándar; <sup>A-M</sup> Letras diferentes mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). PA (proteína extraída por alcalinización), PBU (proteína extraída por baño ultrasónico) y PUP (proteína extraída por ultrasonido piezoeléctrico).



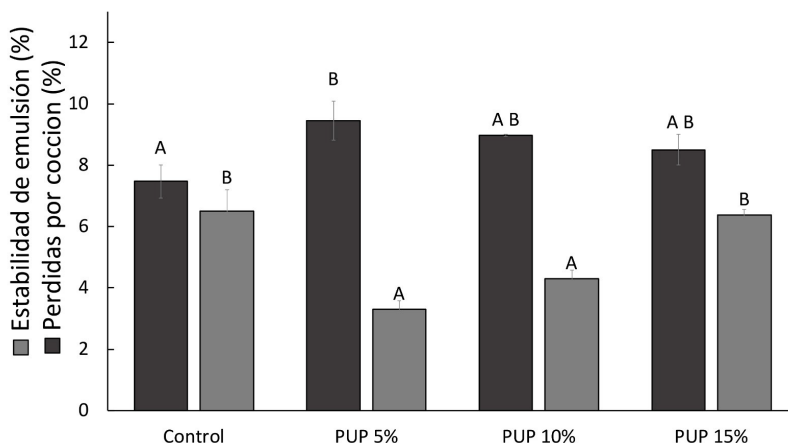
### 3.4 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES TECNO-FUNCIONALES DE LA PROTEÍNA EXTRAÍDA POR ULTRASONIDO PIEZOELÉCTRICO EN SALCHICHAS TIPO VIENA

#### 3.4.1 Pérdida por cocción y estabilidad de la emulsión

La pérdida por cocción (PC) y la estabilidad de la emulsión (EE) de las diferentes salchichas se muestran en Figura 4. Se observa que al utilizar PUP a valores de sustitución del 10% y 15%, las salchichas presentaron una menor PC y estas no presentan diferencias significativas con el control ( $p > 0.05$ ). La reducción de PC en los tratamientos con extracto de PUP podría deberse a la disminución de la humedad, lo que podría explicarse por el aumento del contenido de sólidos que se produjo al sustituir la porción de carne de cerdo (Kim y col., 2017; Park y col., 2017). Además, los resultados

obtenidos podrían indicar que PUP puede presentar cambios en su estructura, como carga superficial y exposición de grupos hidrofílicos o de hidrofobicidad presentes en la proteína. En cuanto a la EE, esta esta expresada en la separación total de fluidos expresables y cuanto menor sea el valor mejor es la estabilidad de emulsión (Choi y col., 2017b). Como se muestra en Figura 4, la emulsión cárnica presenta mejor estabilidad en concentraciones de 5% y 10% de PUP, y los resultados son menores y significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) al control. Estos resultados indican que el extracto de proteína *S. purpurascens* posee propiedades funcionales que ayudan a estabilizar la emulsión formada en los modelos cárnicos. Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Choi y col. (2017b) al incorporar *T. molitor L.* como sustituto de carne a niveles de 5%, 10% y 15%. Kim y col. (2016) no observaron diferencias en la EE con respecto al control en batidos cárnicos con 10% de *T. molitor* y *B. mori* como sustituto de carne. Los resultados obtenidos se pueden atribuir a la extracción asistida con ultrasonido, ya que las propiedades tecno-funcionales de las proteínas son equiparables al control. Además, algunos estudios han demostrado que el método de ultrasonidos aplicado durante el pretratamiento de proteínas de insectos como *S. gregaria*, *A. mellifera* (Mishyna y col., 2019), *Clanis Bilineata tingtauca Mell* (Wang y col., 2021) puede modificar el tamaño de partícula, la solubilidad, aumentar el contenido de sulfhidrilos, aumentar la hidrofobicidad superficial y las propiedades reológicas en las proteínas extraídas debido a sus efectos físicos como las ondas superficiales capilares y la cavitación acústica.

Figura 4. Estabilidad de emulsión (EE) y pérdidas por cocción (PC) en diferentes formulaciones de salchichas con diferentes niveles de sustitución de carne. Cada valor se expresa como la media ( $n=3$ )  $\pm$  la desviación estándar; <sup>A,B</sup> Letras diferentes mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). PUP (proteína extraída por ultrasonido piezoeléctrico).

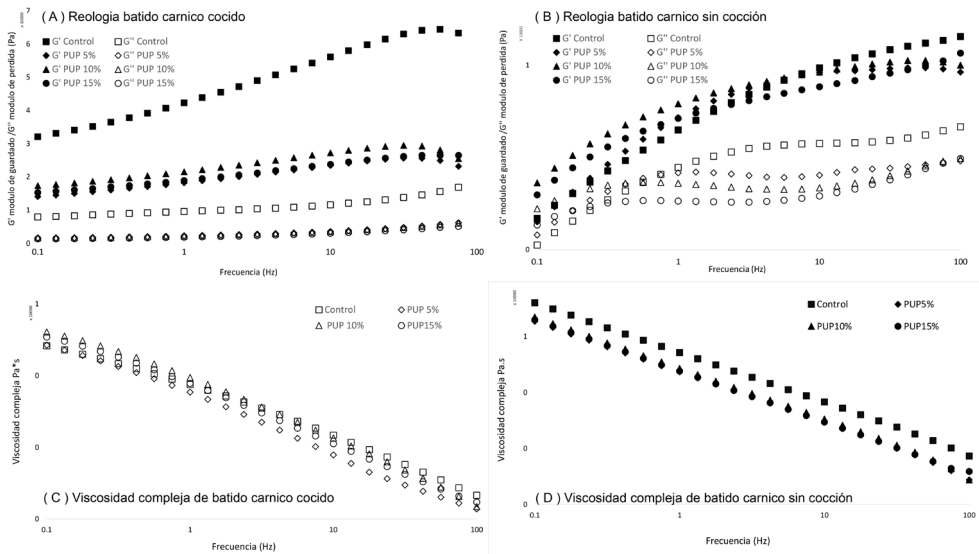


### 3.4.2 Pruebas reológicas (Propiedades viscoelásticas)

La reología oscilatoria dinámica para las salchichas elaboradas con PUP como sustituto de carne se muestra en Figura 5. Los módulos  $G'$  y  $G''$  para los diferentes tratamientos presentan un comportamiento dependiente de la frecuencia, donde el componente elástico ( $G'$ ) está por encima del componente viscoso ( $G''$ ) en todo el intervalo de frecuencia (Figura 5A-B), lo que indica la formación de estructuras de gel ordenadas y elásticas (Li y col., 2020). Por otro lado, se observa una mayor magnitud después de la cocción, donde  $G'$  predominó esto significa que predomina la elasticidad sobre la viscosidad. Para el caso de los batidos antes de la cocción (Figura 5B) se observa valores en los módulos por arriba de la muestra control hasta frecuencias de deformación de 1 y 10 para  $G''$  y  $G'$ , donde el comportamiento se invierte, quedando la muestra control por encima del resto de los perfiles, este comportamiento es característico de los materiales viscoelásticos débiles, que tienden a exhibir un comportamiento similar al sólido donde la elasticidad predomina sobre la viscosidad (Gibis y col., 2017; Scholliers y col., 2020). El comportamiento reológico obtenido para los diferentes tratamientos de esta investigación es similar a lo reportado por Scholliers y col. (2020) donde evaluaron el efecto de la temperatura de calentamiento (70 °C a 90 °C) en la gelificación de soluciones de diferentes proporciones de proteína de larvas de *Z. morio* y proteínas de cerdo en salchichas cocidas. Sus resultados mostraron geles con características elásticas donde  $G'$  fue predominante sobre  $G''$  mostrando una ligera dependencia de la frecuencia. Por el contrario, algunos autores obtuvieron resultados diferentes en sistemas emulsionados usando larvas de *T. molitor* como sustitutos parciales de la proteína miofibrilar ya que los módulos  $G'$  y  $G''$  no se agrupan entre tratamientos (Kim y col., 2020). Las diferencias podrían atribuirse a que una matriz de carne es más compleja en comparación con los sistemas controlados en términos de pH, temperatura y concentración de proteína. Los resultados mostraron que  $\eta^*$  fue menor en los batidos con 5% de PUP, mientras que aquellos con 10 y 15% presentaron valores superiores al control antes de la cocción a bajas frecuencias de deformación (Figura 5 B), por otro lado,  $\eta^*$  fue mayor para el control después de la cocción (Figura 4A). Esto podría explicarse porque la proteína comestible de insectos tiene la capacidad de reducir las capacidades de unión de agua y grasa (Choi y col., 2017b; Kim y col., 2016; Kim y col., 2020). El control y todos los tratamientos con PUP presentaron un comportamiento tixotrópico, disminuyendo valores de  $\eta^*$  con el aumento del tiempo de rotación (Figura 5 C-D) (Choi y col., 2017b). Los datos obtenidos son similares a los resultados reportados por Gibis y col. (2017) donde incorporó CMC a formulaciones

de salchichas y en todas las muestras G' es mayor, por lo cual las muestras son más elásticas y el aumento de la frecuencia debilita la estructura.

Figura 5. Reología oscilatoria dinámica de modelos de carne con proteína extraída por ultrasonido piezoeléctrico (PUP) antes y después de la cocción. Módulo de almacenamiento G' y módulo de pérdida G'' (Pa) y viscosidad compleja  $\eta^*$  (Pa s).



## 4 CONCLUSIONES

La alcalinización combinada con el método de ultrasonido mejora la solubilidad y extracción de proteína, además de mejorar las propiedades tecnofuncionales de la proteína extraída de *Sphenarium purpurascens* en salchichas a niveles de sustitución de carne del 10%, equiparándose al control (100% carne). La proteína extraída con ultrasonido piezoeléctrico (PUP) puede usarse como extensor en productos cárnicos, sin embargo, se recomienda seguir estudiando el efecto de otras proteínas de insectos para desarrollar productos con alto valor agregado.

## REFERENCIAS

Andújar, G., Guerra, M. G. y Santos, R. (2007). La utilización de extensores cárnicos experiencias de la industria cárnica cubana. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

Apango, A. (2013). Elaboración de productos cárnicos, SAGARPA, México.

Buñler, S., Rumpold, B. A., Jander, E., Rawel, H. M., & Schlüter, O. K. (2016). Recovery and techno-functionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Heliyon*, 2(12), e00218.



- Chel-Guerrero, L. A., Corzo-Ríos, L., Betancur-Ancona, D. A. (2003). Estructura y propiedades funcionales de proteínas de leguminosas. *Revista de la Universidad autónoma de Yucatán*. 34-43.
- Choi, B. D., Wong, N. A. K., & Auh, J. H. (2017a). Defatting and Sonication Enhances Protein Extraction from Edible Insects. *Korean journal for food science of animal resources*, 37(6), 955–961.
- Choi, Y. S., Kim, T. K., Choi, H. D., Park, J. D., Sung, J. M., Jeon, K. H., Paik, H. D., & Kim, Y. B. (2017b). Optimization of Replacing Pork Meat with Yellow Worm (*Tenebrio molitor L.*) for Frankfurters. *Korean journal for food science of animal resources*, 37(5), 617–625.
- Corona-Jimenez, E., Martinez, R., Ruiz, H., Carranza, J., 2016. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de semillas de chia (*Salvia hispanica L.*) y su actividad antioxidante. *Agrociencia*. 50.
- Cruz-López, S. O., Álvarez-Cisneros, Y. M., Domínguez-Soberanes, J., Escalona-Buendía, H. B., & Sánchez, C. N. (2022a). Physicochemical and Sensory Characteristics of Sausages Made with Grasshopper (*Sphenarium purpurascens*) Flour. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(5), 704.
- Cruz-López, S. O., Escalona-Buendía, H. B., Román-Guerrero, A., Domínguez-Soberanes, J., & Alvarez-Cisneros, Y. M. (2022b). Characterization of Cooked Meat Models using Grasshopper (*Sphenarium purpurascens*) Soluble Protein Extracted by Alkalisiation and Ultrasound as Meat-Extender. *Food science of animal resources*, 42(3), 536–555.
- Fenemma, O. (2010). *Química de los Alimentos*. III. Acribia. Zaragoza. España. 1166.
- De Carvalho, N. M., Madureira, A. R., & Pintado, M. E. (2020). The potential of insects as food sources - a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(21), 3642–3652.
- Gibis, M., Schuh, V., Allard, K., & Weiss, J. (2017). Influence of molecular weight and degree of substitution of various carboxymethyl celluloses on unheated and heated emulsion-type sausage models. *Carbohydrate polymers*, 159, 76–85.
- Hleap, J. I., Cardona, L., Agudelo, J., Gomez, A., (2015). Parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales de salchichas elaboradas con inclusión de quitosano. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 18 (2): 455 - 464.
- Hui, Y. H., Guerrero, I., Rosmini, M. R. 2006. *Ciencia y tecnología de carnes*. Limusa. México. 229-230.
- Jambrak AR, Lelas V, Mason TJ, Krešić G, Badanjak M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*. 93: 386-393.
- Janssen, R. H., Vincken, J. P., van den Broek, L. A., Fogliano, V., & Lakemond, C. M. (2017). Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Three Edible Insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(11), 2275–2278.
- Jantzen da Silva Lucas, A., Menegon de Oliveira, L., da Rocha, M., & Prentice, C. (2020). Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. *Food chemistry*, 311, 126022.
- Jeong, M. S., Lee, S. D., & Cho, S. J. (2021). Effect of Three Defatting Solvents on the Techno-Functional Properties of an Edible Insect (*Gryllus bimaculatus*) Protein Concentrate. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(17), 5307.
- Ju-Hye, C.; Hae In, Y.; Su-Kyung, K.; Tae-Kyung, K.; Yun-Sang, C. (2019). The quality characteristics of pork patties according to the replacement of mealworm (*Tenebrio molitor L.*). *Korean Journal Food Cook Science*. 35: 441–449.

Kim HW, Setyabrata D, Lee YJ, Jones OG, Kim YHB. (2016). Pre-treated mealworm larvae and silkworm pupae as a novel protein ingredient in emulsion sausages Innovative Food Science and Emerging Technologies. 38:116-123.

Kim, H. W., Setyabrata, D., Lee, Y., Jones, O. G., & Kim, Y. H. B. (2017). Effect of House Cricket (*Acheta domesticus*) Flour Addition on Physicochemical and Textural Properties of Meat Emulsion Under Various Formulations. Journal of food science, 82(12), 2787–2793.

Kim, T. K., Yong, H. I., Kim, Y. B., Kim, H. W., & Choi, Y. S. (2019). Edible Insects as a Protein Source: A Review of Public Perception, Processing Technology, and Research Trends. Food science of animal resources, 39(4), 521–540.

Kim, T. K., Lee, M. H., Yong, H. I., Jung, S., Paik, H. D., Jang, H. W., & Choi, Y. S. (2020). Effect of Interaction between Mealworm Protein and Myofibrillar Protein on the Rheological Properties and Thermal Stability of the Prepared Emulsion Systems. Foods (Basel, Switzerland), 9(10), 1443.

Kouřimská L, Adámková A. (2016). Nutritional and sensory quality of edible insects. NFS Journal; 4:22–26.

Lepoint-Mullie, F., De Pauw, D., Lepoint, T., Supiot, P., Avni, R. (1996). Nature of the “extreme conditions” in single sonoluminescing bubbles. The Journal of Physical Chemistry. 100 (30): 12138-12141.

Lepoint, T., and Lepoint-Mullie, F. (1998). Theoretical bases. En J. L. Luche (Ed.), Synthetic Organic Sonochemistry. New York: Plenum. 1-49.

Li K, Fu L, Zhao YY, Xue SW, Wang P, Xu XL, Bai YH. (2020). Use of high-intensity ultrasound to improve emulsifying properties of chicken myofibrillar protein and enhance the rheological properties and stability of the emulsion. Food Hydrocolloids.;98:105275. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105275.

Li, H., Pordesimo, L., & Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. Food Research International. 37: 731-738.

Melo Ruiz, V., Sandoval ITrujillo, H., Quirino-Barreda, C., Sanchez Herrera, K., DazGarca, R., Calvo Carrillo, C. (2015). Chemical composition and amino acids content of five species of edible Grasshoppers from Mexico. Emirates Journal of Food and Agriculture. 17.

Mishyna, M., Martinez, J. I., Chen, J., & Benjamin, O. (2019). Extraction, characterization and functional properties of soluble proteins from edible grasshopper (*Schistocerca gregaria*) and honeybee (*Apis mellifera*). Food research international (Ottawa, Ont.), 116, 697–706.

Mishyna M, Keppler JK, Chen J. (2021). Techno-functional properties of edible insect proteins and effects of processing. Current Opinion in Colloid & Interface Science.56:101508.

Park, Y. S., Choi, Y. S., Hwang, K. E., Kim, T. K., Lee, C. W., Shin, D. M., & Han, S. G. (2017). Physicochemical Properties of Meat Batter Added with Edible Silkworm Pupae (*Bombyx mori*) and Transglutaminase. Korean journal for food science of animal resources, 37(3), 351–359.

