

Alda Rocío Ortiz Muñiz
(Organizadora)



ESTUDOS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SUAS TECNOLOGIAS

VOL II

 EDITORA
ARTEMIS
2026

Alda Rocío Ortiz Muñiz
(Organizadora)



ESTUDOS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SUAS TECNOLOGIAS

VOL II



**EDITORA
ARTEMIS**

2026



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.**

Editora Chefe	Prof. ^a Dr. ^a Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Executiva	M. ^a Viviane Carvalho Mocellin
Direção de Arte	M. ^a Bruna Bejarano
Diagramação	Elisangela Abreu
Organizadora	Prof. ^a Dr. ^a Alda Rocío Ortiz Muñiz
Imagem da Capa	mikkiorso/123RF
Bibliotecário	Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

Conselho Editorial

Prof.^a Dr.^a 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.^a Dr.^a Alda Rocío Ortiz Muñiz, Universidad Autónoma Metropolitana, México
Prof.^a Dr.^a Amanda Ramalho de Freitas Brito, Universidade Federal da Paraíba, Brasil
Prof.^a Dr.^a Ana Clara Monteverde, Universidad de Buenos Aires, Argentina
Prof.^a Dr.^a Ana Júlia Viamonte, Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP), Portugal
Prof. Dr. Ángel Mujica Sánchez, Universidad Nacional del Altiplano, Peru
Prof.^a Dr.^a Angela Ester Mallmann Centenaro, Universidade do Estado de Mato Grosso, Brasil
Prof.^a Dr.^a Begoña Blandón González, Universidad de Sevilla, Espanha
Prof.^a Dr.^a Carmen Pimentel, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil
Prof.^a Dr.^a Catarina Castro, Universidade Nova de Lisboa, Portugal
Prof.^a Dr.^a Cirila Cervera Delgado, Universidad de Guanajuato, México
Prof.^a Dr.^a Cláudia Neves, Universidade Aberta de Portugal
Prof.^a Dr.^a Cláudia Padovesi Fonseca, Universidade de Brasília-DF, Brasil
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil
Dr. Cristo Ernesto Yáñez León – New Jersey Institute of Technology, Newark, NJ, Estados Unidos
Prof. Dr. David García-Martul, Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, Espanha



Prof.^a Dr.^a Deuzimar Costa Serra, Universidade Estadual do Maranhão, Brasil

Prof.^a Dr.^a Dina Maria Martins Ferreira, Universidade Estadual do Ceará, Brasil

Prof.^a Dr.^a Edith Luévano-Hipólito, Universidad Autónoma de Nuevo León, México

Prof.^a Dr.^a 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.^a Dr.^a Elvira Laura Hernández Carballido, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México

Prof.^a Dr.^a Emilas Darlene Carmen Lebus, Universidad Nacional del Nordeste, 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.^a Dr.^a Galina Gumovskaya – Higher School of Economics, Moscow, Russia

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 Godínez, Universidad Autónoma de Baja California, México

Prof. Dr. Juan Carlos Cancino Díaz, 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-Yáñez, 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 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 M^aGraça 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. Sergio 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 Ciências Biológicas e suas Tecnologias II [livro eletrônico] / Organizadora Alda Rocío Ortiz Muñiz. – 1. ed. – Curitiba, PR: Editora Artemis, 2026.
il. color.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Edição bilíngue.

Inclui bibliografia.

ISBN 978-65-82858-33-8

DOI 10.37572/EdArt_280926338

1. Ciências biológicas. 2. Biotecnologia. 3. Microbiologia. I. Ortiz Muñiz, Alda Rocío.

CDD 570

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422



PRÓLOGO

Las ciencias biológicas se caracterizan por una amplia diversidad de áreas de estudio que abarcan desde las moléculas, las células y los microorganismos hasta los procesos ecológicos y evolutivos. Esta diversidad permite abordar la complejidad de los sistemas vivos desde distintas escalas de análisis y establecer vínculos entre la investigación básica, el desarrollo biotecnológico, la salud, el ambiente y la reflexión sobre el conocimiento científico.

El segundo tomo de *Estudos em Ciências Biológicas e suas Tecnologias* reúne once capítulos que reflejan esta pluralidad de enfoques y perspectivas. Los trabajos presentan investigaciones experimentales y análisis conceptuales que exploran procesos biológicos, metodologías de estudio y aplicaciones tecnológicas en ámbitos como la biotecnología, los biomateriales, los productos naturales, la microbiología, el control biológico, la biorremediación y la evolución. En conjunto, las contribuciones muestran la diversidad de problemas y aproximaciones que caracterizan la investigación y la reflexión en las ciencias biológicas.

La obra se organiza en tres ejes temáticos que permiten articular los distintos campos de estudio y destacar las principales aportaciones de los capítulos.

El primer eje, **Biotecnología, biomateriales y aplicaciones de recursos naturales**, reúne investigaciones orientadas a la caracterización de recursos naturales, el desarrollo de materiales y la evaluación de sus propiedades biológicas. Los capítulos abordan la optimización de métodos de extracción de proteínas vegetales, la síntesis biogénica de nanopartículas de óxido de zinc mediante el uso de aceite de oliva, la evaluación citogenética de un extracto acuoso de *Taxodium mucronatum*, la elaboración de membranas de quitosano y alcohol polivinílico para el mantenimiento de células troncales mesenquimales y el estudio de la actividad antimicrobiana de aceites ozonizados. En conjunto, estos trabajos muestran distintas estrategias experimentales para el aprovechamiento de recursos naturales y el desarrollo de materiales y productos de interés biotecnológico y biomédico.

El segundo eje, **Microorganismos y estrategias de control biológico y remediación ambiental**, integra estudios sobre microorganismos, comunidades microbianas y materiales naturales en contextos agrícolas y ambientales. Las contribuciones incluyen la caracterización de una cepa bacteriana con capacidad para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos, el análisis de poblaciones fúngicas y concentraciones de metales en aguas y suelos agrícolas, la evaluación de biomasas naturales para la remoción de cromo hexavalente y el estudio de la capacidad de

Trichoderma asperellum para remover un colorante sintético en solución acuosa. Estos trabajos exploran el potencial de los sistemas biológicos y de los recursos naturales en el control de organismos fitopatógenos y en el desarrollo de alternativas para la remoción de contaminantes.

El tercer eje, **Evolución biológica, origen del ser humano y conocimiento científico**, reúne dos capítulos que abordan cuestiones fundamentales sobre la evolución biológica, el origen del ser humano y la naturaleza del conocimiento científico. Uno de ellos examina la controversia entre evolución y creacionismo, así como los criterios epistemológicos que permiten distinguir las explicaciones científicas de otros tipos de planteamientos. El segundo aborda la cuestión de la existencia del primer ser humano. En conjunto, ambos trabajos incorporan una perspectiva reflexiva sobre la evolución, la interpretación de la evidencia y la construcción del conocimiento en las ciencias biológicas.

La integración de estos tres ejes permite reconocer las ciencias biológicas como un campo dinámico y diverso, en el que la investigación experimental, la innovación tecnológica, el estudio de los problemas ambientales y la reflexión sobre el conocimiento científico ofrecen distintas perspectivas para comprender los sistemas vivos. Los trabajos reunidos en esta obra muestran la amplitud de los temas que conforman este campo de conocimiento y la variedad de enfoques mediante los cuales se exploran sus preguntas y desafíos.

Esperamos que este volumen contribuya a la difusión del conocimiento científico, al intercambio académico entre investigadores y al fortalecimiento de nuevas perspectivas de estudio en las ciencias biológicas y sus tecnologías.

Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa, México

SUMÁRIO

BIOTECNOLOGÍA, BIOMATERIALES Y APLICACIONES DE RECURSOS NATURALES

CAPÍTULO 1..... 1

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA PARA HOJAS Y RAÍCES DE *Tecoma stans*

Eduardo Anaya Esteban

Mario Valera Zaragoza

Ariana Arlene Huerta Heredia

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2809263381

CAPÍTULO 2..... 12

SÍNTESIS BIOGÉNICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC CON ACEITE DE OLIVA

Mario Valera-Zaragoza

Arely García-Gómez

Ariana Arlene Huerta-Heredia

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2809263382

CAPÍTULO 3..... 21

EVALUACIÓN CITOGENÉTICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Taxodium mucronatum* EN VICIA FABA MEDIANTE MICRONÚCLEOS

Saúl Flores-Maya

Ana Belén Palacios Loaeza

Martha Martínez-García

Erick Nolasco Ontiveros

Norberto Alarcón-Herrera

Paulina Abrica-González

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2809263383

CAPÍTULO 4..... 38

MEMBRANAS A BASE QUITOSANO-ALCOHOL POLIVINÍLICO CON DIVERSAS TOPOGRAFÍAS PARA EL MANTENIMIENTO DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

David Alejandro Macías Martín

Francisco Josué Avelar Rodríguez

Zaira Yunuen Carvajal García

Flor Yohana Flores Hernández

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2809263384

CAPÍTULO 5..... 50

USO DE ACEITES OZONIZADOS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS

Gloria Paulina Monterrubio-López

Ricardo Monterrubio-López

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2809263385

MICROORGANISMOS Y ESTRATEGIAS DE CONTROL BIOLÓGICO Y REMEDIACIÓN AMBIENTAL

CAPÍTULO 6..... 59

***Kosakonia cowanii* Ch1 ISOLATED FROM MEXICAN CHILI POWDER REVEALS GROWTH INHIBITION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI**

Jacqueline González Espinosa

Yoali Fernanda Hernández Gómez

Yomaiko Javier Martínez

Francisco Javier Flores Gallardo

Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Miguel Ángel Ramos López

Jackeline Lizzeta Arvizu Gómez

Carlos Saldaña Gutierrez

José Alberto Rodríguez Morales

María Carlota García Gutiérrez

Aldo Amaro Reyes

Erika Álvarez Hidalgo

Jorge Nuñez Ramírez

José Luis Hernández Flores

Juan Campos Guillén

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2809263386

CAPÍTULO 7.....82

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS Y SUELOS DE TIERRAS AGRÍCOLAS

Louisiana Ivonne Espinosa Pérez

Claudia Margarita Martínez Domínguez

Adriana Rodríguez Pérez
Juan Fernando Cárdenas González
Víctor Manuel Martínez Juárez
Ismael Acosta Rodríguez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2809263387

CAPÍTULO 8.....92

REMOCIÓN DE CROMO (VI) EN SOLUCIÓN ACUOSA POR DIFERENTES BIOMASAS NATURALES

Nancy C. Pacheco Castillo
Dalila del Socorro Contreras Briones
Adriana Rodríguez Pérez
Juan Fernando Cárdenas González
Víctor Manuel Martínez Juárez
Ismael Acosta Rodríguez

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2809263388

CAPÍTULO 9..... 101

REMOCIÓN DE ROJO BÁSICO 46 MEDIANTE *Trichoderma asperellum* EN SOLUCIÓN ACUOSA

Esteban Montiel Palacios
David Antonio Moreno Medina
Veronica Arellano Solis
Jose Luis Gadea Pacheco
Angie Nicole Rios López

 https://doi.org/10.37572/EdArt_2809263389

EVOLUCIÓN BIOLÓGICA, ORIGEN DEL SER HUMANO Y CONOCIMIENTO CIENTÍFICO

CAPÍTULO 10..... 109

¿EVOLUCIÓN O CREACIÓN? DARWIN, CREACIONISMO Y LOS LÍMITES DE LA CONTROVERSI CIENTÍFICA

Humberto Álvarez Sepúlveda

 https://doi.org/10.37572/EdArt_28092633810

CAPÍTULO 11..... 121

¿EXISTIÓ EL PRIMER SER HUMANO? EL PROBLEMA DE BUSCAR UN «ADÁN BIOLÓGICO»

Humberto Álvarez Sepúlveda

 https://doi.org/10.37572/EdArt_28092633811

SOBRE A ORGANIZADORA.....133

ÍNDICE REMISSIVO134

CAPÍTULO 1

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA PARA HOJAS Y RAÍCES DE *Tecoma stans*¹

Data de submissão: 20/08/2026

Data de aceite: 06/09/2026

Eduardo Anaya Esteban

Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

División de Estudios de Posgrado

Doctorado en Biotecnología

Tuxtepec-Oaxaca, México

<https://orcid.org/0009-0005-0456-7180>

Mario Valera Zaragoza

Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

Centro de Investigaciones Científicas

Instituto de Química

Tuxtepec-Oaxaca, México

<https://orcid.org/0000-0003-4341-5997>

Ariana Arlene Huerta Heredia

Universidad del Papaloapan

Campus Tuxtepec

Centro de Investigaciones Científicas

Instituto de Biotecnología

Tuxtepec-Oaxaca, México

<https://orcid.org/0000-0003-4182-1529>

RESUMEN: *Tecoma stans* es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diversas enfermedades, principalmente

la diabetes. Se ha comprobado que posee actividades terapéuticas como antiinflamatoria, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, hepatoprotectora y actúa en la cicatrización de heridas. En el presente trabajo se evaluaron cuatro metodologías diferentes de extracción de proteína utilizando plantas de *T. stans*, con la finalidad de establecer un único protocolo para estudios proteómicos de hoja y raíz. Para la extracción de proteína se usó una muestra con 0.25 g de hoja y otra con 0.5 g de raíz. Los extractos fueron cuantificados mediante la técnica de Bradford, posteriormente se evaluó la cantidad de proteína soluble que se obtuvo de cada protocolo, así como para cada tipo de órgano. Las muestras de proteína de cada protocolo se cargaron a una electroforesis SDS-PAGE al 9 y al 12%, con el fin de observar el número de bandas, resolución y nitidez de las muestras proteicas. El análisis de varianza del número de bandas obtenidas sugiere que tanto el tipo de órgano, el método de extracción y su interacción tienen efectos significativos en cada experimento. Con base a las interacciones de las medias obtenidas en la prueba Tukey con 95% de confianza. El mejor efecto se obtuvo al utilizar TCA/acetona para extraer proteína a partir de raíces (22±1 bandas). Por lo tanto, en este trabajo estableció la metodología de extracción óptima, obteniendo resultados satisfactorios que pueden permitir estudios proteómicos desde tejidos de *T. stans*.

PALABRAS CLAVE: extracción de proteína de plantas; TRI-Reagent; TCA/Acetona; ammonium sulfate precipitation.

¹ No existen conflictos de interés.

EVALUATION OF PROTEIN EXTRACTION METHODS FROM LEAVES AND ROOTS OF *TECOMA STANS*

ABSTRACT: *Tecoma stans* is a plant widely used in traditional Mexican medicine for the treatment of various diseases, mainly diabetes. It has been proven to possess therapeutic activities such as anti-inflammatory, anticancer, antibacterial, antifungal, antioxidant, hepatoprotective, and it aids in wound healing. In the present work, four different methodologies for total protein extraction using *T. stans* plants were evaluated, with the aim of establishing a single protocol for proteomic studies from leaf and root tissue. For protein extraction, 0.25 g of leaf and 0.5 g of root were used. The extracts were quantified using the Bradford technique, and subsequently, the amount of soluble protein obtained from each protocol was evaluated, as well as for each type of organ. The protein samples from each protocol were loaded onto a 9 and 12% SDS-PAGE gel to observe the number of bands, resolution, and clarity of the protein samples. The analysis of variance of the number of bands obtained suggests that both the type of organ, the extraction method, and their interaction have significant effects in each experiment. Based on the interactions of the means obtained in the Tukey test with 95% confidence. The best effect was obtained by using TCA/acetone to extract protein from roots (22 ± 1 bands). Therefore, in this work, the optimal extraction methodology was established, obtaining satisfactory results that may allow proteomic studies from *T. stans* tissues.

KEYWORDS: plant protein extraction; TRI-Reagent; TCA/acetone; SDS-PAGE.

1. INTRODUCCIÓN

T. stans es una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diversos padecimientos y principalmente es usada para tratar la diabetes, además existen estudios que validan su actividad hipoglucemiante (Ibarra *et al.*, 2009, Irigoten-Rascon and Paredes, 2015; Ramírez-Ortiz *et al.*, 2016 y Torres, 2019). Esta planta posee otros beneficios terapéuticos, como su actividad cicatrizante, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, hepatoprotectora, anticancerígena entre otras (Anand & Basavaraju, 2020). Hasta el día de hoy, se han aislado 120 compuestos químicos en esta especie, tales como alcaloides monoterpénicos, ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, terpenoides, glucósidos, fitoesteroles, aceites volátiles y ácidos grasos insaturados (Taha, 1954; Sbihi *et al.*, 2015; Taher *et al.*, 2016; Alade *et al.*, 2019; Mohammed *et al.*, 2019).

A estos componentes se les conoce como metabolitos secundarios (MS), los cuales son compuestos que participan favoreciendo la interacción de la planta con su ambiente y otros organismos, también, participan como mediadores contra la infección, la depredación, el agobio ambiental y la competencia con otras especies, las protegen del consumo por parte de los herbívoros, atraen a los polinizadores y además de estar

involucrados en la dispersión y protección de frutos y semillas (Alcantar-Aguirre, 2005; Rivera-Núñez y Obón de Castro, 2007).

Los MS son el resultado de una biosíntesis constitutiva, específica y localizada, ya sea en algún tipo órgano, tejido o bien en toda la planta. Estos pueden almacenarse en órganos o tejidos ajenos a su origen, y estos productos pueden o no distribuirse de manera uniforme en la planta (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Alcantar-Aguirre, 2015). Una parte importante en la biosíntesis de los MS son las proteínas o enzimas involucradas, pues están específicamente relacionadas con la producción o acumulación de éstos. Por lo que, para poder conocer las proteínas involucradas en la biosíntesis de los MS, es prioritario seleccionar el material vegetal rico en MS de interés, y acto seguido, extraer las proteínas del tejido u órgano (Martínez-Esteso *et al.*, 2015).

La extracción de proteínas es un paso crucial para futuros estudios de análisis proteómicos, hablamos de un proceso mediante el cual se recuperan las proteínas intracelulares, ya sea por métodos mecánicos o químicos, priorizando el menor daño posible a éstas (Ahmed, 2005). La elección del método de ruptura depende de la localización de la proteína y las características mecánicas del tejido o células de donde se pretende aislar (Ramírez, 2016). Además, los tejidos vegetales presentan niveles relativamente bajos de proteína, y la extracción se puede ver afectada por la presencia de proteasas, interferentes como polisacáridos, pigmentos, ácidos nucleicos, lípidos y compuestos fenólicos (Faurobert *et al.*, 2007; Méchin *et al.*, 2007). Actualmente, ninguna metodología de extracción de proteínas logra capturar el proteoma completo de una planta, por lo que es necesario optimizar o bien buscar el protocolo que favorezca la mejor extracción posible. Existen metodologías de extracción para plantas modelo, sin embargo, para plantas con un alto contenido de MS, se deben aplicar metodologías robustas y reproducibles para futuros análisis proteómicos (Pavoković, Križnik & Krsnik-Rasol, 2012).

Sabiendo que *T. stans* es una planta que tiene un uso potencial en la medicina tradicional, y se conocen sus fitoconstituyentes y efectos terapéuticos. En este trabajo se realizaron diferentes metodologías de extracción de proteína total utilizando una planta de *T. stans*, con la finalidad de establecer un protocolo de extracción para estudios proteómicos de hoja y raíz de esta planta medicinal.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron hojas y raíces frescas del árbol de *T. stans* (San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca; 18°04'53.3"N 96°10'32.2"W) y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Para cada uno de los diferentes métodos utilizados en los experimentos de extracción de proteína total soluble se utilizaron 0.25g de muestra de hoja y 0.5g de muestra de raíz, además la extracción se realizó por triplicado.

2.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL MEDIANTE EL MÉTODO DE TCA/ACETONA

Se siguió el protocolo descrito por Niu *et al.*, (2018), el pellet obtenido al final se le agregó buffer de rehidratación (Biorad, 1632106), se mezcló y se realizó una centrifugación a 12,000 rpm a 4°C durante 2 min para recuperar la proteína soluble, el sobrenadante se guardó a -20 °C.

2.2. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL MEDIANTE EL MÉTODO DE SULFATO DE AMONIO

El método se realizó de acuerdo con el protocolo de Ferrer *et al.*, (2005) y Bahadur *et al.*, (2023) para lo cual las muestras de *T. stans* se maceraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, posteriormente se agregó 1 mL de solución de extracción, compuesta de 0.1 M de solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.5, 1 mM de KCl, 2 mM de EDTA y 1.5% de polivinilpolipirrolidona (PVPP). La muestra se dejó en extracción durante 2 horas a 4 °C y una vez pasado este tiempo se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min a 4 °C. El extracto acuoso obtenido se precipitó toda la noche a 4 °C con sulfato de amonio al 70%. Pasado este tiempo se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C y el pellet se resuspendió en buffer de rehidratación (Biorad, 1632106). Se realizó una última centrifugación a 12,000 rpm a 4°C durante 2min para recuperar solamente la proteína soluble y finalmente fue guardada a -20°C.

2.3. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL MEDIANTE EL MÉTODO TRI-REAGENT

Para este protocolo, se siguió las indicaciones del proveedor. Las muestras de *T. stans* se pulverizaron en nitrógeno líquido, posteriormente se adicionó 1 mL de solución TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, 93289). El pellet obtenido al final del protocolo se resuspendió en buffer de rehidratación (Biorad, 1632106).

2.4. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA TOTAL MEDIANTE EL KIT SIGMA ALDRICH (PE0230)

Se siguió el protocolo de extracción descrito en el Kit de extracción de proteína total de Sigma Aldrich (Sigma-Aldrich, PE0239).

2.5. ELECTROFORESIS SDS-PAGE Y TINCIÓN DE GELES

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 9 y 12%, con el fin de observar el número de bandas, resolución y nitidez de las muestras proteicas. Las condiciones de electroforesis fueron tampón Tris-Glicina-SDS, 20 min a 70 v y 100 v durante 90 min. La tinción se realizó con azul de Coomassie.

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de varianza de dos factores (ANOVA de dos vías) a los valores de concentración de proteína recuperada y las bandas obtenidas por cada tipo de órgano y método utilizado. La prueba Tukey con 95% de confianza fue aplicada al número de bandas obtenidas, con el fin de evaluar el mayor efecto en la extracción de proteínas, es decir, el tipo de método (4 diferentes), el tipo de órgano (raíz y hoja) o bien la interacción de ambos. Se utilizo el software Minitab 18 (prueba gratis).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta investigación se evaluaron 4 diferentes protocolos, descritos en la metodología. En la Tabla 1, se muestran los resultados de la cuantificación de proteína total soluble de los diferentes precipitados proteicos. Según los datos, el protocolo de extracción para hoja que proporcionó una mayor concentración de proteína fue el método de sulfato de amonio seguido de la metodología de TRI-Reagent, TCA/acetona y Kit de Sigma Aldrich (650±62, 481±11, 167±17, 77±12µg de proteína/g de biomasa respectivamente). En el caso de raíz, el mejor método es TCA/acetona (286±31 µg de proteína/g de biomasa). El análisis de varianza mostró diferencias significativas (valor de P<0.05) sobre los valores de concentración obtenidos por cada método y tipo de órgano.

Tabla 1. Cuantificación de proteína total soluble por el método de Bradford.

Método	Concentración (µg/µL)		Proteína total (µg)		µg de proteína/g de biomasa	
	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz
TCA/Acetona	4±1	27±3	19±3	143±16	77±12	286±31
Sulfato de amonio	32±3	9±8	162±15	46±40	650±62	91±81
Kit-SIGMA	4±0.4	1±0.2	42±4	14±0.1	167±17	29±0.2
TRI-Reagent	12±0.3	3±1	120±3	28±9	481±11	57±17

Por otra parte, la electroforesis SDS-PAGE permitió observar con mayor claridad si el extracto proteico contenía proteínas o no, la posible presencia compuestos interferentes o la degradación de la muestra. Una virtud más de estos geles es su versatilidad de modificar el tamaño del poro, solo variando la concentración del polímero (Álvarez-Contreras, 2011). En este contexto, el contenido de proteína se verificó en geles SDS-PAGE. En la Tabla 2, se presenta el condensado de bandas proteicas obtenidas de hoja y raíz de *T. stans* de cada una de las metodologías seleccionadas. El protocolo de extracción que proporcionó visibilidad a un mayor número de bandas fue el método de TCA/acetona para los extractos de raíz y hoja (22 ± 1 y 8 ± 1 bandas, respectivamente), seguido de la metodología de sulfato de amonio para el caso de raíz (9 ± 1 bandas), TRI-Reagent en el caso de hoja (5 ± 0 bandas) y finalmente el Kit Sigma (2 ± 0).

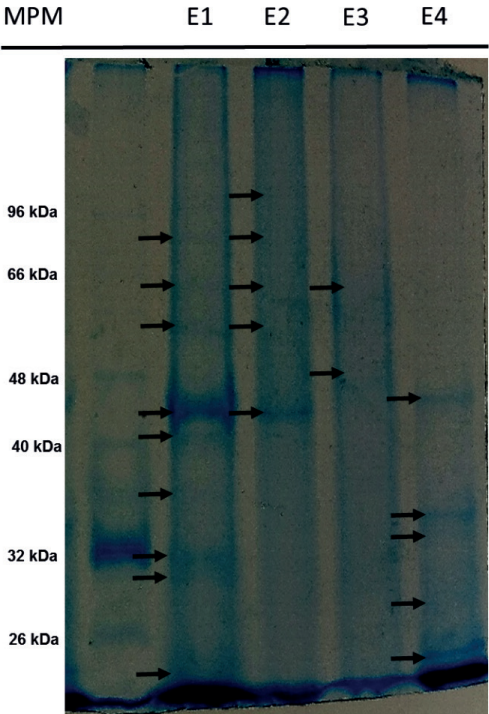
Tabla 2. Promedio de bandas obtenidas en el perfil electroforético de las diferentes metodologías de extracción/precipitación y órgano de la planta.

Métodos	Bandas observadas	
	Promedio de bandas	
	Hoja	Raíz
TCA/acetona	8 ± 1^b	22 ± 1^a
Sulfato de amonio	3 ± 2^c	9 ± 1^b
Kit Sigma	2 ± 0^c	1 ± 0^c
TRI-Reagent	5 ± 0^{bc}	4 ± 3^c

En columnas, letras distintas indicaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Se muestra media y desviación estándar.

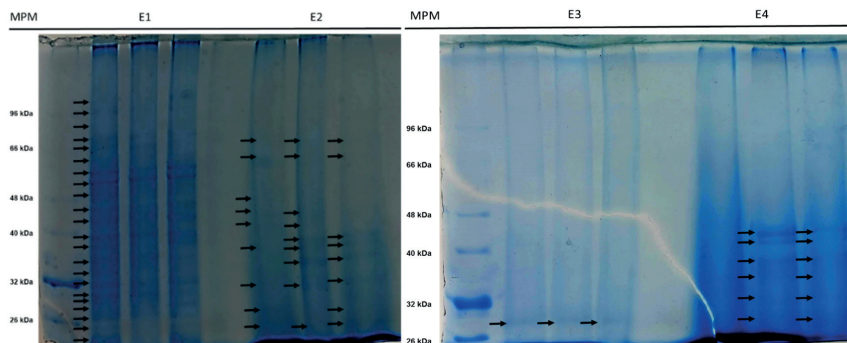
En la Fig. 1, se muestra el gel SDS-PAGE para los extractos de hoja. La mejor metodología fue TCA/acetona que dio como resultado 9 bandas definidas (20, 30, 32, 37,42, 44, 57, 64 y 85 kDa). En comparación con los demás métodos, bandas que se logran apreciar, en su mayoría no se encuentran muy bien definidas, por ejemplo; para la extracción con sulfato de amonio se aprecian 5 bandas de las cuales 4 concuerdan con las observadas en TCA/acetona, que se encuentran entre los 44, 57, 64 y 85 kDa.

Fig. 1. Gel SDS-PAGE al 9% con proteína total soluble extraída de hojas de *T. stans*. Muestra de proteína extraída utilizando el método de: E1) TCA/acetona. E2) Sulfato de amonio. E3) Kit Sigma Aldrich PE0230. E4) TRI-Reagent.



En la Fig. 2, se muestra el condensado del perfil electroforético de los extractos obtenidos a partir de raíz. Se observó un número de bandas mayor que en hoja respecto algunos métodos en particular, y un bandeo mucho más definido. El perfil electroforético de los extractos mediante TCA/acetona evidencia al menos 22 bandas que van desde los 20 a 100 kDa aproximadamente, presentes en el triplicado del experimento. En las muestras recuperadas a partir de la extracción con sulfato de amonio, se logró observar un bandeo definido, en el que se pueden apreciar 11 diferentes bandas, de las cuales 5 están presentes en todas las muestras (23, 32, 38, 63 y 86 kDa). Para las metodologías de TRI-Reagent y el Kit Sigma PE0230, el bandeo fue menor y los condensados de proteínas fueron definidos por debajo de 48 kDa. Para el Kit Sigma PE0230, se logró observar una sola banda (29 kDa). Para la metodología TRI-Reagent se aprecian al menos 6 bandas (entre 45 y 29 kDa).

Fig. 2. Gel SDS-PAGE al 9% con proteína total soluble extraída de raíz de *T. stans*. E1) TCA/acetona. E2) Sulfato de amonio. E3) Kit Sigma Aldrich PE0230. E4) TRI Reagent.

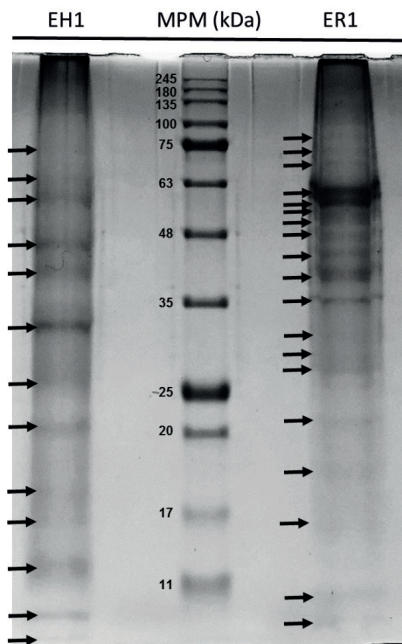


Según Wang *et al.*, (2016) y Niu *et al.*, (2018), el uso de la metodología de TCA/acetona para extracción de proteínas en plantas ha mostrado resultados favorables al tener perfiles proteicos con buena resolución y definición de bandas, lo que concuerda con los resultados de este trabajo.

De manera particular, en la metodología de sulfato de amonio, las investigaciones sugieren que este método necesita de un paso de purificación para eliminar completamente las sales de sulfato restantes, como la cromatografía en columna o algunos métodos de ultrafiltración (Básaca-Loya *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2020), sin embargo, en este trabajo no se incluyó dicho paso.

Para comparar la similitud o diferencia de bandeo entre los dos órganos de estudio (ver Fig. 3), se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 12%, usando el método de extracción TCA/Acetona por ser aquel donde se obtuvieron los mejores resultados. El perfil electroforético indicó una notable diferencia en el número de bandas, para las muestras de hoja se observaron al menos 13 bandas definidas y separadas unas de otras. Mientras que, las muestras de raíz revelaron la presencia de 19 bandas definidas. En el caso de las proteínas de hoja se observaron 5 bandas más por debajo de 20 kDa, las cuales no se habían visualizado en el gel elaborado al 9%. De igual manera, en el caso de la muestra de raíz se detectaron 4 bandas proteicas más. Tomando en cuenta la relación entre las bandas observadas en el caso las muestras de raíz, las 22 bandas detectadas al 9% corresponden a 14 bandas en el gel elaborado al 12%. El bandeo observado en todos los geles son resultado de la tinción con azul de Coomassie, el cual tiene una sensibilidad de 0.1 a 0.5 µg de proteína (Brunelle & Green, 2014). De tal modo que, tanto en las muestras de raíz como de hoja pudieran ser detectadas un mayor número de bandas proteicas si se utilizara otro método de tinción más sensible.

Fig. 3. Gel SDS-PAGE al 12% con proteína total soluble extraída de raíz y hoja de *T. stans*. EH1) Extracción con TCA/acetona en hoja. ER1) Extracción con TCA/acetona en raíz.



Para cada tipo órgano a estudiar es necesario verificar la extracción de proteína con diferentes métodos para poder asegurar la mejor extracción de proteína total soluble. Al realizar la prueba Tukey con 95% de confianza, los valores de la media indican que los mejores efectos respecto al método, órgano y la interacción de ambos son; el mejor método es el de TCA/acetona, seguido del tipo órgano el cual es la raíz y, por último, el mejor efecto se puede obtener al utilizar el método de TCA/acetona para extraer proteína a partir de raíces de *T. stans*.

4. CONCLUSIONES

Se logró cuantificar proteína en cada uno de los cuatro diferentes métodos evaluados, tanto en hoja con raíz de la planta y los mejores resultados se obtuvieron en los métodos de TCA/acetona y TRI-Reagent. Los valores de concentración, cantidad de proteína y la relación proteína/biomasa obtenida estuvieron correlacionados con el perfil electroforético (número de bandas) de 3 métodos utilizados (TCA/acetona, TRI-Reagent y el Kit Sigma).