Pintado, T., & Delgado-Pando, G. (2020). Towards More Sustainable Meat Products: Extenders as a Way of Reducing Meat Content. Foods (Basel, Switzerland), 9(8), 1044.

Ramos-Elorduy, J., Pino, J. M., y Morales de León, J. 2002. Análisis químico proximal, vitaminas y nutrimentos inorgánicos de insectos consumidos en el estado de Hidalgo, México. Folia entomológica mexicana. 41: 15-29.

Torruco-Uco JG, Hernández-Santos B, Herman-Lara E, Martínez-Sánchez CE, Juárez-Barrientos JM, Rodríguez-Miranda J. (2019). Chemical, functional and thermal characterization, and fatty acid profile of the edible grasshopper (*Sphenarium purpurascens* Ch.) Eur Food Res Technol. 245:285–292.

Scholliers, J., Steen, L., & Fraeye, I. (2020). Partial replacement of meat by superworm (*Zophobas morio* larvae) in cooked sausages: Effect of heating temperature and insect: Meat ratio on structure and physical stability. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 66, 102535.

Smarzyński K, Sarbak P, Musiał S, Jeżowski P, Piątek M, Kowalczewski PŁ. (2019). Nutritional analysis and evaluation of the consumer acceptance of pork pâté enriched with cricket powder - Preliminary study. The Open Agriculture Journal.;4:159–163.

Udomsil N, Imsoonthornruksa S, Gosalawit C, Ketudat-Cairns M. (2019). Nutritional values and functional properties of house cricket (*Acheta domestica*) and field cricket (*Gryllus bimaculatus*) Food Science and Technology Research. 25:597–605.

Van Huis A, Van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, Vantomme P. (2013). Edible insects: Future prospects for food and feed security. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); Rome, Italy: FAO Forestry Paper no. 171.

Wang, S., Zhou, B., Shen, Y., Wang, Y., Peng, Y., Niu, L., Yang, X., & Li, S. (2021). Effect of ultrasonic pretreatment on the emulsification properties of *Clanis Bilineata* Tingtauica Mell protein. Ultrasonics sonochemistry, 80, 105823.

Yi, L., Lakemond, C. M., Sagis, L. M., Eisner-Schadler, V., van Huis, A., & van Boekel, M. A. (2013). Extraction and characterization of protein fractions from five insect species. Food chemistry, 141(4), 3341–3348.

Yi, L., Van Boekel, M.A.J.S., & Lakemond, C.M.M. (2017). Extracting *Tenebrio molitor* protein while preventing browning: effect of pH and NaCl on protein yield. Journal of Insects as Food and Feed, 3(1), 21-32.

Zhao, X., Vázquez-Gutiérrez, J. L., Johansson, D. P., Landberg, R., & Langton, M. (2016). Yellow Mealworm Protein for Food Purposes - Extraction and Functional Properties. PloS one, 11(2), e0147791.

# CAPÍTULO 7

## PRODUCCIÓN ARTESANAL DE PILONCILLO CON ENFOQUE SOSTENIBLE<sup>1</sup>

Data de submissão: 30/09/2024

Data de aceite: 14/10/2024

### **M.C. Luisiana Fabiola Palomo González**

Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de  
San Luis Potosí  
San Luis Potosí, México

<https://orcid.org/0009-0000-6263-2941>

### **José Antonio de los Reyes**

Área de Ingeniería Química  
Universidad Autónoma Metropolitana  
Iztapalapa, Ciudad de México, México

<https://orcid.org/0000-0003-1962-9848>

### **Marco A. Sánchez Castillo**

Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de  
San Luis Potosí  
San Luis Potosí, México

<https://orcid.org/0000-0002-5989-0453>

**RESUMEN:** Una deuda histórica en las comunidades rurales mexicanas con altas necesidades socioeconómicas es mejorar la economía de sus micro y pequeñas unidades agroindustriales, como factor clave para lograr una mejor calidad de vida de las familias. En este capítulo se describe un modelo interdisciplinar e intersectorial para contribuir al desarrollo sostenible de comunidades que se dedican al cultivo de la caña de azúcar y a la producción artesanal de piloncillo. De forma relevante, se identifican y validan los principales elementos tecnológicos, sociales, económicos, ambientales y energéticos, que se deben tomar en cuenta al definir una estrategia de desarrollo sostenible para estas comunidades. Así mismo, se documenta la propuesta del equipo de trabajo para lograr la “Producción artesanal de piloncillo con enfoque sostenible” en comunidades piloncilleras Tének, localizadas en el centro geográfico de México. En particular, se describen los retos, estrategias, acciones, avances y favorables impactos conseguidos al aplicar el modelo en campo. Notoriamente, la operación sostenible de las micro y pequeñas unidades piloncilleras Tének se concretará en la medida que los miembros de la comunidad se organicen para formalizar las figuras legales a través de las cuales comercialicen productos en los mercados nacional e internacional. El modelo de investigación e incidencia propuesto para detonar el desarrollo sostenible de micro y pequeñas unidades productivas luce

<sup>1</sup> Los autores agradecen el apoyo económico de parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) de México para el desarrollo del proyecto de investigación e incidencia PRONACES 321073 “Desarrollo social y económico de pequeñas unidades agroindustriales con base en la socialización, gestión, generación y/o uso eficiente de energía sustentable”, cuyos resultados sustentan esta publicación.

muy promisorio y se validará en otros sistemas productivos rurales en zonas de alta marginación socioeconómica.

**PALABRAS CLAVE:** Desarrollo sostenible. Comunidades Tének. Piloncillo artesanal. Calidad y productividad. Comercio justo.

## 1 INTRODUCCIÓN

En México, la caña de azúcar es un cultivo muy extendido en las zonas cálidas del país y un producto agrícola de particular relevancia por su contribución a las cadenas de valor del sector alimentario, así como por su favorable impacto a la economía y al desarrollo social de las zonas rurales del país (SADER 2024). Diversas políticas, estrategias y programas públicos de apoyo incentivan el incremento de la productividad, la calidad y la competitividad en el cultivo, cosecha y conversión de la caña de azúcar a nivel industrial. Estas iniciativas benefician preferentemente a los medianos y grandes productores de caña de azúcar y a los ingenios cañeros. Sin embargo, los apoyos no son equitativos para los micro y pequeños productores (MyPP) de caña de azúcar, en particular para quienes laboran en comunidades que exhiben altos niveles de rezago social y económico.

Los MyPP de caña de azúcar deben darle un valor agregado para comercializarla localmente ante la imposibilidad de venderla en un ingenio azucarero. En este escenario, recurren a procesos artesanales centenarios para convertir la caña de azúcar en jugo, melaza, pilón y piloncillo granulado, todos ellos son productos representativos de la gastronomía tradicional mexicana. Los procesos artesanales adolecen de la tecnología y de las buenas prácticas de manufactura necesarias para mejorar la productividad y calidad de los productos, pero incluyen elementos culturales y tradicionales que son signo de identidad de los pueblos originarios, como es el caso de las comunidades Tének de la huasteca potosina, localizada en el centro geográfico de México. Los productores artesanales de piloncillo deben también enfrentar otro reto mayúsculo en su actividad productiva, un proceso de comercialización de sus productos que reside en un intermediarismo unilateral e injusto, que condiciona drásticamente sus ingresos económicos y acota su potencial para ofrecer una buena calidad de vida a sus familias.

En este contexto de retos complejos para los MyPP, también se pueden identificar oportunidades. En cierta medida, en las últimas dos décadas las comunidades Tének productoras de piloncillo han recibido apoyos de organizaciones públicas y privadas que no se hacen patentes en el campo. Un análisis de los apoyos otorgados sugiere que, en cada oportunidad, los apoyos se han dirigido a diferentes eslabones de la cadena de valor del sistema productivo caña de azúcar – piloncillo, ya sea a los aspectos agrícolas de cultivo y cosecha, a la infraestructura y servicios requeridos para la conversión de la

caña, a la habilitación de los espacios donde llevan a cabo sus procesos (conocidos como trapiches) o a la capacitación técnica de los productores, por indicar los más recurrentes. Sin embargo, hay algunos aspectos que por lo general no se consideran. Uno de ellos es el proceso de comercialización directa de los productos del trapiche en el mercado, sin intermediarios, que implica una capacitación de los productores en emprendimiento o en esquemas de economía solidaria. Otro elemento relevante tiene que ver el desarrollo de la confianza, la autoestima y el empoderamiento de los productores, para que reconozcan sus derechos y los hagan valer, para que tengan la motivación y la capacidad de identificar soluciones para enfrentar los retos y gestionar soluciones viables. Además, se requiere convencer e inducir a los productores al trabajo en equipo, para que sean capaces de colaborar solidariamente, de asociarse para hacer sus gestiones ante organizaciones públicas y privadas, para instalar centros de procesamiento comunitarios y para crear figuras legales que les faciliten la comercialización directa de su productos artesanales. Todos los elementos indicados coadyuvan al desarrollo del productor, de la unidad productiva, de las comunidades y, sin duda promueven diferentes facetas del desarrollo sostenible.

En el propósito de contribuir a la producción sostenible de piloncillo artesanal, el equipo de trabajo considera pertinente promover otros elementos como: a) el uso de energías alternativas, particularmente la energía solar, para mejorar las condiciones de trabajo en el trapiche y la calidad de vida en las viviendas, b) esquemas de economía circular que valoricen los residuos agrícolas, agroindustriales y domésticos que se generan alrededor de estas unidades productivas. Este último enfoque permite generar energía verde y productos químicos de valor agregado que, además de diversificar la cartera de productos del trapiche, son un vector para que los productores obtengan mejores ingresos económicos, como premisa indispensable del bienestar de sus familias.

Con base a lo anterior, el grupo de trabajo realizó un diagnóstico comunitario para identificar, validar y jerarquizar los retos y oportunidades de las comunidades piloncilleras Tének de la huasteca potosina. El diagnóstico indicó el interés de los productores para considerar las opciones de energía alternativa para mejorar las condiciones de trabajo en el trapiche y de vida en sus casas. Los productores también reconocieron el potencial de la valorización de los residuos antes referido. Si embargo, fueron inflexibles al indicar que previo a estas alternativas de desarrollo necesitaban, urgentemente, resolver el reto del intermediarismo en la venta de sus productos. El equipo de trabajo fue sensible a esta solicitud y convino con los productores en establecer una estrategia que, involucrando todos los eslabones de la cadena de producción artesanal del piloncillo, abriera una

oportunidad para abrir canales alternativos de comercialización. La estrategia propuesta por el equipo de trabajo se basó en tres ejes: i) el desarrollo científico y tecnológico, ii) el emprendimiento social y iii) la gestión social comunitaria. De forma operativa, al integrar elementos de los ejes referidos, el proyecto promovió el desarrollo de 3 paquetes tecnológicos para las comunidades, siendo uno de ellos la “Producción artesanal de piloncillo con enfoques sostenible”. En este caso, las estrategias y acciones de campo realizadas en las unidades productivas y en las viviendas de las familias, propiciaron la transferencia de saberes entre los miembros de las comunidades y los académicos, la implementación de buenas prácticas de manufactura para mejorar el proceso productivo, la inducción al emprendimiento social para promover la comercialización directa de los productos y las acciones de sensibilización de niños y jóvenes para destacar los valores personales, familiares y comunitarios, a la par de la protección del medio ambiente y la valorización de residuos.

En este capítulo, se da un contexto de la relevancia de la producción de caña de azúcar en México y se hace énfasis en la importancia que tiene la conversión artesanal de la caña de azúcar en piloncillo por parte de los micro y pequeños productores. A continuación, se describen detalles del proceso de producción artesanal del piloncillo en las comunidades Tének de la huasteca potosina y las áreas de oportunidad asociadas a los aspectos técnicos de la producción. La atención de esta oportunidad se enriqueció con diálogos con otros grupos de investigación e incidencia que ejecutan proyectos similares en diferentes sistemas productivos rurales. Como producto de esas experiencias, el equipo de trabajo identificó una serie de elementos sociales, económicos, energéticos, ambientales y técnicos que deben guiar la propuesta de plan integral de incidencia para lograr el desarrollo sostenible de unidades productivas piloncillas. Estas experiencias se discuten como parte relevante del capítulo, que concluye con la propuesta específicamente diseñada para las comunidades piloncilleras Tének de la huasteca potosina. La documentación incluida en este capítulo abona al desarrollo de un modelo de investigación-incidencia que facilite la identificación de rutas críticas que resuelvan los retos que enfrentan los sistemas productivos rurales, sobre todo aquellos que residen en comunidades con grandes retos socioeconómicos, con un enfoque sostenible.

## 2 CONTEXTO DE LA CAÑA DE AZÚCAR EN MÉXICO

La caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, es una gramínea originaria de Nueva Guinea cuyo cultivo se extendió progresivamente a zonas tropicales a subtropicales alrededor del mundo; en la actualidad, los principales países productores de caña de

azúcar se ubican entre los 36.7° de latitud norte y los 31.0° al sur del Ecuador (SAGARPA, 2015). En España, la caña se introdujo en el siglo VIII y fue traída a México alrededor de 1522. La primera plantación se llevó a cabo en Veracruz, en donde también se instalaron los primeros ingenios azucareros. El cultivo se extendió a otras zonas cálidas del país y en la actualidad la caña de azúcar se cultiva en 22 estados mexicanos (SAGARPA – CONADESUCA, 2015; SAGARPA, 2017).

## 2.1 PERFIL DE PRODUCTORES DE CAÑA DE AZÚCAR

De forma muy general, en las zonas rurales de México se identifican dos grandes grupos asociados a la producción de caña de azúcar.

### **a) Medianos y Grandes Productores de caña de azúcar**

Este grupo lo constituyen productores que tienen más de 3 ha de terreno de cultivo, tienen legalizada la tenencia de la tierra, cultivan una variedad de caña adecuada a las condiciones climatológicas de su región, usan aditivos agrícolas para incrementar el rendimiento de producción, cuentan con la tecnología apropiada para el cultivo, la cosecha y el traslado de la caña al ingenio azucarero, al cual tiene acceso mediante acuerdos preestablecidos en términos de la aceptación y precio del producto, lo cual les da cierta estabilidad financiera.

### **b) Micro o Pequeños Productores de caña de azúcar**

En este grupo se identifican productores con terrenos de cultivo igual o menor a 1 ha (micro-productores) o de 1 a 3 ha (pequeños productores). Se distinguen también porque no tienen legalizada la tenencia de la tierra, tienen diversas variedades de caña en su campo, el cultivo es de temporal y no usan aditivos ni tecnología en sus procesos agrícolas. Notoriamente, los micro y pequeños productores (MyPP) no tienen la posibilidad de entregar su caña de azúcar a un ingenio para obtener un beneficio económico por lo que deben convertir la caña en otros productos para darle valor agregado.

De esta forma, existen enormes brechas entre ambos perfiles de productores en cuanto al nivel de extensión de terreno, variedades vegetales y tecnificación del cultivo y cosecha, que repercuten en la productividad y la calidad de la caña de azúcar. Estas brechas se acentúan aún más cuando se hace el comparativo del proceso de comercialización y los consecuentes beneficios económicos. Por una parte, los medianos y grandes productores abastecen los ingenios azucareros, cuentan con precisión de garantía y reciben anticipos económicos que les permiten vivir más dignamente previo a la época de la zafra. Por el contrario, los MyPP deben cosechar y procesar por su cuenta



la caña de azúcar. Es común en muchas regiones de México que la caña se convierta en piloncillo, un edulcorante artesanal, usando pequeñas unidades productivas rurales conocidas como “trapiches”, mediante procesos artesanales, que se basan en la cultura y/o tradiciones centenarias de sus comunidades.

En este escenario, los MyPP viven de su trabajo diario, ya que por lo general venden el piloncillo al final de la jornada, al pie de su trapiche. La compra la realiza un intermediario que, por lo general, fija unilateralmente el precio de venta, con insignificantes beneficios económicos para los productores. Este desventajoso proceso de comercialización de piloncillo artesanal ha existido por décadas y constituye el principal reto para mejorar la economía de los productores y, en consecuencia, el bienestar de sus familias.

## 2.2 PRODUCCIÓN DE CAÑA DE AZÚCAR

En general, México se identifica como un importante productor de caña a nivel mundial. En 2019, México ocupó el sexto lugar como productor de caña de azúcar con 56,446,821 ton y el séptimo lugar como exportador de azúcar con un total de 1,896,932 t (Reyes-Hernández et al., 2019). En el Segundo Estimado de Producción de Caña y Azúcar de la zafra 2020/21, la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) y la CONADESUCA reportaron que la superficie de caña de azúcar a industrializar fue de 805,491 ton, con un rendimiento en campo promedio de 66.94 ton/ha. El rendimiento de fábrica fue de 11.24% y el rendimiento agroindustrial fue estimado en 7.52 ton/ha (CONADESUCA, 2021). Internamente, en 2020, la SADER reportó que el estado de Veracruz fue el principal productor de caña (21,414,981 ton), seguido de Jalisco (7,635,000 ton) y San Luis Potosí (4,188,000 ton). En este estado, la producción de caña de azúcar se localiza en la región geográfica conocida como la huasteca potosina, que en 2021 tuvo un rendimiento promedio de 52.22 ton/ha. en esta región los principales municipios productores fueron: Ébano (71.94 ton/ha), Tampamolón Corona (67.4 ton/ha), San Vicente Tancuayalab (66.82 ton/ha), Tamuín (63.42 ton/ha), Ciudad Valles (52.2 ton/ha), Tanlajás (50 ton/ha) Aquismón (49.86 ton/ha), Tancanhuitz (47.59 ton/ha), Tamasopo (47.31 ton/ha) y el Naranjo (47.11 ton/ha) (SIAP, 2022). Es importante hacer notar que los niveles de producción de caña documentados públicamente no siempre son representativos de la contribución real de los MyPP, debido a que no hay censos comunitarios o municipales de estos productores; esta situación contrasta con el seguimiento detallado que se puede hacer a partir de la caña que los medianos y grandes productores procesan para los ingenios azucareros.

## 2.3 RELEVANCIA ECONÓMICA DEL SECTOR CAÑERO

La caña de azúcar es un producto agrícola básico en México. Las familias mexicanas tienen un consumo per cápita promedio de 36.7 kg de azúcar/año y su gasto en productos derivados de la caña de azúcar representa el 0.5% de su gasto total en alimentos, bebidas y tabaco (SADER, 2018; Secretaría de Agricultura, 2022). Económicamente, la industria azucarera es un motor de desarrollo económico en zonas rurales y tiene el potencial para exportar diversos productos derivados de la caña de azúcar (PRONAC, CONDUSECA 2021). En 2021, la SEDAR reportó que se cultivaron más de 800,000 ha de caña de azúcar en 267 municipios de 15 Estados y que más de 170 mil productores agrícolas abastecieron la operación de 49 ingenios azucareros. Se estimó que la cadena de valor generó entre 40,000 – 50,000 millones de pesos (SEDAR, 2021). En el mismo periodo, la agroindustria de la caña de azúcar generó alrededor de 440 mil empleos directos y 2.2 millones de empleos indirectos (PRONAC, CONDUSECA 2021). La Cámara Nacional de las Industrias Azucarera y Alcohólica de México estimó que en esta agroindustria involucra a 500,000 familias, 182,379 abastecedores de caña, 153,714 jornaleros, 69,971 cortadores, 31,318 transportistas, 34,916 trabajadores sindicalizados, 7,689 trabajadores de confianza y 11,822 jubilados (CONUEE, 2023). En la zafra 2020-2021, la agroindustria de la caña de azúcar representó el 0.50% del PIB de México, aportó el 3.01% de la industria manufacturera, participó con el 16.74% del PIB en la industria alimentaria, mientras que con el 6.21% PIB agropecuario (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022). En la misma zafra, el 80 % de la azúcar producida se destinó al mercado interno y el 20% para exportación (CONADESUCA, 2022). De hecho, en ese periodo México se ubicó en el cuarto lugar de exportación de confitería a nivel internacional, con un 6 % aproximado del total mundial (SAGARPA, 2017).

Los datos anteriores muestran la relevancia del sector cañero industrial para la economía de México. Sin embargo, se enfatiza que no están disponibles en el país los indicadores económicos de los micro y pequeños productores de caña de azúcar. Estos indicadores son necesario para documentar la situación urgente que prevalece en este tipo micro y pequeñas unidades agroindustrias rurales, que tienen múltiples y complejas necesidades que resolver, para que los procesos artesanales sean viables económicamente y que generen los ingresos económicos suficientes para dar un sustento digno a sus familias.

## 2.4 IMPACTOS SOCIALES DEL SECTOR CAÑERO

La calidad de vida de una familia rural es notoriamente dependiente de su nivel de ingreso económico. En el caso de los MyPP de caña de azúcar, el ingreso reside en

el cultivo, la cosecha y el procesamiento artesanal de la caña de azúcar. Como en todas las cadenas productivas, los ingresos económicos de los productores cañeros están sujetos a la dinámica de la oferta y la demanda de la caña de azúcar (y de sus productos) en el mercado a nivel nacional, que depende de múltiples e interdependientes factores climáticos, tecnológicos, logísticos, económicos y políticos, entre otros. Como resultado, los ingresos económicos de los productores de caña de azúcar son muy variables, pero repercuten de forma más notoria para los MyPP, que están cautivos a un proceso de comercialización controlado por intermediarios. De esta forma, el promedio de ingresos de MyPP solo alcanza el salario mínimo vigente en México, cuando es temporada de caña y pueden procesar sus productos. Si bien el ciclo de vida de la caña de azúcar demanda que el MyPP realice diversas actividades en campo a lo largo del año, su ingreso económico está acotado, por lo general, a un periodo de 6 a 8 meses del año. Esta situación tiene drásticas repercusiones para la condiciones de vida de sus familias y, como resultado, los MyPP emigran un periodo del año a buscar trabajos rurales o urbanos.

De esta forma, como resultado de sus limitados ingresos económicos, los MyPP de la huasteca potosina tienen enormes retos sociales que resolver en materia de vivienda, salud, educación, agua, energía, por mencionar los más apremiantes. Estos rezagos son históricos y muy pocas veces son tomados en cuenta cuando se diseñan políticas públicas y se implementan programas de apoyo asociados al sistema productivo de caña de azúcar. Esta situación debe ser analizada, resuelta y revertida, como premisa básica para garantizar una buena calidad de vida y un horizonte de desarrollo más promisorio para los productores y sus familias.

## 2.5 PERSPECTIVAS DE DESARROLLO DEL SECTOR CAÑERO

Se han realizado y documentado múltiples diagnósticos y análisis de fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas para los productores de caña en México. La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural de México (SADER, 2021) identificó que los retos principales a nivel federal para la caña de azúcar al 2024 incluían: la diversificación del aprovechamiento tradicional de la caña de azúcar, el fortalecimiento productivo y estratégico de la agroindustria de la caña de azúcar, el uso de nuevas tecnologías y geo-tecnologías con un enfoque sustentable para la referenciación de la superficie cultivada y cosechada, además de validar y socializar sistemas de información que se sustenten políticas y programas del sector cañero. Al término del 2024, es notorio que los avances en los retos indicados han sido acotados. Por ejemplo, desde hace varios años los ingenios azucareros usan productos intermedios y residuales de sus

procesos, como melaza y bagazo, para generar otros productos de valor agregado como fertilizantes, alimento animal, etanol, bebidas alcohólicas y papel (Romero *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2015). Sin embargo, a la fecha, las cadenas de valor formalmente establecidas distan mucho de capitalizar integralmente el uso de los subproductos o residuos del proceso de conversión de la caña en energía limpia, combustibles verdes y otros productos químicos, como ya ocurren en otros países alrededor del mundo (Salazar-Ortiz *et al.*, 2017).

Por otra parte, no se tienen identificadas específicamente las perspectivas de desarrollo para los MyPP de caña de azúcar en México. En las últimas dos décadas, diversos programas de apoyo, públicos y de diversas organizaciones civiles, han hecho inversiones económicas nominalmente importantes para los MyPP en algunos estados del país. Sin embargo, a pesar de esos apoyos aún persisten enormes rezagos tecnológicos, económicos y sociales, originando precarias condiciones de bienestar y desarrollo humano para la mayor parte de los MyPP (Sánchez Castillo *et al.*, 2021). Más drástica es la situación que las necesidades de estos productores no captan el interés ni los apoyos de los programas de acción pública municipal vigentes. Esto evidencia un hecho: los apoyos a los MyPP no se otorgan sobre premisas de propiciar desarrollo económico y social sino, desafortunadamente, como resultados de campañas políticas, o beneficios selectivos para unos cuantos productores, de quienes después se benefician los intermediarios que comercializan sus productos artesanales. Esta situación es uno de los principales retos por resolver para cambiar las condiciones de operación de las unidades productivas rurales y, por consecuencia, el bienestar de las familias en las comunidades.

## 2.6 CONVERSIÓN ARTESANAL DE LA CAÑA DE AZÚCAR

Hay varios rasgos distintivos en los procesos de cultivo, cosecha y conversión de la caña de azúcar en las micro y pequeñas unidades productivas de la huasteca potosina, conocidas como “trapiches”.

*En el caso del cultivo de la caña:*

- a) Usan variedades vegetales probadas por su resistencia a las condiciones climáticas locales.
- b) Tienen cultivos de temporal.
- c) No usan fertilizantes ni fungicidas químicos.

*En el caso de la cosecha de caña:*

- a) El corte de la caña es manual, justo antes de su procesamiento.

- b) No queman la caña.
- c) Dejan las podas en campo.

*En el caso de la conversión de la caña:*

- a) Usan un proceso artesanal que implica prácticas ancestrales, que dan sentido de unidad a la comunidad.
- b) Las condiciones de producción se basan en su cultura y tradiciones.
- c) Los productos edulcorantes, la melaza y el pilón, son históricamente distintivos en la cocinas mexicanas y de diversas cadenas productivas familiares a nivel rural.

## 2.7 PRODUCTOS DE LA CONVERSIÓN ARTESANAL DE CAÑA DE AZÚCAR

En los trapiches de la huasteca potosina y de otras zonas cañeras de México, la caña de azúcar se transforma artesanalmente en los siguientes productos principales.

- a) Jugo de caña, que se consume directamente al producirla, como bebida refrescante.
- b) Melaza, una miel con elevado contenido de azúcares, que se consume de forma directa o se emplea para la preparación de dulces con semillas.
- c) Pilon, un sólido edulcorante natural, clásico por su sabor, color y apariencia, que se utiliza industrialmente en bebidas, panadería, confitería, suplementos alimenticios, entre muchas otras aplicaciones.
- d) Piloncillo granulado: un polvo edulcorante, natural, con mínimo contenido de impurezas, en color oro.; con aplicaciones similares al pilón, se usa también en salsas, aderezos, productos orgánicos, productos lácteos, entre otros.

Las caracterizaciones de estos productos por métodos físicos, químicos y bromatológicos, así como las propiedades nutricionales y las aplicaciones comerciales de estos los mismos, fue recopilada recientemente por nuestro grupo de trabajo (Palomo González et al., 2024). Como ya se indicó, el esquema de comercialización más común de esos productos es a través de un intermediario que pasa a la unidad productiva y fija unilateralmente el precio del producto. Otras opciones incluyen la venta del producto casa por casa y en los negocios particulares de las comunidades como restaurantes y cafés. A la fecha, los MyPP de las comunidades Tének no tiene todavía la posibilidad de comercializar su producto de forma directa en otros mercados en los cuales puede tener mayores precios de venta.

## 3 PROCESO ARTESANAL DE PRODUCCIÓN DE PILÓN Y PILONCILLO GRANULADO

### 3.1 TIPOS DE PILONCILLO

Las comunidades Tének en la huasteca potosina producen, preferentemente, dos tipos de piloncillo:

- a) pilón, piloncillo negro o industrial,
- b) piloncillo granulado.

#### 3.1.1 Piloncillo negro o industrial

La mayor parte de las familias Tének producen el piloncillo negro o industrial porque es de fácil elaboración ya que no implica la filtración del jugo ni se realiza la eliminación de residuo. Sin embargo, por estas mismas razones contiene una evidente cantidad de impurezas, lo cual abarata su precio en el mercado. Su presentación comercial son los tradicionales bloques en cono de diferente peso (1, 0.5 y 0.25 kg).

#### 3.1.2 Piloncillo granulado

En los últimos años, diversas organizaciones públicas y privadas han promovido la tecnificación de los procesos artesanales y la elaboración de piloncillo granulado, con la finalidad de mejorar los ingresos de las familias Tének dedicadas a la producción de piloncillo. Este proceso implica más trabajo, depende mucho de la habilitación del productor, de la disponibilidad de la infraestructura necesaria para la producción y de espacios adecuados para el almacenamiento del producto. Sin embargo, la calidad, la inocuidad y la presentación del producto aumentan considerablemente y, por lo tanto, se paga a mayor precio. Notoriamente, el piloncillo granular está siendo demandado en forma creciente por establecimientos comerciales locales, nacionales e internacionales, lo cual incentiva su producción. Sin embargo, a pesar de estas ventajas, muchos micro-productores no tienen la habilitación, ni la tecnología, ni la capacidad de gestión de un crédito que le permita evolucionar su trapiche a la producción de piloncillo granulado. Estas situaciones y la volatilidad de los precios en el mercado acotan la producción de piloncillo granulado.

Por otra parte, los micro-productores han realizado las mejoras necesarias en la producción del piloncillo granular validan que el proceso tiene diversas ventajas:

- a) mayor pureza y mejor apariencia, que se refleja en la calidad del producto;
- b) mayor productividad;

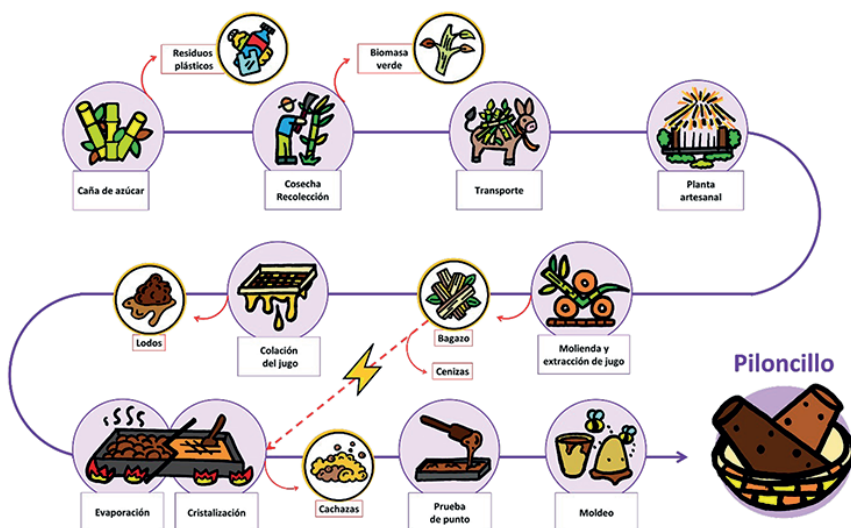
- c) incremento en el tiempo de vida del producto;
- d) aumento del valor del producto en el mercado.

Estas ventajas promueven consecuentemente mayores ingresos para los productores, por lo que se espera que un mayor número de ellos hagan las modificaciones necesarias en sus trapiches para producir piloncillo granular.

### 3.2 ETAPAS DE LA PRODUCCIÓN DE PILONCILLO EN LAS COMUNIDADES TÉNEK

De forma general, la producción artesanal de piloncillo implica las etapas esquematizadas en la Figura 1.

Figura 1. Esquema de la producción artesanal del pilón en las comunidades Tének.



#### 3.2.1 Cultivo de la caña de azúcar

Los MyPP de las comunidades Tének en la huasteca potosina siembran diversas variedades de caña de azúcar, siendo las principales variedades la MEX-55 y la RD-19-11. En general, se identifican dos periodos en el ciclo de la caña de azúcar. A partir de noviembre inicia la “temporada alta”, caracterizada por la mayor cosecha de caña que da lugar, progresivamente, a una elevada cantidad de productos derivados de la caña en el mercado; esta situación repercute en ocasiones en una baja del precio de venta de los estos productos. Por otra parte, a partir de mayo se identifica la “temporada baja”, caracterizada por una muy baja producción de caña de azúcar de aquellos productores que tienen cañas de distintas variedades, en etapas desfasadas de crecimiento a lo largo del año. Para la mayor parte de los productores, en esta

temporada ocurre el mantenimiento de los campos de cultivo y los productores están a la espera de las lluvias de temporada para asegurar el crecimiento y adecuado rendimiento de la caña. Como se indicó, los productores de estas comunidades Tének no usan aditivos químicos como fertilizante ni fungicidas y, cuando es necesario, recurren a técnicas naturales para mitigar los impactos de sequía y plagas en el desarrollo de la caña.

### 3.2.2 Corte y recolección de la caña

El punto adecuado para el corte de caña es un factor crítico para garantizar el mejor rendimiento en la producción de jugo de caña. Los productores determinan de forma empírica el punto de corte, que implica que la caña este “madura”, condición que se alcanza cuando la caña tiene un mismo nivel de contenido de azúcares en la base y en la punta. El corte de la caña se hace muy temprano por la mañana, o bien, la noche previa a su procesamiento en el trapiche. La caña se corta en el extremo inferior en diagonal y es preferente hacerlo en condiciones secas; si llueve previo o durante el corte, la caña exhibirá menor concentración de azúcares. Por lo general, la parte inferior de la caña se queda en campo, donde se descompone y sirve como abono, o bien, se usa como complemento de alimento para ganado. Por otra parte, la caña se traslada al trapiche en “atos”, ya sea cargándola en el hombro, o con el apoyo de una bestia o una carretilla.