Los resultados obtenidos en los perfiles electroforéticos de geles SDS-PAGE de cada tipo de órgano y método de extracción muestran una diversidad, integridad, concentración y abundancia considerable de proteínas, ya que se lograron obtener bandas

con buena definición y nitidez. Con base al análisis estadístico, se concluye que todos los experimentos tienen un efecto significativo, pero el mejor efecto se puede obtener al utilizar el método de TCA/acetona para extraer proteína a partir de raíces de *T. stans*.

BIBLIOGRAFÍA

Alade, A., Ekundayo, I., Aboaba, S., & Flamini, G. (2019). Chemical characterization of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth volatile oils. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*; 7(3), 11-16.

Alcantar-Aguirre, F. C. (2015). Identificación y cuantificación de metabolitos secundarios en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con sistemina y prosistemina de jitomate en respuesta a daño mecánico, herbivoría con *Manduca sexta* e infestación con mosquita blanca. (*Bemisia tabaci*). *Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Irapuato, Guanajuato.*, 149.

Álvarez-Contreras, I. d. (2011). Purificación y caracterización bioquímica de la aminopeptidasa (tcAPE) de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L). En *Tesis de Maestría en Ciencias. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco.*

Anand, M., & Basavaraju, R. (2021). A review on phytochemistry and pharmacological uses of *Tecoma stans* (L.). *Journal of Ethnopharmacology*, 113270.

Bahadur Khadka, D., Pahadi, T., Aryal, S., & Bahadur Karki, D. (2024). Partial purification and characterization of protease extracted from kinema. *Heliyon*, 10(5), e27173. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e27173

Básaca-Loya, G. A., Valdez, M. A., Enríquez-Guevara, E. A., Gutiérrez-Millán, L. E., & Burboa, M. G. (2009). Extracción y purificación de B-ficoeritrina de la microalga roja *Rhodospirillum rubrum*. *Ciencias Marinas*, 35(4), 359-368.

Chen, X., Diao, W., Ma, Y., & Mao, Z. (2020). Extraction and purification of ϵ -poly-L-lysine from fermentation broth using an ethanol/ammonium sulfate aqueous two-phase system combined with ultrafiltration. *RSC advances*, 10(49), 29587-29593.

Ferrer, Á., Carnés, J., Gallego, M. T., Andréu, C., & Fernández, E. (2005). Characterization and improvement of apple extracts for the diagnosis of apple IgE-mediated allergy. *American College of Allergy, Asthma & Immunology*, 95(5), p462-467. doi:10.1016/S1081-1206(10)61172-6

Ibarra, M., Cantú, P. C., Verde, M. V., & Oranday, A. (2009). Caracterización Fitoquímica y Efecto Hipoglucemiante de *Tecoma stans* y su Relación con la Presencia del Cromo como Factor de Tolerancia a la Glucosa. 20(5), 55-65.

Irigoyen-Rascon, F., & Paredes, A. (2015). Raramuri healers, chapter 8. Tarahumara Medicine: Ethnobotany and Healing Among the Raramuri of Mexico. *University of Oklahoma Press, Norman, Publishing Division of the University, Mexico.* doi:978-0-0861-5270-7

Martínez-Esteso, M. J., Martínez-Márquez, A., Sellés-Marchart, S., Morante-Carriel, J. A., & Bru-Martínez, R. (2015). The role of in proteomics progressing insights into plant secondary metabolism. *Front. Plant Sci.*, 6:504.

Méchin, V., Damerval, C., & Zivy, M. (2007). Total Protein Extraction with TCA-Acetone. En H. Thiellement, M. Zivy, & C. Damerval, *Plant Proteomics: Methods and Protocols* (págs. 1-8). Totowa, New Jersey: Primera edición. Humana Press. USA. 2007.

Mohammed, H. A., Abdel-Aziz, M. M., & Hegazy, M. M. (2019). Anti-Oral Pathogens of *Tecoma stans* (L.) and *Cassia javanica* (L.) Flower Volatile Oils in Comparison with Chlorhexidine in Accordance with Their Folk Medicinal Uses. *Medicina*, 55(6), 301.

Niu, L., Zhang, H., Wu, Z., Wang, Y., Liu, H., Wu, X., & Wang, W. (2018). Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. *PLoS ONE* 13(12), 13.

Pavoković, D., Križnik, B., & Krsnik-Rasol, M. (2012). Evaluation of Protein Extraction Methods for Proteomic Analysis of Non-Model Recalcitrant Plant Tissues. *Croat. Chem. Acta* 85 (2) (2012), 177–183.

Ramírez, G., Zamilpa, A., Zavala, M., Perez, J., Morales, D., & Tortoriello, J. (2016). Chrysoeriol and other polyphenols from *Tecoma stans* with lipase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 185, 1-8.

Ramírez-Ortiz, M. E., Rodríguez-Carmona, O. Y., Hernández-Rodríguez, O. S., Chel-Guerrero, L., & Aguilar-Méndez, M. Á. (2017). Estudio de la actividad hipoglucemiante y antioxidante de tronadora, raíz de wereque y raíz de nopal. *Alimentos Funcionales de Hoy. Barcelona, España: OmniaScience*, 143-180. doi:10.3926/oms.361

Rivera-Núñez, D., & Obón de Castro, C. (2007). Manual de teoría y prácticas de etnobotánica. *Capítulo 8. Editores Murcia. España.*, 55-66.

Sbihi, H. M., Mokbli, S., Nehdi, I. A., & Al-Resayes, S. I. (2015). Physico-chemical properties of *Tecoma stans* Linn. seed oil: a new crop for vegetable oil. *Natural Product Research*, 29(13), 1249-1255.

Sepúlveda Jiménez, G., Porta Ducoing, H., & Rocha Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 21, núm. 3, 355-363.

Taha, M. M. (1954). The carotenoids of the petals of two species of *Tecoma*. *Biochem. J.*, 58 (3), 413–415.

Taher, M. A.-H., Dawood, D. H., Sanad, M. I., & Hassan, R. A. (2016). Searching for anti-hyperglycemic phytomolecules of *Tecoma stans*. *European Journal of Chemistry*, 7(14), 397-404. doi:10.5155/eurjchem.7.4.397-404.1478

Torres Xocua, L. M. (2019). Actividad hipoglucemiante de extractos y fracciones de plantas silvestre e in vitro de *Tecoma stans*. (Tesis de Maestría, Universidad del Papaloapan).

Wang, N., Wu, X., Ku, L., Chen, Y., & Wang, W. (2016). Evaluation of Three Protein-Extraction Methods for Proteome Analysis of Maize Leaf Midrib, a Compound Tissue Rich in Sclerenchyma Cells. *Frontiers in Plant Science*, 7(856). doi:10.3389/fpls.2016.00856

CAPÍTULO 2

SÍNTESIS BIOGÉNICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC CON ACEITE DE OLIVA

Data de submissão: 24/08/2026

Data de aceite: 10/09/2026

Mario Valera-Zaragoza

Universidad del Papaloapan
Centro de Investigaciones Científicas
Instituto de Química Aplicada
Oaxaca – México
<https://orcid.org/0000-0003-4341-5997>

Arely García-Gómez

Universidad del Papaloapan
Licenciatura en Ciencias Químicas
Oaxaca – México

Ariana Arlene Huerta-Heredia

Secretaría de Ciencia, Humanidades,
Tecnología e Innovación (SECIHTI)
Ciudad de México – México
Universidad del Papaloapan
Centro de Investigaciones Científicas
Instituto de Biotecnología
Oaxaca – México
<https://orcid.org/0000-0003-4182-1529>

RESUMEN: El óxido de zinc (ZnO) es un compuesto químico ampliamente utilizado en biomedicina por sus propiedades antimicrobianas. Estas propiedades pueden

incrementarse si el ZnO se encuentra en forma de partículas de tamaño nanométrico. Existen métodos químicos convencionales para sintetizar nanopartículas de ZnO. Sin embargo, desde algunos años, la síntesis biogénica de nanopartículas a través de compuestos naturales se ha consolidado como una alternativa más respetuosa con el medio ambiente. Por lo tanto, este trabajo presenta la obtención de nanopartículas de ZnO mediante síntesis biogénica, utilizando aceite de oliva como agente reductor y estabilizante. El objetivo es explorar una metodología sencilla y accesible para obtener nanopartículas de ZnO, aprovechando las propiedades reductoras de los metabolitos secundarios presentes en el aceite de oliva virgen extra. Para ello, se evaluó el comportamiento de la síntesis utilizando diferentes proporciones entre el precursor de zinc y el aceite de oliva. Durante el proceso de síntesis se observaron cambios de color, pasando de amarillo a tonalidades verdes. Mediante microscopia electrónica de barrido por emisión de campo (FE-SEM), se observó una morfología heterogénea que incluyó a las partículas con dimensiones inferiores a 100 nm. En general, los resultados respaldan la viabilidad de utilizar aceite de oliva para sintetizar nanopartículas de ZnO mediante un proceso sencillo y alineado con los principios de síntesis verde.

PALABRAS CLAVE: óxido de zinc; nanopartículas; aceite de oliva; síntesis biogénica; morfología.

ABSTRACT: Zinc oxide (ZnO) is a chemical compound widely used in biomedicine for its antimicrobial properties. These properties can be enhanced if ZnO is constituted as nanometric-sized particles. There are conventional chemical methods exist for synthesizing ZnO nanoparticles. However, for some years now, a more environmentally friendly alternative has been the biogenic synthesis of nanoparticles. Therefore, this work shows the preparation of ZnO nanoparticles by biogenic synthesis using extra virgin olive oil as a reducing and stabilizing agent. The objective was to explore a simple and accessible methodology for obtaining ZnO nanoparticles, taking advantage of the reducing qualities of the secondary metabolites contained in extra virgin olive oil. To this end, the synthesis behavior was evaluated using different ratios of zinc precursor to olive oil. During the synthesis, color changes were observed, shifting from yellow to different shades of green. Using field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), a heterogeneous morphology with particles of dimensions less than 100 nm were observed. Overall, the results support the feasibility of using extra virgin olive oil to synthesize ZnO nanoparticles through a simple process and aligned with green synthesis principles.

KEYWORDS: zinc oxide; nanoparticles; olive oil; biogenic synthesis; morphology.

1. INTRODUCCIÓN

El óxido de zinc (ZnO) es un compuesto altamente valorado por sus propiedades fisicoquímicas. En biomedicina, es ampliamente utilizado debido a su comportamiento antimicrobiano (Alyamani et al., 2021). El ZnO es un semiconductor con un valor de banda de energía prohibida (banda gap) de alrededor de 3.3 eV. Cuando se incide una cantidad de energía equivalente al valor de la banda gap ocurre un desplazamiento de electrones de la banda de valencia a la banda de conducción, generando la formación de pares electrón-hueco, los cuales al interactuar con el oxígeno del entorno producen especies reactivas de oxígeno (ROS; por sus siglas en inglés) (He et al., 2016). La generación de ROS puede causar estrés oxidativo a membranas celulares o componentes microbianos. Las propiedades antimicrobianas del ZnO pueden incrementarse si el compuesto está constituido por partículas con tamaño nanométrico. Además de ROS otros fenómenos, tales como la liberación de iones Zn^{+2} o a la interacción física de las nanopartículas de ZnO con la pared celular conducen a la deformación y ruptura de la membrana (Saliani et al., 2016). Las partículas con tamaño nanométrico presentan una alta relación área superficial-volumen, lo cual conduce a una mayor interacción con microorganismos, potencializando su actividad antimicrobiana.

Existen diversos métodos para sintetizar nanopartículas de ZnO, tales como ablación laser, sputtering y otros (enfoque “top-down”), procesos sol-gel, electrodeposición, síntesis química, etc (enfoque “bottom-up”) (Luque-Morales et al., 2021). Sin embargo, en

los últimos años se ha logrado sintetizar nanopartículas utilizando recursos de origen natural. Estos métodos entran dentro del enfoque “bottom-up” pero funcionan como una alternativa viable y “verde” frente a procedimientos convencionales que pueden requerir condiciones más complejas, costosas y que requieren disolventes orgánicos o sustancias químicas potencialmente perjudiciales al ser humano o al medio ambiente. En este contexto, existen diversos productos naturales, tales como proteínas, azúcares, aceites y extractos vegetales que contienen compuestos bioactivos capaces de participar en los procesos de reducción y estabilización para la formación de nanopartículas (El-saadony et al., 2024, Ramírez-Hernández et al., 2022).

Por lo tanto, el presente trabajo consiste en un estudio exploratorio de la síntesis de nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO) empleando una sal precursora de zinc y aceite de oliva virgen extra como recurso de origen natural. La metodología propuesta considera el empleo de condiciones controladas de agitación y temperatura, con el propósito de favorecer la formación y estabilidad de las nanopartículas obtenidas. El objetivo fue aprovechar los compuestos químicos naturales con capacidad reductora del aceite de oliva virgen extra, tales como los fenoles, para obtener a las nanopartículas de ZnO.

El aprovechamiento de los recursos naturales como métodos alternativos para la síntesis de ZnO permite explorar metodologías más accesibles y con un enfoque orientado hacia procesos de menor impacto ambiental (síntesis verde). Por ello, la obtención de nanopartículas de ZnO utilizando aceite de oliva virgen extra constituye una estrategia de interés para explorar nuevas posibilidades en la generación de materiales con propiedades antimicrobianas y potencial utilidad en aplicaciones relacionadas con la atención y recuperación de lesiones cutáneas (tratamiento de heridas y quemaduras) y cuidados posoperatorios.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIA PRIMA

Para la síntesis de las nanopartículas de ZnO se utilizó nitrato de zinc hexahidratado ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) como sal precursora y aceite de oliva virgen extra como agente reductor y estabilizante, agua destilada, disolventes hexano y diclorometano (Sigma Aldrich) para la preparación de muestras.

2.2. SÍNTESES DE LAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC

Para llevar a cabo la síntesis, primero se preparó una disolución acuosa de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 0.1 M. Posteriormente, diferentes cantidades de la disolución fueron mezcladas por separado y directamente con aceite de oliva virgen extra. Considerando un volumen total de 100 mL, se mezclaron contenidos de disolución de sal precursora y de aceite de oliva virgen extra tal como se indica en la Tabla 1. Los experimentos de síntesis fueron realizados bajo condiciones controladas de temperatura, agitación y tiempo de reacción. Cada reacción se llevó a cabo bajo agitación magnética constante, a una temperatura de 60 °C durante 3 h. El comportamiento físico de cada reacción, tal como el cambio de color, fue monitoreado visualmente. Una vez finalizadas las reacciones fueron almacenadas en refrigeración para su posterior caracterización.

Tabla 1. Datos de las reacciones realizadas.

Reacción	Sal precursora	Aceite de oliva
Blanco	0.5 mL de H_2O	50 mL
RxnA-5	50 mL	5 mL
RxnA-25	50 mL	25 mL
RxnAS-50	50 mL	50 mL
RxnS-5	5 mL	50 mL
RxnS-0.5	0.5 mL	50 mL

2.3. CARACTERIZACIONES

Con el propósito de evaluar el comportamiento de los productos de reacción, los productos de reacción fueron caracterizados mediante espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) y microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM).

Para el análisis por UV-Vis se utilizó hexano como disolvente de las muestras y de la referencia. Para la referencia, se preparó una disolución utilizando 100 μL de aceite de oliva en 3 mL de hexano. Cada muestra se colocó posteriormente en una celda de cuarzo y se realizó el barrido espectroscópico en un intervalo de 200 a 800 nm, empleando las fuentes de radiación correspondientes al intervalo de análisis. El estudio fue realizado en un espectrofotómetro ultravioleta-visible Lambda 25 de Perkin Elmer.

La caracterización morfológica se realizó en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM), modelo MIRA 3 de la marca Tescan. Previo al análisis, las muestras fueron encapsuladas en películas delgadas utilizando un polímero termoplástico (Elvax 40w®). Para ello, el polímero fue disuelto en diclorometano, en el cual se adicionaron los productos de reacción. Una vez que el disolvente fue evaporado

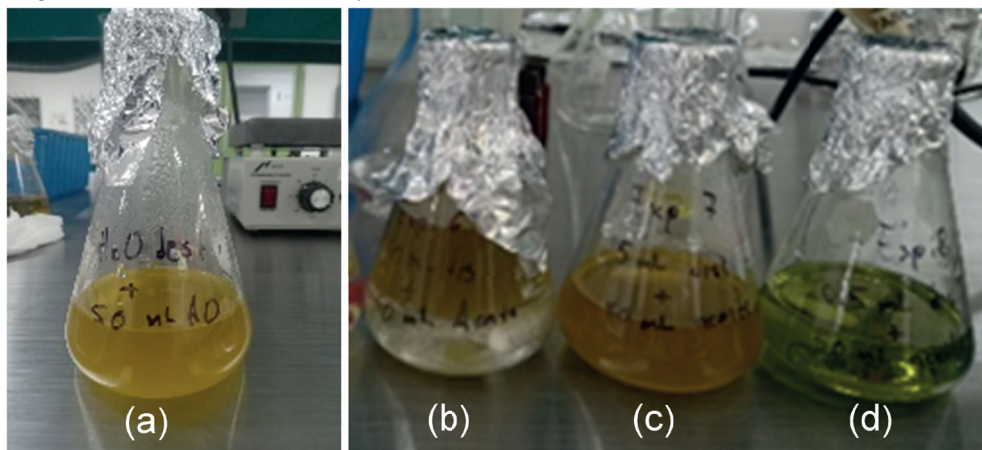
y se formaron las películas, estas fueron fracturadas usando nitrógeno líquido. Las zonas fracturadas fueron posteriormente cubiertas con una capa ultradelgada de oro, con la intención de volverlas conductoras y con ello, permitir el análisis mediante FE-SEM. El comportamiento morfológico de los productos de reacción fue determinado a 8 kV, con una distancia de trabajo de aproximadamente 9 mm y usando un detector de electrones secundarios.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. CAMBIOS FÍSICOS DURANTE LA SÍNTESIS

Como efecto de la reacción entre la sal precursora de zinc y el aceite de oliva se observaron cambios visibles en la coloración y consistencia de las mezclas. El aceite de oliva mezclado solo con agua destilada, utilizado como blanco o referencia, mostró una tonalidad amarilla, tal como se observa en la Figura 1(a), mientras que las reacciones a diferentes condiciones de reacción mostraron cambios en la tonalidad con una tendencia al color verde. Los cambios de tonalidad más evidentes se observaron en los experimentos con una mayor proporción de aceite de oliva, particularmente en las condiciones RxnAS-50, RxnS-5 y RxnS-05 mostradas en la Figura 1.

Figura 1. Cambios de coloración de los productos de reacción. (a) Blanco, (b) RxnS-50 (c) RxnS-5 (d) RxnS-05.

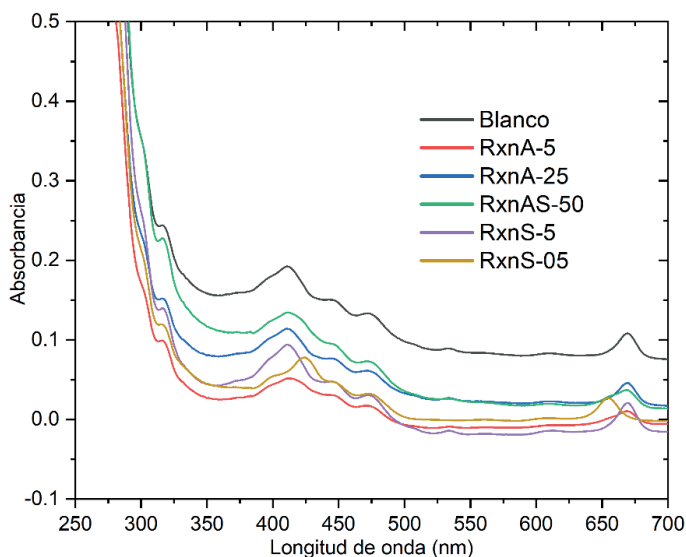


3.2. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

Los resultados de los productos de reacción obtenidos mediante espectroscopía UV-Vis mostraron solo ligeras variaciones en las señales de absorción en comparación con el blanco (aceite de oliva) (Figura 2). Sin embargo, con la muestra RxnS-05 el cambio

en las señales de absorción fue más evidente. Esta muestra consistió en bajo contenido de sal precursora y alto contenido de aceite de oliva. Como consecuencia, se esperaba un comportamiento similar a la muestra blanco o control. Contrariamente, el resultado fue diferente. Los picos de absorción alrededor de 400 y 675 nm, los cuales son representativos del aceite de oliva fueron desplazados. La primera señal fue desplazada a una mayor longitud de onda. Contrariamente, la segunda señal fue desplazada a una menor longitud. Debido a estos cambios de absorción en la zona de irradiación visible, el color del producto de reacción cambió, tal como se muestra en la Figura 1(d), de amarillo a verde. El efecto podría adjudicarse a desplazamientos electrónicos internos de los grupos químicos presentes en el aceite de oliva. El compuesto natural está constituido de diversos compuestos, entre ellos, fenoles cuya estructura consiste en grupos aromáticos, otros dobles enlaces conjugados y grupos carbonilos (Servili et al.; 2014). Como consecuencia, dependiendo de las condiciones de reacción y de los contenidos de sal precursora y los grupos fenoles, podrían existir interacciones químicas que se manifiestan a través de la absorción y emisión de luz visible (cambio de color) y con la formación de nanopartículas de óxido de zinc.

Figura 2. Espectros de absorción por UV-Vis de las reacciones.



3.3. COMPORTAMIENTO MORFOLÓGICO

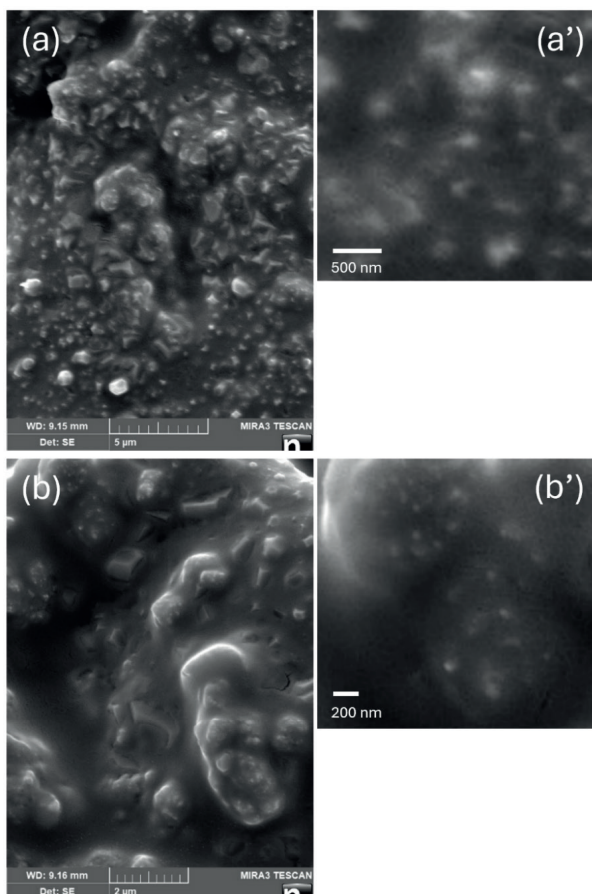
En la Figura 3 se muestra el resultado de la caracterización mediante microscopía electrónica de barrido con emisión de campo (FE-SEM) del producto de reacción denominado RxnA-25, correspondiente a 50 mL de la disolución de la sal precursora

y 25 mL de aceite de oliva. En las micrografías es posible observar conformaciones estructurales de diferente tamaño con una morfología heterogénea soportadas en el polímero usado como plantilla. Las imágenes aumentadas del lado derecho muestran partículas de dimensiones inferiores a 100 nm (ver Figuras a' y b').

La morfología heterogénea obtenida implica que el proceso de síntesis continúa en evolución, es decir, los parámetros de síntesis tales como relación sal precursora/ agente reductor, temperatura, tiempo de reacción y agitación permitieron obtener nanopartículas del óxido metálico, pero no se alcanzó un control en el tamaño y forma del producto. Esto indica que las variables de síntesis juegan un papel fundamental en el desarrollo de la nucleación y el control en el crecimiento de las nanopartículas para obtener tamaños uniformes y formas definidas. Se han reportado diversas morfologías y tamaños para la generación de nanopartículas de ZnO por métodos verdes. Generalmente, la morfología y tamaño es dependiente del método y las variables de síntesis, así como del procesamiento o tratamiento posterior a la síntesis (Agarwal et al.; 2017). El método de síntesis biogénica para producir nanopartículas y óxidos metálicos ha sido favorablemente conveniente, debido a la formación rápida, simple, económica y respetuosa con el medio ambiente. Aunque, debido a la presencia de diversos grupos químicos presentes en los compuestos naturales, controlar la morfología y el tamaño de las nanopartículas no es tan fácil. Por lo tanto, para cada par sal precursora/compuesto natural se investigan los parámetros de síntesis que puedan, inicialmente, generar la formación de las nanopartículas y posteriormente, alcanzar un control sobre el tamaño y forma.

El aceite de oliva virgen extra contiene diversos compuestos bioactivos tales como los fenoles. Por lo general, el aceite de oliva virgen extra ha sido estudiado debido a sus propiedades benéficas para la salud humana. Por ejemplo, Servili et al., (2014) reportaron una revisión sobre el contenido y comportamiento de fenoles en aceite de oliva virgen extra y su actividad biológica, principalmente su actividad antioxidante. Por lo tanto, posiblemente, los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen extra sean los encargados del fenómeno de reducción de la sal precursora a nanopartículas de óxido de zinc, mientras que los demás compuestos naturales contenidos en el aceite de oliva podrían estar interfiriendo en la estabilización de las nanopartículas generadas. Es decir, podrían favorecer para estabilizar la forma y el tamaño o contrariamente, impedir la formación de una morfología definida. De manera general, es necesario una mayor profundidad en el estudio, explorando diversas variables de síntesis para controlar el tamaño y forma de las nanopartículas obtenidas y establecer algún mecanismo de interacción entre los compuestos naturales del aceite de oliva virgen extra y el precursor metálico.

Figura 3. Micrografías tomadas por FE-SEM del producto de reacción RxnA-25 a: (a) 10,000x, (b) 20,000x. El lado derecho muestra imágenes aumentadas de las micrografías, con su escala en nanómetros para hacer notar a las nanoestructuras formadas.



4. CONCLUSIONES

El presente estudio consistió en una exploración de una metodología simple, económica y respetuosa con el medio ambiente (síntesis verde) para generar nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) usando aceite de oliva extra virgen como recurso de origen natural y condiciones suaves de síntesis (relativa baja temperatura). Durante el proceso de reacción se observaron cambios de color que evidenciaron la reacción química. Mediante microscopía electrónica se comprobó la formación de una morfología heterogénea, donde algunas estructuras tienen dimensiones inferiores a 100 nm.

En conjunto, los resultados obtenidos respaldan la viabilidad de emplear aceite de oliva como componente de origen natural en la síntesis de nanopartículas de ZnO mediante una metodología relativamente sencilla. No obstante, la heterogeneidad

observada en las partículas evidencia que aún es necesario optimizar las condiciones de reacción para lograr un mayor control sobre su tamaño, distribución y morfología.

Los resultados constituyen una base experimental para continuar con el desarrollo de esta estrategia de síntesis biogénica, aprovechando los compuestos bioactivos y con carácter reductor del aceite de oliva virgen extra. La profundidad en los estudios permitirá alcanzar una morfología y tamaños de nanopartículas definidos para dirigirlos hacia estudios de actividad biológica, particularmente la capacidad antimicrobiana. Con el fin de crear en futuras aplicaciones materiales destinados al tratamiento de heridas y quemaduras. Es decir, aprovechar las características concomitantes antimicrobianas del ZnO y bioactivas del aceite de oliva virgen extra.

REFERENCIAS

AGARWAL, H.; KUMAR, S.V.; RAJESHKUMAR, S. A Review on Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles – an Eco-friendly Approach. **Resources-Efficient Technologies**, v.3, p.406-4013, 2017. DOI: 10.1016/j.reffit.2017.03.002.

ALYAMANI, A.A.; ALBUKHATY, S.; ALOUFI, S.; ALMALKI, F.A.; AL-KARAGOLY, H.; SULAIMAN, G.M. Green Fabrication of Zinc Oxide Nanoparticles Using Phlomis Leaf Extract: Characterization and In Vitro Evaluation of Cytotoxicity and Antibacterial Properties. **Molecules**, v.26, n.20, p.6140, 2021. DOI: 10.3390/molecules26206140.

EL-SAADONY, M.T.; FANG, G.; YAN, S.; ALKAFAS, S.S.; EL NASHARTY, M.A.; KHEDR, S.A.; HUSSIEN, A.M.; GHOSH, S.; DLADLA, M.; ELKAFAS, S. S.; IBRAHIM, E.H.; SALEM, H.M.; MOSA, W.F.A.; AHMED, A.E.; MOHAMMED, D.M.; KORMA, S.A.; EL-TARABILY, M.K.; SAAD, A.M.; EL-TARABILY, K.A.; ABUQAMAR, S.F. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Biomedical Applications – A Review. **International Journal of Nanomedicine**, v.19, p.12889-12937, 2024. DOI: 10.2147/IJN.S487188.

LUQUE-MORALES, P.A.; LOPEZ-PERAZA, A.; NAVA-OLIVAS, O.J.; AMAYA-PARRA, G.; BAEZ-LOPEZ, Y.A.; OROZCO-CARMONA, V.M.; GARRAFA-GALVEZ, H.E.; CHINCHILLAS-CHINCHILLAS, M.J. ZnO Semiconductor Nanoparticles and Their Application in Photocatalytic Degradation of Various Organic Dyes. **Materials**, v. 14, p. 7537, 2021. DOI: 10.3390/ma14247537.

HE, W.; JIA, H.; CAI, J.; HAN X.; ZHENG, Z.; WAMER, W.G.; YIN, J. Production of Reactive Oxygen Species and Electrons from Photoexcited ZnO and ZnS Nanoparticles: A Comparative Study for Unraveling their Distinct Photocatalytic Activities. **The Journal of Physical Chemistry C**, v.120, p. 3187-3195. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b11456.

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, M.J.; VALERA-ZARAGOZA, M.; VIÑAS-BRAVO, O.; HUERTA-HEREDIA, A.A.; PEÑA-RICO, M.A.; JUAREZ-ARELLANO, E.A.; PANIAGUA-VEGA, D.; RAMÍREZ-VARGAS, E.; SÁNCHEZ-VALDES, S. In Search of Cytotoxic Selectivity on Cancer Cells with Biogenically Synthesized Ag/AgCl Nanoparticles. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v.13, p.1505-1519, 2022. DOI: 10.3762/bjnano.13.124.

SALIANI, M.; JALAL, R.; GOHARSHADI, E.K. Mechanism of Oxidative Stress Involved in the Toxicity of ZnO Nanoparticles Against Eukaryotic Cells. **Nanomedicine Journal**, v.3. p. 1-14. DOI: 10.7508/nmj.2016.01.001.

SERVILI, M.; SORDINI, B.; ESPOSTO, S.; URBANI, S.; VENEZIANI, G.; DI BATTISTA, G. Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. **Antioxidants**, v.3, n.1, p.1-23, 2014. DOI: 10.3390/antiox3010001.

CAPÍTULO 3

EVALUACIÓN CITOGÉNÉTICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Taxodium mucronatum* EN VICIA FABA MEDIANTE MICRONÚCLEOS

Data de submissão: 01/09/2026

Data de aceite: 16/09/2026

Erick Nolasco Ontiveros

Laboratorio de Bioactividad de
productos Naturales, UBIPRO
Facultad de Estudios Superiores (FES)
Iztacala, Universidad Nacional
Autónoma de México, Av. de los Barrios 1
Los Reyes Iztacala, 54090, Tlalnepantla
Estado de México, México
<https://orcid.org/0009-0007-1858-375X>

Saúl Flores-Maya

Laboratorio de Recursos Naturales, UBIPRO
Facultad de Estudios Superiores (FES)
Iztacala, Universidad Nacional
Autónoma de México, Av. de los Barrios 1
Los Reyes Iztacala, 54090, Tlalnepantla
Estado de México, México
<https://orcid.org/0000-0002-8474-8029>

Norberto Alarcón-Herrera

Laboratorio de Recursos Naturales, UBIPRO
Facultad de Estudios Superiores (FES)
Iztacala, Universidad Nacional
Autónoma de México, Av. de los Barrios 1
Los Reyes Iztacala, 54090, Tlalnepantla
Estado de México, México
<https://orcid.org/0000-0001-8456-8098>

Ana Belén Palacios Loeza

Laboratorio de Recursos Naturales, UBIPRO
Facultad de Estudios Superiores (FES)
Iztacala, Universidad Nacional
Autónoma de México, Av. de los Barrios 1
Los Reyes Iztacala, 54090, Tlalnepantla
Estado de México, México
<https://orcid.org/0009-0000-9504-3043>

Paulina Abrica-González

Laboratorio de de Técnicas Fototérmicos
Unidad Profesional de Biotecnología, IPN
Av. Acueducto, La Laguna Ticomán
Gustavo A. Madero, 07340
Ciudad de México, CDMX
<https://orcid.org/0000-0001-7392-7702>

Martha Martínez-García

Laboratorio de Biología Molecular, UBIPRO
Facultad de Estudios Superiores (FES)
Iztacala, Universidad Nacional Autónoma
de México, Av. de los Barrios 1, Los Reyes
Iztacala, 54090, Tlalnepantla
Estado de México, México
<https://orcid.org/0000-0001-6354-0408>

RESUMEN: Estudios recientes confirman propiedades antimicrobianas y antitumorales de especies del género *Taxodium*, comúnmente conocido como “ahuehuete”, tule o “ciprés de Moctezuma”. En este contexto, el presente estudio aporta datos citogenotóxicos para

futuras investigaciones farmacológicas. Como sistema de prueba, se utilizó el ensayo de micronúcleos en células meristemáticas de *Vicia faba* L., que analiza la frecuencia de micronúcleos (MN) y el índice mitótico (IM). Se utilizaron cuatro concentraciones de extracto acuoso de hojas: 10, 20, 50 y 100 µl/ml. Como testigo negativo se empleó agua destilada, mientras que el dicromato de potasio a 0.5 mg/ml fue el testigo positivo. Se realizaron cinco ensayos de repetición. Las raíces de *V. faba* expuestas en los tratamientos y en los testigos fueron cosechadas a las 24, 48 y 72 horas. Inmediatamente, se aplicó la técnica citogenética mediante tinción con acetoorceína para su observación al microscopio de células en división (%IM) y para el conteo de micronúcleos (%MN). Los datos promedio fueron analizados mediante la prueba paramétrica ANOVA ($\alpha < 0.05$) y, al detectarse diferencias significativas, se sometieron a la prueba múltiple de Dunnett ($\alpha < 0.05$). Previamente, se realizaron pruebas colorimétricas para identificar metabolitos secundarios en las hojas del árbol, identificándose los siguientes tipos de compuestos: saponinas, fenoles, flavonoides, glucósidos y taninos. El extracto acuoso de *T. mucronatum* no mostró diferencias significativas en el %IM respecto de la media del testigo negativo a las concentraciones de 10, 20 y 50 µl/ml. La concentración de 100 µl/ml fue citotóxica. Ninguna de las concentraciones mostró diferencias significativas en la frecuencia del %MN. En conclusión, el extracto acuoso de *T. mucronatum* presentó citotoxicidad leve sobre la división celular de *V. faba* y no provocó daño genotóxico.