### 3.2.3 Molienda de la caña de azúcar en el trapiche

El molino necesario para extraer el jugo de la caña de azúcar también se conoce como “trapiche”. Este equipo es el corazón de la micro unidad productiva piloncillera. Para un productor, la tenencia de un trapiche es sinónimo de independencia y liderazgo en la comunidad; es también una alternativa para aspirar a mejores horizontes económicos. Por esta razón, todos los MyPP aspiran a tener su propio trapiche; de hecho, culturalmente, las familias son renuentes a compartir un trapiche, situación que dificulta su desarrollo productivo y económico.

### 3.2.4 Colado del jugo de caña

Al obtener el jugo de caña, se hace pasar manualmente a través de un colador, que es una malla (o cedazo) de acero inoxidable, con el tamaño apropiado para retirar las fibras y/o partículas de mayor tamaño presentes en el jugo de caña que, de otra forma, son arrastradas al proceso.



### 3.2.5 Carga del jugo en la “puntera”

La cantidad típica de jugo para hacer un “punto” oscila entre 6 y 12 latas (120 y 240 L). El jugo de caña se carga en una “puntera”, que es el contenedor en el cual se lleva a cabo la concentración del jugo de caña para obtener, en primera instancia, la melaza y, en etapas subsiguientes, el pilón y el piloncillo granulado. Actualmente, las punteras son de acero inoxidable y sus dimensiones representativas son de 1.80 a 2.40 de largo, de 0.9 a 1.2 m de ancho, y de 25 a 30 cm de alto. En estas condiciones, el productor produce de 20 a 45 kg de piloncillo granulado en cada punto. La producción final es función de múltiples factores asociados a la variedad, el cultivo y las condiciones de cosecha de la caña, así como a los procedimientos y condiciones de operación que sigue cada trapiche.

### 3.2.6 Suministro de energía de proceso

La evaporación del agua del jugo de caña, requerida para alcanzar la concentración de los azúcares distintiva de la melaza o del piloncillo granulado, se logra mediante el calentamiento del jugo, usando un horno colocado en la base de la puntera. La energía calorífica en el horno se logra mediante combustión de biomasa, que puede ser leña o bagazo, siendo este último el más común, dado que es el subproducto del proceso de extracción de jugo de caña.

#### ***Biomasa como combustible***

A la descarga del trapiche, el bagazo tiene una humedad variable, que depende de la eficiencia de la extracción del jugo. Por esto, el bagazo se somete a un proceso de secado exponiéndolo directamente al sol durante 2 o 3 días. El bagazo seco se resguarda en un almacén. Para su carga al horno, el bagazo se agrupa en “atos” de 2 a 2.5 kg, que se alimentan en forma intermitente a lo largo de todo el proceso de evaporación. La frecuencia de alimentación del bagazo al horno se determina empíricamente, en función de las necesidades energéticas para sostener la evaporación del agua. El uso de bagazo seco hace que la combustión sea más eficiente y no genere el humo que muchas ocasiones inunda el trapiche, sobre todo cuando el horno no cuenta con un tiro adecuado que descargue los gases de combustión al exterior del trapiche.

#### ***Hornos artesanales***

Por otra parte, el horno de combustión es rectangular, de un tamaño acorde a las dimensiones de la base de la puntera y tiene una altura de 0.5 a 0.6 m. El horno puede estar construido con adobe, ladrillo u otro material refractario local y puede estar sobre el suelo, o bien, enterrado con la parte superior a ras de suelo. Estas configuraciones del

horno son dependientes del diseño del resto de la puntera y ambos tienen beneficios y desventajas. En cualquier caso, el horno está bien aislado y el calor generado en la combustión se transfiere mayoritariamente a la base de la puntera. Para favorecer la combustión, el horno tiene una base metálica a unos centímetros del fondo, para generar un espacio en el que fluye el aire para favorecer una mejor condición de combustión. La descarga de los gases de combustión se hace a través de un tiro cuya descarga debe ser fuera de la puntera y a una altura razonable para reducir su exposición a los trabajadores del trapiche.

### 3.2.7 Evaporación del agua del jugo de caña

El proceso de evaporación de agua en el jugo de caña de azúcar permite incrementar la concentración de azúcares desde 18 - 22 ° Brix hasta 80 - 82 °Brix. Este proceso de evaporación es función de diversos factores, entre ellos, el área de transferencia de la puntera, el diseño y eficiencia en la operación del horno, el tipo y el calor de combustión de la biomasa utilizada. Típicamente, el proceso de evaporación lleva de 2 a 3 h, hasta alcanzar el punto de melaza y, después, el punto de piloncillo granulado. Durante el proceso de evaporación de agua, los residuos en el sobrenadante de la puntera, conocidos como cachaza, son colectados y desechados en el campo porque no representan una cantidad significativa a ser valorizada ni tiene impactos negativos en el medio ambiente.

### 3.2.8 La condición de “el punto” para obtención de los productos

En la etapa de evaporación de agua, las características del jugo de caña cambian progresivamente hasta alcanzar la consistencia característica de la melaza, o las requeridas para el pilón o el piloncillo granulado. La condición de operación requerida para lograr las características de cada producto se conoce como “el punto”, el cual se determina empíricamente, con base en la experiencia de cada trapiche, que se pasa de generación en generación. Algunas de las estrategias convencionales para identificar que el producto está “a punto” incluyen, entre otras:

- a) la introducción de la pala, la agitación del producto y la elevación de la pala para ver la formación de “hilos”;
- b) el probar la miel y hacerla bola en la boca, después sacar la bola de miel y observar si está suficientemente sólida;
- c) introducir una cuchara y observar la “cristalinidad” de la miel.

De esta forma, el control de calidad para el producto es únicamente sensorial, ya sea por la textura, la consistencia y el color de la miel.

Al lograr el punto deseado, para melaza, pilón o piloncillo granulado, se retira la puntera del horno para que enfríe progresivamente; en caso necesario, la mezcla está sujeta a una continua agitación para evitar que el producto se solidifique en la puntera.

### **3.2.9 Producción de melaza**

En el proceso, los productores identifican en primera instancia “el punto” de melaza, que es un producto semi-cristalizado; su apariencia es similar a la miel de abeja y tiene un sabor dulce y agradable, que se puede ingerir de forma directa. Al lograr “el punto” de melaza los productores retiran la puntera y proceden a la recolección de la miel.

### **3.2.10 Producción de pilón negro**

Al lograr el “punto” del pilón, se procede al quitar la puntera del horno y verter el contenido de la puntera en otro contenedor de acero inoxidable. La mezcla del producto se mantiene en agitación mientras se enfría y continua entonces con el moldeado, el cual se hace de forma manual. Los moldes que dan la forma característica al pilón son de barro y en volúmenes que permiten obtener productos de 1, 0.5 o 0.25 kg. Para facilitar esta operación, el molde se moja previo a su llenado. Después, los moldes llenos se dejan enfriar por alrededor de 20 – 30 min. A continuación, el pilón se saca del molde y se deja oreando al aire libre. Al final del proceso, en las condiciones referidas, se obtienen lotes de alrededor de 45 kg de producto.

### **3.2.11 Producción de pilón granular**

También en este caso, al lograr el “punto” del pilón granulado, se procede a quitar la puntera del horno. La mezcla del producto se mantiene en agitación hasta que se empiezan a formar las partículas granulares características. Este proceso de amasado se hace de forma manual hasta que se enfría el producto. Después se procede a desbaratar los agregados de partículas muy grandes y se realiza un cribado con una malla que uniforma el producto a un rango deseado.

El cribado se realiza manualmente con una malla de metal y raspando el producto con una paleta de madera para forzar que los gránulos de mayores dimensiones pasen a través de la malla. Cuando las condiciones de operación o el clima condicionan el proceso regular, se tienen problemas de aglomerado de partículas que no se logran pulverizar y que se consideran como mermas del proceso.

### 3.2.12 Almacén del producto

Por lo general, la venta de la melaza, el pilón y del piloncillo granulado se realiza diariamente, al pie del trapiche. Cuando no es el caso, el productor almacena temporalmente el producto guardando la melaza en bidones de plástico, el pilón en cajas de cartón y el piloncillo granulado en bolsas de plástico dentro de un costal.

En las siguientes figuras se ilustran algunas etapas del proceso de producción de pilón y piloncillo granulado en las comunidades Tének de la huasteca potosina.

Figura 2. Cultivo y corte de caña de azúcar en las comunidades piloncilleras Tének.



Figura 3. Recolección de caña de azúcar.





Figura 4. Trapiches representativos de las comunidades piloncilleras Tének.



Figura 5. Proceso de carga de jugo de caña a la puntera y de combustible al horno artesanal.



Figura 6. Etapas de proceso de evaporación del jugo y de remoción de cachaza.



Figura 7. Etapas de moldeo del pilón y de cribado del piloncillo granulado.



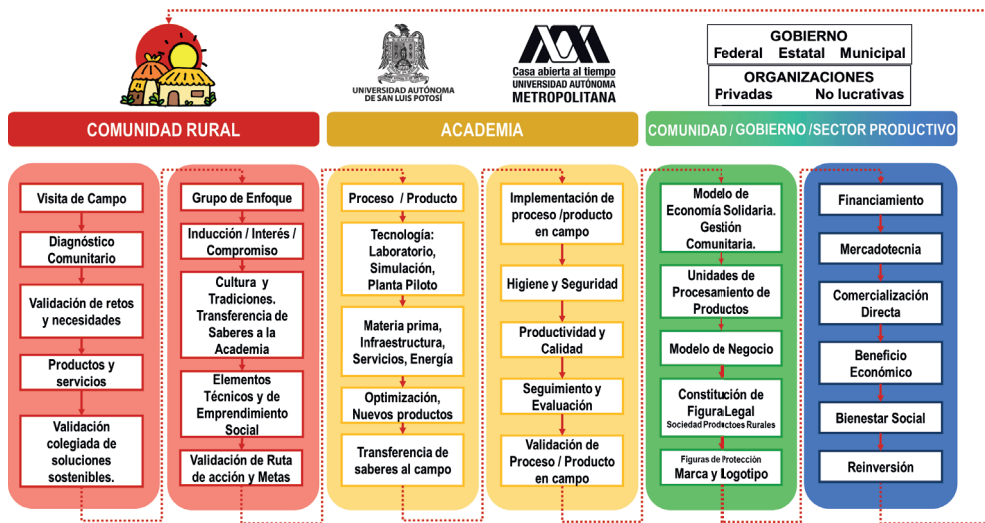
#### 4 PROYECTO DE INVESTIGACIÓN – INCIDENCIA PARA LAS COMUNIDADES PILONCILLERAS TÉNEK

En el marco de referencia referido, se realizó un proyecto de investigación e incidencia para optimizar la producción artesanal de pilón y piloncillo artesanal con



un enfoque sostenible, en las comunidades Tének de la huasteca potosina, en México. El proyecto promovió la convivencia y el desarrollo de la confianza con los diferentes miembros de la comunidad y, en todo momento, prevaleció el respeto irrestricto a su cultura y tradiciones. Los estudios y análisis realizados en múltiples trapiches de estas comunidades, que se llevaron a cabo en el marco de una transferencia de saberes entre MyPP y académicos, fueron la base para identificar, sugerir e implementar una serie de acciones técnicas, energéticas, ambientales y económicas, para mejorar el proceso artesanal de la producción de piloncillo, introduciendo prácticas consistentes con el desarrollo sostenible. De forma general, los sectores implicados, así como los elementos y la secuencia de acciones que se deben integrar armónicamente para detonar el desarrollo y consolidación de los sistemas de producción de piloncillo artesanal, desde una perspectiva de sostenibilidad, se esquematizan en la figura 8.

Figura 8. Esquema de una estrategia para promover la producción sostenible de piloncillo artesanal.



Los sectores que deben estar implicados en del desarrollo del proyecto son:

- Comunidad Rural
- Academia
- Gobierno / Sector productivo

Estos sectores son los ejes de los sistemas de la triple hélice que, al vincularse eficientemente, detonan cadenas de valor con beneficios económicos y sociales para todos los actores participantes de la cadena productiva. Los autores han documentado la aplicación de esta estrategia para el sistema productivo caña-piloncillo de las

comunidades Tének de la huasteca potosina en diferentes reportes técnicos (Sánchez Castillo et al., 2023).

#### 4.1 DIAGNÓSTICO EN LAS COMUNIDADES PILONCILLERAS TÉNEK

El diagnóstico comunitario de la operación de los trapiches piloncilleros de las comunidades Tének se realizó y actualizó en diferentes etapas del proyecto de investigación e incidencia, de acuerdo con la estrategia desarrollada por el equipo de trabajo (Sánchez Castillo et al., 2023). En este entorno, se identifican dos ejes de acción muy importantes.

##### **a) Intercambio de saberes entre MyPP y académicos**

El intercambio de saberes se realizó de forma continua y es la fuente más importante para identificar y validar las situaciones de contexto (sociales y económicas), las políticas, estrategias, programas de apoyo dirigidos al sector, las necesidades/retos de los productores y los asociados al proceso y a los productos, las oportunidades que se identifican en otros trapiches, susceptibles de ser implementadas en la zona de incidencia. De forma relevante, en los diálogos con los productores se conocen y valoran las tradiciones y costumbres que sustentan los procesos de producción en el trapiche.

##### **b) La caracterización técnica de los sistemas de producción en el trapiche**

La cual se realizó en diversas visitas de campo en trapiches de las comunidades Tének de El Jomté, Paitzán, El Barrancón y San José Xilatzén, del municipio de Tanlajás, S.L.P. En cada visita se realizaron las mediciones necesarias para caracterizar los procesos del corte y traslado de la caña, así como de la conversión de la caña de azúcar a jugo, melaza, pilón o piloncillo granulado. La descripción de cada etapa se hace cuali y cuantitativamente, midiendo los parámetros físicos, químicos o biológicos implicados en cada etapa.

#### 4.2 RETOS Y OPORTUNIDADES IDENTIFICADOS Y VALIDADOS COLEGIADAMENTE

Como resultado de las acciones anteriores, el grupo de trabajo identificó y validó colegiadamente con los MyPP de la comunidades Tének, los retos y oportunidades más relevantes en el contexto de la operación de sus trapiches. Estos elementos se reportan sintéticamente en la Tabla 1.



Tabla 1. Retos/Oportunidades identificadas por los productores Tének en la producción de piloncillo.

<b>Etapa</b>	<b>Retos / Oportunidades</b>
<b><i>Política pública federal al campo</i></b>	Limitados programas y apoyos económicos en el sector agrícola de la zona de incidencia que tengan con beneficios tangibles para los MyPP.
<b><i>Política pública estatal al campo</i></b>	Asimétrica distribución de recursos económicos al sector agrícola en el estado y en el municipio. Insuficiencia de apoyos para adquisición de tecnología (trapiches) y de accesorios e insumos de trabajo para MyPP.
<b><i>Variedad de Caña</i></b>	Debate entre MyPP sobre las ventajas de mejorar la productividad y calidad del jugo de caña, haciendo cambios de la variedad MEX-55 actualmente cultivada. Se requieren estudios técnicos por parte de especialistas para resolver el debate sobre datos técnicos
<b><i>Buenas prácticas de cultivo</i></b>	Los MyPP necesitan capacitación y seguimiento en sus prácticas de preparación de campo y cultivo, a pesar de su experiencia y capacitaciones previamente recibidas.
<b><i>Uso de fertilizantes / químicos</i></b>	Los MyPP no saben cómo validar que su producto es orgánico ni capitalizar económicamente este tipo de productos Hay interés del Instituto Nacional de Pueblos Indígenas para fomentar que el cultivo de la caña reciba la denominación de orgánico, evitando el uso de fertilizantes o herbicidas químicos.
<b><i>Cosecha de la caña</i></b>	Los MyPP no monitorean el nivel de producción de caña ni rendimientos de sus productos. No tienen datos para contrastar si sus procesos actuales son competitivos.
<b><i>Traslado o acarreo de caña</i></b>	Los MyPP que son adultos mayores y tienen terrenos en laderas solicitan equipos que faciliten el traslado de la caña y de insumos al trapiche.
<b><i>Molienda de la caña en el trapiche</i></b>	Los MyPP demandan trapiches para sustentar/mejorar su actividad productiva: No se cumplen los apoyos para adquirir un trapiche. Se debe cambiar el trapiche de bestia por uno de gasolina No tienen recursos propios para compra de un trapiche que para sus medios y necesidades es muy caro y está sobredimensionado. La propiedad de un trapiche sigue siendo un tema de empoderamiento del productor y su familia.
<b><i>Prelimpieza</i></b>	No hay protocolos de limpieza del jugo estandarizados, ni todos los MyPP cumplen esta etapa.
<b><i>Clarificación y consistencia</i></b>	No hay un control en la implementación de estos procesos por la falta de entendimiento del impacto que tienen en la calidad final del producto.
<b><i>Conversión del jugo en melaza, pilón y piloncillo granular</i></b>	No hay protocolos comunes para la producción de la melaza, el pilón y del piloncillo granular entre los MyPP. lo que impide lograr una calidad uniforme. No hay incentivos para mejorar la productividad. No hay buenas prácticas de higiene y seguridad en el trapiche
<b><i>Evaporación</i></b>	No hay un uso útil del agua evaporada. No se visualiza su aprovechamiento en el trapiche, a pesar de los retos que tienen en la disponibilidad de agua potable.

<b>Energía usada para la evaporación de jugo</b>	<p>Muchos hornos están en malas condiciones y generan notorios riesgos en salud.</p> <p>No hay idea de la cantidad de energía requerida para el proceso de evaporación de agua, ni incentivos para optimizar el uso de bagazo.</p> <p>No hay protocolos estandarizados para el secado del bagazo ni la carga de bagazo al horno.</p> <p>No hay incentivos para reducir el uso de bagazo y usarlo en otros procesos para generar productos de alto valor agregado.</p>
<b>Descachazado</b>	No todos los productores implementan esta etapa correctamente.
<b>“El punto”</b>	<p>No está estandarizada la condición de “el punto” de cada producto.</p> <p>Tema delicado: Definición del punto con base a tradiciones y costumbres y usando tecnología.</p>
<b>Enfriado</b>	<p>Hay riesgos al desmontar manualmente la puntera.</p> <p>Falta tecnología para facilitar el procesamiento de los productos.</p>
<b>Batido y moldeado (pilón)</b>	<p>No hay estandarización en estas etapas.</p> <p>No hay limpieza en los pilones ni en los espacios de trabajo.</p>
<b>Amasado y cribado (granular) (pilón)</b>	<p>No están estandarizadas estas etapas, que genera gránulos de diferente tamaño en detrimento de productividad, calidad e ingresos económicos.</p> <p>Falta capacitación para el manejo del producto.</p>
<b>Empacado</b>	<p>No hay espacio, accesorios ni materiales adecuados para esta etapa.</p> <p>Los MyPP lo ven como un gasto en su proceso productivo.</p>
<b>Almacenaje</b>	<p>No hay espacios de almacenamiento apropiado.</p> <p>No hay centros de acopio comunitario.</p>
<b>Higiene</b>	<p>No hay condiciones de higiene apropiadas en la mayoría de las etapas.</p> <p>No se ha socializado los favorables impactos de la higiene en el proceso productivo y la calidad del producto.</p>
<b>Seguridad</b>	<p>No hay condiciones de seguridad apropiadas en la mayoría de los trapiches.</p> <p>No se percibe la pertinencia de reducir riesgos.</p> <p>No hay recursos para mejorar los aspectos de seguridad.</p>
<b>Recursos Humanos en el trapiche</b>	Participan niños, mujeres y personas de edad avanzada en el proceso productivo
<b>Comercialización</b>	<p>El problema principal que persiste a la fecha es el intermediarismo (coyotaje).</p> <p>No hay registro del nivel de producción, ni de calidad, ni de venta.</p> <p>No hay idea de los costos de producción ni de los precios de venta en el mercado.</p> <p>Falta confianza e ideas de cómo hacer un cambio en la venta de sus productos.</p> <p>Los MyPP no tienen idea de cómo planear su producción, manejar sus cuentas, formar asociaciones para producir/comercializar sus productos.</p>
<b>Aspectos generales</b>	<p>La mayoría de los trapiches no cuenta con servicios públicos (luz, agua, drenaje)</p> <p>Los MyPP reconocen la necesidad de cambiar el techo y el piso de sus trapiches, pero no tienen recursos.</p> <p>Se necesitan accesorios o insumos para la producción, para monitorear sus procesos.</p> <p>Algunos MyPP están abiertos a la tecnología, pero sin detrimento de sus procesos tradicionales.</p>

En las comunidades piloncilleras Tének, la mayoría de los MyPP jerarquizó las siguientes prioridades en sus trapiches:

- Cambiar la forma de comercialización de los productos.
- Facilitar la adquisición de trapiches, a un costo accesible.
- Optimizar la producción de piloncillo granulado, aumentando la producción y la calidad.
- Trabajar en equipo para mejorar la producción y comercialización del producto.
- Desarrollar otros productos derivados de la caña de azúcar y del piloncillo, así como de los residuos generados en el trapiche y en la comunidad.
- Producir caña de azúcar “orgánica”, sin el uso de químicos en el cultivo de la caña.

Es importante hacer notar que los MyPP no identifican como prioridad algunos temas que coadyuvan a la solución de las problemáticas identificadas, entre ellos:

- Optimizar el diseño y la operación de la puntera y del horno.
- Implementar o mejorar hábitos de higiene y seguridad en cada etapa de proceso.
- Validar la calidad del producto mediante análisis fisicoquímicos
- Diversificar la cartera de productos usando los actuales productos y residuos del trapiche.
- Implementar energías alternativas para facilitar su trabajo en el trapiche.

#### 4.3 LÍNEAS DE ACCIÓN EJECUTADAS

El equipo de trabajo estableció líneas de acción para atender y resolver algunos de los retos/oportunidades más relevantes en el trapiche. En cada caso, la primera acción fue realizar un análisis y una validación colegiada con los MyPP sobre las soluciones más viables para implementar en los trapiches, sustentada en factores como: nivel de jerarquización por parte del productor, situaciones imperantes en entorno, recursos disponibles, experiencia y capacidades del equipo de trabajo. A continuación, se realizó el proceso de gestión para obtener los recursos necesarios para implementar las siguientes acciones.

- a) Optimizar la operación de los trapiches sobre elementos técnicos que coadyuven a las sostenibilidad del proceso, para incrementar la productividad y calidad de los productos artesanales característicos (melaza, pilón y piloncillo granulado).

- b) Diversificar la cartera de productos a base de caña, jugo, melaza o piloncillo granulado, trabajando a la fecha en dulces de piloncillo con semillas, biochar y ron.
- c) Capacitar a los MyPP en emprendimiento social, como premisa para detonar después sistemas de economía solidaria, que resuelvan del intermediarismo identificado como el principal problema.
- d) Sensibilización de los niñas, niños, jóvenes y padres de familia sobre la relevancia de los valores personales, familiares y comunitarios, así como del cuidado del medio ambiente, la valorización de los residuos y el aprovechamiento de las energía alternativas.

Con el desarrollo del proyecto, se identificó la pertinencia de incluir las siguientes acciones:

- a. Introducir el uso de fuentes alternativas energía para mejorar las condiciones de trabajo en el trapiche y de brindar condiciones de salud y comodidad en las viviendas de las familias.
- b. Habilitar un trapiche tradicional como modelo de una micro-biorrefinería.
- c. Habilitar una unidad de procesamiento de productos de piloncillo usando energías alternativas.
- d. Equipar un espacio para mostrar a la comunidad los avances y resultados del proyecto en un “Centro de Innovación para para la conversión sostenible de residuos y energías renovables” (CIVASORER).

Los autores han documentado las estrategias, acciones, resultados y logros alcanzados en cada una de esta líneas de acción en diferentes reportes técnicos (Sánchez Castillo et al., 2023). Los resultados del proyecto fueron presentados en diferentes foros nacionales e internacionales y ha sido evaluadas por el organismo que otorgó los fondos económicos para el desarrollo del proyecto. Los análisis realizados en preparación a estas acciones de seguimiento y evaluación, así como el intercambio de saberes, experiencias y vivencias con diferentes actores de la comunidad y con organizaciones que ejecutan proyectos similares, permitieron que el grupo de trabajo recopilará un conjunto de acciones que deben ser tomadas en cuenta para coadyuvar de mejor forma al desarrollo sostenible de las comunidades piloncilleras Tének.

## **5 ACCIONES INTEGRALES PARA PROMOVER LA PRODUCCIÓN SOSTENIBLE DE PILONCILLO ARTESANAL**

En esta sección se identifican las estrategias y/o acciones operativas relevantes para contribuir al desarrollo sostenible de la producción de piloncillo artesanal. Es

importante hacer notar que este enfoque no solo se privilegia la conservación del medio ambiente, sino que también impulsa, de forma integral, el bienestar socioeconómico de las comunidades rurales a través de mejoras en todos los eslabones de la cadena de valor.

Para identificar un conjunto de acciones viables que promuevan el desarrollo sostenible de la producción artesanal de piloncillo en las comunidades Tének, el equipo de trabajo complementó los elementos del diagnóstico comunitario extendiendo el análisis del sistema productivo, para validar retos y oportunidades para los MyPP en 5 ejes:

- a) Social
- b) Tecnológico
- c) Ambiental
- d) Energético
- e) Económico

## 5.1 SOCIAL

La producción artesanal de piloncillo es una actividad de tipo familiar en la que participan los padres de familia, los niños (en muchos casos desde temprana edad), los jóvenes y los adultos mayores, quienes están por lo general siempre vinculados a sus núcleos familiares y son respetados por su sabiduría o experiencia en la operación de los trapiches. En el entorno social algunas de los retos / oportunidades de este tipo de sistemas productivos son los siguientes.

### **a) *Condiciones laborales insalubres y/o inseguras.***

Como en la mayor parte del país, las condiciones que prevalecen en los trapiches de las comunidades Tének son por general insalubres debido a la carencia de servicios públicos y a la falta de educación de los productores y sus familias, quienes desconocen las condiciones necesarias para garantizar procesos limpios que rindan productos de calidad. Además, el trabajo implica la exposición de los trabajadores a temperaturas y humedad extremas que prevalecen en la zona de incidencia, sin facilidades para hidratarse y sin acceso a servicios para sus necesidades más básicas. Están también expuestos a la emisión de gases de combustión y faltan en el trapiche herramientas adecuadas para simplificar y hagan menos pesada su jornada. Todos estos factores repercuten en condiciones indignas para realizar su trabajo con notorias repercusiones en su calidad de vida. En estos escenarios, de deben mejorar las condiciones laborales, empezando por capacitar a los trabajadores de los beneficios de la higiene y seguridad, así como instalar servicios básicos a los trapiches, mejorar la instrumentación de las diferentes etapas del proceso y equipar a los trabajadores con los accesorios de protección adecuados.

### **b) Impacto en la salud comunitaria**

Las condiciones laborales insalubres y/o inseguras afectan la salud de los productores y sus familias, propiciando enfermedades que no se atiende adecuadamente por la falta de servicios de salud pública. Por esta razón, es imperativo mejorar la condiciones de producción, así como inducir mejoras en la infraestructura sanitaria y el acceso a la atención médica.

### **c) Explotación infantil y de adultos mayores**

En muchos trapiches labora niños y adultos mayores en tareas que son inadecuadas y riesgosas para sus edades. En el caso de niños, su participación en el trapiche impacta su desarrollo físico, emocional y educativo. En el caso de los adultos mayores, las actividades repercuten preferentemente en su salud. A este respecto, se deben aplicar las políticas y leyes que impiden la explotación de grupos vulnerables, así como garantizar la educación infantil y programas de salud pública para adultos mayores.

### **d) Desigualdad de género**

Las mujeres tienen un rol preponderante en el trapiche, aunque no siempre se valora a la par de los productores. En muchos casos, su participación se acota a ser la ayudante en el proceso, no se toma en cuenta su opinión en la toma de decisiones y raras veces son las líderes en la actividad productiva. Estos factores determinan condiciones de desigualdad de género en las comunidades piloncilleras Tének. Por esta razón, se debe promover y hacer cumplir la participación digna y equitativa de las mujeres en todas las actividades del trapiche, fomentando así su empoderamiento y capacidad de liderazgo y de gestión pública.

### **e) Migración**

La época de la cosecha de caña y la elaboración del piloncillo se extiende alrededor de 6 meses. Aunque en el resto del tiempo hay múltiples actividades agrícolas por cumplir, la falta de un trabajo remunerado y/o de bajos salarios, la falta de recursos para cubrir sus necesidades en alimentación, salud, vivienda y educación, entre otros, promueve la migración de los productores, principalmente de los más jóvenes, hacia las zonas urbanas en búsqueda de trabajo mejor pagado. Si los productores se afianzan en estos empleos, inicialmente temporales, ya no regresan a sus comunidades para seguir con la producción de piloncillo, induciendo la pérdida de mano de obra calificada y hasta la desintegración comunitaria. En este escenario, una opción es diversificar el tipo de productos artesanales derivados del piloncillo y de otros recursos naturales, así como capacitar y equipar con infraestructura a los productores para diversificar su actividades productivas, acopladas a créditos justos y simplificados, para crear nuevos productos

cuya favorable comercialización les genere ingresos económicos para vivir dignamente. Por supuesto, se deben fortalecer las relaciones sociales y promover la solidaridad entre los productores y facilitar la gestión de los recursos que les den opciones de desarrollo en su comunidad.

**f) Pérdida de tradiciones y saberes.**

Los retos sociales antes indicados, como la migración y la falta de incentivos para los productores, repercuten negativamente en la pérdida de elementos culturales y/o tradicionales. Por esta razón, acoplado a la solución de los retos ejemplificados, de deben fomentar programas de valorización y transferencia de saberes a las nuevas generaciones.

## 5.2 TECNOLÓGICO

En los sistemas productivos artesanales de comunidades originarias un dilema es “¿cómo introducir tecnología para optimizar y hacer sostenible el proceso sin menoscabo de acciones que son elementos que dan identidad a un proceso centenario con profundas raíces culturales” Una estrategia para conseguirlo reside sin duda en el diálogo de saberes entre productores y académicos, en un marco de respeto, de motivación y de validación de beneficios para la operación de la unidad productiva. A la fecha, entre los elementos tecnológicos más importantes por atender en las micro y pequeñas unidades piloncilleras son los siguientes.

**a) Falta de molinos adecuados para optimizar el proceso de extracción de jugo**

El molino usado para extraer el jugo de la caña de azúcar se conoce como trapiche. En las comunidades piloncilleras Tenek la tenencia de un trapiche no solo condiciona la posibilidad de llevar a cabo la actividad productiva, sino que tiene fuertes implicaciones sociales en términos de la autoestima de los productores y del reconocimiento que reciben de parte de la comunidad. En la zona de incidencia, alrededor del 40% de los productores usa molinos con tracción de bestia para extraer el jugo de la caña. Estos trapiches se sustituyen progresivamente con molinos con tracción de motor a gasolina, que significa notorias reducciones en el tiempo y el esfuerzo necesarios para colectar el jugo necesario para una jornada de trabajo. Cuando existe energía eléctrica en el trapiche, se pueden usar molinos con tracción de motor eléctrico que representan beneficios en aspectos ambientales y de salud, preferentemente. En otros países, los trapiches eléctricos se hacen más relevantes cuando en el trapiche se usa energías alternativas para su operación. En cualquier tipo de trapiche, algunos de los elementos clave a evaluar son la capacidad de procesamiento, el rendimiento de extracción de jugo,

el costo de adquisición y el mantenimiento para mantenerlo en operación. Cada uno de estos elementos es un reto por resolver en la zona de incidencia, siendo la capacidad del productor para adquirir un trapiche el más limitante de todos.

A este respecto, la vinculación de productores con instituciones académicas puede ser pertinente para el desarrollo de trapiches de motor de gasolina y de motor eléctrico, con la potencia suficiente para garantizar el procesamiento de la tarea de caña necesaria para una jornada de trabajo y con la eficiencia de extracción de necesaria para incrementar la productividad. Por supuesto, estos trapiches deben ser robustos, modulares (para facilitar su traslado) y, sobre todo, de bajo costo. La evaluación y validación del uso de energías alternativas para la operación del “trapiche”, como equipo de extracción y como espacio productivo.

#### ***b) Uso de hornos de combustión artesanales con baja eficiencia***

Los hornos usados en el trapiche son artesanales; de forma práctica, son rudimentarios y con muy baja eficiencia energética. En consecuencia, existe un alto consumo de la biomasa residual (bagazo) usada como combustible, hay una asimétrica transferencia de calor al contenedor del jugo de caña (conocido como puntera) que condiciona el tiempo de producción, la productividad y la calidad de los productos. El diseño de los hornos se hace de forma empírica, sin conocer los impactos que tienen la geometría y las dimensiones relativas en cada dimensión, el material de construcción y/o aislamiento en función de su posición relativa del horno con el suelo, la orientación y las condiciones que favorecen la entrada y flujo de aire, así como de la cantidad relativa de bagazo/aire, la limpieza del canal de flujo, el diseño, limpieza y posición de la descarga del tiro, las condiciones de secado del bagazo, la velocidad de adición del bagazo, la alternativa para usar el vapor de agua y la energía residual generada, entre otros factores.

En este escenario, nuevamente, la vinculación de productores con instituciones académicas puede ser pertinente para el desarrollo de hornos de combustión diseñados y modelados para resolver las necesidades identificadas localmente. Estos procesos pueden hacer uso de estrategias de simulación y de validar estos resultados con pruebas en campo. Los impactos de la optimización del horno de combustión son múltiples y es un punto de inflexión para la sostenibilidad del proceso, ya que tiene impactos en las dimensiones ambientales, energéticas, económicas y sociales.