PALABRAS CLAVE: planta medicinal; *Taxodium huegelii*; citotoxicidad; Cupressaceae; índice mitótico.

CYTOGENETIC EVALUATION OF THE AQUEOUS EXTRACT OF *Taxodium mucronatum* IN VICIA FABAE USING MICRONUCLEI

ABSTRACT: Recent studies confirm the antimicrobial and antitumor properties of species from the genus *Taxodium*, commonly known as “ahuehuete”, tule or “Montezuma cypress.” In this context, the present study provides cytogenotoxic data for future pharmacological research. The micronucleus assay was used in meristematic cells of *Vicia faba* L. to analyze the frequency of micronuclei (MN) and the mitotic index (MI). Four concentrations of aqueous leaf extract were used: 10, 20, 50, and 100 µl/ml. Distilled water was used as the negative control, while potassium dichromate at 0.5 mg/ml served as the positive control. Five replicate tests were carried out, and the roots of *V. faba* exposed to the treatments and controls were harvested at 24, 48, and 72 hours. The cytogenetic technique was then applied using acetoorcein staining to observe dividing cells (%MI) and count micronuclei (%MN) under the microscope. The average data were analyzed using parametric ANOVA ($\alpha < 0.05$) and, when significant differences were detected, subjected to Dunnett’s multiple test ($\alpha < 0.05$). Colorimetric tests were also carried out to identify secondary metabolites in the tree leaves, including saponins, phenols, flavonoids, glycosides, and tannins. The aqueous extract of *T. mucronatum* did not show significant differences in the %MI compared to the negative control at concentrations of 10, 20, and 50 µl/ml. The 100 µl/ml concentration was cytotoxic. None of the concentrations showed significant differences in the %MN frequency. In conclusion, the aqueous extract of *T. mucronatum* showed mild cytotoxicity on *V. faba* cell division and did not cause genotoxic damage.

KEYWORDS: medicinal plant; *Taxodium huegelii*; cytotoxicity; Cupressaceae; mitotic index.

1. INTRODUCCIÓN

En México se puede encontrar una gran diversidad de vegetación como resultado de su compleja fisiografía, geología y variedad climática que ha desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de distintos tipos de comunidades vegetales, entre ellas las comunidades acuáticas y riparias en las cuales se desarrolla un tipo de vegetación que forma corredores naturales entre los sistemas acuáticos y terrestres, conocida como bosque de galería o vegetación riparia (Naiman et al., 1993; Rzedowski, 2006).

Dentro de los géneros más representativos de este tipo de vegetación en México se encuentra el género *Taxodium*, perteneciente a la familia Taxodiaceae, el cual se distribuye en algunas regiones templadas del hemisferio norte (Carranza, 1992). De las 3 especies que conforman el género *Taxodium*, solo una se encuentra presente en México *Taxodium mucronatum* Ten., endémica de México y Guatemala, conocida comúnmente como ahuehuete, tule o ciprés de Moctezuma (Su et al., 2013).

Este género ha existido desde hace millones de años y ha sido utilizado por diversas culturas como medicina tradicional. En años recientes, estudios han señalado que, debido a la presencia de diversos compuestos bioactivos, las especies pertenecientes a este género presentan potencial terapéutico. (Su et al., 2013).

Distintas especies arbóreas asociadas a ecosistemas riparios han generado interés científico debido a su capacidad para producir metabolitos secundarios, que son respuestas a condiciones adversas, como la disponibilidad de agua, suelo, luz y nutrientes, así como para evitar posibles ataques de depredadores y microorganismos (Lustre-Pereyra, 2022). Estos metabolitos secundarios pueden desempeñar funciones de defensa y fisiológicas, lo que ha generado un mayor interés en investigar sus compuestos bioactivos con posibles aplicaciones biológicas y farmacológicas.

T. mucronatum ha servido como recurso en la medicina tradicional de diversas culturas. Las hojas son empleadas en el tratamiento de la malaria y de enfermedades hepáticas. La corteza se aplica en llagas, quemaduras y ulceraciones de la piel. La corteza, ramas, hojas y estróbilo se aprovechan para preparar infusiones y ungüentos para el tratamiento de heridas, hemorroides, reumatismo, diarrea, problemas de circulación, hidropesía, presión arterial, trastornos menstruales, prevenir dolores de muelas y de cabeza, gota y enfermedades bronquiales. Los aceites esenciales de las hojas y los conos de *Taxodium* se utilizan para tratar la inflamación, las infecciones y diversas dolencias cutáneas, gastrointestinales y respiratorias; asimismo, se ha reportado que presentan actividades antitumorales (Comisión Nacional Forestal, s. f.; Carranza, 1992; Su et al., 2013).

Algunos tratamientos que han sido empleados de *Taxodium* han sido respaldados por diversos estudios empleando aceite esencial, extracto etanólico y extracto de hexano de hojas y conos que comprueban las propiedades antimicrobiano especialmente potencial contra tuberculosis, neumonía y fumigatus, también tiene un gran efecto gastroprotector, en la disminución del dolor inflamatorio agudo, protege la mucosa gástrica frente a úlceras inducidas por etanol, actúa como vasorrelajante y presenta actividades antiespasmódicas y broncodilatadoras (Perrusquia et al., 1995; Cortés-Arroyo et al., 2011; Al-Sayed, 2018; Onofre-Hurtado et al., 2023; Gaona-Ríos et al., 2026).

Sin embargo, incluso al utilizar productos de origen vegetal, no se garantiza la ausencia de efectos adversos, ya que en ocasiones los metabolitos secundarios podrían ser contraproducentes, dependiendo de la dosis y la exposición (Pérez-Almeida et al., 2022).

En las últimas décadas, estos extractos también han sido objeto de numerosas investigaciones biológicas y farmacológicas orientadas a evaluar su eficacia y seguridad (Torres-Rodríguez et al., 2016; Alegre et al., 2017; Alelign et al., 2020). Por lo cual es necesario analizar su posible impacto a nivel celular y genético mediante bioensayos confiables.

Aunque diversos estudios han señalado la bioactividad de *Taxodium*, son limitadas las investigaciones que han evaluado sus posibles efectos toxicológicos. En este sentido, de los antecedentes más relevantes está el estudio realizado por De la Cruz et al., (2012), quienes analizaron la toxicidad aguda y el impacto sobre la propulsión intestinal en ratones tras la administración de extractos de *T. mucronatum* y *Acacia farnesiana*. Sus resultados aportan evidencia preliminar sobre la seguridad y los efectos fisiológicos de estos extractos, contribuyendo a las evaluaciones toxicológicas de estas especies.

Las propiedades bioactivas se deben principalmente a los componentes de este género. Entre los que se han registrado se encuentran esteroides, flavonoides, saponinas y taninos (Juárez-Montoya, 2006; Arriaga-Arana et al., 2015). Incluso se han realizado análisis más específicos sobre estos componentes; de acuerdo con (Luján-Hidalgo et al., 2012), se encontró actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en hojas de *Bursera graveolens* y *T. mucronatum* y, de manera complementaria, realizaron una cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas para identificar algunos componentes presentes en distintas estructuras de *T. mucronatum*. Los resultados fueron: α -pineno, sabineno, tujopseno, 4-terpineno, λ -terpineno y β -mirceno.

Por otra parte, Mendoza et al., (2026) obtuvieron compuestos tanto de frutos como de ramas; principalmente encontraron taxoquinona en frutos. Este compuesto está ligado

a la actividad antifúngica, la inhibición de la α -glucosidasa, la inhibición de la tirosinasa, la citotoxicidad, la inhibición del virus de la influenza H1N1 y la actividad antioxidante. Sugiol es un metabolito presente tanto en ramas como en frutos y se considera característico del género *Taxodium*. Este compuesto presenta propiedades citotóxicas y antiinflamatorias. El ciclomargenol es otro componente presente que reduce las actividades de COX-1 y COX-2. Finalmente, otro compuesto sobresaliente de este estudio es taxodiona, la cual exhibe propiedades antivirales (Mendoza et al., 2026).

La evaluación de efectos citotóxicos y genotóxicos es una herramienta fundamental para determinar la seguridad biológica de distintas sustancias naturales, ya que nos permite identificar alteraciones a nivel celular y posibles daños al material genético, los cuales podrían afectar a organismos expuestos directa o indirectamente (López-Nigro et al., 2009).

A pesar de los estudios existentes sobre la bioactividad y toxicidad de distintas especies del género *Taxodium*, la información sobre los posibles efectos citotóxicos y genotóxicos de *T. mucronatum* es limitada (López-Nigro et al., 2009), especialmente en lo relativo a los extractos acuosos y su evaluación mediante modelos vegetales, lo que resalta la necesidad de realizar estudios que aporten al conocimiento de su seguridad para su posible aprovechamiento. En este contexto, el presente estudio se orienta a evaluar los posibles efectos citotóxicos y genotóxicos de un extracto acuoso de *Taxodium mucronatum*, utilizando como modelo biológico células meristemáticas radiculares de *Vicia faba* y el ensayo de micronúcleos como herramienta para la detección de daño genético.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Recursos Naturales de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), situada en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, en Tlalnepantla de Baz, Edo. de México, México.

2.1. REACTIVO

Dicromato de Potasio (sal dipotásica del ácido crómico) A.C.S. Marca: Fermont.
Catálogo: 29842. Presentación 500 g, concentración 99.0%. Fórmula: $K_2Cr_2O_7$.
CAS: 7778-50-9.

2.2. MATERIAL VEGETAL

El material biológico utilizado en este estudio fue proporcionado por la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala,

UNAM. Las semillas certificadas de *V. faba* (variedad minor) fueron donadas por el laboratorio de Recursos Naturales. Mientras que el follaje fresco de *T. mucronatum* fue facilitado por la Dra. Martha Martínez García, del Laboratorio de Bioquímica Molecular.

2.3. GERMINACIÓN

Las semillas de *V. faba* (variedad minor) fueron desinfectadas por 5 min en una solución de hipoclorito de sodio al 5%, posteriormente fueron lavadas cuatro veces con agua destilada. Inmediatamente fueron embebidas durante 12 h en 500 ml de agua destilada. Para la germinación, las semillas se colocaron entre dos capas de algodón humedecido a 22 °C por cinco días. Cuando las raíces alcanzaron un tamaño de 1 a 2 cm de longitud, fueron usadas para este estudio.

2.4. TRATAMIENTOS

Se sometió a ebullición una mezcla de 250 ml de agua destilada y 10 g de hojas de *T. mucronatum* durante 5 min. Tras retirar la muestra de la fuente de calor y registrar una temperatura de 80 °C, el extracto se dejó enfriar a temperatura ambiente. El contenedor se cubrió con papel de aluminio para evitar su contaminación y se mantuvo en refrigeración a 4 °C. A partir de este extracto acuoso, se prepararon las concentraciones evaluadas de 10, 20, 50 y 100 µl/ml.

2.5. EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD

Las semillas germinadas con raíces primarias de aproximadamente 1 cm de largo se seleccionaron al azar para conformar dos grupos el primero con cuatro tratamientos: 1) 15 semillas que se sumergieron en 30 ml en una concentración de 10 µl/ml del extracto acuoso, 2) 15 semillas que fueron sumergidas en 30 ml en una concentración de 20 µl/ml del extracto acuoso, 3) 15 semillas que se sumergieron en 30 ml de extracto acuoso al 50 µl/ml y 4) 15 semillas que se sumergieron en 30 ml de extracto acuoso al 100 µl/ml y el segundo grupo dos tratamientos testigos, un testigo negativo donde se colocaron 15 semillas en 30 ml de agua destilada y un testigo positivo en el cual se expusieron 15 semillas en 30 ml en una concentración de 0.5 mg/ml de dicromato de potasio. Cada grupo tuvo un tiempo de exposición de 24, 48 y 72 h. Los dos grupos experimentales estuvieron en condiciones de incubación a 22 °C $\pm$ 1 °C y en oscuridad para evitar el incremento de la oxidación o la alteración fisicoquímica de los extractos por microorganismos y cada 24 h se cambió el extracto acuoso por el mismo volumen en todos los tratamientos.

2.6. REGISTRO TOXICIDAD (% IM) Y ENSAYO DE MICRONÚCLEOS (%MN)

Se siguió el protocolo de Ma et al. (1995) para la prueba de micronúcleos. Al concluir los tiempos de los tratamientos de 24, 48 y 72 h, las raíces fueron cortadas en un tamaño de aproximadamente 5 mm a partir de la zona meristemática y se fijaron en solución Farmer (etanol-ácido acético 3:1). Inmediatamente fueron almacenadas a 4 °C por 12 horas. Posteriormente fueron hidrolizadas en HCl 1 N a 60 °C por 5 min; pasado este tiempo fueron lavadas en tres tiempos con agua destilada para eliminar el HCl. Después del proceso de hidrólisis, se cortaron las raíces de aproximadamente 2 mm de la zona meristemática. Cada meristemo fue macerado en ácido acético al 45% sobre un portaobjetos. Después, las células se tiñeron con aceto-orceína al 1%. Finalmente, utilizando un cubreobjetos, se realizó el aplastamiento en monocapa (“squash”) para dispersar las células con la finalidad de observarlas al microscopio.

La frecuencia de micronúcleos (MN) es expresada en términos del número de células con $\%MN = \text{No. MN} / 1000 \times 100$ células contabilizadas por raíz en un microscopio óptico Nikon observando a 1000 aumentos. Simultáneamente se contabilizó la cantidad de células en división mitótica. A partir de la siguiente fórmula se calculó el índice mitótico $\%IM = \text{No. de células en I+P+M+A+T} / 1000 \times 100$, parámetro usado para evaluar citotoxicidad.

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos tanto para el % IM como para el % MN, obtenidos para *V. faba*, fueron estadísticamente evaluados individualmente con la prueba paramétrica de análisis de varianza de un factor (ANOVA) en un nivel de confianza de $\alpha = 0.05$; después, si había diferencia significativa, se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunnett ($p < 0.05$). Donde se determinó cuál de los valores promedio de los tratamientos será diferente estadísticamente al valor promedio del testigo negativo.

2.8. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

El extracto acuoso de *T. mucronatum* se concentró hasta obtener los sólidos totales. Para la identificación de metabolitos secundarios, se utilizaron 5 mg de extracto seco, los cuales se disolvieron en 5 ml de metanol y agua en proporción 1:1 con el fin de asegurar la máxima solvatación de los analitos presentes en el extracto. A partir de la solución stock, se tomaron 500 µl y se colocaron en tubos de ensayo, a los cuales se les añadieron 100 µl de cada uno de los reactivos correspondientes (Tabla 1).

Adicionalmente, se realizó una cromatografía en capa fina (CCF) con el fin de obtener el perfil de flavonoides, para lo cual se utilizó la fase móvil compuesta por 70% de acetona, 25% de metanol y 5% de agua. Las placas se revelaron con revelador de productos naturales y se visualizaron bajo luz ultravioleta a 365 nm, de acuerdo con la metodología descrita por Wagner y Bladt (1996).

Tabla 1. Pruebas de identificación de las principales familias de metabolitos secundarios presentes en el extracto de *Taxodium mucronatum*.

Grupo de metabolitos secundarios	Revelador / Agente cromógeno	Método
Saponinas		Prueba de espuma.
Alcaloides	Prueba de Dragendorff	Reacción colorida (rojo a naranja).
Fenoles	Cloruro Férrico	Reacción colorida (azul claro o coloraciones oscuras).
Flavonoides	Revelador de productos naturales	Reacción colorida (amarillo, azul o verde).
Taninos	Cloruro férrico / Prueba de hemólisis con agar sangre.	Reacción colorida (verde oscuro o azul)
Glucósidos	Prueba de Molisch (α -naftol y HCl concentrado)	Reacción colorida (anillo de color violeta o púrpura intenso)

3. RESULTADOS

3.1. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL ÍNDICE MITÓTICO

El análisis del índice mitótico (%IM) mostró diferencias entre los tratamientos evaluados. El testigo negativo presentó el mayor valor promedio ($43.06 \pm 8.58 \%$),

mientras que el tratamiento con dicromato de potasio (0.5 mg/ml) presentó el menor índice mitótico ($1.09 \pm 1.38 \%$), este dato coincide con lo mencionado por Prieto et al., (2008) sobre la toxicidad del dicromato, que para este estudio sirvió como un estándar de referencia que permitió observar los efectos de los tratamientos y como validación interna de la presente investigación. En los tratamientos con extracto de *Taxodium*, los valores promedio fueron de $15.54 \pm 14.05 \%$, $20.42 \pm 5.20 \%$, $16.39 \pm 5.40 \%$ y $12.47 \pm 8.57 \%$ para las concentraciones de 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

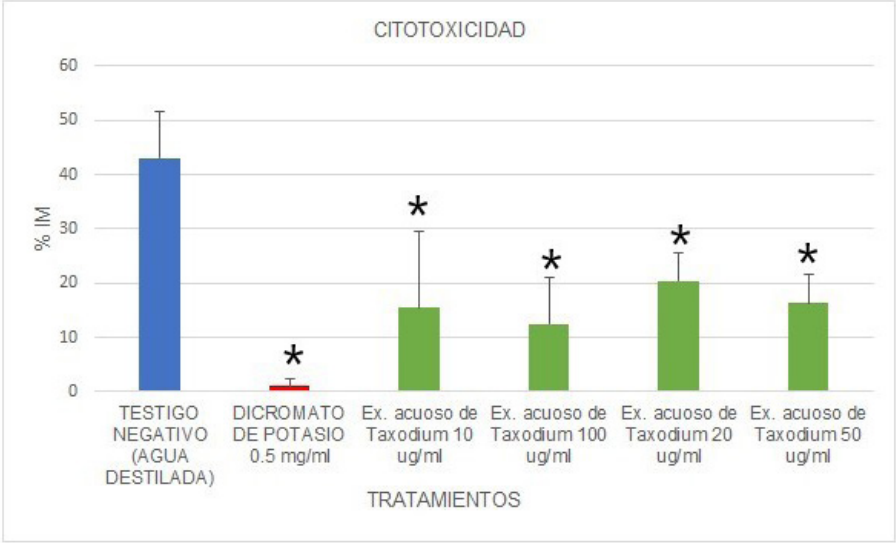
El análisis de varianza de una vía mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F_{5,84} = 42.88$; $p < 0.001$). El modelo explicó el 71.85 % de la variabilidad observada en el índice mitótico ($R^2 = 71.85 \%$; R^2 ajustado = 70.17 %), con una desviación estándar agrupada de 8.19.

La comparación múltiple de Dunnett, utilizando el testigo negativo como referencia y una tasa de error familiar de 0.05, mostró que todos los tratamientos presentaron diferencias significativas respecto a este testigo. El dicromato de potasio presentó la mayor diferencia respecto al control (-41.967 ; IC95%: -49.629 a -34.305). Para el extracto de *Taxodium*, las diferencias respecto al testigo negativo fueron de -27.520 para 10 $\mu\text{g/ml}$ (IC95%: -35.182 a -19.858), -30.587 para 100 $\mu\text{g/ml}$ (IC95%: -38.249 a -22.925), -22.640 para 20 $\mu\text{g/ml}$ (IC95%: -30.302 a -14.978) y -26.667 para 50 $\mu\text{g/ml}$ (IC95%: -34.329 a -19.005).

Los intervalos de confianza de todas las comparaciones se ubicaron completamente por debajo de cero, confirmando que los valores del índice mitótico de los tratamientos fueron significativamente menores que los del testigo negativo. Entre las concentraciones del extracto, el tratamiento de 20 $\mu\text{g/ml}$ presentó el mayor índice mitótico ($20.42 \pm 5.20 \%$), mientras que la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ presentó el menor valor ($12.47 \pm 8.57 \%$).

En relación con el testigo negativo, la disminución del índice mitótico fue de aproximadamente 96.0 % para el dicromato de potasio y de 63.9, 52.6, 61.9 y 71.0 % para las concentraciones de 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ del extracto de *Taxodium*, respectivamente (Figura 1).

Figura 1. Valores promedio del % del IM obtenidos de la exposición al extracto acuoso de las hojas de *Taxodium mucronatum* sobre las células meristemáticas de *Vicia faba*. * La media marcada con asterisco es significativamente diferente de la media del nivel del testigo negativo de acuerdo con la prueba múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).



3.2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS

La frecuencia de micronúcleos (%MN) presentó variaciones entre los tratamientos evaluados. El testigo negativo no presentó micronúcleos detectables, con un valor promedio de 0.0000 ± 0.0000 %. En contraste, el tratamiento con dicromato de potasio (0.5 mg/ml) presentó la mayor frecuencia de micronúcleos, con un promedio de 0.4800 ± 0.2484 %. Los tratamientos con extracto de *Taxodium* presentaron valores inferiores, correspondientes a 0.0133 ± 0.0352 %, 0.0467 ± 0.0743 %, 0.0067 ± 0.0258 % y 0.0067 ± 0.0258 % para las concentraciones de 10, 100, 20 y 50 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

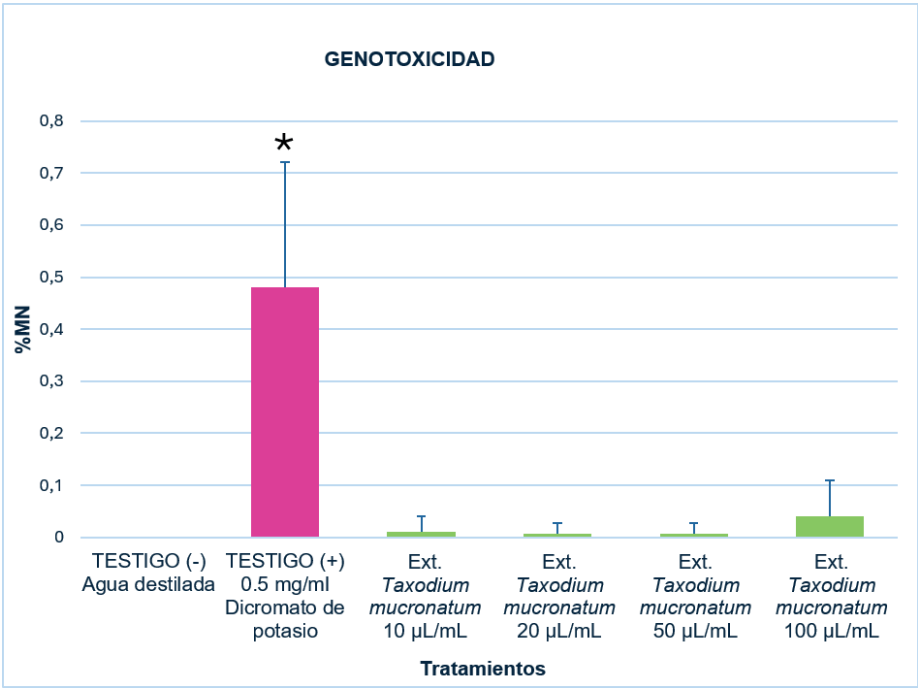
El análisis de varianza de una vía mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($F_{5,84} = 46.88$; $p < 0.001$), con un coeficiente de determinación de $R^2 = 73.62$ % y un R^2 ajustado de 72.05 %. Estos resultados indican que el tratamiento aplicado explicó una proporción importante de la variabilidad observada en la frecuencia de micronúcleos.

La comparación múltiple de Dunnett, utilizando el testigo negativo como referencia, mostró una diferencia estadísticamente significativa únicamente para el tratamiento con dicromato de potasio datos que concuerdan con Prieto et al., (2008) sobre la genotoxicidad del dicromato. La diferencia entre este tratamiento y el testigo negativo fue de 0.4800, con un intervalo de confianza del 95 % de 0.3791 a 0.5809, intervalo que no incluyó el valor cero.

En contraste, las concentraciones de 10, 100, 20 y 50 $\mu\text{g/ml}$ del extracto de *Taxodium* no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo negativo, debido a que sus respectivos intervalos de confianza incluyeron el valor cero: 10 $\mu\text{g/ml}$ (–0.0876 a 0.1142), 100 $\mu\text{g/ml}$ (–0.0542 a 0.1476), 20 $\mu\text{g/ml}$ (–0.0942 a 0.1076) y 50 $\mu\text{g/ml}$ (–0.0942 a 0.1076).

En conjunto, los resultados indican que el dicromato de potasio produjo un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos, mientras que los tratamientos con extracto de *Taxodium* no modificaron significativamente este parámetro respecto al testigo negativo bajo las condiciones experimentales evaluadas (Figura 2).

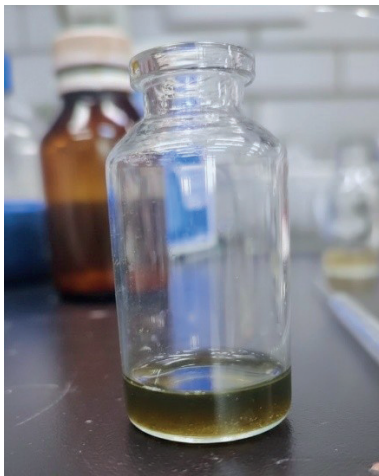
Figura 2. Valores promedio del % MN obtenidos de la exposición del extracto acuoso de las hojas de *Taxodium mucronatum* sobre las células meristemáticas radiculares de *Vicia faba*. Las medias marcadas con asterisco son significativamente diferentes de la media al nivel del testigo negativo de acuerdo con la prueba múltiple de Dunnett ($p < 0.05$).



3.3. ANÁLISIS QUÍMICO PRELIMINAR

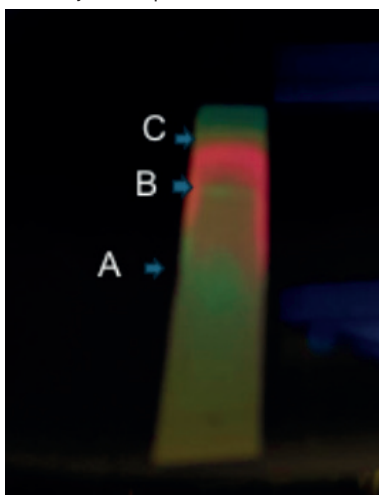
Los resultados de las pruebas de identificación química preliminar del extracto de *T. mucronatum* mostraron una respuesta positiva a compuestos fenólicos y taninos, evidenciada por el cambio de coloración característico (Figura 3).

Figura 3. Prueba con cloruro férrico para identificar compuestos fenólicos y taninos. La coloración verde oscura indica que la prueba es positiva.



Por otra parte, al realizar la cromatografía en capa fina para determinar la presencia de flavonoides en el extracto, se identificaron bandas de color verde y amarillo, lo cual daría positivo en dicha prueba (Figura 4).

Figura 4. Cromatografía en capa fina para obtener el perfil de flavonoides. Las bandas A, B y C indican la presencia de flavonoides, mientras que la banda en rojo corresponde a clorofilas.



El único grupo de metabolitos secundarios que no se encontró presente en el extracto de *T. mucronatum* es el de los alcaloides, ya que en la prueba no hubo reacción.

En la Tabla 2 se presentan todos los resultados de las pruebas de identificación química realizadas:

Tabla 2. Resultados obtenidos tras realizar las distintas pruebas de identificación de metabolitos secundarios en el extracto de *Taxodium mucronatum*.

Grupo de metabolitos secundarios	Resultado observado	Interpretación
Saponinas	Formación de espuma persistente	Positivo (+)
Alcaloides	No hubo reacción colorida	Negativo (-)
Fenoles	Coloración verde-gris oscuro	Positivo (+)
Flavonoides	Revelación en cromatografía de capa fina color verde y amarillo	Positivo (+)
Taninos	Coloración verde oscuro Presencia de hemólisis en agar sangre	Positivo (+) Positivo (+)
Glucósidos	Anillo de color violeta	Positivo (+)

4. DISCUSIÓN

El índice mitótico (IM) se define como el coeficiente entre el número de células en mitosis y aquellas que no están en división dentro de una población celular (Instituto Nacional del Cáncer, s.f.). Este indicador es importante para evaluar la citotoxicidad de algunos agentes xenobióticos, ya que permite identificar alteraciones en la proliferación celular. En este estudio, los tratamientos expuestos al extracto acuoso de *T. mucronatum* mostraron una disminución del índice mitótico respecto al testigo negativo (agua destilada), observándose una mayor inhibición a una concentración de 100 µl/ml que de acuerdo a los resultados de la prueba de comparación múltiple de Dunnett esta concentración mostro diferencia significativa respecto al testigo negativo, sin embargo en las demás concentraciones evaluadas no se observó un efecto citotóxico marcado bajo las condiciones evaluadas.

Con base en los resultados, se puede inferir que el extracto influye en la actividad mitótica. Sin embargo, este efecto es mínimo en comparación con la intensidad citotóxica observada en el testigo positivo, que presentó una reducción muy evidente del IM (1.09%), siendo significativamente diferente al testigo negativo (24.54 %), lo que confirma su capacidad inhibitoria sobre la proliferación celular.

Resultados similares han sido reportados por De la Cruz y colaboradores en el año 2012, quienes evaluaron la dosis letal media (LD_{50}) de un extracto acuoso y de etanol de hojas y tallos de *T. mucronatum* en ratones, utilizando el método de Lorke (1983), modificado por el enfoque de Reed-Müench, y unidades probit; los resultados muestran que el extracto es débilmente tóxico. Aunque la metodología fue distinta, los resultados coinciden con los obtenidos en este estudio. En conjunto, estos resultados evidencian una disminución significativa de la actividad mitótica en todos los tratamientos respecto al testigo negativo; sin embargo, la respuesta al extracto no siguió un patrón estrictamente lineal con el incremento de la concentración.

Respecto al análisis de micronúcleos (%MN), los resultados no mostraron daños genotóxicos en las raíces expuestas a las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *T. mucronatum*, ya que los valores eran bajos (0.007-0.04%). Sin embargo, al realizar el análisis estadístico utilizando un ANOVA unidireccional marcaba diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los tratamientos; no obstante, cuando se realizó la prueba de comparación múltiple de Dunnett, comprobamos que estas diferencias eran atribuidas principalmente al dicromato de potasio, utilizado como testigo positivo, el cual registró el mayor porcentaje de micronúcleos (0.48%), esto nos ayuda a validar la respuesta del sistema experimental y confirma que el extracto no evidenció un efecto genotóxico bajo las condiciones evaluadas.

Aunque el extracto ocasionó una leve disminución del índice mitótico, no incrementó significativamente la frecuencia de micronúcleos. Esto sugiere que la reducción de la división celular no estuvo acompañada de daño cromosómico detectable. Ambos resultados podrían estar relacionados con algunos metabolitos secundarios presentes en el extracto. El análisis químico preliminar permitió identificar la presencia de saponinas, fenoles, flavonoides, taninos y glucósidos, resultados que coinciden parcialmente con los reportados por Juárez-Montoya (2006) y por Arriaga-Arana *et al.* (2015), quienes también identificaron estos metabolitos en extractos de *T. mucronatum*. Sin embargo, dichos autores reportaron, además, la presencia de otros metabolitos secundarios que no fueron analizados en el presente estudio. Estas variaciones podrían atribuirse al tipo de solvente empleado para la extracción, ya que la solubilidad de los metabolitos secundarios puede variar en función del solvente utilizado.