#### ***c) Falta de entendimiento y control en el proceso de evaporación del agua***

El proceso más distintivo en la conversión de la caña de azúcar de evaporación del agua en el jugo de caña: Este proceso es crítico y requiere un control preciso de la temperatura y la concentración de azúcares en la mezcla. Se debe, además, tener



control del volumen de mezcla y del tiempo de procesamiento. En el trapiche, estos factores se regular con base a la experiencia y, como consecuencia, hay notorias diferencias en la calidad de los productos obtenidos en cada trapiche, lo cual no favorece después los procesos acopio y mezclado, que son etapas indispensables en el proceso de comercialización de productos en mercados nacionales e internacionales. A este respecto, es necesario hacer una serie de estudios en campo y hacer las mediciones necesarias para caracterizar a detalle la naturaleza de cada fase de proceso. Si bien las mediciones de proceso se hacen en campo, se requiere de una serie de caracterizaciones fisicoquímicas de laboratorio de la materia prima, de los intermediarios y de los productos del proceso. Esta información permite hacer los balances de materia que, acoplados a los balances de energía del horno, facilitan la descripción técnica del proceso y del efecto de las variables de operación en el mismo, además de validar el rendimiento del proceso y la calidad del producto. De forma similar al horno, la información de la puntera es vital para desarrollar procesos sostenibles. Además, es necesario capacitar al productor para que entienda la naturaleza del proceso en la puntera, las variables que afectan su operación, de convencerlo que la tecnología le puede facilitar la definición de la condición del “punto de cada producto” y compartirle un conjunto de buenas practicas de manufactura que contribuyan a la correcta operación del proceso.

**d) *No hay condiciones de higiene y seguridad en el trapiche***

Una de las características de los sistemas de agricultura familiar y procesamiento artesanal de la caña de azúcar en el trapiche en la zona de incidencia es la falta de higiene y seguridad, tanto en campo como en las unidades productivas. Esta situación es, quizás, un reflejo de las costumbres y educación de los miembros de la comunidad y, por supuesto, esta acoplada al manejo de las etapas de producción, a la carencia de recursos económicos y a la falta de servicios públicos en trapiches y viviendas: falta de agua, luz, gas y drenaje. Esta situación representa un reto muy importante, debido a que las leyes y normas implicadas para evaluar la calidad de los procesos de fabricación y de manejo de alimentos son muy estrictas; además, son una condición obligatoria que deben cumplir los productos para comercializar los productos en el mercado nacional e internacional.

En este contexto, es imperativo identificar las buenas practicas de manufactura que deben ser implementadas y cumplidas por los trabajadores en la unidad productiva en cada etapa del proceso de producción. Así mismo, se deben identificar e impulsar las adecuaciones necesarias en el trapiche para aislarlo apropiadamente del entorno, y de implementar las acciones necesarias para contribuir a la seguridad del trapiche.

Adicionalmente, es muy importante sugerir e implementar mecanismos alternativos para contar con los servicios básicos en el trapiche, entre ellos agua limpia, energía eléctrica y letrinas. Los procesos de capacitación de productores en el tema de higiene y seguridad es imperativo, así como la gestión de los recursos para hacer las adecuaciones necesarias en el trapiche, el seguimiento al cumplimiento de buenas practicas de manufactura y, sobre todo, evaluar el convencimiento y compromiso de los productores para operar siempre el trapiche en condiciones que contribuyan a la sostenibilidad del proceso productivo.

**e) *No hay tecnología para el manejo, empaquetado y almacenaje de productos***

Los productos del proceso productivo se manipulan, se empaquetan o ensacan (según sea necesario) y se venden en el trapiche. Por esta razón, y por el bajo costo de venta, no hay requerimientos ni incentivos para tener un control más riguroso del producto. Solo en estas etapas, es ya imperativo establecer protocolos apropiados para el seguimiento y manejo adecuado de los productos. Por supuesto, en el potencial caso de incrementar la escala de producción para atender nuevos mercados, también se deben considerar los espacios y los procedimiento formales para el almacenaje temporal de los productos. El gradiente para cumplir satisfactoriamente con estos procesos y lineamientos es preservar la calidad del producto que depende en gran medida su contenido de agua, por lo cual es pertinente un manejo, empaquetado y almacenaje en condiciones que incrementen la humedad de los productos. Por supuesto, al limpieza de los espacios y de la higiene del personal de trabajo son también factores para cuidar en detalle.

A este respecto, es necesario identificar las tecnologías mas simples y económicas para los proceso de empaquetado y las características mínimas de los espacios y el mobiliario necesario para el almacenaje de los productos. Así mismo, se deben identificar e implementar las alternativas simples y eficientes para mantener limpias las áreas de manejo de productos y compartir a los productores el equipamiento y accesorios mínimos requeridos para mantener condiciones higiénicas en estas etapas del proceso.

**f) *No hay trazabilidad en el proceso productivo ni en los productos***

Los MyPP, por lo general, no llevan una bitácora de sus procesos productivos ni de sus productos debido a que no tienen la capacitación o entrenamiento para hacerlo, y a que no conocen los beneficios de contar con esta información como elemento de toma de decisiones en situaciones de carácter tecnológico y económico. Al no existir bitácoras se dificulta el seguimiento del nivel de producción, de la calidad del producto y de la comercialización. Sin estos datos es complicado establecer las bases para proponer nuevas estrategias de comercialización de los productos. Por esta razón, es

necesario conocer los procesos locales, identificar las condiciones y parámetro de operación que son críticos e indispensables para caracterizar cada “punto” en el trapiche. Después es necesario proponer los formatos o rubricas para documentar por impreso esta información. El productor debe aprender a completar estos formatos y a archivarlos apropiadamente. Así mismo, se debe orientar al productor de como hacer el análisis de esa información e indicarle como los resultados encontrados le pueden ayudar a tomar decisiones en términos de producción y comercialización. Una observación importante es que el perfil de los miembros de la comunidad, la disponibilidad de servicios públicos y el acceso a tecnología puede facilitar o inhibir el seguimiento digital de los proceso productivos y de los productos en cada trapiche.

#### **g) No hay diversificación de productos ni de procesos**

Históricamente, los MyPP se han dedicado a la producción del pilón. Mas recientemente, se han capacitado y equipado para producir piloncillo granulado, motivados por el mayor precio de este en el mercado. Sin embargo, existen muchos otros productos que se pueden obtener del jugo de caña, de la melaza, del pilón y del piloncillo granulado. Algunos MyPP se interesan y producen dulces de piloncillo con semillas, pan, mole o mermeladas, por mencionar los mas representativos. A la fecha, es bien conocido el potencial para usar el jugo, la melaza o el piloncillo en la fabricación de otros productos en el área de alimentos y bebidas que puede requerir espacios y tecnología que por el momento no están disponibles en la unidades productiva rurales. Esta situación y la falta de competencias para producirlos acotan por ahora su desarrollo.

Complementariamente, en un enfoque de economía circular, los residuos agrícolas y agroindustriales son ahora materias primas de las cuales se pueden obtener una amplia diversidad de materiales y de productos químicos de mayor valor agregado que los tradicionales. Este enfoque es la premisa que dio origen al proyecto de investigación e incidencia en las comunidades piloncilleras Tének y se discute en diversas secciones de este capítulo. La apropiada integración de estos conceptos puede generar, en un futuro mediato, que un trapiche se convierta en una micro o pequeña unidad productiva en la cual se generen en paralelo múltiples productos, emulando una micro o pequeña biorrefinería.

### **5.3 AMBIENTAL**

La producción de caña y de piloncillo a nivel industrial implica el uso de métodos que pueden originar graves problemas al medio ambiente que demandan múltiples acciones técnicas y económicas para mitigarlos o revertirlos. Entre los principales

retos/oportunidades del sector ambiental se identifican los siguientes asociados a las comunidades piloncilleras Tének.

**a) *Monocultivo de caña de azúcar***

La práctica de solo cultivar caña de azúcar puede llevar al agotamiento de nutrientes del suelo y a una mayor vulnerabilidad a plagas, lo cual demanda el uso de fertilizantes y plaguicidas, además de reducir la biodiversidad. Para atender este resto se deben diversificar los cultivos, como ya lo hacen en algunos MyPP en la zona de incidencia. Sin embargo, es imperativo orientar a los productores capacitaciones y otorgar los apoyos económicos para extender la práctica de rotación de cultivos y la introducción de variedades de caña que sean más productivas y resistentes a las dinámicas condiciones del entorno.

**b) *Destrucción de hábitats naturales***

La expansión de los cultivos de caña de azúcar sin una planeación y manejo adecuado del uso de suelo lleva a la destrucción de hábitats naturales, que afectan las especies de flora y fauna locales. Por esta razón de orientar a los productores, por ejemplo, en el uso de estrategias de agroforestería, que contribuyen a preservar la biodiversidad a la par de extender el cultivo y producción de la caña de azúcar.

**c) *Gestión del agua***

La producción artesanal de piloncillo requiere de agua en las etapas de cultivo y procesamiento de la caña. En la zona de incidencia hay una temporada de lluvia bien definida; sin embargo, el hecho de no contar con tecnología adecuada para acumular el agua condiciona que durante la época de sequía ocurra una sobreexplotación de los pozos locales para satisfacer las necesidades básicas y, de hecho, no hay agua suficiente ni los medios para hacer el riego del cultivo de caña de azúcar. En este escenario, se deben gestionar e implementar, entre otras acciones, la recolección y almacenamiento de agua de lluvia, sistemas de riego eficientes (riego por goteo, por ejemplo), así como optimizar el uso del agua en la etapa de producción.

**d) *Uso intensivo de agroquímicos***

La producción industrial de caña de azúcar por lo general implica fertilizantes y plaguicidas químicos para maximizar la producción en campo. Sin embargo, esta bien documentado el efecto negativo que tienen estos productos químicos cuando escurren y se filtran hacia los cuerpos de agua locales. A este respecto, la mayoría de los MyPP de las comunidades Tének conocen y están convencidos de la pertinencia de fomentar la agricultura orgánica, usando biofertilizantes y plaguicidas naturales para evitar el

uso de agroquímicos y proteger así los recursos hídricos. Los MyPP tiene además la idea que la certificación orgánica de sus productos también puede tener favorables implicaciones económicas.

**e) Quema de caña de azúcar**

En la producción industrial de caña se mantiene la costumbre de hacer la quema de los campos de caña para facilitar su corte. Es bien conocido que esta práctica provoca la pérdida de materia orgánica en el suelo, además de liberar grandes cantidades de gases que contribuyen al cambio climático. Afortunadamente, los MyPP de las comunidades Tének tienen la convicción de cosechar en verde, convencidos de los beneficios que esta técnica tiene para el cuidado del suelo y del medio ambiente.

**f) Manejo inadecuado de residuos**

La producción artesanal de piloncillo genera relativamente bajas cantidades de residuos como lodos y cachaza; el principal residuo es el bagazo generado durante la extracción del jugo de caña. El bagazo se seca y se usa localmente como combustible para el horno del trapiche o para fabricar composta o alimento para animales. Sin embargo, el bagazo es una materia prima para una gran diversidad de productos incluyendo materiales funcionales, productos químicos y combustibles verdes en fase gas o líquida.

**g) Emisiones de gases de efecto invernadero**

A nivel artesanal de producción de piloncillo, las principales emisiones de gases resultan de la operación de trapiches con motor de gasolina y de la combustión del bagazo. Por las condiciones típicas de operación de las unidades productivas, los gases resultantes no solo contribuyen al cambio climático, sino que afectan drásticamente la salud de los productores y de sus familias. Por esta razón, se deben desarrollar trapiches alternativos basados en energía eléctrica, optimizar el diseño del horno y las características de secado del bagazo para hacer una operación menos contaminante y reducir los impactos en la salud de los MyPP y sus familias.

## 5.4 ENERGÉTICO

**a) Uso de biomasa como combustible**

En el proceso artesanal de la producción de piloncillo, la energía para concentrar el jugo de la caña se obtiene de la combustión de diferentes tipos de biomasa, incluyendo leña, otates (especie de bambú local) y bagazo de caña. Cuando se usa leña, se corre el riesgo de contribuir a la deforestación y pérdida de biodiversidad. De esta forma, el oteate y el bagazo residual son alternativas más convenientes, aunque se debe optimizar su

consumo en el trapiche, dado que ambos materiales tienen aplicaciones alternativas de mayor valor agregado.

**b) *Baja eficiencia energética en los hornos en el trapiche***

En lo general, los hornos artesanales usados en el trapiche son ineficientes desde el punto de vista energético. Estos hornos consumen grandes cantidades de biomasa para generar la energía necesaria para evaporar el jugo de caña, pero exhiben notorias pérdidas de energía debido, entre otros factores, a un mal diseño, a una construcción o uso de materiales inadecuados, a la falta de un buen aislamiento. Estas condiciones incrementan la demanda de energía y, en consecuencia, el uso de la biomasa residual, por lo que es imperativo identificar e implementar alternativas para optimizar el uso de la energía generada en la combustión.

**c) *No se aprovecha la energía residual del proceso de evaporación***

La energía generada en el proceso de evaporación del jugo de caña simplemente se disipa y se pierde a la atmosfera, desperdiciando una gran cantidad de calor y de vapor de agua, que no se utilizan en procesos alternativos. Por esta razón, se deben visualizar la implementación de sistemas de recuperación de calor y de agua para ser reutilizar ambos insumos en procesos o productos que mejoren las condiciones de trabajo y de confort en el trapiche.

**d) *Limitado uso de energía renovable en el trapiche***

En las comunidades Tének, la mayoría de los trapiches no tienen energía eléctrica lo que impone severas limitaciones en su proceso productivo. Por ejemplo, no se puede extraer el jugo de caña usando un motor eléctrico, o se debe trabajar solo cuando hay luz de día, a pesar de las inclementes condiciones climatológicas que imperan en la zona de producción, que repercute en la salud de los productores y sus familias. En este escenario es imperativo explorar y validar el uso de energías alternativas que generen electricidad. La alternativa más común es el uso de energía solar que no se implementado y evaluado en las comunidades piloncilleras Tének por falta de conocimiento y de recursos económicos. Es imperativo hacer la validación de impactos de las energías alternativas en el trapiche para facilitar la transición a fuentes de energía limpias, para reducir el impacto ambiental, para lograr mejores condiciones de trabajo y para la políticas y programas públicos que apoyen económicamente la implementación de energías alternativas en el trapiche.

**e) *No se conoce el balance de energía integral en la cadena de producción***

La producción artesanal de piloncillo es una cadena de valor que va desde el cultivo de la caña hasta la venta de diversos productos generados a partir del piloncillo.

En cada etapa de este proceso se requieren diferentes tipos y cantidades de energía. La cuantificación y la optimización de la energía de cada etapa es un reto pendiente, así como la integración de la red de energía en algunas de las etapas del proceso. Este análisis energético, acoplado a extraer y optimizar la energía asociada a las corrientes residuales del proceso, es imperativo para aprovechar mejor todos los recursos naturales y para diversificar los productos que resultan en la cadena productiva con favorables implicaciones ambientales y económicas. A este respecto, se den realizar el análisis de ciclo de vida de toda la cadena de producción artesanal de piloncillo, para identificar los cuellos de botella y alternativas para aprovechar eficazmente la energía en toda la cadena de valor.

#### **f) Costos energéticos elevados**

Un aspecto que pasa desapercibido por los MyPP de las comunidades Tének es que la energía implicada en la cadena de valor ya sea en las etapas de cultivo, cosecha, producción, servicios, acopio y distribución del producto, tiene un costo que afecta su economía. Este costo energético es uno de los factores que acota la rentabilidad del proceso y reduce el margen de ganancia de los productores. Por esta razón, es necesario capacitar a los productores para que reduzcan los costos energéticos en cada etapa de la producción artesanal de piloncillo.

## 5.5 ECONÓMICO

#### **a) No hay un mercado justo: monopolización del proceso de comercialización por intermediarios**

Para la materia de los MyPP la venta del producto artesanal ocurre al pie del trapiche, al cual llegan los intermediarios que fijan unilateralmente precios muy bajos, lo que impide a los productores un proceso de comercialización justo. Esto ha ocurrido históricamente en las comunidades piloncilleras Tének porque no tienen la visión de que existen otros mercados y otras formas de comercialización. Por esta razón, es imperativo capacitar a los productores y darles la confianza que pueden acceder a mercados más rentables, a ampliar su cartera de clientes y a negociar por sí mismos las mejores condiciones de comercialización de sus productos. Es también pertinente que las autoridades fijen marcos formales de precios mínimos para productos artesanales y que se empodere a los MyPP para que tengan el control de su cadena de valor. Estos escenarios serán realistas si es posible inducir y capacitar a los productores para que se organicen y trabajen colectivamente para crear las figuras legales, como cooperativas o sociedad de productores rurales, que les permitan una venta directa de sus productos en

diferentes mercados nacionales e internacionales, aumentando sus ingresos al obtener precios justos por sus productos artesanales.