En comparación con el presente estudio, en el que se realizó un análisis químico preliminar mediante pruebas cualitativas, otros autores utilizaron técnicas instrumentales que permitieron caracterizar con mayor detalle la composición química de *T. mucronatum*, identificando metabolitos específicos pertenecientes a distintos grupos, entre ellos compuestos fenólicos, incluidos flavonoides y biflavonoides, terpenoides y fitoesteres. Estos metabolitos han sido asociados a múltiples actividades biológicas, principalmente antioxidantes, antimicrobianas y citoprotectoras (Pan *et al.*, 2005; Gallegos-Ramírez, 2006; Luján-Hidalgo *et al.*, 2012; Mendoza *et al.*, 2026). En el presente estudio, los resultados concuerdan con los autores antes mencionados, refiriendo que en conjunto estos metabolitos podrían contribuir a explicar la respuesta citoprotectora observada en el ciclo celular (% IM) y la baja frecuencia de micronúcleos en las células meristemáticas radiculares de *V. faba*.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio aportan evidencia sobre la seguridad biológica del extracto acuoso de *Taxodium mucronatum* Ten. en el modelo vegetal *Vicia faba* L. y constituyen una base para futuras investigaciones orientadas a profundizar en su composición química, su mecanismo de acción y su evaluación en otros modelos biológicos.

Mediante el análisis del porcentaje de índice mitótico (%IM) se encontró que el extracto no provocó alteración importante en la división celular, por lo que no se observó evidencia de citotoxicidad relevante en las concentraciones evaluadas.

La evaluación de daño a nivel genético mediante el ensayo de micronúcleos mostró que el extracto no produjo un incremento significativo en la frecuencia de micronúcleos con respecto al testigo negativo, lo que sugiere que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, el extracto no presentó un efecto genotóxico.

El análisis químico preliminar del extracto permitió identificar la presencia de saponinas, fenoles, flavonoides, taninos y glucósidos. Estos grupos de metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la composición química reportada para esta especie.

BIBLIOGRAFIA

Al-Sayed, E. (2018). Unearthing the chemical composition of *Taxodium distichum* (L.) Rich leaf essential oil and its antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*, 126, 76–82. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669018308720>

Alegre, A., Iannacone, J., & Carhuapoma, M. (2017). Toxicidad del extracto acuoso, etanólico y hexánico de *Annona muricata*, *Minthostachys mollis*, *Lupinus mutabilis*, y *Chenopodium quinoa* sobre

Tetranychus urticae y *Chrysoperla externa*. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 33(3), 273-284. <http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902017005000705>

Alelign, T., Chalchisa, D., Fekadu, N., Solomon, D., Sisay, T., Debella, A., & Petros, B. (2020). Evaluation of acute and sub-acute toxicity of selected traditional antiulcerogenic medicinal plant extracts in Wistar albino rats. *Toxicology Reports*, 7, 1356-1365. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.10.001>

Arriaga-Arana, E. L., Montero-Matías, E. D., Bautista-Ramírez, M. E., & Gómez y Gómez, Y. D. I. M. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante in vitro de los extractos de cuatro plantas medicinales. *Docencia e Investigación en Química*, 1(1), 1128-1133 <https://zaloamati.azc.uam.mx/server/api/core/bitstreams/e7def9ff-4df1-426d-8be6-910e0f900988/content>

Carranza, E. (1992). Taxodiaceae. *Flora del Bajío y de regiones adyacentes*. Instituto de Ecología, A. C. Centro Regional del Bajío. Fascículo 4, 1-7. <https://doi.org/10.21829/fb.131.1992.4>

Comisión Nacional Forestal. (s. f.). *Taxodium mucronatum*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/1011Taxodium%20mucronatum.pdf>

Cortés-Arroyo, A. R., Domínguez-Ramírez, A. M., Gómez-Hernández, M., Medina-López, J. R., Hurtado de la Peña, M., & López-Muñoz, F. J. (2011). Antispasmodic and bronchodilator activities of *Taxodium mucronatum* Ten leaf extract. *African Journal of Biotechnology*, 10(1), 54-64. https://www.researchgate.net/publication/266884463_Antispasmodic_and_bronchodilator_activities_of_Taxodium_mucronatum_Ten_leaf_extract

De la Cruz, S., Rodríguez, E., Dávalos, H. N., & Astudillo-Vázquez, A. (2012). Acute toxicity and decreased peristalsis in mice caused by *Taxodium mucronatum* and *Acacia farnesiana* extracts. *Revista Latinoamericana de Química*, 40(1), 19-25. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-59432012000100003&lng=es&tlng=

Gallegos-Ramírez, L. A. (2006). *Aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución en la investigación de flavonoides en plantas medicinales mexicanas* [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio Institucional UAQ. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/6104>

Gaona-Ríos, S. O., Gómez-Martínez, A.E., Vergara-Aragón, P., Sánchez-Chinchillas, A., Bustamante-García, R., Sánchez-Alcántara, A. R., Betanzos-Martínez, P. Y., Vázquez-Álvarez, A. M., & Bustamante-García, R. (2026). Inducción de úlcera gástrica por modelo químico (etanol) para la evaluación del efecto gastroprotector del extracto acuoso de *Taxodium mucronatum* en ratas cepa Wistar. *Ambiens Techné et Scientia México*, 14(2), 163-174. <https://atsmexico.org/atsm/article/view/220>

Instituto Nacional del Cáncer. (s.f.). Índice mitótico. En *Diccionario de cáncer del NCI*. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/indice-mitotico>

Juárez-Montoya, E. (2006). *Rastreo de metabolitos secundarios de plantas usadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares* [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro]. Repositorio de la UAQ <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/7082>

López-Nigro, M. M., Portmann, E., Angeleri, G., Gurni, A., y Carballo, M. A. (2009). Biomarcadores para evaluación de genotoxicidad potencial. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(2), 154-159. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85611769014.pdf>

Luján-Hidalgo M.C., Gutiérrez-Miceli F.A., Ventura-Canseco L.M.C., Dendooven L., Mendoza-López M.R., Cruz-Sánchez S., García-Barradas O., y Abud-Archila M. (2012). Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hojas de *Bursera graveolens* y *Taxodium mucronatum* de Chiapas, México. *Gayana Botanica*, (69) 7-14. <https://www.researchgate.net/>

publication/287447948_Chemical_composition_and_antimicrobial_activity_of_Bursera_graveolens_and_Taxodium_mucronatum_essential_oils_from_Chiapas_Mexico

Lustre-Pereyra, A. (2022). Metabolitos secundarios: las respuestas de las plantas ante el estrés. *Revista Digital Universitaria (RDU)*, 23(2). https://www.revista.unam.mx/wp-content/uploads/v23_n2_a10.pdf

Ma, T.-H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H., Rabago, E. V., Arreola, G. A., & Zhang, H. (1995). The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 334(2), 185-195. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)90010-1)

Mendoza, N., Pérez-Valera, O., Nieto-Camacho, A., Ramírez-Apan, M. T., Téllez-Martínez, M. G., Escamilla-Silva, E. M., & Delgado, G. (2026). Chemical Constituents of *Taxodium mucronatum* (Cupressaceae) and Some of Its Endophytic Fungi, and Their In Silico and In Vitro Evaluations as SARS-CoV-2 Inhibitors and as Cytotoxic Agents. *Chemistry & Biodiversity*, 23(3), Artículo e03702. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202503702>

Naiman, R., Décamps, H., & Pollock, M. (1993). The role of riparian corridors in maintaining regional biodiversity. *Ecological Applications*, 3(2), 209-212. <https://doi.org/10.2307/1941822>

Onofre-Hurtado, L. F., Bustamante-García, R., Gómez-Martínez, A. E., Rivera-Huerta, M., Gracia-Mora, I., & Carballo-Villalobos, A. I. (2023). Efecto antiinflamatorio de la combinación de los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Taxodium huegelii* 16 en ratas Wistar usando un modelo de edema plantar. *Ambiens Techné et Scientia México*, 251-271 <https://atsmexico.org/atsm/article/view/166/211>

Pan, X., Tan, N., Zeng, G., Zhang, Y., & Jia, R. (2005). Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human Cathepsin B. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(20), 5819–5825. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.05.071>

Pérez-Almeida, I., Requena-Rondón, F., & Pinero, G. (2022). Riesgos y beneficios de los metabolitos secundarios vegetales para la alimentación animal y humana. *Revista de Investigación Hatun Yachay Wasi*, 1(2), 127-142. <https://doi.org/10.57107/hyw.v1i2.30>

Perrusquia, M., Mendoza, S., Bye, R., Linares, E., & Mata, R. (1995). Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology*, 46(1), 63–69. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01230-b](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01230-b)

Prieto, Z., Fernández, R., León-Incio, J., Quijano-Jara, C., & Vallejo-Rodríguez, R. (2008). *Genotoxicidad del dicromato de potasio en meristemos radiculares y meiocitos de Vicia faba*. *Arnaldoa* 15(2): 217 - 226, url={<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:82906968>}

Rzedowski, J. (2006). *Vegetación de México* (1.^a ed. digital). Capítulo 19. Vegetación acuática y subacuática. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, 340-364 https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/VegetacionMx_Cont.pdf

Su, Z., Yuan, W., Wang, P., & Li, S. (2013). Ethnobotany, phytochemistry, and biological activities of *Taxodium* Rich. *Pharmaceutical Crops*, 4(1), 1-14. DOI: 10.2174/2210290601304010001

Torres-Rodríguez, M. L., García-Chávez, E., Soto-Peña, G. A., Aradillas-García, C., & Cubillas-Tejeda, A. C. (2016). Evaluación de la toxicidad aguda in vivo del extracto etanólico y acuoso de *Calea urticifolia*. *Botanical Sciences*, 94(1), 133-140. <https://doi.org/10.17129/botsoci.191>

Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas* (2.^a ed.). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1002/pauz.19970260314>

CAPÍTULO 4

MEMBRANAS A BASE QUITOSANO-ALCOHOL POLIVINÍLICO CON DIVERSAS TOPOGRAFÍAS PARA EL MANTENIMIENTO DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES¹

Data de submissão: 26/08/2026

Data de aceite: 14/09/2026

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, México
<https://orcid.org/0000-0002-8287-8823>

Francisco Josué Avelar Rodríguez

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, México
<https://orcid.org/0000-0002-1222-1471>

Zaira Yunuen Carvajal García

Doctora en Farmacia
Investigación en Biomateriales en la
Unidad de Biotecnología Médica y
Farmacéutica del
Centro de Investigación y
Asistencia en Tecnología y
Diseño del Estado de Jalisco. CIATEJ
Guadalajara, México
<https://orcid.org/0000-0002-9216-0612>

Flor Yohana Flores Hernández

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

RESUMEN: En este trabajo se sintetizaron biomateriales a base de quitosano (CTS)/ alcohol polivinílico (PVA) mediante evaporación del disolvente, con el fin de obtener membranas con diferentes topografías para el mantenimiento y crecimiento de células madre mesenquimales (hMSC) derivadas del cordón umbilical, tejido adiposo y pulpa dental. La topografía de las membranas obtenidas se analizó mediante microscopía de fuerza atómica. El comportamiento de las células mesenquimales cultivadas en

¹ Agradecimientos a los programas por el apoyo económico otorgado. El trabajo fue financiado parcialmente por Proyecto 233146 CONAHCYT-SSA-IMSS-ISSSTE. Nuestro agradecimiento a la Dra. Maria José Rivas, en el laboratorio de Biotecnología y Bioprocesos, del edificio de Medicina y Salud del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey en Guadalajara. Se agradece al Dr. Gabriel Luna Bárcenas del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional CINVESTAV en Querétaro.

los materiales se supervisó mediante técnicas de microscopía óptica. Se obtuvieron membranas con superficies lisas, surcos lineales y celdas hexagonales, que mostraron una elevada higroscopicidad al exponerse a medios acuosos. Se demostró que las células mesenquimales cultivadas en las membranas eran viables a las 24 horas; sin embargo, mantuvieron una morfología esférica, formando conglomerados. Al realizar subcultivos de estas hMSC en cajas de cultivo, adquirieron una morfología fibroblástica típica y proliferaron en las cajas; es decir, las células mesenquimales mantuvieron su viabilidad y tuvieron la capacidad de volverse a adherir al sustrato de cultivo. Por lo tanto, las membranas de CTS/PVA podrían utilizarse como posibles vehículos o portadores de células madre mesenquimales para la administración de materiales biológicos y la terapia celular en medicina regenerativa.

PALABRAS CLAVE: células troncales mesenquimales; membranas; quitosano; alcohol polivinílico.

MEMBRANES BASED ON CHITOSAN-POLYVINYL ALCOHOL WITH VARIOUS TOPOGRAPHIES FOR THE MAINTENANCE OF MESENCHYMAL STEM CELLS

ABSTRACT: In this study, chitosan (CTS) and polyvinyl alcohol (PVA) biomaterials were synthesized via solvent evaporation to produce membranes with different topographies for the maintenance and growth of mesenchymal stem cells (hMSCs) derived from umbilical cord, adipose tissue, and dental pulp. The topography of the resulting membranes was analyzed using atomic force microscopy. The behaviour of mesenchymal cells cultured on the materials was monitored using optical microscopy. Membranes with smooth surfaces, linear grooves, and hexagonal cells were obtained, all of which exhibited high hygroscopicity when exposed to aqueous media. It was demonstrated that mesenchymal cells cultured on the membranes remained viable after 24 hours; however, they maintained a spherical morphology and formed clusters. When these hMSCs were subcultured in culture dishes, they acquired a typical fibroblastic morphology and proliferated, maintaining their viability and adhesion properties. Therefore, CTS/PVA membranes could serve as potential vehicles or carriers for mesenchymal stem cells for the delivery of biological materials and cell therapy in regenerative medicine.

KEYWORDS: mesenchymal stem cells; membranes; chitosan; polyvinyl alcohol.

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de las células troncales como base en terapia celular impulsa la medicina regenerativa. La administración de fármacos asistida por material biológico y la terapia celular se han estudiado cada vez más en los últimos años. (Hussen BM., et al., 2024). Un vehículo o acarreador adecuado, no solo puede proteger a las células madre de agresiones mecánicas y prevenir la migración fuera de los sitios objetivo, sino que también, les proporciona condiciones de crecimiento adecuadas.

En este sentido, el microambiente de las células troncales juega un papel importante en la iniciación y regulación de su diferenciación (Qu, Fu, Han, & Sun, 2019). Ese comportamiento es modulado por propiedades de los biomateriales tales como el tamaño de poro, la topografía, la geometría y la rigidez; éstas promueven la distribución celular, la adhesión, la migración, la morfología, la proliferación y finalmente la diferenciación hacia estirpes con alto valor para su uso en la regeneración de diversos tejidos, como cartilago, óseo, dental, pancreático, entre otros. (Jingming Gao et al., 2022; Qu et al., 2019)

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético, hidrofílico y biocompatible, incoloro e inodoro, preparado mediante la hidrólisis del poli(acetato de vinilo), donde los grupos acetato se reemplazan por hidroxilos (Pugar D. et al., 2024), por otro lado, el quitosano (CTS), un polisacárido natural derivado de la quitina (Gholap AD. Et al., 2023), ambos son utilizados para diferentes aplicaciones en la ingeniería de tejidos. Estos materiales son útiles en biotecnología médica y farmacéutica, como excipiente, adhesivo, formador de películas, matriz, en preparaciones oftálmicas y medicamentos de liberación controlada, entre otras diversas aplicaciones. (Martínez-Vela, L. et al., 2026). Sin embargo, algunas de ellas requieren mejoras en las propiedades mecánicas y topográficas, para lo cual se han modificado mediante agentes químicos reticulantes como el glutaraldehído o la epíclorhidrina y se han utilizado moldes metálicos (Pugar D. et al., 2024; Garnica-Palafox IM et al., 2014).

Por lo anterior, en este trabajo se planteó utilizar biomateriales a base de quitosano y alcohol polivinílico tipo membranas con diversas topografías, que puedan ser utilizados como soportes en medicina regenerativa para el mantenimiento de células troncales mesenquimales humanas (hMSCs). La respuesta celular fue analizada mediante métodos de cultivo celular, microscopía óptica y de fuerza atómica.

2. METODOLOGÍA

2.1. PREPARACIÓN DE LOS BIOMATERIALES A BASE DE CTS-PVA

Para la preparación de las membranas de CTS y PVA se siguió lo descrito por (Garnica-Palafox et al., 2014).

Supensiones poliméricas: Se preparó una suspensión de quitasol al 2.5% p/v en una solución de ácido acético 0.4 M (2.5g en 100 mL de ácido acético 0.4 M) y de dejó en agitación mecánica por 2 horas. La suspensión de PVA se preparó al 7.8% p/v en agua destilada a 90°C manteniendo en agitación magnética por 2 h.

La mezcla de CTS-PVA se preparó en una proporción 4 a 3 respectivamente, dejando en agitación por 2 horas. Se pesaron 100 g de esta mezcla y se procedió al entrecruzamiento químico con epiclorhidrina, se llevó en baño maría a 40 °C y con agitación magnética constante durante 30 minutos, se añadieron 2.85mL de NaOH 1M (por cada 100 g de mezcla CTS-PVA) como catalizador, agitando por 10 minutos, después se añadieron 750 µL de ECH y se dejó en agitación durante 1 h.

2.2. FORMACIÓN DE LAS MEMBRANAS DE CTS-PVA CON DIFERENTES TOPOGRAFÍAS

Esta mezcla fue agregada a placa de cultivo Petri de 10 centímetros de diámetro para formar la membrana, dejando secar a 37°C por 24 horas. Se realizaron 13 lavados con agua destilada para retirar ácido acético y epiclorhidrina residuales.

Se generaron membranas con tres diferentes topografías superficiales utilizando moldes metálicos para crear: superficies lisas, surcos lineales en altorrelieve y celdas hexagonales. Para ello se vertieron 15 mL de la mezcla en una caja Petri de 10 cm de diámetro y se colocaron los moldes metálicos con la finalidad de obtener las topografías deseadas. Se dejaron secando por aproximadamente 2 horas a 60 °C y se desprendieron de los moldes metálicos cuidadosamente.

Las membranas se recortaron de acuerdo con las dimensiones del tamaño del pozo de cultivo de 2 cm², se realizaron 13 lavados con agua estéril, y se colocaron sobre el fondo de cada pozo y se procedió al entrecruzamiento físico por radiación UV empleando un crosslinker CL-1000 (254 nm y 1.6 Joules/cm²) para su esterilización (Garnica-Palafox et al, 2014).

2.3. CAPACIDAD DE CAPTACIÓN DE AGUA

Para evaluar la capacidad de hidratación, se dejaron secar a 37°C por 24 horas, volviendo a rehidratar con agua destilada, PBS o medio, después de 20 días se corroboró degradación, para ello se utilizó la siguiente formula;
$$\text{Water absorption (\%)} = \frac{(S - W)}{W} \times 100$$

2.4. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)

Las muestras circulares con 5 milímetros de diámetro con las topografías superficies lisas, surcos lineales y celdas hexagonales fueron examinadas usando un microscopio de fuerza atómica en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en Querétaro.

2.5. CULTIVO DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

Las células troncales mesenquimales de cordón umbilical (hUCMS) y tejido adiposo (hAMSCs) fueron adquiridas del banco ATCC (American Type Culture Collection PSC-500-010 y PSC-500-011 respectivamente), las células de pulpa dental (hDPMSCs) fueron aisladas de un tercer molar donado bajo consentimiento informado por un paciente de 22 años, sexo masculino, siguiendo los protocolos de ética. Se procedió a fenotipificar su estirpe identificando marcadores mesenquimales de membrana para CD90, CD105 y CD44, así como marcadores hematopoyéticos, por citometría de flujo, y se realizó la diferenciación a linajes del mesodermo (osteoblastos, adipocitos y condrocitos), según la sociedad internacional de terapia celular (ISCT), se utilizaron medio comerciales marca SIGMA ya formulados y posteriores tinciones de rojo oleoso (adipocitos), azul alciano (fibras de colágeno) y Von Kossa (depósitos de calcio). Todas las células mesenquimales fueron cultivadas en medio DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), incubadas a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%.

2.6. CULTIVO CELULAR EN LAS MEMBRANAS DE PVA-CTS ENTRECRUZADAS

Las membranas se sometieron a una segunda exposición de radiación ultravioleta por veinte minutos dentro de un área estéril (campana de flujo laminar); después se agregó 1 mL de suspensión celular con 62,500 células a cada uno de los pozos, dejándolas en cultivo a 37°C con 5% de CO₂, en humedad relativa. Se evaluó la morfología celular mediante microscopía óptica y se obtuvieron imágenes empleando una cámara marca Optika digital, dando un seguimiento durante 15 días.

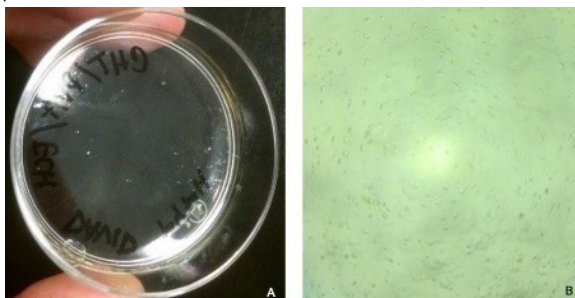
3. RESULTADOS

3.1. EVALUACIÓN DE LA MEMBRANA DE QUITOSANO Y ALCOHOL POLIVINÍLICO

Se produjo una película homogénea a la cual se le evaluó el pH (figura 1), para verificar que el material contara con un pH cercano a 7, lo cual se logró, esto es relevante ya que las células se mantienen viables a pH cercanos a pH fisiológico.

Por otro lado, el tratamiento de superficie con ácido acético y posteriores lavados influyó directamente en la estabilidad de las películas CTS-PVA, las cuales no se expandieron al ser rehidratadas manteniéndose sin deformaciones.

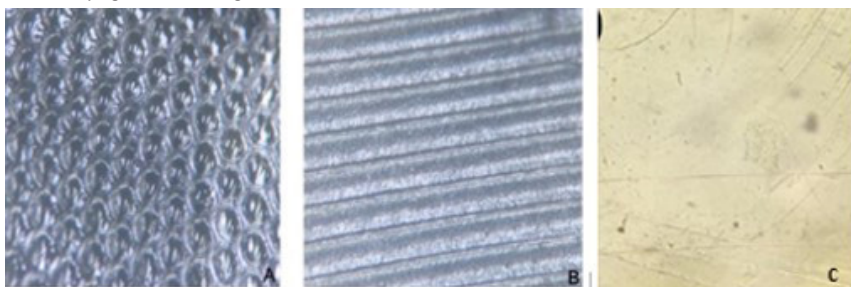
Figura 1. Placa Petri con membrana de CTS-PVA. (A): Se puede observar la membrana con topografía lisa. (B): Fotografía de microscopía de la membrana hidratada a un aumento de 200X.



3.2. MOLDEADO DE QUITOSANO Y ÁCIDO POLIVINÍLICO CON DIFERENTES TOPOGRAFÍAS

Las películas del biomaterial fueron impresas, logrando las topografías deseadas, únicamente la topografía lineal sufrió un moldeo menos uniforme que la topografía hexagonal, esto fue perceptible por microscopía, como se muestra en la figura 2. Esto fue verificado por AMF.

Figura 2. Fotografías de microscopía estereoscópica a un aumento de 20X de las membranas de biomaterial (A): Moldeado con topografía de hexagonal, (B): moldeado lineal. (C) Lisas.



3.3. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM).

Para la caracterización de las membranas por AFM se obtuvieron mediciones relativas a su topografía, que corresponden a dimensiones de rugosidad, número de orificios ordenados de acuerdo con su volumen, perímetro y áreas, así como número de eventos de diferentes alturas medidas. Las películas mostraron en general superficies uniformes respecto a su aspecto macroscópico.

Las imágenes generadas por el software son gráficos en dos y tres dimensiones que muestran las medidas longitudinales, la máxima altura topográfica detectada en la región digitalizada y una barra de tonalidades que muestra cómo se da la texturización de la imagen por colores. En seguida se muestran gráficos que agrupan en barras el

número de eventos detectado según la altura (en inglés *height*), el número de agujeros detectado según su perímetro (en inglés *perimeter*), según su volumen y su área, así como su localización dentro de la región digitalizada (figura 3). El AMF muestra que la superficie hexagonal presenta mayor uniformidad que las topografías lisa y lineal, es decir, la porosidad y el conteo de agujeros son considerablemente menores en comparación con las topografías lisa y lineal. En una comparativa las dimensiones de los agujeros detectados eran similares tanto en largo, ancho y profundidad, que alcanzarían un micrómetro de longitud (figura 3, tabla 1), mientras que la topografía hexagonal presenta la mayor rugosidad (RMS) calculada, por lo que se postula como la topografía que más favorecería a la adhesión celular debido a que tendría una mayor superficie de contacto (figura 4).

Tabla 1. Comparativa de los promedios de las mediciones realizadas a las superficies lisa, lineal y en panal.

Topografía	Rugosidad RMS	Agujeros		
		Área máx. (nm ²)	Perímetro máx. (nm)	Volumen máx. (nm ³)
Lineal	8.32			
Lisa	22.45	16637.5	968.75	377500
Panal	64.66	16562.5	375	140000

Figura 3. Comparativa de diversos acercamientos en las películas lisa (columna A), lineal (columna B) y de celdas (columna C) por microscopía de fuerza atómica con longitudes de 20, 10, 5, 3 y 1 μm por lado.

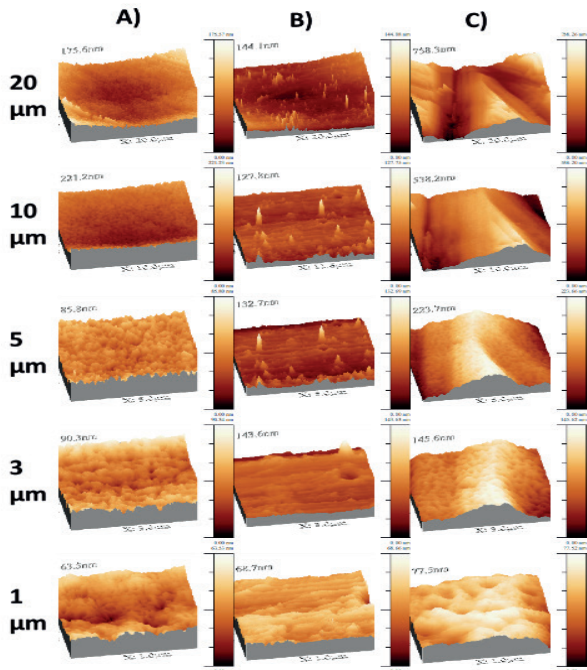
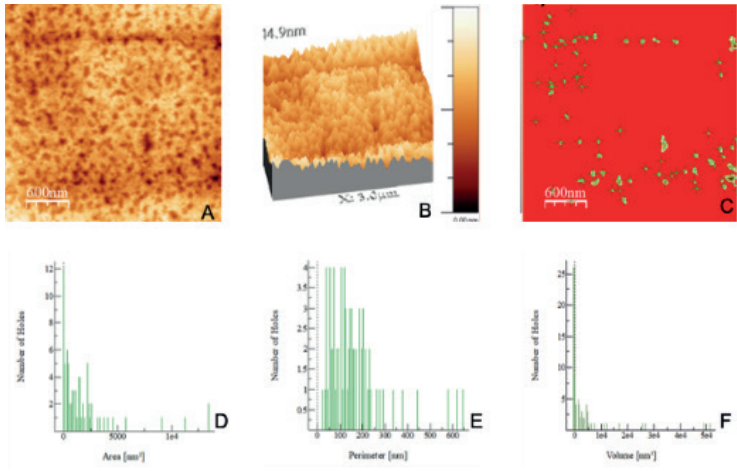


Figura 4. Representación gráfica de una región de $3 \times 3 \mu\text{m}$ con topografía hexagonal. (A): Alturas máximas de 44.9 nm bidimensional; (B): Altura tridimensional; (C): Agujeros localizados en la misma región; (D): Áreas menores a 2500 nm^2 ; (E): Perímetros inferiores a 250 nm y (F): Volúmenes por debajo de 5000 nm^3 .

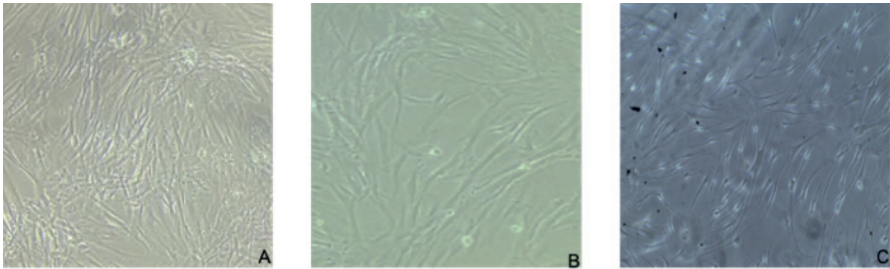


3.4. CULTIVO Y VERIFICACIÓN CELULAR

Todas las células troncales mesenquimales (hMSCs) fueron cultivadas de forma estándar en botellas de cultivo 25 cm^2 , a las 24 h mostraron una confluencia de entre 40 y 60% en 25 cm^2 .

Las hAMSCs y hUMSCs que fueron adquiridas de la casa comercial ATCC contaban con un certificado de análisis que estipula que fueron evaluadas y cumplieron con las especificaciones que solicita la sociedad internacional para la terapia celular (ISCT) para la estirpe de células troncales mesenquimales.

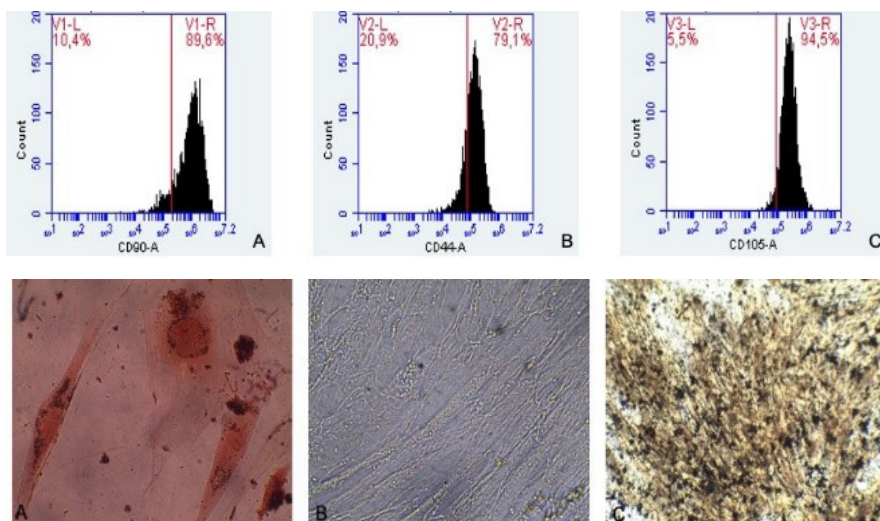
Figura 5. Fotografías de microscopía óptica con un aumento de $200\times$ de los cultivos de células troncales mesenquimales. (A): Cordón umbilical (B): Tejido adiposo y (C): Pulpa dental.



Por otra parte, las DPSC adquiridas de exodoncia fueron capaces de diferenciarse a adipocitos, condrocitos y osteocitos y mostraron porcentajes positivos a marcadores mesenquimales en un 89.6% para CD90, 79.1% para CD44 y CD105

94.5%, también se pueden observar con las tinciones de rojo oleoso las vesículas de lípidos, las fibras de colágeno con la tinción de azul alciano, y depósitos de calcio con tinción Von Kossa (figura 6), por lo anterior las células de pulpa dental cuentan con las características solicitadas por la ISCT para ser consideradas como mesenquimales. (Martin, Ireland, Baldomero, & Passweg, 2014).

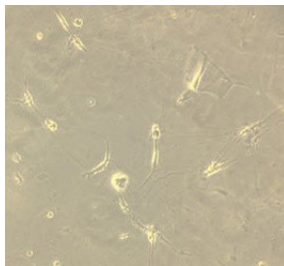
Figura 6. En la parte superior se muestran los histogramas con los porcentajes de positividad de cada marcador mesenquimal (colocando como límite la autofluorescencia). En la parte inferior se observan las imágenes de las diferentes diferenciaciones. A. Rojo oleoso; B. Azul alciano y C. Von Kossa.



3.5. CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES SOBRE UNA SUPERFICIE DE QUITOSANO CON ALCOHOL POLIVINÍLICO

Al exponer las hMSCs a las membranas de los biomateriales, estas mostraron mantenerse estables, manteniendo morfología habitual esférica al estar en suspensión. Aunque se logró mantener una película adecuada para poder colocar células troncales al inocular las células al as 24 horas se observó una mínima adherencia celular, figura 7; es por ello en este material se probaron diversas topografías con la finalidad de incrementar la adhesión celular y a su mantenimiento en este biomaterial ya que para otros tipos celulares estas formulaciones han dado buenos resultados como sustrato de cultivo como lo mencionó Melgarejo-Ramírez, Y. et., al en el 2014.

Figura 7. Fotografía de microscopía óptica de los cultivos de células troncales mesenquimales de tejido adiposo expuestas a las superficies de CTS-PVA a las 24 horas en las que podemos observar escasa adherencia a un aumento de 200X.

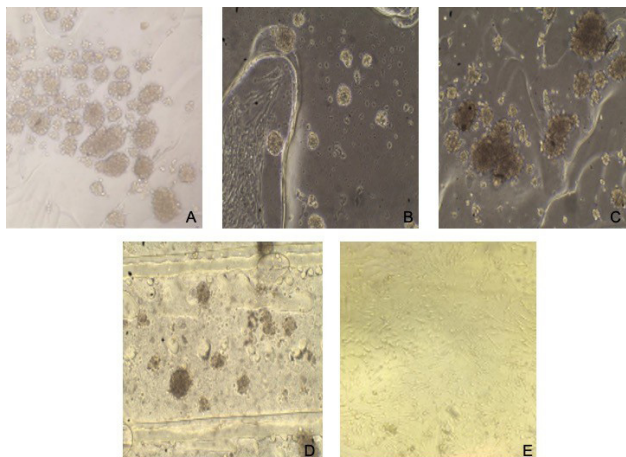


3.6. ADAPTACIÓN DE LAS DIFERENTES TOPOGRAFÍAS DE QUITOSANO CON ALCOHOL POLIVINÍLICO EN PLACAS DE CULTIVO

Las células se adhirieron en la periferia libre de la película, demostrando que sí permite la proliferación celular en el entorno. El biomaterial no demostró capacidad de promover la adherencia de hMSC's, se observó la formaron conglomerados celulares (figura 8), con prolongaciones originadas de la parte inferior anclándolas a la superficie de las membranas de CTS-PVA. Por lo que éste fenómeno se presenta como una oportunidad para estudiar los efectos diferidos sobre células somáticas como las utilizadas en el trabajo publicado por (Garnica-Palafox et al., 2014).

En nuestro caso, se pudieron observar agregados celulares en la película de topografía lisa, mientras que en la película de topografía hexagonal se presentó proliferación celular.

Figura 8. Fotografías de microscopía óptica a un aumento de 200X de los cultivos de células troncales mesenquimales de tejido adiposo expuestas a las membranas. (A): Grumos celulares en la membrana de topografía lisa; (B): Agujeros en la película de topografía lisa con proliferación celular; (C): Grumos celulares en la película de topografía hexagonal; (D): Grumos celulares en la película de topografía lineal; (E): Cultivo control con grumo celular con prolongaciones sobre la película con topografía hexagonal.



4. CONCLUSIÓN

Las hMSC's cultivadas sobre las membranas de PVA-CTS entrecruzadas con ECH mantenían una morfología esférica, formando conglomerados celulares. A pesar de que no hubo adhesión celular, las células mantuvieron su capacidad de proliferación. Al subcultivar las células expuestas a las membranas de CTS-PVA-ECH, en cajas de cultivo ausentes de membranas, estas volvieron a adherirse, adquirir su morfología fibroblastoide típica y proliferar, es decir, las células mesenquimales mantuvieron su viabilidad y la propiedad de adhesión. Por lo que, las membranas podrían ser empleadas como potenciales vehículos/acarreadores de hMSC's para aplicaciones en la administración de material biológico y terapia celular en medicina regenerativa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Garnica-Palafox, I. M., Sánchez-Arévalo, F. M., Velasquillo, C., García-Carvajal, Z. Y., García-López, J., Ortega-Sánchez, C., ... Solís-Arrieta, L. (2014). Mechanical and structural response of a hybrid hydrogel based on chitosan and poly(vinyl alcohol) cross-linked with epichlorohydrin for potential use in tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(1), 32–50. <https://doi.org/10.1080/09205063.2013.833441>

Gholap AD, Rojekar S, Kapare HS, Vishwakarma N, Raikwar S, Garkal A, Mehta TA, Jadhav H, Prajapati MK, Annapure U. Chitosan scaffolds: Expanding horizons in biomedical applications. *Carbohydr Polym.* 2024 Jan 1;323:121394. doi: 10.1016/j.carbpol.2023.121394

Hussen BM, Taheri M, Yashooa RK, Abdullah GH, Abdullah SR, Kheder RK, Mustafa SA. Revolutionizing medicine: recent developments and future prospects in stem-cell therapy. *Int J Surg.* 2024 Dec 1;110(12):8002-8024. doi: 10.1097/JS9.0000000000002109

Jingming Gao, Xiaoye Yu, Xinlei Wang, Yingning He, Jiandong Ding, Biomaterial-Related Cell Microenvironment in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Engineering, Volume 13, 2022, Pages 31-45, ISSN 2095-8099, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.11.025>.

Martin, I., Ireland, H., Baldomero, H., & Passweg, J. (2014). The Survey on Cellular and Engineered Tissue Therapies in Europe in 2012. *Tissue Engineering Part A*, 21(1–2), 1–13. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0515>

Martínez-Vela, L. d. J., Montero-Cortés, M. I., Qui-Zapata, J. A., Farias-Cervantes, V. S., López-Velázquez, J. C., Chávez-Rodríguez, A. M., Barba-Godínez, J. M., & García-Carvajal, Z. Y. (2026). Gelatin–Chitosan–PVA Hydrogels Incorporating *Trichoderma* and Their Application in the Control of Phytopathogens. *Gels*, 12(2), 144. <https://doi.org/10.3390/gels12020144>.

Melgarejo-Ramírez, Y., Sánchez-Sánchez, R., García-Carvajal, Z., García-López, J., Gutiérrez-Gómez, C., Luna-Barcenas, G., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2014). Biocompatibility of Human Auricular Chondrocytes Cultured onto a Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Epichlorohydrin-Based Hydrogel for Tissue Engineering Application. *International Journal of Morphology*, 32(4), 1347-1356. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022014000400036>

Pugar, D., Haramina, T., Leskovac, M., & Ćurković, L. (2024). Preparación y caracterización de películas de mezcla de polímeros de poli(alcohol vinílico)/quitosano reticuladas químicamente con glutaraldehído: investigaciones mecánicas y térmicas. *Molecules*, 29 (24), 5914. <https://doi.org/10.3390/molecules2924591>

Qu, H., Fu, H., Han, Z., & Sun, Y. (2019). Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review. *RSC Advances*, 9(45), 26252–26262. <https://doi.org/10.1039/c9ra05214c>

Rongji Liang, Jiayou Chen, Jingtao Huang, Penghua Fu, Zhijian Shi, Yaohang Yue, Haojian Wang, Haochi Lun, Quan Lin, Fuyang Cao, Hui Zeng, Xintao Zhang, Jianjing Lin, Injectable microsphere-based delivery strategies for stem cells and their derivatives in tissue regeneration, *Bioactive Materials*, Volume 66, 2026, Pages 428–468, ISSN 2452-199X, <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2026.07.005>.

Xu, B., Fan, D., Zhao, Y., Li, J., Wang, Z., Wang, J., Wang, Z., Guan, Z., Niu, B. (2020) Three-dimensional culture promotes the differentiation of human dental pulp mesenchymal stem cells into insulin-producing cells for improving the diabetes therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 10 (January), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01576>

Zhu, B., Liu, W., Zhang, H., Zhao, X., Duan, Y., Li, D., Jin, Y. (2017). Tissue-specific composite cell aggregates drive periodontium tissue regeneration by reconstructing a regenerative microenvironment. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(6), 1792-1805. <https://doi.org/10.1002/term.2077>

CAPÍTULO 5

USO DE ACEITES OZONIZADOS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS

Data de submissão: 25/08/2026

Data de aceite: 10/09/2026

Gloria Paulina Monterrubio-López

Instituto Politécnico Nacional
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Departamento de Microbiología
Ciudad de México
<https://orcid.org/0000-0002-2651-3977>

Ricardo Monterrubio-López

Instituto Politécnico Nacional
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Departamento de Ingeniería Bioquímica
Ciudad de México
<https://orcid.org/0000-0003-4473-4199>

RESUMEN: Los aceites ozonizados son aceites naturales que han sido transformados por el ozono y contienen moléculas que funcionan como antimicrobianos y estimulan la regeneración de tejidos, por lo que son utilizados en el tratamiento de patologías que afectan sobre todo la dermis y mucosas; los más empleados son el aceite de girasol y el de oliva. El objetivo de la investigación fue comparar el porcentaje de reducción microbiana de tres aceites: oliva, girasol y aguacate, ozonizados y sin ozonizar, a distintos

tiempos de exposición mediante una técnica de reto microbiano. El aceite de oliva y el de aguacate presentaron un mayor porcentaje de reducción microbiana que el aceite de girasol. No se encontró diferencia aparente entre las bacterias Gram negativas o positivas, ni entre cepas sensibles o resistentes a fármacos. En la levadura *Candida albicans* se observó una mayor diferencia entre el porcentaje de reducción del aceite ozonizado y el no ozonizado, aunque fue la que presentó los valores de reducción menores en comparación con las bacterias. En la cinética de reducción microbiana, a partir de los 10 minutos de exposición de los aceites ozonizados, se alcanzaron porcentajes de reducción mayores al 95% en la cepa de *Escherichia coli*. Los aceites sin ozonizar mostraron tener un efecto antimicrobiano *per se*, atribuido a distintas moléculas presentes de manera natural en los aceites, sobre todo de oliva y aguacate. Los buenos resultados obtenidos con el aceite de aguacate impulsan a continuar con su estudio en futuras determinaciones. Dado el problema tan grave de salud pública relacionado con la resistencia a antibióticos que se está viviendo en el mundo, los aceites ozonizados son una alternativa que puede ayudar complementando las terapias de los pacientes, a un bajo costo y con menores efectos secundarios.

PALABRAS CLAVE: aceite ozonizado; antimicrobiano; aceite de oliva; aceite de girasol; aceite de aguacate.

ABSTRACT: Ozonated oils are natural oils structurally transformed by ozone, containing bioactive molecules with antimicrobial properties and tissue-regenerative potential. They are widely applied in pathologies affecting the dermis and mucosal surfaces, with sunflower and olive oils being the most commonly used. The aim of this study was to compare the microbial reduction percentage of three oils: olive, sunflower and avocado, both ozonated and non-ozonated, at different exposure times using a microbial challenge assay. Olive and avocado oils exhibited higher microbial reduction percentages compared to sunflower oil. No apparent differences were observed between Gram-negative and Gram-positive bacteria, nor between drug-sensitive and drug-resistant strains. In *Candida albicans*, a greater difference was noted between ozonated and non-ozonated oils, although this yeast showed the lowest reduction values compared to bacteria. In the microbial reduction kinetics, it was observed after 10 minutes of exposure, that all ozonized oils achieved microbial reduction rates above 95%. Non-ozonized oils also demonstrated intrinsic antimicrobial activity, attributed to naturally occurring molecules, particularly in olive and avocado oils. The promising results obtained with avocado oil encourage further investigation in future studies. Considering the global public health challenge posed by antibiotic resistance, ozonated oils represent a cost-effective alternative that may complement patient therapies with fewer side effects.

KEYWORDS: ozonated oils; antimicrobial agent; sunflower oil; olive oil; avocado oil.

1. INTRODUCCIÓN

Los aceites ozonizados son compuestos elaborados a partir del burbujeo de ozono en distintos tipos de aceites naturales, los más utilizados y estudiados son los de oliva y girasol, sin embargo, también se han desarrollado análisis con aceites de nuez, arroz, maíz, mostaza, soya, semillas de uvas, entre otros. Su principal uso es en el área médica, para el tratamiento de patologías en piel, odontológicas, ginecológicas y gástricas, ya que tienen efectos antimicrobianos así como de regeneración de tejidos y antiinflamatorios (De Almeida *et al.*, 2012; Martínez-Sánchez, 2021; Ugazio *et al.*, 2020). También se ha iniciado su investigación en otras aplicaciones como en la conservación de alimentos y control de plagas en la agricultura (Aura *et al.*, 2025; Dominguez-Lacueva *et al.*, 2026).

Hasta el momento no se ha identificado que este tipo de compuestos tengan efectos secundarios ni tampoco que generen fenómenos de resistencia antimicrobiana, adicionalmente, son fáciles de aplicar y de bajo costo, lo que los hace una gran alternativa para emplearse en el cuidado de la salud (Colombo *et al.*, 2018).

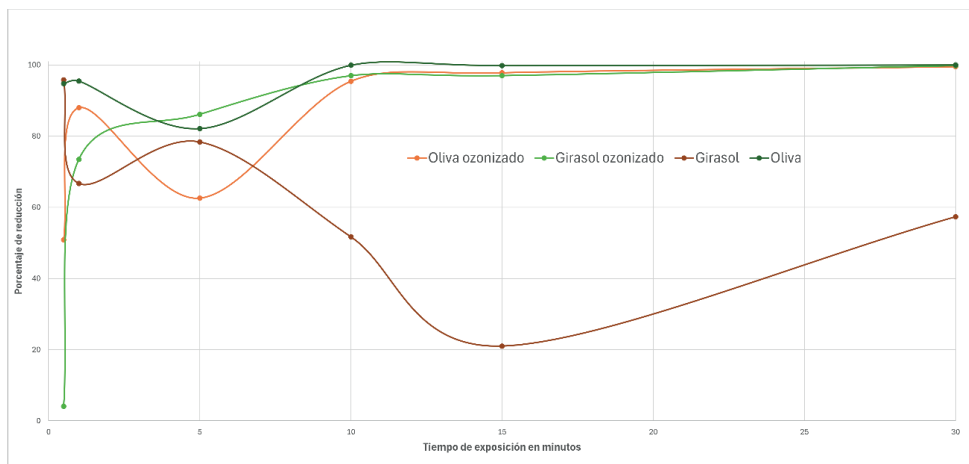
El aceite ozonizado de aguacate no ha sido evaluado como agente antimicrobiano, sin embargo, en nuestro país es un elemento de alta producción e interés cultural, el cual es interesante de investigar. El objetivo de la investigación fue comparar el porcentaje de reducción microbiana de tres aceites: oliva, girasol y aguacate, ozonizados y sin ozonizar, a distintos tiempos de exposición mediante una técnica de reto microbiano, bajo la hipótesis de que, a mayor contenido de lípidos poliinsaturados, mayor generación de compuestos antimicrobianos.

2. DETERMINACIONES ANTIMICROBIANAS

Existen diferentes metodologías que permiten evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de una sustancia: métodos de difusión, con el uso de sensidiscos, y métodos de dilución, donde se incluyen la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC), siendo éstas últimas las más empleadas; sin embargo, los métodos no tienen la misma sensibilidad y los resultados pueden estar influenciados por el grado de solubilidad del compuesto (Ramírez y Marín, 2009). En el caso de los aceites ozonizados que se emplean para uso dérmico, éstos deben evaluarse mediante la técnica de reto microbiano según la Norma Mexicana NMX-BB-040-SCFI-1999, para demostrar su efecto germicida, en donde se incluyen tiempos específicos de exposición al agente utilizando una alta concentración de microorganismos para simular condiciones de peor caso.

En nuestro laboratorio se aplicó la técnica de reto microbiano con una cepa de *Escherichia coli* aislada de una úlcera de pie y ajustada a una concentración de 10^8 UFC/mL, utilizando diferentes tiempos de exposición. Los aceites empleados fueron ozonizados durante cuatro horas a 38°C con un flujo de gas de ozono de $\frac{3}{4}$ de litro por minuto, llegando a una concentración final de 35 µg/mL. Para poder detener la reacción del agente antimicrobiano en el tiempo especificado, se empleó un neutralizante, conformado por la mezcla de Tween 80, lecitina de soya y tiosulfato de sodio; este neutralizante fue evaluado previamente para demostrar que no fuera tóxico para los microorganismos analizados. Se realizaron los ensayos de reto y se comparó el efecto del aceite de oliva y girasol ozonizados con los no ozonizados obteniéndose los resultados que se muestran en la Figura 1.

Figura 1. Cinética de reducción microbiana de *E. coli* con aceites de oliva y girasol ozonizados y sin ozonizar. Elaboración propia.



En nuestros resultados se observa un incremento importante en el efecto antimicrobiano del aceite de girasol ozonizado a partir del primer minuto de exposición, comparado con el aceite de girasol no ozonizado, sin embargo, este efecto no se ve en el aceite de oliva, ya que incluso el aceite sin ozonizar presenta un valor de reducción antimicrobiana mayor que el ozonizado y que el de girasol. Es difícil comparar estos resultados con los obtenidos por otros grupos de investigación, debido a la metodología empleada, ya que la mayoría determina la MIC.

Vieira y colaboradores en el 2025 realizaron un trabajo utilizando una técnica parecida, exponiendo también a diferentes tiempos, pero únicamente evalúan aceite de girasol ozonizado, por lo que no se puede ver la comparación con el resto de los aceites ozonizados y sin ozonizar, además de realizar la prueba hasta los dos minutos, mientras que nosotros prolongamos el análisis hasta los 30 minutos. Los porcentajes de reducción que obtuvieron son mucho mayores que los nuestros y esta diferencia puede deberse a múltiples factores: el tipo de aceite empleado en cuanto a su origen y pureza, las condiciones de conservación del aceite y el grado de ozonización derivado del uso de distintos equipos y de variaciones en los tiempos y técnicas de burbujeo. Ellos manejaron una concentración de 60 $\mu\text{g/mL}$ en el aceite ozonizado, a diferencia de nosotros que obtuvimos una concentración de 35 $\mu\text{g/mL}$, lo anterior indica que, según los porcentajes de reducción obtenidos, los aceites de oliva permitirían generar una reducción microbiana igual o mayor que el de girasol con un costo menor de ozonización.

Es interesante observar en nuestra cinética que existe un efecto antimicrobiano en los primeros minutos que disminuye y posteriormente vuelve a incrementarse,

manteniéndose estable y alcanzando su nivel máximo en casi todos los aceites a los 30 minutos. Es por lo que, realizamos nuevamente la técnica de reto microbiano, pero ahora únicamente exponiendo a los 30 minutos con diferentes cepas de referencia y aislados clínicos, provenientes de la colección microbiana del Laboratorio de Producción y Control de Biológicos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Porcentajes de reducción microbiana de aceites de oliva y girasol ozonizados y sin ozonizar en diferentes cepas.

Cepa	Oliva	Oliva ozonizado	Girasol	Girasol ozonizado
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	39.428	> 99.999	31.428	79.000
<i>S. aureus</i> (a.c.) ^a	> 99.999	99.999	58.090	76.476
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	> 99.999	> 99.999	55.450	58.136
<i>E. coli</i> ATCC 8739	> 99.999	> 99.999	52.603	48.905
<i>A. baumannii</i> (a.c. Acb07) ^b	99.963	99.988	85.887	89.679
<i>A. baumannii</i> (a.c. Acb18) ^a	99.998	>99.999	91.593	96.333
<i>P. aeruginosa</i> (a.c. Pa14) ^a	99.565	99.955	68.803	82.479
<i>P. aeruginosa</i> (a.c. Pa63) ^b	99.999	>99.999	93.795	94.821

Notas: a.c.: aislado clínico, ^aaislado sensible a antibióticos ^baislado resistente a antibióticos. Elaboración propia.

Los porcentajes de reducción obtenidos en las distintas cepas fueron mayores en los aceites de oliva que en los de girasol y casi iguales en el aceite de oliva ozonizado y sin ozonizar, a excepción de la levadura. La cepa de *C. albicans* ATCC 10231 tiene una reducción microbiana de 5 logaritmos con el aceite de oliva ozonizado, es precisamente la cepa donde la ozonización marca la mayor diferencia: 39,4 % en el aceite de oliva sin ozonizar frente a > 99,999 % en el aceite ozonizado; también en el aceite de girasol se observa mayor porcentaje de reducción en el aceite ozonizado, pero los valores no son tan altos como en el de oliva. No se identificó una diferencia en el porcentaje de reducción entre microorganismos Gram negativos y positivos.

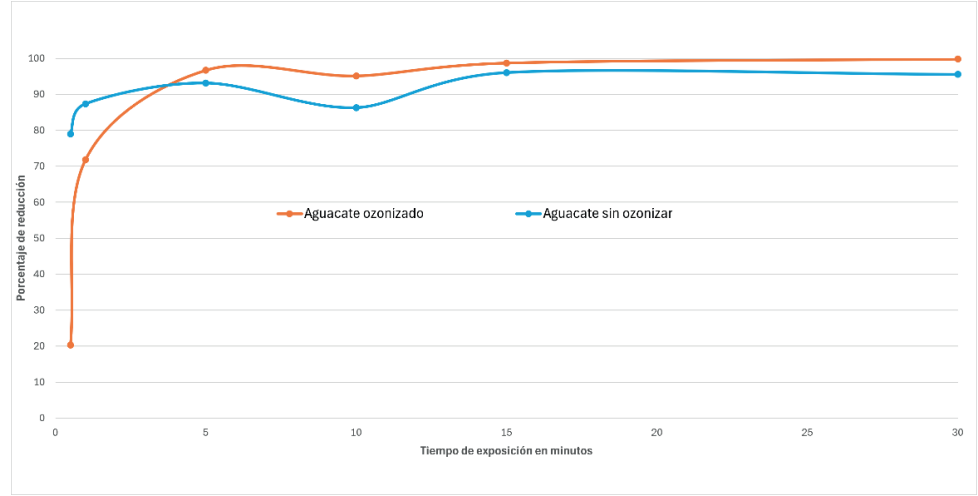
En este ensayo se incluyeron dos cepas resistentes a antibióticos: la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* Pa63, la cual se clasifica como pan-resistente (PDR) y la de *Acinetobacter baumannii* Acb07, la cual es extremadamente resistente (XDR) (Monterrubio-López *et al.*, 2023). Estas cepas también mostraron sensibilidad a los aceites, lo que coincide con otros trabajos como el de Di Pietro y colaboradores del 2022 y el de Wang y colaboradores del 2021, donde observaron sensibilidad a extractos de aceite de oliva en cepas de *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos. Estos resultados son alentadores tomando en cuenta el panorama que existe en el mundo ante la problemática de resistencia a

antibióticos, convirtiendo a estos compuestos en una alternativa para complementar los tratamientos médicos.

3. EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE DE AGUACATE

El aguacate, originario de Mesoamérica y cultivado extensamente en México, representa no sólo un recurso agrícola de relevancia mundial, sino también un componente esencial de la identidad cultural y económica del país, cuyo impacto nutricional y potencial biotecnológico lo posicionan como un alimento estratégico en la investigación científica contemporánea. Es por ello que realizamos un ensayo de reto microbiano utilizando aceite de aguacate ozonizado y sin ozonizar, empleando diferentes tiempos de exposición a una cepa de *E. coli* aislada de una úlcera de pie, los porcentajes de reducción obtenidos se muestran en la Figura 2.

Figura 2. Cinética de reducción microbiana de *E. coli* con aceites de aguacate ozonizados. Elaboración propia.



En los resultados se puede observar que el aceite de aguacate por sí mismo muestra un efecto antimicrobiano ante la cepa de *E. coli*, el cual se ve incrementado con la ozonización, observándose un mayor porcentaje de reducción después de los cinco minutos de exposición. Si comparamos los resultados con los del aceite de oliva y girasol ozonizados, podemos ver que el efecto es casi el mismo que el de oliva y mayor que el de girasol. Hay pocos estudios disponibles respecto al aceite de aguacate, los cuales se enfocan principalmente en sus propiedades fisicoquímicas y aplicaciones agrícolas, por lo que su actividad antimicrobiana ante *E. coli* nos impulsa a seguir investigando su efecto en otros microorganismos (Aura *et al.*, 2025).

4. MECANISMOS DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA

El ozono al ponerse en contacto con los aceites vegetales transforma su estructura química a través de reacciones de ozonólisis, rompiendo los dobles enlaces de los triacilglicéridos insaturados, generando una mezcla de distintos compuestos: ozónidos, peróxidos, aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos. Estos compuestos son los que contribuyen al efecto antimicrobiano al romper la integridad de la membrana celular de los microorganismos a través de una peroxidación lipídica y la desnaturalización de proteínas (De Almeida *et al.*, 2012; Martínez-Sánchez, 2021).

De acuerdo al mecanismo de acción, se supondría que, a mayor contenido de lípidos poliinsaturados, habría mayor generación de compuestos antimicrobianos. Como se muestra en la Tabla 2, el aceite de girasol contiene una mayor proporción de ácido linoleico, el cual es un lípido poliinsaturado, aproximadamente contiene entre un 48 y 74% dependiendo de su origen y pureza, a diferencia de los aceites de oliva y aguacate, los cuales tienen mayor proporción de ácido oleico, entre un 53 y 83%, el cual presenta un menor número de insaturaciones en su estructura; con los datos anteriores supondríamos que los aceite de oliva y aguacate tendrían un menor efecto antimicrobiano, lo cual es contrario a nuestros resultados, donde su porcentaje de reducción es mayor que el del aceite de girasol.

Tabla 2. Contenido de ácidos oleico y linoleico en los aceites de oliva, girasol y aguacate.

Aceite	Ácido oleico (%)	Ácido linoleico (%)	Tipo predominante de insaturación	Referencia
Aguacate	53.6–72.1	8.6–15.2	Monoinsaturado	Sánchez-González et al., 2025
Oliva	55–83	3.5–21	Monoinsaturado	International Olive Council, 2026
Girasol	14–39.4	48.3–74	Poliinsaturado	Codex Alimentarius, 2001

Nota: Los rangos de composición de los ácidos grasos pueden variar en función de la variedad, origen geográfico, condiciones de cultivo, grado de madurez, método de extracción y procesamiento del aceite. Elaboración propia.

Adicionalmente, estamos viendo un efecto antimicrobiano en los aceites sin ozonizar, sobre todo de oliva y aguacate, lo que comprueba que existen otros compuestos presentes de forma natural en los aceites que también tienen efecto contra los microorganismos, como pueden ser los polifenoles, aldehídos y monoglicéridos. Estos compuestos son componentes minoritarios del aceite de oliva, que se encuentran en mayor proporción en el extra virgen. En el caso del aceite de girasol éstos compuestos casi no están presentes,

lo que puede justificar el comportamiento en la cinética de reducción microbiana de estos aceites (Medina *et al.*, 2006; Sánchez-Rodríguez y Mesa, 2018).

5. CONCLUSIONES

Los aceites ozonizados demostraron un efecto antimicrobiano significativo frente a *Escherichia coli*, alcanzando porcentajes de reducción superiores al 95% después de 10 minutos de exposición.

Los aceites de oliva y aguacate mostraron una actividad antimicrobiana mayor que el aceite de girasol, incluso en su forma no ozonizada, lo que sugiere la presencia de compuestos naturales con efecto germicida.

No se observaron diferencias relevantes en la sensibilidad entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, ni entre cepas sensibles o resistentes a antibióticos, lo que refuerza el potencial de estos aceites como alternativas frente a la resistencia antimicrobiana.

La levadura *Candida albicans* fue el microorganismo con menor porcentaje de reducción, pero donde más se notó la diferencia entre el efecto antimicrobiano de los aceites ozonizados y no ozonizados.

El aceite de aguacate presentó resultados prometedores, posicionándose como un candidato atractivo para futuras investigaciones en el campo de la microbiología aplicada y la biotecnología.

Considerando la problemática global de resistencia a antibióticos, los aceites ozonizados representan una alternativa terapéutica complementaria, de bajo costo, biocompatible y con menores efectos secundarios, que puede contribuir al cuidado de la salud pública.

6. AGRADECIMIENTOS

Gloria Paulina Monterrubio López agradece al Instituto Politécnico Nacional por el soporte financiero proporcionado a través de la Secretaría de Investigación y Posgrado, bajo los proyectos de investigación con número 20211273 y 20241020.

REFERENCIAS

AURA, R.; SANTIAGO, A.; ALEJANDRO, H.-S.; NELSON, C.-A. (2025). **Effect of ozonated avocado and high-oleic palm oils on “Bolo Verde” variety squash**. Horticulturae, v. 11, n. 6, p. 676. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae11060676>.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. (2001). **Codex standard for named vegetable oils (CXS 210-1999)**. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization.

COLOMBO, M.; CECI, M.; FELISA, E.; POGGIO, C.; PIETROCOLA, G. (2018). **Cytotoxicity evaluation of a new ozonized olive oil.** *European Journal of Dentistry*, v. 12, n. 4, p. 585-589. DOI: 10.4103/ejd.ejd_422_18. PMID: 30369807; PMCID: PMC6178687.

DE ALMEIDA, N. R.; BEATRIZ, A.; MICHELETTI, A. C.; DE ARRUDA, E. J. (2012). **Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: A review.** *Orbital Electron Journal of Chemistry*, v. 4, p. 313–326.

DI PIETRO, M.; FILARDO, S.; MATTIOLI, R.; FRANCOSE, A.; RAPONI, G.; MOSCA, L.; SESSA, R. (2022). **Extra virgin olive oil-based green formulations with promising antimicrobial activity against drug-resistant isolates.** *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 885735. DOI: 10.3389/fphar.2022.885735.

DOMINGUEZ-LACUEVA, P.; CORELLA-GUILLAMÓN, P.; CANTALEJO-DÍEZ, M. J. (2026). **Exploring ozonated vegetable oils as antimicrobial and functional agents in food systems: A systematic narrative review.** *Foods*, v. 15, n. 11, p. 1850. DOI: 10.3390/foods15111850. PMID: 42279639; PMCID: PMC13257085.

INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL. (2026). **Trade standard applying to olive oils and olive-pomace oils (COI/T.15/NC No 3/Rev.22/2026).** International Olive Council.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. (2021). **Racional científico para las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización.** *Ozone Therapy Global Journal*, v. 11, n. 1, p. 201-237. ISSN: 2174-3215.

MEDINA, E.; DE CASTRO, A.; ROMERO, C.; BRENES, M. (2006). **Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 14, p. 4954-4961. DOI: 10.1021/jf0602267. PMID: 16819902.

MONTEERRUBIO-LÓPEZ, G. P.; MENDIETA-PÉREZ, C. C.; SANTIAGO-CARRILLO, M.; MONTEERRUBIO-LÓPEZ, R. (2023). **Antimicrobial effect of olive and sunflower oils determined by microbial challenge.** *Journal of Basic Biomedical Research*, v. 7, p. 1–7.

RAMÍREZ, L. E.; MARÍN CASTAÑO, D. (2009). **Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal.** *Scientia et Technica*, v. XV, n. 42, art. 42.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; et al. (2025). **Joint metabolites for avocado oil identity: fatty acid profiles and fatty alcohol esters as unique derivatives.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c06815>.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M.; MESA, M.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E.; MARÍA, C.; GARCÍA, D. (2018). **Compuestos bioactivos del aceite de oliva virgen.** *Nutrición Clínica y Medicina*, v. 12, p. 80–94.

UGAZIO, E.; TULLIO, V.; BINELLO, A.; TAGLIAPIETRA, S.; DOSIO, F. (2020). **Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications: their characterization, current applications, and advances in improved delivery techniques.** *Molecules*, v. 25, n. 2, p. 334. DOI: 10.3390/molecules25020334. PMID: 31947580; PMCID: PMC7024311.

VIEIRA, M. H.; BORESKI, D.; FRANZEN MATTE, B.; ARIAS, J. L. d. O.; JÚNIOR, C. M.; BAUAB, T. M.; GABRIEL, S. A.; CHIN, C. M. (2025). **Ozonized sunflower oil: standardization and mechanisms of the antimicrobial effect.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, n. 18, p. 9156. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26189156>.

WANG, X.; LIAO, D.; JI, Q. M.; YANG, Y. H.; LI, M. C.; YI, X. Y.; LI, C.; CHEN, Y.; TAO, H. B.; ZHAI, W. H. (2022). **Analysis of bactericidal effect of three medical ozonation dosage forms on multidrug-resistant bacteria from burn patients.** *Infection and Drug Resistance*, v. 15, p. 1637-1643. DOI: 10.2147/IDR.S353277. PMID: 35418764; PMCID: PMC8995158.

CAPÍTULO 6

Kosakonia cowanii Ch1 ISOLATED FROM MEXICAN CHILI POWDER REVEALS GROWTH INHIBITION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI¹

Data de submissão: 04/08/2026

Data de aceite: 20/08/2026

Jacqueline González Espinosa

Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro 76220, México

<https://orcid.org/0009-0004-3536-4960>

Yoali Fernanda Hernández Gómez

Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro 76220, México

<https://orcid.org/0009-0009-9639-5898>

Yomaiko Javier Martínez

Facultad de Química
Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro 76010, México

<https://orcid.org/0000-0003-0196-3952>

Francisco Javier Flores Gallardo

Facultad de Química
Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro 76010, México

<https://orcid.org/0000-0001-9679-4375>

Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Facultad de Química
Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro 76010, México

<https://orcid.org/0000-0001-8365-4488>

Miguel Ángel Ramos López

Facultad de Química
Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro 76010, México
<https://orcid.org/0000-0002-7105-5039>

Jackeline Lizzeta Arvizu Gómez

Secretaría de Investigación y Posgrado
Centro Nayarita de Innovación y
Transferencia de Tecnología (CENITT)
Universidad Autónoma de Nayarit

Tepic 63173, México
<https://orcid.org/0000-0001-7514-6256>

Carlos Saldaña Gutierrez

Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro 76220, México

José Alberto Rodríguez Morales

Facultad de Ingeniería
Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro 76010, México
<https://orcid.org/0000-0002-4532-9665>

María Carlota García Gutiérrez

Facultad de Química
Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro 76010, México
<https://orcid.org/0000-0001-9504-8194>

Aldo Amaro Reyes

Facultad de Química
Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro 76010, México
<https://orcid.org/0000-0001-6520-5742>

¹ This work was previously published in *Microorganisms* (2023) under the title “*Kosakonia cowanii* Ch1 Isolated from Mexican Chili Powder Reveals Growth Inhibition of Phytopathogenic Fungi.”