**b) *Desconocimiento del costo de producción y de los precios de venta en el mercado***

Un aspecto relevante y altamente prevaeciente entre los MyPP de las comunidades Tének, que usan procesos tradicionales, es que no tiene idea de los costos de producción de sus productos. Esta situación condiciona drásticamente la economía de su cadena de valor y limita sus ganancias. El productor no conoce los costos de inversión ni los costos de operación de su proceso. De forma más específica, no los valora. Su forma de pensar les sugiere que muchos de los recursos, los servicios o los procesos implicados en cada etapa no tiene un costo, de tal forma que no los cuantifican. No tiene tampoco idea de la necesidad de eficientizar sus procesos para reducir costos de producción, ni de la conveniencia de aumentar la productividad y calidad, como otros condicionantes del valor de su productos. Esta tipo de situaciones les impide conocer el valor real de su producto y los deja en una situación de total desventaja al negociar con el intermediario o con otros clientes. Por esta razón, es imperativo capacitar a los productores para que determinen sus costo de producción, así como las estrategias para reducir los mismos, como premisa para incrementar después sus ganancias.

**c) *Reducidos beneficios económicos, salarios bajos y ausencia de derechos laborales***

Como se resultado de la actividad de los intermediarios se acota notoriamente la ganancia del productor. Por otra parte, para quienes no tienen trapiche y se emplean con otros productores, los salarios son muy bajos y, por supuesto, productores y empleados carecen de prestaciones como el seguro social, acceso a sistemas de salud o pensiones. En este escenario, nuevamente, se debe promover el comercio justo, orientando esquemas de economía solidaria en los cuales los productores trabajan colaborativamente para producir sus productos en mayor cantidad y con más calidad, como premisa para comercializar mejor sus productos.

**d) *Falta de diversificación de productos***

La mayoría de los MyPP de las comunidades piloncilleras Tének solo producen el pilón tradicional. Mas recientemente, varios productores han aprendido a producir el piloncillo granulado al tener este mejor precio de venta. Sin embargo, al tener solo dos productos limitan sus oportunidades de mercado y de ingresos y son muy vulnerables a la temporalidad de la demanda de los productos o a las fluctuaciones de precios en el mercado. Por esta razón, es imperativo reducir la dependencia de un solo



producto mediante procesos de capacitación que les enseñen a los productores como diversificación sus productos típicos de piloncillo a otros como dulces, bebidas pan o mermeladas, que les generar nuevas fuentes de ingresos. La capacitación se puede extender a procesos más elaborados para diversas ramas de la industria de alimentos. En cada caso, será pertinente identificar las estrategias para que la diversificación de los productos ocurra preferentemente en espacios comunitarios, con la infraestructura y servicios necesarios y con la convicción de los productores de trabajar colectivamente para lograr mejores estándares de calidad y productividad.

**e) Políticas asistenciales y limitadas oportunidades de financiamiento y crédito**

Los apoyos para la actividad productiva de las comunidades piloncilleras Tének, por lo general, resulta de programas públicos a fondo perdido. Es decir, los MyPP han recibido capacitación, espacios productivos, infraestructura o servicios sin ningún costo. El reto es que este tipo de apoyos es finito, no es sostenible porque no hay recurso suficiente para cada productor o familia y, en muchas situaciones, está asociado a políticas electorales locales. Además, hay una amplia percepción que hay un sesgo en la selección de los beneficiarios que descompone el tejido social e inhibe la colaboración entre los miembros de las comunidades. En otros casos, los programas públicos supeditan el apoyo a que el productor haga el 50% de la aportación económica necesaria; esta condición imposibilita el apoyo de la gran mayoría de los MyPP que solo cuentan con lo indispensable para vivir cotidianamente. En este escenario, las opciones públicas y privadas para apoyo a los productores a través de financiamiento y créditos es prácticamente imposible para los productores, que no cuentan con garantías para conseguirlos, ni tendrán oportunidad para pagarlos ante la inestabilidad y los exiguos ingreso económicos de su actividad productiva. En este escenario urge un cambio de política pública que promueva sistemas distintivos de economía solidaria, que de forma colectiva facilite que los productores sean capaces de mejorar las condiciones producción y comercialización de sus productos como punto de partida para que por sí mismos lleguen a horizontes en los cuales puedan hacer inversión en los espacios y la infraestructura necesaria para diversificar sus productos y potencial de ingresos en ventas directas en mercados nacionales e internacionales.

**f) Falta capacitación en emprendimiento social y economía solidaria**

Además de las necesidades de capacitación técnica, es imperativo que los MyPP reciban capacitación en las áreas que detonen proceso de comercialización justos. Al incrementar la productividad y la calidad de sus productos artesanales, los productores deben ser capaces de comercializarlos por sí mismos para que los beneficios redunden en

ellos y en sus familias. Inicialmente, se puede proponer la capacitación en emprendimiento social, como una estrategia para los productores validen los elementos diferenciadores de sus productos artesanales y un modelo o estrategia de negocio, que les permite colocar directamente sus productos en el mercado. Estos procesos de capacitación en emprendimiento social deben ser trajes a la medida al perfil y necesidades de cada comunidad. Deben también implicar estrategias didáctica adecuadas para que los productores, progresivamente, transiten en los proceso de inducción e inmersión a los conceptos, estrategias y/o herramientas distintivas del emprendimiento social y haya después un proceso de acompañamiento para que los ponga en práctica en su caso de interés. La capacitación en emprendimiento social debe inducir la pertinencia de optimizar sus actuales procesos, hacer uso de cierto nivel de tecnología y promover la diversificación de sus productos con algún elemento que sea muy atractivo para el mercado. Además, debe establecer la ruta crítica necesaria para asegurar, que independientemente del asimétrico perfil de los miembros de la comunidad, sean capaces de comprender las estrategias y acciones necesarias para organizarse colectivamente, para estimar sus costos y ganancias, para crear su cartera de clientes, para identificar sus mejores canales de comercialización, para empoderarse y sean capaces de gestionar los apoyos que requieran, par que identifique y se vinculen con los socios estratégicos que les ayuden solidariamente a salir adelante con sus proyectos. Estos escenarios son premisas pertinentes para el establecimiento y consolidación de sistemas de economía solidaria en los que se sustente el bienestar social y económico de productores y familias.

#### ***g) Falta de infraestructura de producción y comercialización***

La individualidad en los procesos productivos y de comercialización que prevalece en las familias de las comunidades piloncilleras Tének, acota notoriamente su potencial para resolver su situación económica actual. Por esta razón, de debe inducir la creación de organizaciones colectivas que, aun con diferente nivel de formalidad, induzcan los procesos necesarios para cambiar hacia mejores escenarios de bienestar de toda la comunidad. Como ejemplo, este tipo de organización facilitaría atender y resolver dos retos importantes: la falta de infraestructura para la producción y la comercialización de los productos. Esquemas de colaboración solidaria pueden facilitar la implementación de trapiches totalmente equipados, para que 3 o 4 familias lo operen conjuntamente. También pueden facilitar el establecimiento de unidades de acopio y procesamiento de productos de piloncillo, en los que se incremente al cantidad y se uniformice la calidad de los productos, y tener mejor oportunidad de atender las demandas del mercado. Estas estrategias pueden facilitar que los MyPP tengan una oportunidad viable para tener

mejores ingresos. El reto, por supuesto, es tener la mentalidad y la capacidad para crear y desarrollar las organizaciones colectivas que faciliten las estrategias ejemplificadas.

#### ***h) Retos en competitividad***

Para un MyPP, sus productos artesanales de piloncillo enfrentan diversas competencias. La primera es la competencia de otros productores con mayores extensiones de cultivo, trapiches mejor con más tecnologías o servicios, o con mejores canales de venta. Colectivamente, los MyPP enfrentan la competencia de los productos industrializados, que más uniforme son cuanto a características (mas “calidad) y cuyos niveles de producción los hace más baratos comparados con los artesanales y que tienen una cadena establecida que les da presencia en mercados nacionales e internacionales. Esta es la real competencia a los que los MyPP deben enfrentar colectivamente porque, literalmente, les come el mercado y sus beneficios económicos. Los retos para mejorar la competitividad de los productos artesanales implican la atención de oportunidades que se han referido en esta y en secciones previas. Para este propósito es imperativo que los MyPP identifiquen los elementos diferenciadores de sus productos artesanales de piloncillo y que los hagan valer. Por ejemplo, el piloncillo artesanal, y sus productos, pueden obtener certificaciones como productos orgánicos y de comercio justo. Hay certificaciones locales que también distinguen y promocionan los productos locales entre la población para promover su consumo. Se pueden también validar el uso de tecnologías alternativas en su proceso de producción y su compromiso por la conservación del medio ambiente. Así mismo, se puede validar la calidad del producto mediante análisis físicos, químicos, bromatológicos y microbiológicos y sustentar las tablas nutricionales y el tiempo de vida de anaquel. Se puede, por supuesto hacer la gestión de una marca propia antes la autoridad local en la materia y generar y proteger al imagen o logotipo distintivo de su producto, para que sea fácilmente reconocido por los clientes en el mercado. Se pueden generar estrategias de comercialización rescatando el valor de la cultura y de las tradiciones asociadas a los productos, sin menoscabo de usar las herramientas tecnológicas más avanzadas para socializar y comercializar el producto.

#### ***i) Asociaciones estratégicas para implementar respuestas oportunas a las variables económicas externas.***

La producción artesanal de piloncillo en las comunidades Tének implica métodos tradicionales de producción y comercialización que les impide reaccionar a cambios económicos en el entorno, que condicionan sus procesos y ganancias. Por ejemplo, hay notorias variaciones en precios debido a la ley de la oferta y la demanda. La temporada y nivel de producción, así como el precio comparativo del piloncillo, el azúcar y otros

edulcorantes en el mercado, afectan directa o indirectamente los ingresos de los MyPP. Además, el relativamente bajo valor agregado del piloncillo que se vende mayoritariamente como pilón, en su forma más básica, también acota el precio que los productores pueden cobrar. Así mismo, la falta de acceso a mercados nacionales o internacionales sea de forma directa o de intermediarios, debido a la falta de conocimiento sobre regulaciones, barreras comerciales o certificaciones necesarias para la exportación, también limita el potencial de crecimiento económico. En estos escenarios, los MyPP necesitan de socios estratégicos que los orienten y los capaciten para que puedan atender y resolver estos retos externos que demandan, entre muchas otras soluciones, la obtención de certificados de calidad del producto, de producto orgánicos y de comercio justo que promuevan el acceso a mercados nacionales e internacionales, la gestión de mecanismos de precios estables como contratos a largo plazo, el acceso a información sobre normativas internacionales. Los socios estratégicos pueden inclusive sugerir otros servicios complementarios que generen beneficios económicos, como el turismo rural que visite las “rutas del piloncillo artesanal”, por mencionar un ejemplo. El reto importante que los MyPP deben identificar con claridad que los mejores socios estratégicos deben tener un perfil social y altruista, que sea afín a sus necesidades socioeconómicas. Las instituciones educativas y organizaciones sociales sin fines de lucro pueden ser opciones viables para los MyPP.

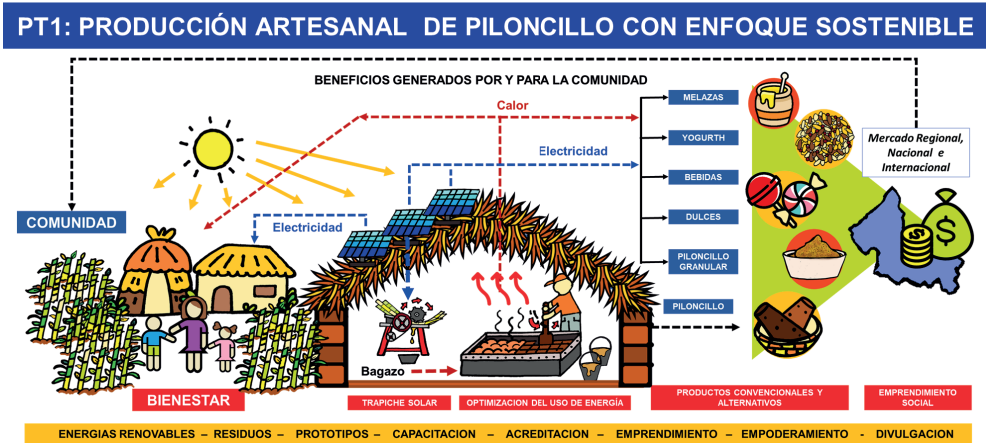
## **6 CASO PRÁCTICO PROPUESTO PARA LAS COMUNIDADES PILONICLLERAS TÉNEK**

Las secciones anteriores documentan las bases para la “Producción artesanal de piloncillo con enfoque sostenible”. De forma práctica no es trivial implementar cada una de las acciones y, por otra parte, algunas de ellas tienen la posibilidad de atender y resolver varios retos/oportunidades identificadas. En esta situación, la selección de las acciones sociales, económicas, ambientales, energéticas y sociales en cada comunidad debe ser el resultado de un cuidadoso análisis de las necesidades puntuales, de las condiciones de contorno y de los recursos disponibles para las acciones de incidencia. La experiencia muestra que, en muchos casos, se debe proponer que un enfoque totalmente sostenible se alcance a través de una secuencia de varias etapas, en cada una de las cuales se den pasos firmes para conseguir, progresivamente, la armónica integración de metas que realmente contribuyan al desarrollo sostenible de la comunidad.

## 6.1 PROPUESTA MODELO

Como ejemplo, la figura 9 esquematiza la propuesta del grupo de trabajo para las comunidades piloncilleras Tének de la huasteca potosina.

Figura 9. Producción Artesanal de Piloncillo con Enfoque Sostenible: propuesta para las comunidades Tének de la huasteca potosina.



Los elementos más relevantes que se propusieron en este caso fueron los siguientes.

### **Elementos técnicos:**

- Rediseño de los trapiches, implementando ajustes que garanticen condiciones de operación que promuevan la higiene y seguridad de la actividad productiva.
- El desarrollo y validación de trapiches funcionales de bajo costo, a partir del intercambio de saberes entre productores y académicos. Estos trapiches operan con motor de gasolina de 5 HP y motor eléctrico de 2 HP; Los productores tienen acceso a los diseños para replicar su construcción en la zona de incidencia.
- Optimización de la operación de la puntera para disminuir los tiempos de procesamiento y para definir las condiciones del punto de melaza, pilón y piloncillo granulado.
- Rediseño del horno artesanal para hacer más eficiente la transferencia de energía a la puntera y reducir los tiempos de procesamiento. Además, buenas prácticas para reducir la cantidad de bagazo necesaria para lograr el punto de cada uno de los productos.

- Procesos de capacitación técnica de productores para describir los conceptos, estrategias, acciones y metas esperadas en la operación de un trapiche con enfoque sostenible.
- Aplicación y seguimiento de buenas prácticas de higiene para el manejo de los productos en sus etapas de moldeo o de tamizado-cribado, y en el almacenamiento de los productos terminados.

***Elementos económicos:***

- Proceso de capacitación en emprendimiento social para jóvenes, mujeres y productores de las comunidades piloncilleras Tének.
- Diversificación de los productos a base de piloncillo, incluyendo el envasado de melaza, la producción de dulces de piloncillo con semillas. Las acciones implican los proceso de inducción en campo, capacitación en una institución educativa, implementación y seguimiento de procesos en campo.
- Desarrollo de un modelo de negocio para la venta directa de los productos de piloncillo en el mercado nacional e internacional.
- Apoyo en la gestión de una marca comercial.
- Orientación para la creación de una figura asociativa legal (sociedad de productores rurales) para establecer canales de comercialización formales con supermercados.
- Adaptación de un espacio comunitario como una Unidad de Procesamiento de Productos de Piloncillo, para el acopio, homogenización y comercialización de productos.

***Elementos ambientales y energéticos:***

- Implementación de sistemas demostrativos de energías alternativas para generar calor y electricidad en la UP3, por medio de un calentador solar para el agua caliente requerida en el lavado de utensilios, un biodigestor para la producción de biogás usado en las parrillas de preparación de dulces, una estufa ecológica a base de leña.
- Implementación de sistemas demostrativos de energías alternativas para generar electricidad en un trapiche tradicional, por medio de un panel solar que permite iluminar la unidad productiva, cargar un celular y operar un ventilados, creando las condiciones necesarias para dar comodidad en la operación del trapiche cuando no hay luz solar o las temperatura ambiental es muy alta.

### **Elementos Sociales**

- Procesos de sensibilización de niñas, niños y jóvenes en escuelas primarias, secundarias y preparatorias, en las cuales se imparten pláticas y talleres para detonar la confianza y la autoestima de los participantes, y su compromiso por el desarrollo sostenible.
- Procesos de capacitación de jóvenes y adultos para sensibilizarlos de los retos por atender en las comunidades.
- Proceso de inducción a la gestión de recursos necesarios para resolver las necesidades de la comunidad.

## **6.2 RESULTADOS E IMPACTOS DE LAS ACCIONES DE INCIDENCIA**

En un periodo de dos años y medio de acciones de incidencia para el paquete tecnológico de producción artesanal de piloncillo con enfoque sostenible, los principales resultados fueron los siguientes.

### ***En relación a cobertura geográfica***

- Comunidades y productores del sistema Caña-Piloncillo del Municipio de Tanlajás, S.L.P., en México
- El municipio se localiza en la zona conocida como la huasteca potosina y cuenta con 19,312 habitantes, de los cuales 15,281 personas son indígenas, siendo la principal etnia la Tének.
- El municipio está catalogado por el gobierno como de alta marginación social y económica en San Luis Potosí.
- El impacto se proyecta para 800 pequeños productores de piloncillo artesanal, solo en estas comunidades.
- El proyecto se extiende ahora a las comunidades y productores de otros Municipios de la Zona Huasteca: Aquismón, San Antonio, Tancanhuitz y Huehuetlán.

### ***En relación a elementos técnicos:***

- 1) Buenas prácticas de cultivo, cosecha y procesamiento de la caña de azúcar en pilón y piloncillo granulado.
- 2) Caracterización fisicoquímica de caña de azúcar, jugo de caña, bagazo y productos terminados.
- 3) Dos prototipos de trapiche funcionales y de bajo costo con motor de gasolina y eléctrico, con reporte de construcción y manual de operación. Justificación

del reto técnico para suministrar la energía eléctrica del trapiche con un sistema fotovoltaico. Uso de esta tecnología para aportar comodidades mínimas al trabajo del productor.

- 4) Optimización del horno de combustión y la puntera para mejorar productividad y el uso eficiente de energía.
- 5) Buenas prácticas de higiene, seguridad y calidad.

#### ***En relación a la capacitación de productores***

- 3 prácticas de campo, con 304 productoras(es) beneficiadas(os) de 7 diferentes comunidades Tének.
- Capacitación de productores (talleres) en: Buenas prácticas agrícolas y en la producción de piloncillo, Optimización de energía en el proceso productivo, Aprovechamiento de residuos agroindustriales.

#### ***En relación a Emprendimiento Social***

- Programa de Emprendimiento para Jóvenes, Mujeres y Productores de las Comunidades Piloncilleras en Tanlajás, S.L.P.

El programa consistió de 11 talleres, 6 acciones de seguimiento en campo y 1 participación en feria comercial, con 242 beneficiarios de 12 comunidades inducidos al emprendimiento, de los cuales 32 completaron el programa integral de emprendimiento social.

Otros resultados relevantes fueron los siguientes.

#### ***Un Modelo de Diagnóstico Comunitario***

- Se mejoró la estrategia de diagnóstico y se utilizó para validar las estrategias y acciones a realizar.

#### ***Un Modelo de Capacitación***

- Se generó un modelo general de capacitación transdisciplinar a diferentes miembros de la comunidad.

#### ***Un Programa de Acción Social***

- Capacitación en 4 temas: Criando con el corazón, Tu eres importante, En comunidad se avanza más, La naturaleza y yo somos uno, dirigidos a niños y niñas, jóvenes y mujeres. 4 talleres con una cobertura de 618 beneficiados: 117 niños y niñas, 264 jóvenes. 163 mujeres y 74 hombres, de 11 diferentes comunidades.

#### ***Acciones de Gestión Local***

- 20 reuniones en dependencias municipales.



- 3 reuniones en dependencias del sector agrícola.
- 11 reuniones con instituciones educativas de la zona de incidencia: COBACH, EMSAD, UBBJG en Aquismón, Universidad Intercultural en Tancanhuitz.
- 5 reuniones con Gobernadora Indígena y representantes del Instituto Nacional de Pueblos Indígenas.

### ***Socialización de resultados***

- Participación de estudiantes UASLP: 3 Posgrado, 9 de Ing. Mecánica y 8 de Ing. Química. 2 estudiantes de Ing. en Procesos Agroindustriales de UBBJG-Aquismón, 1 graduado de la Universidad de Zaragoza, España.
- Difusión de resultados en plataformas digitales, entrevistas de radio, notas de periódicos y eventos técnicos

De forma relevante, por su naturaleza el proyecto es de caracteres interdisciplinar, interinstitucional e intersectorial. A la fecha, las organizaciones vinculadas al proyecto han sido:

### ***Instituciones académicas:***

- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ: Facultad de Ciencias Químicas, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Coordinación Académica de la Región Altiplano, Facultad de Ingeniería, Coordinación Académica de la Región del Altiplano Oriente, Facultad de Contaduría y Administración, Oficina de Transferencia de Tecnología.
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA: Unidad Iztapalapa, Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica.
- UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, Facultad de Ingeniería Química.
- Consejo regional de productores de piloncillo en Tanlajás, S.L.P.

### ***Organismos públicos y privados en vinculación con el proyecto:***

- Presidencia Municipal de Tanlajás, S.L.P.
- Jueces Auxiliares y Comisariados Ejidales de las Comunidades de Tanlajás, S.L.P.
- Colegio de Bachilleres Plantel 09, Tanlajás, S.L.P.
- Instituciones educativas de nivel básico y medio superior de Tanlajás, S.L.P.
- Presidencia Municipal de Aquismón, S.L.P.
- Gobernadora Indígena de San Luis Potosí
- Instituto Nacional de Pueblos Indígenas (INPI).
- Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Recursos Hidráulicos (SEDARH).

- Asociación civil: Fondos para la paz.
- Proyectos de Investigación e Incidencia de Energía y Cambio Climático de México 321077 y 320510.

## 7 IDEAS CONCLUSIVAS

El equipo de trabajo identificó la necesidad de apoyar, desde la academia, el desarrollo sostenible de comunidades rurales en zonas de alta marginación social y económica. Este interés se acopló a las políticas estrategias y programas establecidas por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías de México, para atender las necesidades en el tema de Energía y Cambio Climático. Como resultado, el grupo de trabajo estableció un proyecto de investigación e incidencia en comunidades Tének de la huasteca potosina, una región localizada en el centro de México, que se dedican a la producción artesanal de piloncillo, para aprovechar los recursos naturales y los residuos agrícolas y agroindustriales para generar energía, materiales y productos químicos. Se propuso estos productos fueran comercializados directamente en mercados nacionales e internacionales usando esquemas de emprendimiento social, para que redituaran mayores beneficios económicos y sociales a los productores y sus familias.

En el inicio del proyecto, el equipo de trabajo estableció un adecuado canal de comunicación y recibió la confianza de las comunidades piloncilleras Tének. Sobre estas bases fue posible realizar un diagnóstico comunitario y, como resultado de este, se identificaron y validaron los retos de las unidades productivas y las familias. El trabajo colegiado se extendió a la definición y jerarquización de las acciones de incidencia que, desde las perspectivas técnica, social, económica, ambiental y energética, coadyuven al bienestar socioeconómico de las comunidades. El equipo de trabajo socializó el proyecto y realizó gestiones con otros actores y organizaciones del ecosistema local, para conseguir servicios o apoyos complementarios para la ejecución de las actividades del proyecto.

Operativamente y de forma progresiva, se logró que los MyPP de las comunidades Tének valoren la pertinencia de optimizar sus procesos productivos, de diversificar sus productos, de capacitarse como emprendedores, de hacer buen uso de la energía en sus unidades productivas y viviendas y de incorporar fuentes alternas de energía. En la etapa que se describe en este capítulo se dan cuenta de los retos, estrategias, acciones, avances y logros para inducir la “Producción artesanal de piloncillo con enfoque sostenible” entre las comunidades Tének. La experiencia adquirida por el equipo en el trabajo en campo se enriqueció con los diálogos de saberes con los productores locales y con otras organizaciones públicas y privadas que, a nivel local y nacional,

trabajan en la cadena productiva caña de azúcar – piloncillo. Como resultado, el equipo de trabajo identificó en este capítulo los elementos tecnológico, sociales, económicos, ambientales y energéticos que deben ser considerados cuando se define una estrategia para promover el desarrollo sostenible de micro y pequeñas unidades piloncilleras. Así mismo, se ha documentado el caso práctico desarrollado por el equipo de trabajo en las comunidades piloncilleras Tének. En este caso práctico se incorporaron varios elementos de cada una de las dimensiones que contribuyen a la sostenibilidad y se ha dado cuenta de los avances y resultados relevantes a la fecha. Estos resultados validan claramente la pertinencia de hacer acciones de incidencia en cada uno de los eslabones de la cadena de valor y de trabajar secuencial y paralelamente en las diferentes dimensiones de la sostenibilidad. Por supuesto, es evidente la necesidad de incluir otros elementos de sostenibilidad en futuras etapas del proyecto, de tal forma que se pueda consolidar la operación y desarrollo independiente de las micro y pequeñas unidades productivas, para lograr mayores ingresos económicos que se traduzcan después en mejores condiciones de vidas para las familias.

Para contextualizar la relevancia de los resultados a la fecha, se refiere que otros hitos de esta etapa del proyecto fueron la adecuación de un trapiche tradicional como modelo de una micro-biorrefinería rural y el establecimiento de una Unidad de Procesamiento de Productos de Piloncillo. Además, está en desarrollo la instalación de un “Centro de Innovación para la valorización sostenible de residuos y energías renovables” (CIVASORE), que será un espacio de capacitación, entrenamiento, certificación y divulgación de los resultados para todos los miembros de la comunidad.

Complementaria y relevantemente, se fortalecieron los procesos de transferencia de saberes entre productores y académicos que facilitaron las actividades y el logro de las metas del proyecto. Por otra parte, se ha inducido, capacitado y empoderado a los productores para realizar acciones de capacitación técnica de otros productores, y de socialización de los avances y logros del proyecto; los productores imparten sus talleres en Tének con favorables beneficios en términos de impacto. Las(os) productoras(es) y emprendedoras(es) también han sido capacitados para la gestión de recursos ante organizaciones públicas y privadas para resolver sus necesidades. Así mismo, se han establecido elementos de emprendimiento que facilitarán la independencia de los intermediarios, y el desarrollo de modelos de negocios que les permitirán lograr mejores ingresos. Estas bases son una premisa muy importante para detonar a futuro procesos de economía solidaria y el bienestar de las comunidades.

Finalmente, el modelo propuesto para impulsar la producción artesanal de piloncillo con enfoque sostenible en las comunidades Tének de la huasteca potosina, se considera

muy pertinente tomando en cuenta los resultados y logros a la fecha. De forma relevante, el modelo fue un traje a la medida para las necesidades de la comunidad y debe seguir siendo objeto de apoyos, seguimiento y evaluación continua para lograr su consolidación. La operación independiente de estas comunidades se concretará en la medida que sean capaces de organizarse para formalizar y operar las figuras legales que les permitan la comercialización de sus productos en los mercados nacional e internacional. El modelo de incidencia para detonar el desarrollo sostenible de micro y pequeñas unidades productivas se implementará y validará en otros sistemas productivos rurales en zonas de alta marginación social y económica.

## 8 AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico de parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) de México para el desarrollo del proyecto de investigación e incidencia PRONACES 321073 “Desarrollo social y económico de pequeñas unidades agroindustriales con base en la socialización, gestión, generación y/o uso eficiente de energía sustentable”, cuyos resultados sustentan esta publicación.

Los autores valoran el interés, compromiso y capacidad técnica de todo el equipo de trabajo que ha participado en el proyecto 321073. De forma particular, agradecen el apoyo de la MC Clara María Martínez Jasso en la elaboración de algunas figuras usadas en este capítulo.

Finalmente, los autores agradecen de manera especial el interés y la dedicación de los miembros de las comunidades Tének en los Municipios de Tanlajás, Tancanhuitz y San Antonio, S.L.P., durante su participación en el proyecto.

## REFERENCIAS

AGRICULTURA, S. D. (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. En S. D. AGRICULTURA, *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030* (págs. 1-16). México: SAGARPA.

Azúcar, C. N. (2015). *FICHA TÉCNICA DEL CULTIVO DE LA CAÑA DE AZÚCAR*. MÉXICO: CONADUSECA.

Azúcar, C. N. (2021). *informe estadístico del sector agroindustrial de la caña de azúcar en México. Zafra 2020/2021*. MÉXICO: CONADUSECA.

Caña, C. N. (2021). *Programa Nacional de la Agroindustria de la Caña de Azúcar PRONAC 2021-2024*. MEXICO: CONADUSECA.

Palomo González, L., & Sánchez Castillo, M. (2023). *Caracterización integral de materias primas y productos del sistema Caña de Azúcar - Piloncillo*. San Luis Potosí: UASLP.

Parlamentaria, G. (14 de Noviembre de 2023). Iniciativa año XXVI, número 6406-II-1, Gaceta Parlamentaria. *Gaceta Parlamentaria*.

Perez Iglesias, H., Santana Aguilar, I., & Rodríguez Delgado, I. (2015). *Manejo sostenible de tierras en la producción de caña de azúcar*. Machala, Ecuador: UTMACH.

Pesquera, S. d. (2022). *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. Obtenido de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera: <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>

R. Romero, E., J. Cárdenas, G., Ruiz, M., & Casen, S. (2012). Integración del sorgo azucarado a la cadena de aprovechamiento bioenergético de la caña de azúcar. *EEAOC - Avance Agroindustrial*, 13-17.

Reyes-Hernández, J., Torres-de los Santos, R., Hernández-Torres, H., Hernández-Robledo, V., Alvarado-Ramírez, E., & Joaquín-Cancino, S. (2019). Rendimiento y calidad de siete variedades de caña de azúcar en El Mante, Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 883-893.

Rural, S. d. (22 de Mayo de 2022). *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural*. Obtenido de Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/mexico-cuenta-con-disponibilidad-suficiente-de-azucar-para-atender-el-abasto-nacional-y-exportaciones>

Rural, S. d. (24 de Agosto de 2024). *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural*. Obtenido de Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/la-industria-de-la-cana-de-azucar-pilar-del-desarrollo-productivo-en-mexico>

Salazar-Ortiz, J., Trejo-Téllez, L., Valdez-Balero, H., Senties-Herrera, M., & Rosas-Rodríguez, M. (2017). CANA DE AZUCAR (*Saccharum spp.*) EN LA ALIMENTACION DE RUMIANTES: EXPERIENCIAS GENERADAS CON CANAS FORRAJERAS. *AGROProductividad*, 70-76.

## SOBRE O ORGANIZADOR

**Manuel Simões** é licenciado em Engenharia Biológica e doutorado em Engenharia Química e Biológica. Atualmente é Professor Associado com Agregação e Pró-Diretor da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), e investigador sénior do Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente, Biotecnologia e Energia (LEPABE) do Departamento de Engenharia Química da FEUP. Nos últimos anos esteve envolvido em 10 projetos nacionais (5 como investigador principal) e 6 projetos europeus. Foi membro do comité de gestão da ação COST BACFOODNET (Rede Europeia para Mitigação da Colonização e Persistência Bacteriana em Alimentos e Ambientes de Processamento de Alimentos) e esteve envolvido em outras 2 ações: iPROMEDAI e MUTALIG. Manuel Simões tem mais de 190 artigos publicados em revistas indexadas no Journal of Citation Reports, 4 livros (1 como autor e 3 como editor) e mais de 40 capítulos em livros. Ele é Editor Associado para o jornal Biofouling - The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research (o periódico mais antigo sobre pesquisa em biofilme), Editor Associado para o jornal Frontiers in Microbiology e Section Editor-in-Chief para o jornal Antibiotics. Seus principais interesses de pesquisa estão focados nos mecanismos de formação de biofilme e seu controlo com agentes antimicrobianos, particularmente usando novas moléculas antimicrobianas, e no uso de microalgas para tratamento de efluentes. É um dos investigadores mais citados do mundo (top 1%), tendo sido distinguido nos últimos dois anos no índice Essential Science Indicators, um dos mais prestigiados indicadores da qualidade de investigação.

Identificação SCOPUS: 55608338000; Nº orcid: 0000-0002-3355-4398

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

ADN 22, 29, 30, 36, 37, 39, 40

### C

Calidad y productividad 69, 105

Cellular senescence 13, 17, 18, 19, 20, 21

Células de cáncer 1, 2

Chronoarchitecture 13, 18, 19, 20

Citotoxicidad 1, 2, 4, 5

Comercio justo 69, 104, 107, 108

Comunidades Tének 69, 71, 77, 78, 79, 80, 84, 87, 88, 93, 100, 101, 102, 103, 104, 107, 109, 112, 114, 115, 116

### D

Desarrollo sostenible 68, 69, 70, 71, 87, 92, 93, 108, 111, 114, 115, 116

### E

Endogamia 46, 48

Evaluación sensorial 54

### F

Fenol cloroformo 36, 37, 39

### H

Heterochrony 13, 18

Hibridación 46, 47, 48

### I

Iridovirus 22, 28, 34

### L

Lacasa 1, 2, 3, 4, 9

## M

Maíz pigmentado 46

## N

Neurodegeneration 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21

Neuronal death 13, 14, 15, 16, 17, 19

## P

PCR 22, 29, 30, 33, 34, 36, 37, 40, 41, 42

Pez cebra 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33

Piloncillo artesanal 69, 70, 73, 86, 87, 92, 107, 108, 111

Proteína de insecto 54

## Q

Quercetina 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

## S

Salchichas 54, 56, 57, 58, 61, 62, 63, 64, 65

Sphenarium purpurascens 54, 55, 57, 64, 65, 67

## U

Ultrasonido 54, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 64, 65

## Z

Zea mays L. 46, 52