Erika Álvarez Hidalgo
Facultad de Química
Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro 76010, México

Jorge Nuñez Ramírez
Facultad de Química
Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro 76010, México

José Luis Hernández Flores
Centro de Investigación y de
Estudios Avanzados del IPN
Irapuato 36824, México
<https://orcid.org/0000-0001-6331-526X>

Juan Campos Guillén²
Facultad de Química
Universidad Autónoma de Querétaro
Querétaro 76010, México
<https://orcid.org/0000-0001-7117-6781>

ABSTRACT: *Kosakonia cowanii* strain Ch1 was isolated from Mexican chili powder, and the genome was sequenced. The genome was 4,765,544 bp in length, with an average G + C content of 56.22%, and a plasmid (pCh1) of 128,063 bp with an average G + C content of 52.50%. A phylogenetic analysis revealed a close relation with pathogenic strains; nevertheless, some virulence-related genes were absent, and this genetic characteristic may explain the fact that *K. cowanii* Ch1 behaved as a non-pathogenic strain when infection assays were performed on the leaves and fruits of *Capsicum annuum* L. Surprisingly, we observed that this bacterial strain had the ability to spread throughout serrano pepper seeds. Furthermore, *K. cowanii* Ch1 was evaluated for the production of volatile organic compounds (VOCs) against fungal pathogens, and the results showed that *Alternaria alternata* and *Sclerotium rolfsii* were inhibited in a radial mycelial growth assay by a mean rate of 70% and 64%, while *Fusarium oxysporum* was inhibited by only approximately 10%. Based on the headspace solid-phase microextraction combined with the gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS), 67 potential VOCs were identified during the fermentation of *K. cowanii* Ch1 in TSA medium. From these VOCs, nine main compounds were identified based on relative peak area: dodecanoic acid; 3-hydroxy ethanol; 1-butanol-3-methyl; acetaldehyde; butanoic acid, butyl ester; cyclodecane; 2-butanone, 3-hydroxy; disulfide, dimethyl and pyrazine-2,5-dimethyl. Our findings show the potential of *K. cowanii* Ch1 for the biocontrol of fungal pathogens through VOCs production and reveal additional abilities and metabolic features as beneficial bacterial specie.

KEYWORDS: *Kosakonia cowanii* Ch1; volatile organic compounds; chili powder; fungal pathogens; biocontrol; genome sequencing.

² Autor de correspondencia.

Kosakonia cowanii Ch1 ISOLADA DE PIMENTA EM PÓ MEXICANA REVELA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

RESUMO: A cepa *Kosakonia cowanii* Ch1 foi isolada de pimenta em pó mexicana, e seu genoma foi sequenciado. O genoma apresentou 4.765.544 pb de comprimento, com conteúdo médio de G+C de 56,22%, além de um plasmídeo (pCh1) de 128.063 pb, com conteúdo médio de G+C de 52,50%. A análise filogenética revelou estreita relação com cepas patogênicas; entretanto, alguns genes relacionados à virulência estavam ausentes, e essa característica genética pode explicar o fato de *K. cowanii* Ch1 ter se comportado como uma cepa não patogênica quando ensaios de infecção foram realizados em folhas e frutos de *Capsicum annuum* L. Surpreendentemente, observou-se que essa cepa bacteriana foi capaz de se disseminar pelas sementes de pimenta serrano. Além disso, *K. cowanii* Ch1 foi avaliada quanto à produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs) contra fungos fitopatogênicos, e os resultados demonstraram que *Alternaria alternata* e *Sclerotium rolsii* apresentaram inibição média do crescimento micelial radial de 70% e 64%, respectivamente, enquanto *Fusarium oxysporum* foi inibido em aproximadamente 10%. Com base na técnica de microextração em fase sólida no espaço de cabeça acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (HS-SPME-GC-MS), foram identificados 67 VOCs potenciais durante a fermentação de *K. cowanii* Ch1 em meio TSA. Dentre esses compostos, nove foram identificados como principais, com base na área relativa dos picos: ácido dodecanoico, 3-hidroxi-etanol, 3-metil-1-butanol, acetaldeído, butanoato de butila, ciclododecano, 3-hidroxi-2-butanona, dissulfeto de dimetila e 2,5-dimetilpirazina. Nossos resultados demonstram o potencial de *K. cowanii* Ch1 para o biocontrole de fungos fitopatogênicos por meio da produção de compostos orgânicos voláteis, além de revelar capacidades metabólicas adicionais que reforçam seu potencial como bactéria benéfica.

PALAVRAS-CHAVE: *Kosakonia cowanii* Ch1; compostos orgânicos voláteis; pimenta em pó; patógenos fúngicos; controle biológico; sequenciamento genômico.

1. INTRODUCTION

Kosakonia cowanii belongs to the Enterobacteriaceae family and was reclassified from the Enterobacter genus based on multilocus sequence analysis (MLSA) one decade ago [1]. It is a Gram-negative, facultative anaerobic, rod-shaped, and motile bacterium with a huge metabolic ability to colonize diverse environments. From this perspective and because of the presence of virulence factors associated with the *Kosakonia* genus, several reports indicate that some strains have been involved in human infection as rare events, and therefore, are assumed to be able to act as facultative human pathogens [2]. In this way, *K. radicincitans* has been isolated from a human bloodstream infection [3], as well as a spo-radical case of a *K. cowanii* infection associated with an acute cholecystitis [4].

In recent years, *K. cowanii* has also emerged as an important phytopathogen causing diverse plant diseases [2]. For instance, some reports show the association of *K.*

cowanii with bacterial wilt in tomatoes and patchouli plants [5], where typical symptoms of the disease cause the collapse of the plant [6]. Additionally, *K. cowanii* has been reported in Eucalyptus trees displaying symptoms of bacterial blight [7]. Another report showed that it possesses the ability to cause necrotic spots on leaves of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbia-ceae) [8]. Additionally, it has been detected in plants that present symptoms of bacterial stalk and leaf necrosis, such as onion (*Allium cepa* L.) [9], and as an emergent bacterial pathogen affecting soybean (*Glycine max* Willd) [6].

However, contrary to these adverse traits reported in the *Kosakonia* genus, in recent decades the increased characterization of microbiomes associated with plants and the isolation of beneficial microorganisms as inoculants to ensure crop yield and nutritional quality have allowed for the isolation of several strains of the *Kosakonia* genus as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), conferring upon plants the ability to tolerate abiotic stress [10,11] or as a biocontrol of phytopathogenic fungi [12]. Interestingly, one report showed that *K. cowanii* colonizing the gut of *Anopheles gambiae* displayed direct anti-Plasmodium properties [13]; therefore, these findings revealed that many metabolic features of the *Kosakonia* genus still remain unexplored [10]. Previous efforts to determine the bacterial diversity in Mexican chili powder [14] led us to detect the presence of *K. cowanii* by 16S rDNA Illumina sequencing, and several bacterial isolates were obtained. In this work, we present the results of the characterization of a new *K. cowanii* Ch1 strain through genome sequencing and phytopathogenicity testing in *Capsicum annuum* L. More importantly, we identify for the first time its ability to inhibit phytopathogenic fungi growth by volatile organic compounds (VOCs). *K. cowanii* Ch1 exhibits important biocontrol activity and could be a promising element for the biocontrol of economically important phytopathogenic microorganisms.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. KOSAKONIA STRAIN ISOLATION

K. cowanii Ch1 was isolated from Mexican chili powder and identified by the Laboratory of Molecular Biology of Microorganisms at the Faculty of Chemistry of Queretaro University, Mexico [14]. *K. cowanii* Ch1 possesses a TEM β -lactamase (class A); therefore, the strain was grown on a tryptic soy agar (TSA) medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with 100 μ g/mL of ampicillin and incubated at 37 °C for 24 h. Additionally, antibiotic susceptibilities were determined using the criteria of CLSI standards [15]. *Escherichia coli* XL1 blue was used as a control. Antibiotic discs (Oxoid) containing amikacin (30 μ g), ampicillin (10 μ g), amoxicillin/clavulanic acid (20/10 μ g),

carbenicillin (100 µg), cephalothin (30 µg), cefotaxime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), clindamycin (30 µg), dicloxacillin (1 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), netilmicin (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloxacin (10 µg), penicillin (10 U), tetracycline (30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (25 µg), and vancomycin (30 µg) were used.

2.2. PATHOGENICITY TEST

The pathogenicity test of *K. cowanii* Ch1 was conducted by inoculating the bacterium on *Capsicum annuum* L. plantlets and fruits. *Capsicum annuum* L. var. serrano seeds were surface sterilized by immersion in 10% (v/v) sodium hypochlorite for 5 min and rinsed 3 times with sterile distilled water and germinated in seedling trays containing sterile mixed soil and placed under greenhouse condition. Then, seedlings were transplanted into pots containing sterile soil and grown under greenhouse conditions; 45 days post germination, seedlings with 12–14 true leaves were used. Fruits of the serrano pepper (*Capsicum annuum* L.) were selected based on size uniformity and the absence of visual damage or infections. Additionally, fruits were superficially disinfected by immersion in 10% (v/v) sodium hypochlorite for 10 min, then with 50% (v/v) ethanol for 10 min, and finally rinsed with sterile water and air-dried at room temperature (25 °C). For the bacterial inoculation test, *K. cowanii* Ch1 was grown in tryptic soy broth and incubated at 37 °C for 24 h with continuous shaking (100 rpm), and then the bacterial suspension was diluted to approximately 1×10^8 CFU/mL. From this bacterial suspension, 10 plants were inoculated with 10 µL, using 5–6 leaves of each plant and 10 serrano pepper fruits; all were punctured with a sterile needle and inoculated at that point. Inoculated seedlings were grown in greenhouse conditions, while inoculated fruits were placed inside an airtight container at room temperature (25 °C) for 7 days. Negative controls were inoculated with sterile distilled water.

2.3. 16S RRNA GENE SEQUENCE ANALYSIS

Serrano pepper fruits inoculated with *K. cowanii* Ch1 and controls were analyzed for 7 days post inoculation, and seeds were obtained and placed on a TSA medium (Difco Laboratories; Detroit, MI, USA) supplemented with 100 µg/mL ampicillin and incubated at 37 °C for 24 h. Bacterial colonies that were grown close to the seeds were analyzed by PCR using primers 27F and 1492R for 16s rRNA [16]. The amplicons obtained were sequenced at MacroGen Inc. (Seoul, Republic of Korea) and analyzed using MEGA X with the neighbor-joining method. The evolutionary distances were

computed using the Jukes-Cantor method and compared with the sequence of *K. cowanii* Ch1 [17–21].

2.4. GENOME SEQUENCING AND ASSEMBLY

Genomic DNA of the *K. cowanii* Ch1 strain was extracted using a ZymoBIOMICSTM DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The genomic DNA was processed and analyzed with the Shotgun Metagenomic Sequencing Service (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Sequencing libraries were prepared with an Illumina® DNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA), and the final library was sequenced on the platform NovaSeq® (Illumina, San Diego, CA, USA). Bioinformatic analyses were made using the pipelines at the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC); the Fastq Utilities Service [22], the comprehensive genome analysis service at PATRIC [22], the RAST tool kit (RASTtk) for genome annotation [23], and CIRCOS for the circular genome map [24]. The Codon Tree pipeline of BV-BRC was used to generate bacterial phylogenetic trees. The closest reference genomes were identified using Mash/MinHash [25], and PATRIC global protein families (PGFams) [22] were selected and aligned with MUSCLE v5 [20], then concatenated into a data matrix, and RaxML v8.2.11 (Randomized Axelerated Maximum Likelihood) [21] was used to analyze the matrix with 100 rounds of fast bootstrapping options [22] to determine the phylogenetic analysis. Plasmid assembly was performed using the PlasmidSPAdes version v3.13.0 with default settings [26]. DNA sequences were deposited in NCBI as BioProject ID PRJNA965885. The genome accession number was JAUDFU000000000.

2.5. INHIBITORY EFFECTS OF VOCs PRODUCED BY *K. cowanii* Ch1 ON PATHOGENIC FUNGI IN VITRO

The following fungal pathogens were selected to test the inhibitory effects of *K. cowanii* Ch1 volatile organic compounds (VOCs): *Alternaria alternata*, which causes black spot in diverse fruits and vegetables around the world; *Fusarium oxysporum*, with diverse members of this species causing complex infections on economically relevant crops worldwide with typical symptoms such as chlorosis, necrosis of vascular systems, and potential death of colonized plants; and *Sclerotium rolfsii*, which is a very common soil-borne fungus infecting a wide range of vegetable, ornamental, and field crops. These fungal strains were provided by the Laboratory of Plants and Agriculture Biotechnology at Queretaro University, Mexico. The fungal strains were grown in potato dextrose agar

(PDA) medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and incubated at 28 °C for 7 days prior to use.

The inhibitory effects of VOCs produced by *K. cowanii* Ch1 were evaluated by the inhibition of radial mycelial growth of the fungi using methods described previously [27]. A chamber with two-compartment plastic plates of 9 cm in diameter was used. In the bottom side of the compartment, 100 µL of bacterial suspension (1×10^8 CFU/mL) was inoculated on TSA medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). In the top side of the compartment, the PDA medium was added (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and inoculated with a 7-mm diameter disk of each fungus tested. The negative control only included the fungi tested without bacterial suspension. The chamber with both Petri dishes was immediately sealed with parafilm and incubated for 5–7 days at 28 °C. Then, radial mycelial growth was registered. Each experiment with each fungi strain was performed in triplicate. The following equation was used to analyze the percentage of mycelial growth inhibition (mgi (%)) = $[(dc - dt)/dc] \times 100$, where the terms dc and dt (in mm) represent the average colony diameters of the control and treatment groups, respectively.

The data obtained were analyzed using the DPS V12.01 software for the analysis of variance and Duncan's multiple range test ($p = 0.05$) to measure specific differences between pairs of means.

2.6. HS-SPME-GC-MS ANALYSIS OF VOCS FROM *K. cowanii* Ch1

K. cowanii Ch1 was inoculated in 8 borosilicate glass media bottles of 80 mL (Schott) with 40 mL of tryptic soy medium, sealed with polypropylene screw caps, and incubated at 37 °C for 48 h with continuous shaking (100 rpm). Tryptic soy medium without the strain was used as a blank control. From each culture, samples were obtained every 6 h to collect cell-free filtrate (FCF) as follows: each sample was centrifugated at 14,000 rpm for 5 min two times and filter sterilized using a membrane with a pore size of 0.2 µm (Sig-ma-Aldrich). Mycelial growth inhibition was tested using 500 µL of FCF on PDA medium inoculated with a 7-mm diameter disk of *A. alternata*. An eighteen-hour growth bacterial culture was used for VOC analysis. Samples were incubated at 50 °C for 1 h, and VOCs were collected on a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane fiber (DVB/CAR/PDMS, Supelco, Sigma-Aldrich, CA, USA). Manual injection was conducted in splitless mode, and the injection port and transfer line temperature was set to 250 °C using a 7820A GC with a 5975C MSD (Agilent Technologies, Inc., CA, USA) and HP-5MS 30 m, 0.25 mm, and 0.25 µm GC Column Capillaries (Agilent Technologies Inc., CA, USA).

The column oven was programmed to 40 °C, increasing to 180 °C at 5 °C/min, then 20 °C/min to 260 °C, and held at that temperature for 5 min. Helium (99.999% purity) was used as carrier gas with a flow rate of 1.0 mL/min. Mass spectrometry analyses were conducted using an electron energy of 70 eV, and the m/z range was 33–500. Data were acquired and processed using NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library instrumental analysis software, version 2017, USA.

3. RESULTS

3.1. GENERAL GENOME FEATURES OF STRAIN *K. COWANII* CH1

The assembled genome of *K. cowanii* Ch1 had the following statistics: 75 contigs with a total length of 4,765,544 bp, an average G + C content of 56.22%, Contig L50 is nine, Con-tig N50 is 176,943 bp and a plasmid (pCh1) of 128,063 bp and with an average G + C content of 52.50% (Figure 1A). The genome quality; coarse consistency (98.7), fine consistency (98), CheckM completeness (99.7) and CheckM Contamination (0.1) demonstrate that this genome appears to be of good quality. On this genome we detected 4493 protein coding sequences (CDS) and 90 RNA genes (82 tRNA and 8 rRNA). The annotation included 805 hypothetical proteins and 3688 proteins with subsystem functional assignments (Figure 1B). PATRIC annotation included two types of protein families: 4229 proteins belonging to the genus-specific protein families (PLFams), and 4284 proteins belonging to the cross-genus protein families (PGFams). Many of the genes annotated displayed similarities to known transporters, virulence factors, drug targets, and antibiotic resistance genes. The number of genes and the specific source databases where similarities were found are provided in Table 1. On the plasmid (pCh1) we detected 162 protein coding sequences (CDS), the annotation included 103 hypothetical proteins and 59 proteins with subsystem functional assignments. BLASTN analysis of plasmid pCh1 showed 49% and 46% alignment with plasmid 888-76-1 and plasmid Wem22, respectively; the first plasmid was detected in the pathogenic *K. cowanii* JCM 10956 strain and the second plasmid was detected in *K. cowanii* SMBL-WEM22 strain isolated from seawater in Hong Kong. pCh1 is an IncF plasmid containing repFIB gene that encode to a replication protein and the VapBC toxin-antitoxin systems.

Figure 1. Circular map of *K. cowanii* Ch1 chromosome and plasmid. (A) includes, from outer to inner rings, ensembled contigs, CDS on the forward and reverse strand, RNA genes, CDS for antimicrobial resistance genes, CDS for virulence factors, and GC content and skew. (B) indicates the subsystem functional assignments. The numbers provided in parentheses are the count of subsystems and genes associated with the subsystem name.

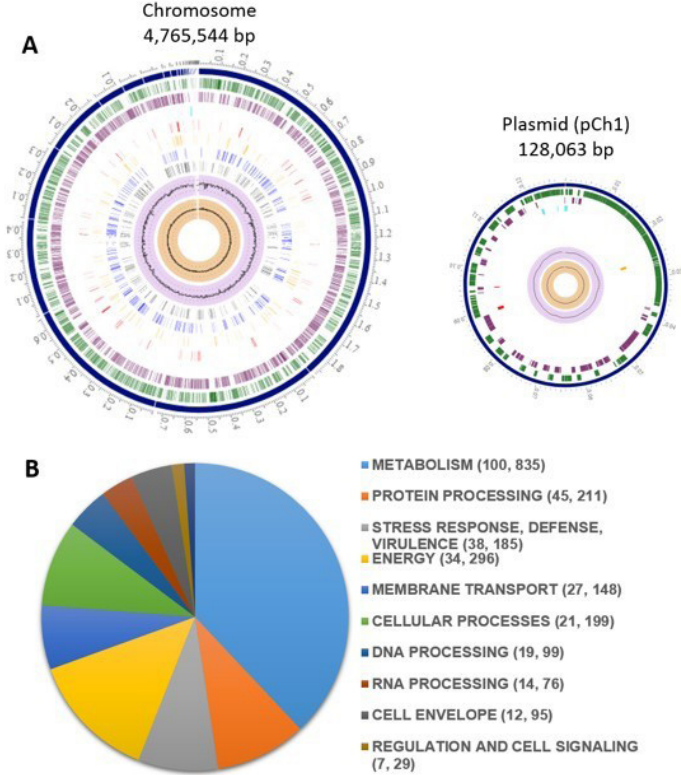


Table 1. Specialty genes.

Category	Source	Genes
Antibiotic Resistance	CARD	49
Antibiotic Resistance	PATRIC	60
Drug Target	DrugBank	275
Drug Target	TTD	54
Drug Target	TCDB	458
Virulence Factor	PATRIC_VF	103
Virulence Factor	VFDB	25
Virulence Factor	Victors	128

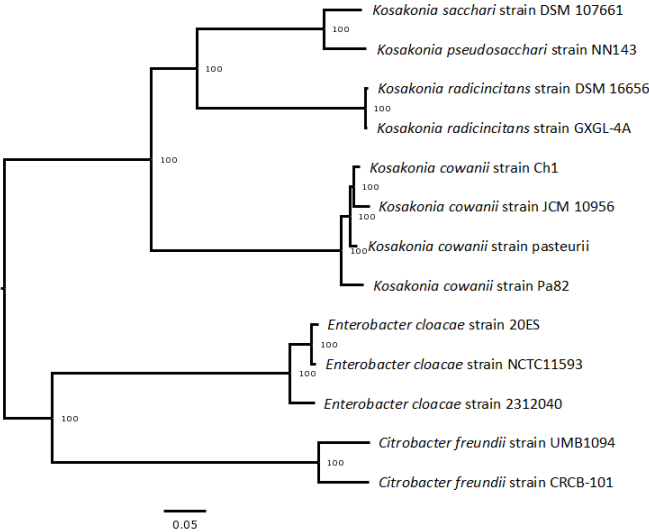
A summary of the antimicrobial resistance genes (AMR) annotated in this genome and the corresponding AMR mechanism classified into eight categories is provided in Table 2. Regarding the AMR phenotype, *K. cowanii* Ch1 showed resistance to the β -lactam antibiotics tested, such as penicillin G, ampicillin, and carbenicillin, likely due to

the presence of TEM β -lactamase detected in the chromosome. In addition, resistance was observed for erythromycin, clindamycin, and vancomycin, likely due to the presence of genes classified as efflux pumps conferring antibiotic resistance (Table 2). The *K. cowanii* isolates showed marked susceptibility to the remaining antibiotics tested. Using the complete genome sequences from *K. cowanii* Ch1 and type strains of the *Kosakonia* genus, a phylogenomic tree based on 100 core genes was constructed (Figure 2). The results showed that *K. cowanii* Ch1 is closely related to *K. cowanii* JCM 10956, an isolate from human infection, and clustered closely together with *K. cowanii* strain *pasteuri*, an isolate from insect gut, and Pa82 strain, a phytopathogenic isolate.

Table 2. Antimicrobial resistance genes.

AMR Mechanism	Genes
Antibiotic activation enzyme	<i>katG</i>
Antibiotic resistance gene cluster, cassette, or operon	<i>marA</i> , <i>marB</i> , <i>marR</i> , <i>bla</i>
Antibiotic target in susceptible species	<i>alr</i> , <i>ddl</i> , <i>drx</i> , <i>EF-G</i> <i>EF-Tu</i> , <i>folA</i> , <i>dfr</i> , <i>folP</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>inhA</i> , <i>fabI</i> , <i>Iso-Trna</i> , <i>kasA</i> , <i>murA</i> , <i>rho</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC</i> , <i>s10p</i> , <i>S12p</i>
Antibiotic target protection protein	<i>BcrC</i>
Efflux pump conferring antibiotic resistance	<i>acrAB-tolC</i> , <i>acrAD-tolC</i> , <i>acrZ</i> , <i>emrAB-tolC</i> , <i>macA</i> , <i>macB</i> , <i>mdfA/cmr</i> , <i>mdtABC-tolC</i> , <i>sugE</i> , <i>tolC/opmH</i>
Gene conferring resistance via absence	<i>GidB</i>
Protein-altering cell-wall charge conferring antibiotic resistance	<i>gdpD</i> , <i>pgsA</i>
Regulator modulating expression of antibiotic resistance genes	<i>acrAB-tolC</i> , <i>emrAB-tolC</i> , <i>H-NS</i> , <i>oxyR</i>

Figure 2. Phylogenetic tree analysis of *K. cowanii* Ch1. The Codon Tree pipeline of BV-BRC was used to generate bacterial phylogenetic trees with *Kosakonia* genus strains (see methodology). *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii* were selected as outgroups.



3.2. PATHOGENICITY TEST

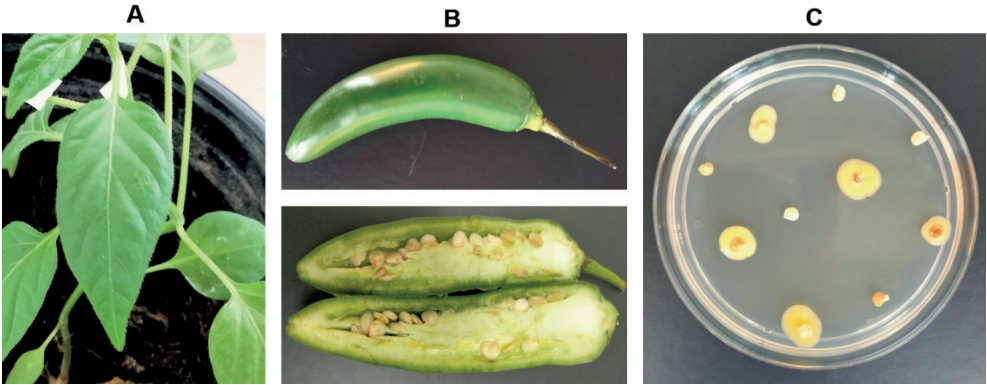
The results of the pathogenicity test showed that after inoculation with *K. cowanii* Ch1 in leaves and in external/internal fruits of the serrano pepper (*Capsicum annuum* L.), there were no symptoms of infection (Figure 3A,B). Virulence-related genes identified in the chromosome were principally flagellar, iron uptake, and siderophore components (Table 3), which likely are related to bacterial colonization, but not to pathogenesis in leaves and fruits of the infected plants, since no SSIII or vir/avr genes were identified. As *K. cowanii* may have the capability of invasion and motility due to the presence of genes related to virulence factors identified in the chromosome (*fliP*, *fliM*, *fliG*, *fliC*, *fliA*, *flgH*, *flgG*, *flgC*, *flgB*), we aimed to determine if the bacterium had the capability of colonization inside the fruit tissues. Interestingly, when we analyzed seeds from fruits inoculated with *K. cowanii* Ch1 seven days after inoculation (supplemented with ampicillin to avoid bacterial contamination), approximately 50% of the seeds tested showed growth of *K. cowanii* Ch1 (Figure 3C). This was validated by PCR for 16S rDNA and amplicon sequencing. This result showed that *K. cowanii* Ch1 may spread throughout the seeds of *Capsicum annuum* L.; however, additional research is necessary to understand the chemotactic mechanisms.

Table 3. Potential virulence-related genes in *K. cowanii* Ch1 predicted by VFDB.

Virulence Factor	Gene Name	Putative Function
Endotoxin	<i>gtrB</i>	Bactoprenol glucosyl transferase
Iron uptake, siderophore	<i>entA</i>	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase of siderophore biosynthesis
	<i>fepB</i>	Ferric enterobactin-binding periplasmic protein FepB
	<i>entS</i>	Enterobactin exporter EntS
	<i>fepG</i>	Ferric enterobactin transport system permease protein FepG
	<i>entB</i>	Isochorismatase of siderophore biosynthesis
Secretion system, invasion, motility	<i>flgC</i>	Flagellar basal-body rod protein FlgC
	<i>motA</i>	Flagellar motor rotation protein MotA
	<i>flgH</i>	Flagellar L-ring protein FlgH
	<i>flgB</i>	Flagellar basal-body rod protein FlgB
	<i>flgG</i>	Flagellar basal-body rod protein FlgG
	<i>fliG</i>	Flagellar motor switch protein FliG
	<i>fepD</i>	Ferric enterobactin transport system permease protein FepD

Virulence Factor	Gene Name	Putative Function
	<i>fliP</i>	Flagellar biosynthesis protein FlhP
	<i>cheW</i>	Positive regulator of CheA protein activity (CheW)
	<i>fliM</i>	Flagellar motor switch protein FlhM
	<i>fliC</i>	Flagellin FlhC
	<i>fliA</i>	RNA polymerase sigma factor for flagellar operon

Figure 3. Pathogenesis test. Infection test with *K. cowanii* CH1 is shown in leaves (Panel **A**) and external/internal fruits (Panel **B**) of serrano pepper (*Capsicum annuum* L.). These results were similar to the controls (data not shown). No lesions were detected when *K. cowanii* was inoculated in plantlets or serrano pepper fruits. Surprisingly, we observed growth of *K. cowanii* Ch1 on seeds of fruits (Panel **C**). TSA medium was supplemented with 100 µg/ mL of ampicillin.

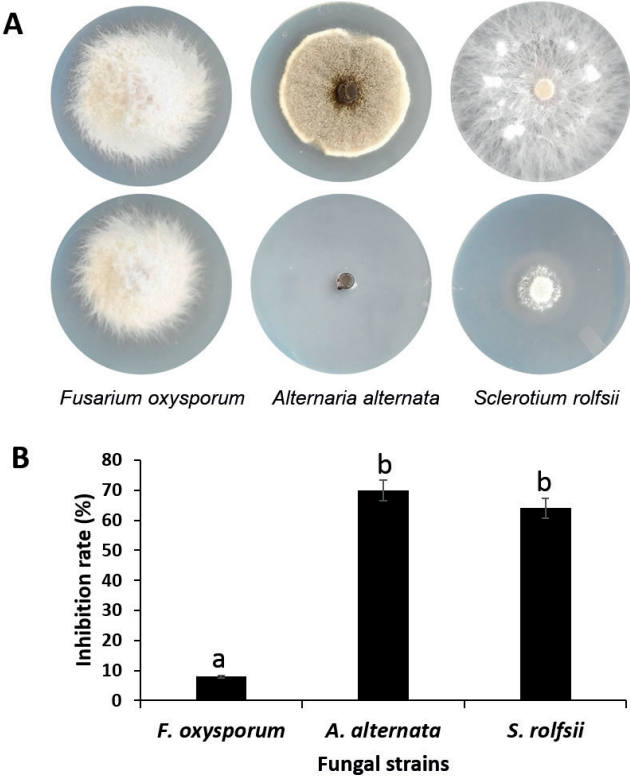


3.3. INHIBITORY EFFECTS OF VOCs PRODUCED BY *K. cowanii* Ch1 ON PATHOGENIC FUNGI IN VITRO

Given the absence of *vir/avr* genes in *K. cowanii* Ch1 and the fact that it is not able to produce symptoms of infection in serrano peppers, we wondered if there was any biological activity for this bacterial strain. To answer this question, we initially chose to evaluate potential biocontrol for volatile organic compounds (VOCs) produced during growth condition in the TSA medium and their potential effects on the presence of fungal strains as indicated in the methodology. Surprisingly, the results demonstrated that *K. cowanii* Ch1 presented antifungal abilities against *Sclerotium rolfsii* and *Alternaria alternata* with a mean rate of 64% and 70%, respectively, of inhibition of radial mycelial growth during the period evaluated, while radial mycelial growth inhibition on *Fusarium oxysporum* was lower than 10% (Figure 4). Therefore, we determined that the *K. cowanii* CH1 strain produces some volatile organic compounds with antifungal activity that cause mycelial growth inhibition on *A. alternate* and *S.*

rolfsii, and the next step was the identification of these key VOCs produced by this bacterial strain.

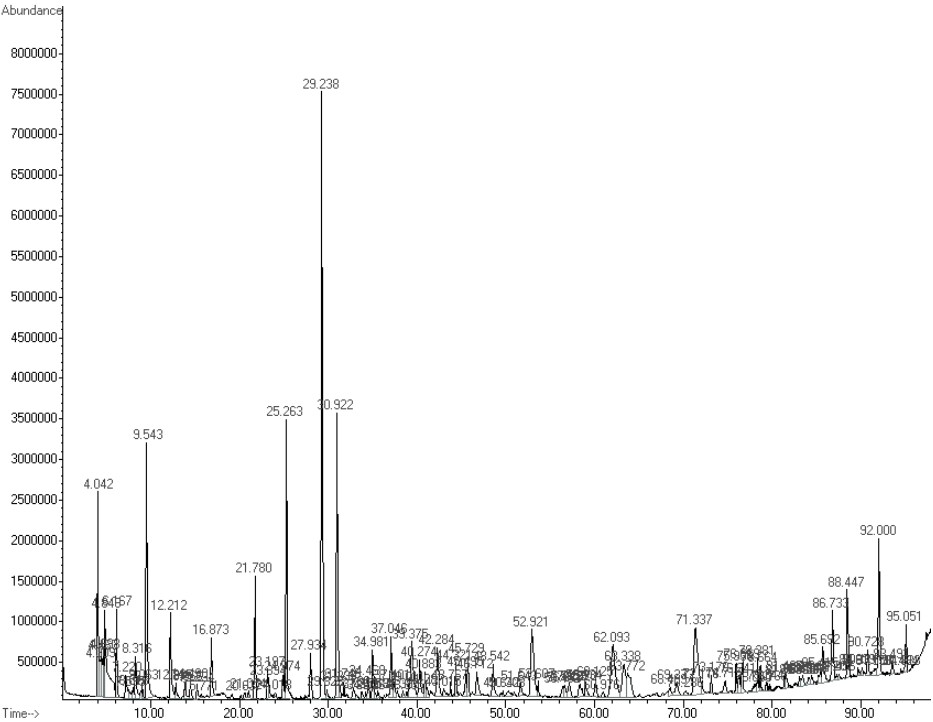
Figure 4. Antifungal activity test of *K. cowanii* Ch1 against fungal pathogens. (A) shows radial mycelial growth for controls (upper) and treatment (lower) at the end of experiments. (B) shows inhibition rate (%) for fungal strains tested. Values by different letters show statistical differences according to Duncan's multiple range test ($p = 0.05$).



3.4. HS-SPME-GC-MS ANALYSIS OF VOCs FROM *K. cowanii* Ch1

To explore the fungal inhibition rate of VOCs produced by *K. cowanii* Ch1 during different fermentation times, filtrate cell free (FCF) values were obtained every 6 h for a 48 h period. The results showed that the FCF values at 18 h exhibited the highest mean inhibition rate against *A. alternata*, with a mean rate of 60%, while the FCF values at 12 h had only a mean rate of fungal inhibition of 20%; the FCF results from other fermentation times showed no significant inhibition. Therefore, we decided to analyze the VOCs from the fermentation time at 18 h using HS-SPME-GC-MS (Figure 5).

Figure 5. VOC detection from 18 h of fermentation culture of *K. cowanii* Ch1 using HS-SPME-GC-MS. Abundance and retention time are shown for each peak.



The volatile organic compounds detected in the control were compared with those produced by *K. cowanii* Ch1 according to its relative peak area, and the results showed 67 VOCs (Table 4). The chemical classes detected were acids (3), alcohols (14), aldehydes (5), esters (11), hydrocarbons (6), ketones (11), organochlorines (2), aromatics (3), thioethers (3), and pyrazines (9). As is indicated by the relative peak area of the HS-SPME-GC-MS profile, the nine compounds with the highest area percentages for each chemical class were dodecanoic acid, 3-hydroxy (1.08%); ethanol (5.40%); 1-butanol-3-methyl (4.88%); acetaldehyde (3.81%); butanoic acid, butyl ester (3.86%); cyclodecane (8.14%); 2-butanone, 3-hydroxy (10.60%); disulfide, dimethyl (1.01%); and pyrazine-2,5-dimethyl (5.86%). Although individual or mixes of synthetic compounds were not tested among the pathogenic fungi, some of them were similar to the VOCs detected in other bacteria with inhibitory activity against pathogenic fungi [27].

Table 4. VOCs produced by *K. cowanii* Ch1 detected by HS-SPME-GC-MS.

Compounds	Retention Time (min)	Relative Peak Area (%)	Chemical Classes	Compounds	Retention Time (min)	Relative Peak Area (%)	Chemical Classes
Ethyl ether	4.463	1.21	Esters	1-Hexanol, 2-ethyl-	39.375	2.53	Alcohols
Methanethiol	4.698	0.72	Alcohols	Benzaldehyde	40.274	1.04	Aldehydes
Acetaldehyde	4.849	3.81	Aldehydes	1-Octanol	42.284	1.74	Alcohols
Acetone	6.167	0.87	Ketones	2-Undecanone	44.321	0.70	Ketones
Butanal	7.595	0.26	Aldehydes	2-Acetylthiazole	45.495	0.53	Other compounds
Ethyl Acetate	8.016	0.23	Esters	Acetophenone	45.729	0.68	Ketones
2-Butanone	8.316	0.84	Ketones	Pyrazine, 2,5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-	46.712	0.80	Pyrazine
Butanal, 3-methyl-	9.063	0.23	Aldehydes	Acetic acid, decyl ester	48.542	0.97	Esters
Ethanol	9.543	5.40	Alcohols	2-Tridecanol	50.308	0.25	Alcohols
2,3-Butanedione	12.212	2.15	Ketones	Cyclodecane	52.921	8.14	Hydrocarbons
Trichloroethylene	12.835	0.39	Other compounds	2-Tridecanone	57.159	0.56	Ketones
Trichloromethane	14.49	0.40	Other compounds	3-Decen-1-ol, acetate, (Z)-	58.32	0.65	Alcohols
Toluene	15.234	0.36	Hydrocarbons	Benzyl Alcohol	60.125	0.54	Alcohols
Disulfide, dimethyl	16.873	1.01	Other compounds	Butanoic acid, butyl ester	62.093	3.86	Esters
p-Xylene	21.054	0.16	Other compounds	Propanoic acid, 2-methyl-, 2,2-dimethyl-1-(2-hydroxy-1-methylethyl)propyl ester	63.338	1.89	Esters
1-Butanol	21.78	1.74	Alcohols	Phenylethyl Alcohol	63.772	1.66	Alcohols
Ethanol, 2-methoxy-	23.334	0.32	Alcohols	Ethanol, 2,2'-oxybis-	68.499	0.36	Alcohols
2-Heptanone	24.018	0.10	Ketones	2-Propenal, 3-phenyl-	73.17	0.35	Aldehydes
1,3-Diazine	24.974	0.50	Other compounds	2-Nonadecanone	74.715	0.50	Ketones
1-Butanol, 3-methyl-	25.263	4.88	Alcohols	Octanoic Acid	76.241	0.59	Acids
Pyrazine, methyl-	27.934	1.06	Pyrazine	Triacetin	76.669	0.60	Other compounds
2-Butanone, 3-hydroxy-	29.238	10.60	Ketones	Cyclododecane	78.05	0.36	Hydrocarbons
2-Propanone, 1-hydroxy-	29.823	0.23	Ketones	2,4,7,9-Tetramethyl-5-decyn-4,7-diol	78.381	1.10	Alcohols

Compounds	Retention Time (min)	Relative Peak Area (%)	Chemical Classes	Compounds	Retention Time (min)	Relative Peak Area (%)	Chemical Classes
Pyrazine, 2,5-dimethyl-	30.922	5.86	Pyrazine	Benzoic acid, 4-tert-butyl-, 3,5-dichloro-4-pyridyl ester	79.344	0.23	Esters
Pyrazine, 2,6-dimethyl-	31.233	0.25	Pyrazine	Benzoic acid, 2-amino-, methyl ester	83.028	0.27	Esters
1-Hexanol	32.78	0.33	Alcohols	Cyclododecene	84.094	0.30	Hydrocarbons
Dimethyl trisulfide	33.755	0.16	Other compounds	Methyl 8-methyl-nonanoate	84.442	0.24	Esters
Pyrazine, 2-ethyl-6-methyl-	34.201	0.11	Pyrazine	Hexanedioic acid, dibutyl ester	85.415	0.35	Esters
Pyrazine, 2-ethyl-5-methyl-	34.469	0.40	Pyrazine	Dodecanoic acid, 3-hydroxy-	85.692	1.08	Acids
2-Nonanone	34.981	1.00	Ketones	Diethyl Phthalate	88.447	1.39	Other compounds
Pyrazine, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	35.581	0.13	Pyrazine	Indole	90.111	0.15	Aromatics
Pyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-	37.046	1.28	Pyrazine	Homosalate	92	3.09	Other compounds
Octanoic acid, ethyl ester	37.401	0.43	Esters	Phthalic acid, hex-2-yn-4-yl isobutyl ester	95.051	0.89	Other compounds
Pyrazine, 2-ethenyl-6-methyl-	38.835	0.09	Pyrazine				

4. DISCUSSION

The *Kosakonia* genus possess a versatile metabolic ability to colonize different ecological niches with diverse beneficial or detrimental effects [2–10,13,28]. Thus, environmental persistence through all of these abiotic stress tolerance features, such as the ability to grow in a wide range of temperatures, pH values, and salt concentrations [11], makes it possible to explain why *Kosakonia* was detected in chili powder [29]. The research approach developed in this study enabled the isolation and characterization of a new strain of nonpathogenic *K. cowanii* Ch1, at least for serrano pepper (*Capsicum annuum* L.), with an important metabolic ability to inhibit mycelial growth in pathogenic fungi through the production during fermentation of volatile organic compounds (VOCs).

According to the genome sequencing and phylogenetic analysis, *K. cowanii* Ch1 appeared to be the closest to *K. cowanii* JCM 10956, a human pathogen isolated from

human blood [2], and in the same clade as the phytopathogenic *K. cowanii* Pa82 [5]. *K. cowanii* JCM 10956 has two plasmid and virulence-related genes with a type III secretion system [2]. Interestingly, plasmid pCh1 has a 49% of similarity with plasmid p888-76-1 of *K. cowanii* JCM 10956 strain [2] and 46% of similarity with plasmid Wem22 identified in *K. cowanii* SMBL-WEM22 strain isolated from seawater in Hong Kong [30]. On the other hand, *K. cowanii* Pa82 has three plasmid and virulence-related genes with a type VI secretion system. In fact, in the *K. cowanii* Pa82 strain, the mutation of the *vgrG* gene, which encodes one of the type VI secretion system components, was functionally validated as a virulence factor causing patchouli bacterial wilt [5]. In Gram-negative bacteria, the type VI secretion system participates in diverse functions, including virulence, antibacterial activity, and metal ion uptake, conferring advantages during bacterial colonization [31]. On the other hand, genome sequencing revealed that *K. cowanii* Ch1 has virulence-related genes of invasion, such as flagellar component genes, but not for secretion systems nor for *vir/avr* genes (Table 3), which might explain the absence of infection symptoms in the leaves and fruits of the serrano pepper (*Capsicum annuum* L.) when the pathogenicity test was carried out. However, the colonization of serrano pepper seeds by *K. cowanii* Ch1 may lead to an important route for the spread of the bacterium and is likely related to the presence of *K. cowanii* in chili powder [29]; future investigation may reveal these chemotaxis mechanisms. Additionally, complete genome sequencing of *K. cowanii* Ch1 revealed the presence of antimicrobial resistance genes (Table 2), which are likely related to the resistance mechanisms of the β -lactam, erythromycin, clindamycin, and vancomycin antibiotics tested; thus, the potential public health risks for this bacterial strain must be evaluated due to its presence in chili powder. Therefore, the genomic information of *K. cowanii* Ch1 will be important for clarifying and understanding the evolution of metabolic versatility of the *Kosakonia* genus.

In recent decades, the increasing use of bacterial inoculants for plant growth promotion and biocontrol of phytopathogenic microorganisms has allowed for the isolation and characterization of the *Kosakonia* genus. Thus, for example, *K. pseudosacchari* TL8 and *K. pseudosacchari* TL13 have been characterized with antimicrobial activity against phytopathogens, such as *Botrytis* spp. and *Phytophthora* spp., as well as with multiple plant growth promotion activities and abiotic tolerance traits [11]. In a different study, *K. cowanii* B-6-1 [12] was isolated from tomato, and characterization showed biocontrol activity against *F. verticillioides*, *A. tenuissima*, and *B. cinerea*. However, in these studies, the production and identification of VOCs as biocontrols of these fungi were not conducted.

Recent studies have demonstrated the potential of VOCs during plant and post-harvest disease control caused by pathogenic microorganisms [28,32]. Diverse

compounds of different chemical classes of VOCs, such as alkenes, alcohols, ketones, organic acids, terpenes, benzenoids, and pyrazines, have been characterized, and based on their physical–chemical properties it has been established that they may affect cell walls and membranes through the downregulation of gene expression related to cell membrane fluidity, wall integrity, energy metabolism, and the production of cell wall-degrading enzymes, as well as alteration in the redox balance [32]. Therefore, in this study, the discovery of the *K. cowanii* Ch1 strain with capability of biocontrol in vitro of *A. alternata* and *S. rolsii*, likely due to VOC production, provides an additional mechanism for *Kosakonia* genus biocontrol activity. Of the 67 potential VOCs identified, nine compounds (dodecanoic acid, 3-hydroxy; ethanol; 1-butanol-3-methyl; acetaldehyde; butanoic acid, butyl ester; cyclodecane; 2-butanone, 3-hydroxy; disulfide, dimethyl; and pyrazine-2,5-dimethyl) were the most abundant compounds. Interestingly, these compounds have been detected in other bacteria with antifungal or antibacterial effects [28,32]; however, cyclodecane is not listed in the mVOC 2.0 Database [33]. Nevertheless, the variation, concentration, and antifungal effects of VOCs produced by each bacterial strain reported are specific, probably due to microbial growth conditions, nutritional requirements, genetics features, and mechanisms, with multiple modes of action against specific pathogenic microorganisms. Therefore, the mycelial growth inhibitory effects on *A. alternata* and *S. rolsii*, but not *F. oxysporum*, cannot be easily explained through the effects of a single compound from a heterogeneous mix of VOCs.

The production of 2-butanone, 3-hydroxy (acetoin), for example, showed the highest relative peak area in *K. cowanii* Ch1. According with genome analysis in *K. cowanii* Ch1, the presence of acetolactate decarboxylase could be an important metabolic route to obtain acetoin and further transformed by reversible reduction into 2, 3-butanediol by 2,3-butanediol dehydrogenase, also present in the genome. Also, production of 2,3-butanedione detected in *K. cowanii* Ch1 (Table 4) from nonenzymatic oxidative decarboxylation of acetolactate and converted to acetoin and 2,3-butanediol by 2,3-butanediol dehydrogenase could be important. Acetoin compound has been detected in some bacteria, such as the *Bacillus* and *Paenibacillus* genera, affecting mycelial growth and spore germination inhibition against diverse fungal strains [28]. Furthermore, the Enterobacteriaceae family commonly produces acetoin from pyruvate during the fermentation of glucose or other carbon sources through the Embden–Meyerhof (EM) pathway [34] and has garnered attention because they function as signal molecules in plants, promoting growth, drought tolerance, and defense against pathogens [35–37]. Additionally, it has been suggested that the acetoin pathway is related to plant

colonization of pathogenic microorganisms and as pheromones to attract a wide variety of insects [34]. On the one hand, the alcohol class detected in *K. cowanii* Ch1, such as ethanol and 1-butanol-3-methyl, with high relative peak areas, are also commonly produced during fermentation in the Enterobacteriaceae family and have been previously detected as components of VOCs in bacterial and fungal strains with antifungal activity [28]. The presence of aldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase enzymes in the genome of *K. cowanii* Ch1 represent an important key to convert the precursor acetyl-CoA to ethanol via acetaldehyde route during ethanol fermentation in an anaerobic environment. Also, butanal (butyraldehyde) route was detected in *K. cowanii* Ch1 genome and might lead to obtaining butanol [34]. Pyrazine-2,5-dimethyl is another VOC found in *K. cowanii* Ch1 with a high relative peak area and has been reported in diverse bacterial species. According to the genome analysis, this is synthesized probably through a threonine pathway to convert the precursor amino acetoacetate. Also, this compound can significantly inhibit the growth of plant pathogens such as *Magnaporthe oryzae*, *Phytophthora capsici*, and *A. solani* [32]. On the other hand, it has been reported that *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, and *Stenotrophomonas* produce disulfide, dimethyl as the most abundant compound in their VOC mixtures, with the ability to control the growth of a wide range of plant pathogens [38], and in our case was produced and detected in *K. cowanii* Ch1. In addition, disulfide, dimethyl improves the growth of plants and induces systemic resistance against plant pathogens [38]. In general, additional VOCs were produced, although with lower abundance, such as acids, alcohols, aldehydes, esters, hydrocarbons, ketones, organochlorines, aromatics, thioethers, and pyrazines, which have been reported to have antifungal activity according to the mVOC 2.0 Database [33].

In vitro experiments confirmed that *K. cowanii* Ch1 has antifungal activity against *A. alternata* and *S. rolfisii*, but not against *F. oxysporum*, probably due to VOCs produced with multiple routes of cell affectation, which accords with the diverse literature demonstrating the potential of VOCs against diverse pathogenic microorganisms. However, we did not perform single compound evaluations, since several reports had evaluated in vitro and in vivo single VOCs with different results, including use limitations on field crops and toxic effects in plants and animals [28,32]. Therefore, additional experiments are required to demonstrate the potential ecological role of *K. cowanii* Ch1 on plant responses against phytopathogenic microorganisms that accord with some of the VOCs detected in our analysis.

In conclusion, the genome sequencing of *K. cowanii* Ch1 open the possibility to further exploring important metabolic pathways related to VOC production and microbial

responses. Additionally, the finding that *K. cowanii* Ch1 may spread through chili seeds but cause no infection in fruits and leaves of *Capsicum annum* L., likely due to the absence of virulence-related genes of the secretion system, opens up the possibility that this bacterial strain can be used as an excellent candidate for the development of biocontrol agents. However, further studies are still needed to understand the role of the VOCs produced by *K. cowanii* Ch1 on pathogenic microorganisms and plant responses, as well as an antibiotic resistance analysis for biosafety during potential applications as a biocontrol.

FUNDING

This research was partially funded by the Universidad Autónoma de Querétaro (FONDEC-UAQ-2022; FOPER-2022).

REFERENCES

1. Brady, C.; Cleenwerck, I.; Venter, S.; Coutinho, T.; De Vos, P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Syst. Appl. Microbiol.* **2013**, *36*, 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.005>.
2. Yang, X.-J.; Wang, S.; Cao, J.-M.; Hou, J.-H. Complete genome sequence of human pathogen *Kosakonia cowanii* type strain 888-76. *Braz. J. Microbiol.* **2018**, *49*, 16–17. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.03.010>.
3. Bhatti, M.D.; Kalia, A.; Sahasrabhojane, P.; Kim, J.; Greenberg, D.E.; Shelburne, S.A. Identification and Whole Genome Sequencing of the First Case of *Kosakonia radicincitans* Causing a Human Bloodstream Infection. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 62. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00062>.
4. Berinson, B.; Bellon, E.; Christner, M.; Both, A.; Aepfelbacher, M.; Rohde, H. Identification of *Kosakonia cowanii* as a rare cause of acute cholecystitis: Case report and review of the literature. *BMC Infect. Dis.* **2020**, *20*, 366. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05084-6>.
5. Zhang, Y.; Wang, B.; Li, Q.; Huang, D.; Zhang, Y.; Li, G.; He, H. Isolation and Complete Genome Sequence Analysis of *Kosakonia cowanii* Pa82, a Novel Pathogen Causing Bacterial Wilt on Patchouli. *Front. Microbiol.* **2022**, *12*, 818228. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.818228>.
6. Krawczyk, K.; Borodynko-Filas, N. *Kosakoniacowanii* as the New Bacterial Pathogen Affecting Soybean (*Glycine max* Willd.). *Eur. J. Plant Pathol.* **2020**, *157*, 173–183. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01998-8>.

7. Brady, C.L.; Venter, S.N.; Cleenwerck, I.; Engelbeen, K.; De Vos, P.; Wingfield, M.J.; Telechea, N.; Coutinho, T.A. Isolation of *Enterobacter cowanii* from Eucalyptus showing symptoms of bacterial blight and dieback in Uruguay. *Lett. Appl. Microbiol.* **2009**, *49*, 461–465. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02692.x>.
8. Furtado, G.Q.; Guimarães, L.M.S.; Lisboa, D.O.; Cavalcante, G.P.; Arriel, D.A.A.; Alfenas, A.C.; Oliveira, J.R. First Report of *Enterobacter cowanii* Causing Bacterial Spot on Mabea fistulifera, a Native Forest Species in Brazil. *Plant Dis.* **2012**, *96*, 1576–1576. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-12-0160-pdn>.
9. Petrzik, K.; Brázdová, S.; Krawczyk, K. Novel Viruses That Lyse Plant and Human Strains of *Kosakonia cowanii*. *Viruses* **2021**, *13*, 1418.
10. Jan-Roblero, J.; Cruz-Maya, J.A.; Barajas, C.G. Chapter 12 – *Kosakonia*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*; Amaran, N., Senthil Kumar, M., Annapurna, K., Kumar, K., Sankaranarayanan, A., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 213–231. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00012-5>.
11. Romano, I.; Ventorino, V.; Ambrosino, P.; Testa, A.; Chouyia, F.E.; Pepe, O. Development and Application of Low-Cost and Eco-Sustainable Bio-Stimulant Containing a New Plant Growth-Promoting Strain *Kosakonia pseudosacchari* TL13. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 2044. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02044>.
12. Shi, J.-F.; Sun, C.-Q. Isolation, identification, and biocontrol of antagonistic bacterium against *Botrytis cinerea* after tomato harvest. *Braz. J. Microbiol.* **2017**, *48*, 706–714. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.03.002>.
13. Dennison, N.J.; Jupatanakul, N.; Dimopoulos, G. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr. Opin. Insect Sci.* **2014**, *3*, 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.07.004>.
14. Celestino Hernández, A.G.; Gómez Ortiz, V.; Arvizu Gómez, J.L.; Ramos López, M.Á.; Rodríguez Morales, J.A.; Flores Macías, A.; Álvarez Hidalgo, E.; Nuñez Ramírez, J.; Flores Gallardo, F.J.; García Gutiérrez, M.C.; et al. Detection of *Bacillus cereus* sensu lato Isolates Posing Potential Health Risks in Mexican Chili Powder. *Microorganisms* **2021**, *9*, 2226.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*; Approved Standard; 12th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018.
16. Monciardini, P.; Sosio, M.; Cavaletti, L.; Chiocchini, C.; Donadio, S. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes1. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2002**, *42*, 419–429. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb01031.x>.
17. Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R.A.; Dabos, M.L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P.; Iorga, B.I. Beta-lactamase database (BLDB) – Structure and function. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 917–919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>.
18. Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4*, 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
19. Felsenstein, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* **1985**, *39*, 783–791. <https://doi.org/10.2307/2408678>.

20. Jukes, T.H.; Cantor, C.R. Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, Munro, H.N., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1969; Volume 3, pp. 21-132.
21. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
22. Olson, R.D.; Assaf, R.; Brettin, T.; Conrad, N.; Cucinell, C.; Davis, J.J.; Dempsey, D.M.; Dickerman, A.; Dietrich, E.M.; Kenyon, R.W.; et al. Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): A resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *51*, D678-D689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>.
23. Brettin, T.; Davis, J.J.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Gerdes, S.; Olsen, G.J.; Olson, R.; Overbeek, R.; Parrello, B.; Pusch, G.D.; et al. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8365. <https://doi.org/10.1038/srep08365>.
24. Naquin, D.; d'Aubenton-Carafa, Y.; Thermes, C.; Silvain, M. CIRCUS: A package for Circos display of structural genome variations from paired-end and mate-pair sequencing data. *BMC Bioinform.* **2014**, *15*, 198. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-198>.
25. Ondov, B.D.; Treangen, T.J.; Melsted, P.; Mallonee, A.B.; Bergman, N.H.; Koren, S.; Phillippy, A.M. Mash: Fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biol.* **2016**, *17*, 132. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0997-x>.
26. Dmitry, A.; Mikhail, R.; Alla, L.; Pevzner, P.A. Plasmid detection and assembly in genomic and metagenomic data sets. *Genome Res.* **2019**, *29*, 961-968.
27. Dennis, C.; Webster, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1971**, *57*, 41-IN44. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80078-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80078-5).
28. Zhao, X.; Zhou, J.; Tian, R.; Liu, Y. Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 922450. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.922450>.
29. Hernández Gómez, Y.F.; González Espinosa, J.; Ramos López, M.Á.; Arvizu Gómez, J.L.; Saldaña, C.; Rodríguez Morales, J.A.; García Gutiérrez, M.C.; Pérez Moreno, V.; Álvarez Hidalgo, E.; Nuñez Ramírez, J.; et al. Insights into the Bacterial Diversity and Detection of Opportunistic Pathogens in Mexican Chili Powder. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1677.
30. Moore, W.E.; Lai, G.K.K.; Griffin, S.D.J.; Leung, F.C.C. Complete genome sequence of SMBL-WEM22, a halotolerant strain of *Kosakonia cowanii* isolated from Hong Kong seawater. *Microbiol. Resour. Announc.* **2021**, *10*, e00891-21.
31. Gallique, M.; Bouteiller, M.; Merieau, A. The Type VI Secretion System: A Dynamic System for Bacterial Communication? *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1454. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01454>.
32. Almeida, O.A.C.; de Araujo, N.O.; Dias, B.H.S.; de Sant'Anna Freitas, C.; Coerini, L.F.; Ryu, C.-M.; de Castro Oliveira, J.V. The power of the smallest: The inhibitory activity of microbial volatile organic compounds against phytopathogens. *Front. Microbiol.* **2023**, *13*, 951130. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.951130>.

33. Lemfack, M.C.; Gohlke, B.-O.; Toguem, S.M.T.; Preissner, S.; Piechulla, B.; Preissner, R. mVOC 2.0: A database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *46*, D1261–D1265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1016>.
34. Marquez-Villavicencio, M.d.P.; Weber, B.; Witherell, R.A.; Willis, D.K.; Charkowski, A.O. The 3-Hydroxy-2-Butanone Pathway Is Required for *Pectobacterium carotovorum* Pathogenesis. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022974>.
35. Ryu, C.M.; Farag, M.A.; Hu, C.H.; Reddy, M.S.; Wei, H.X.; Paré, P.W.; Kloepper, J.W. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4927–4932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730845100>.
36. Ryu, C.-M.; Farag, M.A.; Hu, C.-H.; Reddy, M.S.; Kloepper, J.W.; Paré, P.W. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2004**, *134*, 1017–1026. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>.
37. Cho, S.M.; Kang, B.R.; Han, S.H.; Anderson, A.J.; Park, J.-Y.; Lee, Y.-H.; Cho, B.H.; Yang, K.-Y.; Ryu, C.-M.; Kim, Y.C. 2R,3R-Butanediol, a Bacterial Volatile Produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, Is Involved in Induction of Systemic Tolerance to Drought in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2008**, *21*, 1067–1075. <https://doi.org/10.1094/mpmi-21-8-1067>.
38. Tyagi, S.; Lee, K.-J.; Shukla, P.; Chae, J.-C. Dimethyl disulfide exerts antifungal activity against *Sclerotinia minor* by damaging its membrane and induces systemic resistance in host plants. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6547. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63382-0>.

CAPÍTULO 7

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS Y SUELOS DE TIERRAS AGRÍCOLAS

Data de submissão: 21/08/2026

Data de aceite: 10/09/2026

Louisiana Ivonne Espinosa Pérez

Laboratorio de Micología Experimental
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de
San Luis Potosí, S.L.P.
San Luis Potosí, S.L.P., México

Claudia Margarita Martínez Domínguez

Laboratorio de Micología Experimental
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de
San Luis Potosí, S.L.P.
San Luis Potosí, S.L.P., México
<https://orcid.org/0000-0002-5335-6137>

Adriana Rodríguez Pérez

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Centro de Investigación y
Extensión de la Zona Media
El Balandran. Calle Esconría No. 230
Barrio 3, C.P. 79660
Cd. Fernández, San Luis Potosí, México
<https://orcid.org/0000-0002-6570-6579>

Juan Fernando Cárdenas González

Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Centro de Investigación y
Extensión de la Zona Media
El Balandran. Calle Esconría No. 230
Barrio 3, C.P. 79660
Cd. Fernández, San Luis Potosí, México
<https://orcid.org/0000-0002-3502-5959>

Víctor Manuel Martínez Juárez

Área Académica de Medicina
Veterinaria y Zootecnia
Instituto de Ciencias Agropecuarias
Universidad Autónoma del
Estado de Hidalgo
Avenida Universidad Km. 1 s/n
Exhacienda Aquetzalpa, 43600
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México
<https://orcid.org/0000-0002-7426-6835>

Ismael Acosta Rodríguez

Laboratorio de Micología Experimental
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de
San Luis Potosí, S.L.P.
San Luis Potosí, S.L.P., México
<https://orcid.org/0000-0001-8620-2727>

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue evaluar la concentración de metales pesados y la población fúngica en aguas y suelos de tierras agrícolas. En el análisis de las muestras por Espectrofotometría de Absorción Atómica, se observó que la concentración de los metales estudiados estaba en el rango normal, siendo el estroncio el que se encontró en mayor concentración. Se aislaron 13 especies diferentes de hongos, 3 micelios estériles, un actinomiceto y 3 colonias no identificadas, sumando un total de 47 colonias, encontrándose en mayor proporción las especies de *Aspergillus* sp. 1 y 2, y en menor

proporción, las especies de *Cladosporium* sp., *Drechslera* sp., *Graphium* sp., mientras que el resto de las especies se presentaron de manera intermedia.

PALABRAS CLAVE: metales pesados; hongos contaminantes; aguas; suelos; tierras agrícolas.

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF WATER AND SOIL FROM AGRICULTURAL LAND

ABSTRACT: The objective of this work was to evaluate the concentration of heavy metals and the fungal population in waters and soils of agricultural lands. In the analysis of the samples by Atomic Absorption Spectrophotometry, it was observed that the concentration of the metals studied was in the normal range, with strontium being the one found in the highest concentration. 13 different species of fungi were isolated, 3 sterile mycelia, one actinomycete and 3 unidentified colonies, adding up to a total of 47 colonies, with *Aspergillus* sp., 1 and 2 species found in a greater proportion, and to a lesser extent the species of *Cladosporium* sp., *Drechslera* sp., *Graphium* sp., while the rest of the species were presented intermediately.

KEYWORDS: heavy metals; contaminating fungi; waters; soils; agricultural lands.

1. INTRODUCCIÓN

El suelo, enlace entre factores bióticos y abióticos, es esencial para la vida como lo es el aire y el agua. Además de la sustentabilidad que ofrece a multitud de especies vegetales, animales e incluso microbianas, tiene un papel indispensable en todas las actividades humanas como la agricultura y la minería. Su evidente importancia pasa a veces desapercibida, y a través del tiempo ha sido utilizado como almacén de toda clase de residuos, que no sólo provocan una alteración del mismo, sino que también pueden ser un riesgo para la salud (Konradt et al., 2023). La minería es una de las actividades antropogénicas que más ha contribuido a la contaminación de suelos, de ella se obtiene una amplia gama de metales utilizados para múltiples fines como el cobre (Cu) en la conducción de electricidad, el oro (Au) y la plata (Ag) en la elaboración de joyería o el arsénico (As) en la fabricación de aleaciones (Camacho de la Cruz et al., 2021). Durante todas las fases que encierra la minería, se generan alteraciones al medio ambiente (suelo, aire, aguas superficiales y subterráneas) debido a metales pesados como cadmio (Cd), cromo (Cr), níquel (Ni), plomo (Pb), zinc (Zn) (Acosta-Rodríguez y cols., 2012). En el beneficio se generan residuos sólidos conocidos en el ambiente minero como jales y terreros que bajo condiciones no controladas pueden producir contaminación por elementos potencialmente tóxicos. Ortiz-Monasterio y cols. (1987) los incluyen en la categoría de “Desechos Industriales Peligrosos”. Los factores ambientales como la lluvia y el viento son también responsables de la dispersión de los metales desde las presas de jales y terreros, contaminando suelos aledaños denominados suelos impactados por residuos mineros, que resultan ser un riesgo para la salud (Camacho de la Cruz et al., 2021).

Recientemente, está bien establecido el potencial de adaptación de algunos microorganismos en zonas contaminadas con metales pesados, y el uso de su biomasa viva y/o muerta para tratar de eliminarlos de los diferentes nichos acuáticos contaminados. Por razones económicas, resultan de particular interés los tipos de biomasa abundante, como los desechos generados por fermentaciones industriales de gran escala o de ciertas algas que enlazan metales y se encuentran en grandes cantidad en el mar. Algunos de estos tipos de biomasa que absorben metales en cantidades elevadas, sirven como base para procesos de bioabsorción de metales, previendo su uso particular como medios muy competitivos para la destoxificación de efluentes industriales que contienen metales y para la recuperación de metales preciosos (Jeyakumatr et al., 2023). En la literatura se ha reportado el aislamiento de microorganismos resistentes a metales pesados como: *Cryptococcus albidus* aislada de zonas mineras de Guanajuato resistente a plata (Mendoza y cols., 1994); *Thiobacillus ferrooxidans* a partir de suelos ricos en azufre (Espejo y Romero, 1987) o resistentes a altas concentraciones de arsénico (Orrantia y cols., 1995; *Aspergillus flavus* tolerantes a metales pesados (Díaz y cols., 2002); hongos contaminantes tolerantes a plomo (Robles Galván, 1996) y la acumulación de metales pesados por macromicetos comestibles (Alonso y cols., 2004).

También, se ha estudiado el aislamiento de microorganismos tolerantes y su capacidad de degradación, a partir de sitios contaminados con el mismo, como las bacterias *Rhodococcus aetherivorans* y *E. wratislaviensis* (Auffret et al., 2009), y *Pseudomonas aeruginosa* (Emtiaz et al., 2005), las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* (Ilori et al., 2008), y los hongos filamentosos *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp (Rivera-Cruz et al., 2002) y *Trichoderma asperellum* (Husaini et al., 2008).

Por otro lado, la comunidad de San Vicente Moctezuma, San Luis Potosí, cosecha alfalfa, chile ancho y cascabel, además de tomate, y debido al uso indiscriminado de fertilizantes, se ha sugerido que pudiera estar contaminado con metales pesados, dando como consecuencia una menor producción de los productos antes mencionados, además del potencial de intoxicación en los humanos, debido al consumo de los mismos, así como cambiar la flora del agua y suelo, al desarrollar una tolerancia y/o resistencia a los metales contaminantes. Por lo que es de interés realizar un análisis de metales pesados y microbiológicos de estas tierras para ver si hay contaminación por diferentes agentes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MUESTRAS

Se tomaron muestras de suelo y agua del rancho “La Esmeralda” de la comunidad de San Vicente Moctezuma, San Luis Potosí, en recipientes estériles, se guardaron en

hielera, se transportaron al Laboratorio de Micología Experimental de la FCQ/UASLP, y se guardaron a 4°C hasta su uso.

2.2. ANÁLISIS DE METALES PESADOS

La determinación de metales pesados de las muestras se realizó por Espectrofotometría de absorción atómica.

2.3. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS

2.3.1. Cultivo de microorganismos

Se peso 1 g de cada una de las muestras colectadas (aguas y tierra) y se colocó en tubos de ensaye (20 mm X 100 mm) que contenían 15 mL de caldo nutritivo. Posteriormente, se incubaron a 28°C por 30 días. Los tubos que mostraron desarrollo de hongos se resembraron en medios sólidos para la segregación y aislamiento de las especies.

2.3.2. Aislamiento

Se preparó 1 litro de agar Saboraud Dextrosa (ASD) y se vació en cajas de Petri estériles, y éstas se inocularon por picadura con un asa micológica con los hongos que crecieron en el caldo nutritivo. Se incubaron a 28°C bajo condiciones de aerobiosis, observándose crecimiento a la semana en algunas colonias y a las dos semanas en otras. Una vez separadas, las colonias se resembraron en tubos de ensaye (20 mm X100 mm) con Agar Papa Dextrosa (APD) en pico de flauta por duplicado, con el fin de preservar los hongos y facilitar su manipulación.

2.3.3. Identificación

La identificación se realizó a partir de los cultivos puros previamente obtenidos, realizando observaciones directas al microscopio óptico, utilizando el colorante azul algodón lactofenol para resaltar las estructuras vegetativas y reproductoras. En aquellas colonias en las que sólo se observó micelio estéril, fue necesario montar la técnica de microcultivo de Riedell, con medio ADP preparándose laminillas semipermanentes para su observación al microscopio. En algunos microcultivos no se logró el crecimiento de los hongos, por lo que se probó otro medio para su desarrollo como el agar avena/jitomate. La identificación se realizó empleando diversas fuentes bibliográficas (Koneman, 1987; López- Martínez y cols., 2004). También se realizó un análisis de la macromorfología colonial y las características generales de la colonia (tamaño, color, apariencia), de las

hifas y de las estructuras reproductoras para la determinación de géneros y especies (López -Martínez y cols., 2004).

Los criterios más importantes respecto a la macromorfología colonial fueron:

Tiempo de crecimiento. Varía entre 24 h a 3 semanas o más dependiendo del hongo en estudio.

Aspecto: puede ser aterciopelado, pulverulento, algodonoso, rugoso, plegado, cerebriforme, para la mayoría de los hongos filamentosos, o cremosa en el caso de hongos levaduriformes.

Consistencia: dura, membranosa, blanda o suave, entre otras.

Pigmentación: el color de la colonia depende del pigmento del micelio o de los propágulos. El reverso de la colonia puede presentar pigmento difusible al medio.

En cuanto a la micromorfología los criterios seguidos fueron:

- Tipo de micelio.
- Estructuras de reproducción.

3. RESULTADOS

En el análisis de las muestras por Espectrofotometría de Absorción Atómica, se observó que la concentración de los metales estudiados estaba en el rango normal, siendo el estroncio el que se encontró en mayor concentración (Tabla No. 1).

Tabla No. 1.- Parámetros y metales pesados analizados en las muestras estudiadas.

DQO	10.3	NMX-030-SCFIÑ2001
NITRATOS	2.79	SM-4500-NO ₃ -D
NITRITOS	<0.023	NMX-AA-099-SCFI-2006
FLÚOR	0.95	NMX-AA-077-SCFI-2001
Al	<0.03	EPA 200.7
As	<0.03	EPA 200.7
B	0.319	EPA 200.7
Ba	0.049	EPA 200.7
Cd	<0.03	EPA 200.7
Cr	<0.03	EPA 200.7
Cu	<0.03	EPA 200.7
Mn	<0.03	EPA 200.7
Ni	<0.03	EPA 200.7
Pb	<0.03	EPA 200.7
Sb	<0.03	EPA 200.7
Se	<0.03	EPA 200.7

Sn	<0.03	EPA 200.7
Sr	1.508	EPA 200.7
Zn	<0.03	EPA 200.7

3.1. AISLAMIENTO DE LOS HONGOS

Con el fin de seleccionar hongos tolerantes a metales, se realizó un análisis micológico usando las muestras de agua y suelo. Se aislaron 13 especies distintas de hongos, 3 micelios estériles, un actinomiceto y 3 colonias no identificadas, sumando un total de 47 colonias. En las siguientes fotografías, se observan algunas de las especies aisladas, encontrándose en mayor proporción las especies de *Aspergillus* sp. 1 y sp. 2 y en menor las especies de *Cladosporium* sp., *Drechslera* sp., y *Penicillium* sp., 1, el resto de las especies se presentaron de manera intermedia.

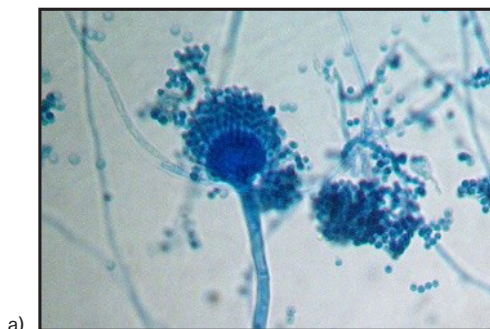
Resistencia en placa de *A. fumigatus* a 200 y 500 ppm de Pb.



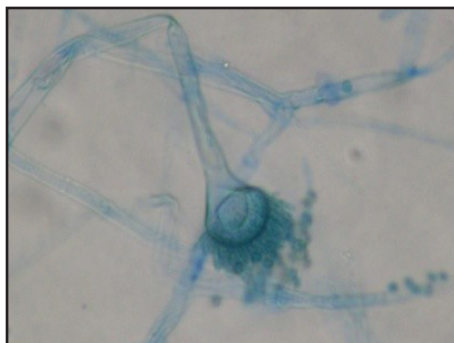
Resistencia en placa de *Penicillium* sp.1 a 200 y 500 ppm de Pb.



Morfología microscópica de *A. fumigatus*. Control (a), con 200 y 500 ppm de Pb (b) y 200 y 500 ppm de Cu (c) (40X).



200 ppm



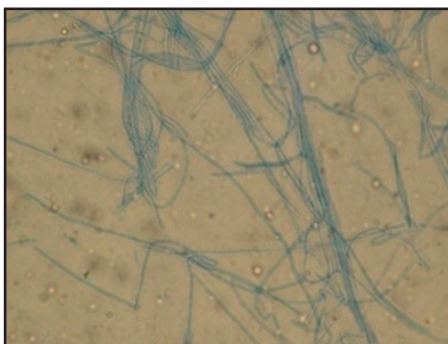
500 ppm



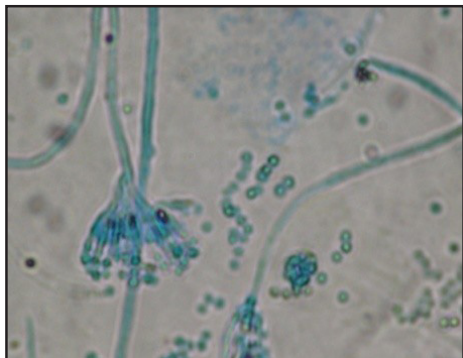
200 ppm



500 ppm



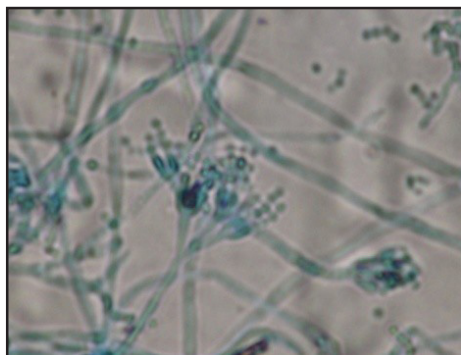
Morfología microscópica de *Penicillium* sp.1. Control (a), con 200 y 500 ppm de As (b) y 200 y 500 ppm de Pb (c) (40X).



a)

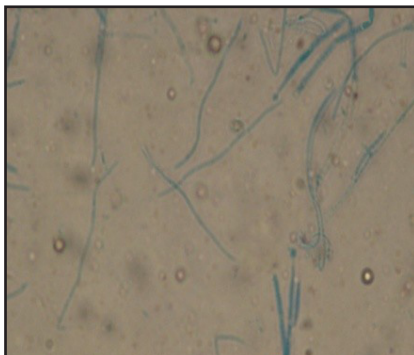
200 ppm

500 ppm



b)

200 ppm

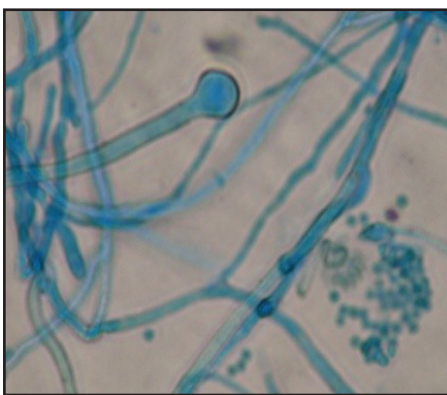


500 ppm



c)

200 ppm



500 ppm

4. CONCLUSIONES

Las muestras de agua y suelo analizadas mostraron una concentración normal de los metales pesados estudiados, además, se encontraron diferentes hongos, los cuales presentan diferentes resistencias a metales pesados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta-Rodríguez, I., Cárdenas González, J.K. y Martínez Juárez, V.M. 2012. El uso de diferentes biomásas para la eliminación de metales pesados de sitios contaminados. *Ide@s Concyteg*. Vol. 5, No. 85. Julio. pp. 911-922. ISSN 2007-2716.

Acosta, I., Rodríguez, X., Gutiérrez, C., Moctezuma, M.G. 2004. Biosorption of chromium (VI) from aqueous solutions by fungal biomass. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2(1), 1-7.

Asha, V. 1987. *Handbook of atomic absorption analysis*. Vol.1. CRS Press, Inc.

Atlas, R.M. Bartha, R. 2002. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. 4ª Edición. Pearson Educación, Madrid.

Babich, H; Stotzky, G. 1985. Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecologic processes: a review and potential application to regulatory policies. *Environ. Res.* 36: 111-137.

Baldrian, P. 2003. Interactions of heavy metals with-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 32: 78-91.

Camacho de la Cruz, A.A., Espinosa-Reyes, G., Reboloso-Hernández, C.A., Carrizales-Yáñez, L., Ilizaliturri-Hernández, C.A., Reyes-Arreguín, L.E., Díaz-Barriga, F. 2021. Holistic health risk assessment in an artisanal mercury mining region in Mexico. *Environmental Monitoring and Assessment*. 193(541):1-14. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09312-7>

Carroll, L. 1989. Metal toxicity. In: Hughes, M.N. and Poole, R.K. (Eds). *Metals and microorganisms*. Chapman and Hall, New York, N.Y. pp 253-301.

Cervantes, C; Moreno-Sánchez, R; Cañizarez-Villanueva, R.O; Gutiérrez-Corona, F; González-Moreno, S; Devars, S; Sosa-Luna, L. 1999. Biorremediación de los desechos contaminados por metales pesados. En: Cervantes, C; Moreno-Sánchez, R. (Eds). *Contaminación ambiental por metales pesados*. AGT Editores, México, D.F. pp 133-141.

Cox, P.A. 1995. *The elements on earth: Inorganic Chemistry in the Environment*. Press. Oxford University, Oxford.

Díaz, M.P., Moctezuma, M.G., Acosta, I. 2002. Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de desechos mineros y su capacidad de remoción de metales pesados y flúor en solución. *FEMISCA*. Septiembre: 471-472.

Flores-Vázquez, J.A., Ly, M., Tapia-Huanambal, N., Maldonado-García, H. 2001. Biorremediación de metales tóxicos en efluentes mineros aplicando biosorción. *Rev. del Instituto de Investigación de la Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias*, 4, (7): 46-51.

Gadd, G.M. 1990. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganism. *Experimentia*. 46: 834-840.

Gadd, G.M. 1992. Microbial control of heavy metal pollution. En: Fry, J.C., Gadd, G.M., Herbert, R.A., Jones, C.W., Watson-Crick (Eds). Microbial control of environmental pollution. pp 59-88.

Gadd, G.M. Sayer, A.J. 2000. Influence of fungi on the environmental mobility of metals and metalloids. In: Lovley D. (Ed). Environmental Microbe-Metal Interactions. ASM. Press. Washington, D.C. pp. 237-256.

Gazgó, G.L. 2001. The key microbial process in the removal of toxic metals and radionuclides from the environment. CEJOEM, 7, (3) (4): 178-185.

Gutiérrez-Corona, F., Obregón-Herrera A., Cano-Canchola, C. 1999. Resistencia a metales pesados en hongos. En: Cervantes, C. y Moreno-Sánchez, R. (Eds). Contaminación ambiental por metales pesados. AGT Editores, México, D.F. pp 79-97.

Jeyakumar, P., Debnath, Ch., Vijayaraghavan, R., Muthuraj, M. 2023. Trends in Bioremediation of Heavy Metal Contaminations. Environ. Eng. Res. 28(4): 220631 <https://doi.org/10.4491/eer>.

Juárez Alcaraz, A. 2004. Biolixiviación de minerales sulfuro-ferrosos en jales: aislamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados. Tesis profesional doctoral. Biotecnología. Universidad de Colima, Tecomán.

Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. 1992. Trace elements in soil and plants. 2nd edition. CRC Press. Boca Raton.

Kapoor, A. and Viraraghavan T. 1997. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. Bioresource Technology 61 (3): 221-227.

Koneman, R. 1987. Micología Práctica de Laboratorio. 3ª Edición. Médica Panamericana, Buenos Aires, pp 100-120.

Konradt, N., Dillmann, S., Becker, J., Schrodén, D., Rohns, H.P., Wagner, C., Müller, U., Konradt, D., Janknecht, P., Hobby, R. et al. 2023. Removal of Chromium Species from Low-Contaminated Raw Water by Different Drinking Water Treatment Processes. Water. 15, 516. <https://doi.org/10.3390/w15030516>

Kosman, J.D. 1994. Transition metal ion uptake in yeast and filamentous fungi. In: Winkelman, G. y Winge, D.R. (Ed). Metal ions in fungi. Marker Dekker. Inc. New York, N.Y. pp 1-37.

CAPÍTULO 8

REMOCIÓN DE CROMO (VI) EN SOLUCIÓN ACUOSA POR DIFERENTES BIOMASAS NATURALES

Data de submissão: 21/08/2026

Data de aceite: 10/09/2026

Nancy C. Pacheco Castillo

Instituto de Física
Universidad Autónoma de
San Luis Potosí, S.L.P.
Av. Parque Chapultepec No. 1570
Col. Privadas del Pedregal. C.P. 78295
San Luis Potosí, S.L.P., México
<https://orcid.org/0009-0009-8847-0050>

Dalila del Socorro Contreras Briones

Laboratorio de Micología Experimental
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de
San Luis Potosí, S.L.P.
Av. Dr. Manuel Nava No. 6
Zona Universitaria. C.P. 78210
San Luis Potosí, S.L.P., México
<https://orcid.org/0000-0003-3260-5947>

Adriana Rodríguez Pérez

Universidad Autónoma de
San Luis Potosí
Centro de Investigación y
Extensión de la Zona Media
El Balandran. Calle Escontría No. 230
Barrio 3, C.P. 79660
Cd. Fernández, San Luis Potosí, México
<https://orcid.org/0000-0002-6570-6579>

Juan Fernando Cárdenas González

Universidad Autónoma de
San Luis Potosí
Centro de Investigación y
Extensión de la Zona Media
El Balandran. Calle Escontría No. 230
Barrio 3, C.P. 79660
Cd. Fernández, San Luis Potosí, México
<https://orcid.org/0000-0002-3502-5959>

Víctor Manuel Martínez Juárez

Área Académica de Medicina
Veterinaria y Zootecnia
Instituto de Ciencias Agropecuarias
Universidad Autónoma del
Estado de Hidalgo
Avenida Universidad Km. 1 s/n
Exhacienda Aquetzalpa, 43600
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México
<https://orcid.org/0000-0002-7426-6835>

Ismael Acosta Rodríguez

Laboratorio de Micología Experimental
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de
San Luis Potosí, S.L.P.
Av. Dr. Manuel Nava No. 6
Zona Universitaria. C.P. 78210
San Luis Potosí, S.L.P. México
<https://orcid.org/0000-0001-8620-2727>

RESUMEN: Recientemente, se han utilizado microorganismos y materiales de bajo costo, como: residuos industriales, agrícolas ó

urbanos para la adsorción y/o recuperación de metales pesados de efluentes industriales contaminados, entre los que se encuentran cáscaras y semillas de diferentes frutos, con resultados satisfactorios, por lo que el objetivo de este trabajo, fue analizar la remoción y/o reducción de Cromo (VI), por diferentes biomásas naturales (Naranja, Tamarindo, Mandarina, Litchi, Limón, Mamey y Melón) determinando la concentración de Cr (VI) en solución, por el método colorimétrico de la Difenilcarbazida, el Cr (III) por Cromazurol S y el Cr total por Espectrofotometría de Absorción Atómica, encontrando que todas las biomásas analizadas remueven eficientemente 1 g del metal a un pH de 1.0 y 60°C, además eliminan el metal de tierra contaminada con 297 mg de cromo (VI)/g tierra, y éste se puede desorber de la biomasa lo cual representa otra gran ventaja para su utilización.

PALABRAS CLAVE: cromo (VI); eliminación; biomásas naturales; contaminación; biorremediación.

REMOVAL OF HEXVALENT CHROMIUM [CR(VI)] FROM AQUEOUS SOLUTION USING DIFFERENT NATURAL BIOMASSES

ABSTRACT: Recently, microorganisms and low-cost materials – such as industrial, agricultural, or urban waste (including fruit peels and seeds) – have been used to adsorb and/or recover heavy metals from contaminated industrial effluents with satisfactory results. Therefore, the objective of this study was to analyze the removal and/or reduction of Chromium (VI) using different natural biomasses (orange, tamarind, mandarin, lychee, lemon, mamey, and melon). Chromium (VI) concentrations in solution were determined using the diphenylcarbazide colorimetric method, Chromium (III) using Chromazurol S, and total Chromium via atomic absorption spectrophotometry. The results showed that all analyzed biomasses efficiently removed 1 g of the metal at pH 1.0 and 60°C, and also removal the metal from soil contaminated with 297 mg of Cr(VI)/ gram of soil; furthermore, the metal could be desorbed from the biomass, representing another significant advantage for its application.

KEYWORDS: chromium (VI); elimination; biomasses; natural; contamination; biorremediatoón.

1. INTRODUCCIÓN

El cromo es un elemento esencial para hombres y animales, aunque niveles elevados de este metal (15 mg en agua de ríos y 0.10 mg /L en agua potable) resultan tóxicos en los seres vivos. Particularmente, el Cromo (VI) tiene efectos carcinogénicos en animales y mutagénicos en humanos y bacterias. En las aguas residuales, este metal se encuentra en solución como CrO_4^{2-} , el cual puede eliminarse por reducción, precipitación química, adsorción e intercambio iónico. El proceso más utilizado es la adición de un agente reductor que convierta el Cromo (VI) a Cromo (III), y posteriormente se le precipita con soluciones básicas a $\text{Cr}(\text{OH})_3$. Recientemente, se ha analizado el uso de metodologías alternativas para la adsorción y absorción de metales pesados, así como la reducción de

Cromo (VI) a Cromo (III) por algunos microorganismos, como: *Pseudomonas* sp. (Maclean et al. 2001), *Pseudomonas putida* (Park et al., 2000), *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Allegretti et al., 2006), *Arthrobacter rhombi* (Elangovan et al., 2009), *Candida maltosa* (Ramírez-Ramírez et al., 2004), *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. (Acevedo et al., 2006), que son bacterias, levaduras y hongos, así como la bioadsorción del mismo por biomásas fúngicas como: *Cryptococcus neoformans* y *Helminthosporium* sp. (Acosta et al., 2004), *Aspergillus niger* (Park et al., 2005), *Rhizopus arrhizus* (Sag et al. 2002) *Mucor hiemalis* (Tewari et al., 2005), *Aspergillus niger* (Khambhaty et al., 2009), *Paecilomyces* sp (Acosta et al., 2010) y diferentes especies de *Penicillium* (Acosta et al., 2024).

Se han utilizado materiales de bajo costo, como residuos industriales agrícolas o urbanos para la adsorción y/o recuperación de metales pesados de efluentes industriales contaminados, entre los que se encuentran las biomásas de: cáscara y semillas de Manzana, (Sarin et al., 2006), cáscaras de Avellana (Cimino et al., 2000), Naranja (Pérez et al., 2007), Tamarindo (Popuri et al., 2007; Acosta et al., 2010), caña azúcar (*Saccharum officinarum*) (Aranda-González et al., 2024) y de cacahuete (*Arachys hypogaea*) (Rodríguez-Pérez et al., 2025). Además, se ha reportado que algunas de estas biomásas pueden reducir el Cromo (VI) a cromo (III), como la biomasa de Kombucha (hongo del Te) (Razmovski et al., 2008), Mezquite (Aldrich et al., 2003), corteza de Eucalipto (Sarin et al., 2006), bauxita calcinada (Baral, et al., 2007), residuos de rosas rojas (Shafqat, et al., 2008), corteza de Yohimbina (Fiol et al., 2008), cáscara de Litchi (Martínez et al., 2010). Por lo anterior, es de gran interés analizar otros materiales de fácil obtención para tratar de eliminar y/o reducir el metal de aguas y suelos contaminados con el mismo metal. El objetivo de este trabajo fue determinar la remoción de Cromo (VI) en solución acuosa por las biomásas de las cáscaras de Limón, Naranja, Mandarina, Melón, Litchi, Tamarindo y Mamey.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. OBTENCIÓN DE LAS BIOMASAS CELULARES

Para la obtención de las biomasa, las cáscaras (obtenidas a partir de los frutos recolectados entre los meses de junio-septiembre de 2025, del mercado República de la ciudad capital), se cortan en piezas pequeñas, lavando exhaustivamente con agua tridesionizada, para remover el polvo y los componentes adheridos, se secaron a 60°C/24 h y se molieron hasta la obtención de un polvo fino, utilizando diferentes concentraciones de estas biomásas estériles, para los estudios descritos a continuación.

2.2. ESTUDIOS DE REMOCIÓN

Para los estudios de remoción y reducción, se trabajó con 100 mL de una solución de 100 mg/L de Cr (VI) obtenida por dilución de una solución patrón de 1.0 g/L preparada en agua tridesionizada a partir de $K_2Cr_2O_7$. Se ajustó el pH de la dilución a analizar con H_2SO_4 1 M y/o NaOH 1 M, antes de adicionarla a la biomasa celular. Se mezcló 1.0 g de las diferentes cáscaras a analizar (previamente esterilizada a 15 libras y 120°C, en matraces Erlenmeyer de 250 mL), con 100 mL de una solución de diferentes concentraciones del metal, incubando con agitación constante a 100 rpm a 28°C, tomando a diferentes tiempos y en condiciones estériles, alícuotas de 5 mL cada una, las cuales se centrifugaron a 3000 rpm (5 min), y al sobrenadante respectivo se le determinó la concentración de Cr (VI) en solución, utilizando el método colorimétrico de la Difenilcarbazida (desarrollo de coloración rosa violeta, el Cr (III) por el del Cromazurol S y el Cr total por Espectrofotometría de Absorción Atómica. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

2.3. BIORREMEDIACIÓN

En 14 matraces Erlenmeyer de 250 mL fueron colocados 5 g de las siguientes biomazas de cáscara de Tamarindo, Naranja, Litchii, Mandarina, Mamey, Melón y Limón, respectivamente, después se les agregaron 20 g de tierra contaminada con aproximadamente 297 mg Cr (VI)/g de tierra, obtenida de una tina de lavado de una cromadora de Celaya, Gto., y fueron aforados con agua tridesionizada a volumen final de 100 mL. La mezcla de tierra contaminada y las diferentes biomazas se incubaron a 28°C con agitación constante (100 rpm), y cada 24 h, se tomaron alícuotas de 5.0 mL, determinándoles la concentración de Cr (VI) en el sobrenadante.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las biomazas analizadas remueven eficientemente el Cromo VI a pH=1.0 y 28°C, siendo la más eficaz la cascara de Litchi, pues a los 5 min remueve el 100% del metal, seguida de la de Mamey y Tamarindo (25 y 30 min, respectivamente) (Figura 1). Con respecto a la temperatura, la mayor remoción a 60 °C fue con la cascara de Litchii, pues elimina 1.0 g/L de Cr VI a los 35 minutos (Figura 2), mientras que a 28°C, lo elimina a los 90 minutos (Figura 3). Además, todas las biomazas estudiadas reducen el metal en solución, con gran eficiencia a diferentes tiempos de incubación (Figura 4). Por otro lado, todas las biomazas remueven y reducen el metal a partir de tierra contaminada con 297 mg/g de tierra, en porcentajes del 92 al 100% (Figura 5). Finalmente las biomazas son capaces de desorber el metal al cambiar el pH (Figura 6).

Figura 1.- Remoción de Cr VI por diferentes biomاسas utilizando 1 g de biomasa con una solución de 50 mg/L Cr VI a 100 rpm. pH 1.0. 28°C.

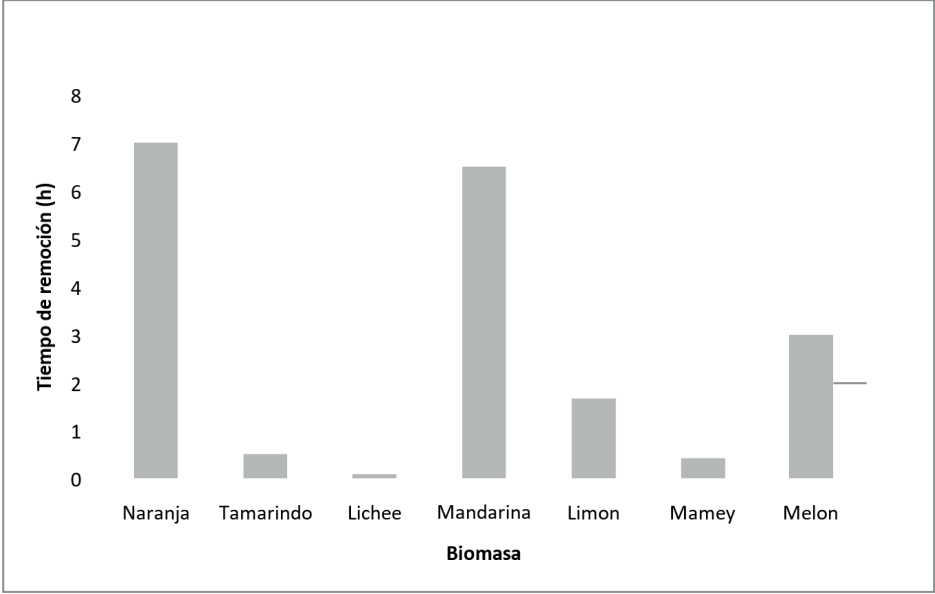


Figura 2.- Remoción de 1 g/L de Cr VI por diferentes biomاسas a 60°C, pH=1 a 100 rpm utilizando 1 g de biomasa.

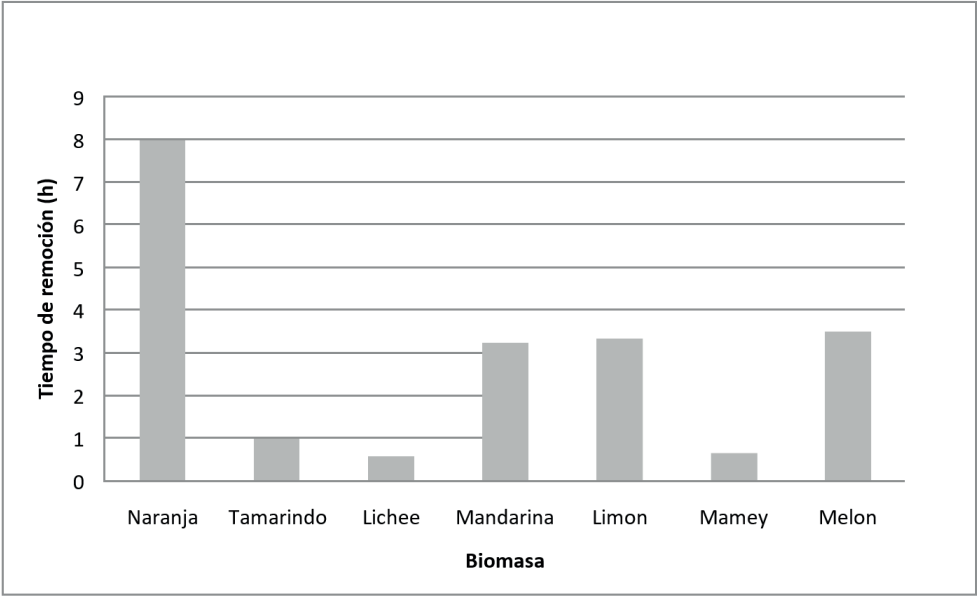


Figura 3.- Remoción de 1 g/L de Cr VI por diferentes biomosas a 28°C, pH=1 a 100 rpm utilizando 1 g de biomasa.

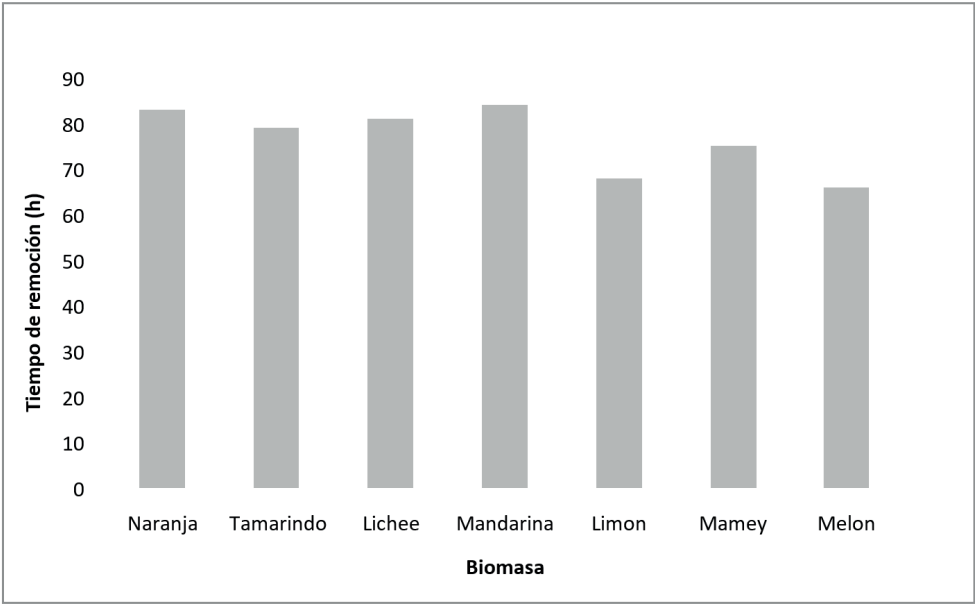


Figura 4.- Reducción de 1 g/L de Cr VI por diferentes biomosas 28°C, pH=1 utilizando 1 g de biomasa a 100 rpm.

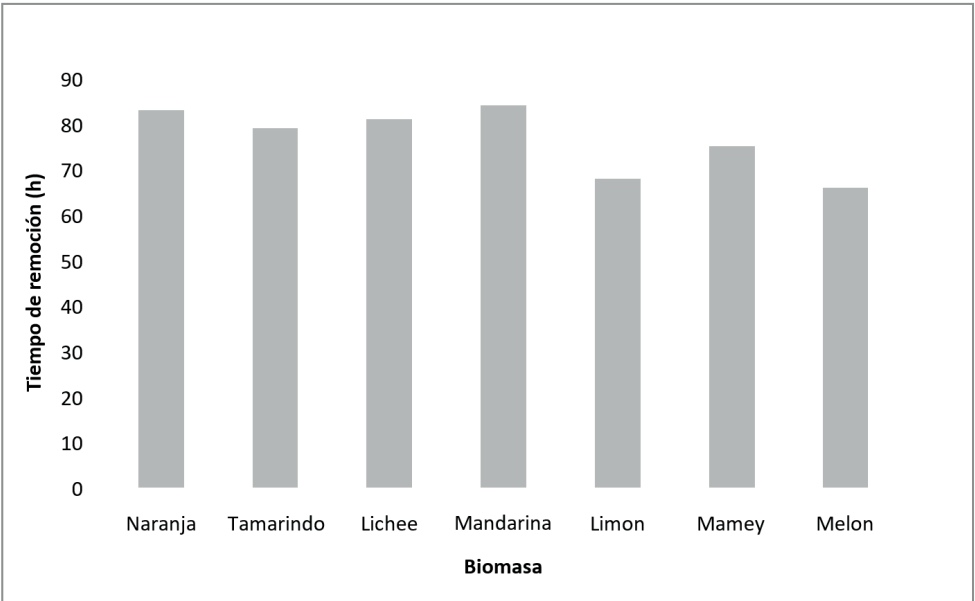


Figura 5.-Bioremediación de tierra contaminada con 297 mg/g de Cr VI/ g de tierra. 28°C. 100 rpm. 20 g de tierra contaminada. 5 g de biomasa. 6 días de incubación.

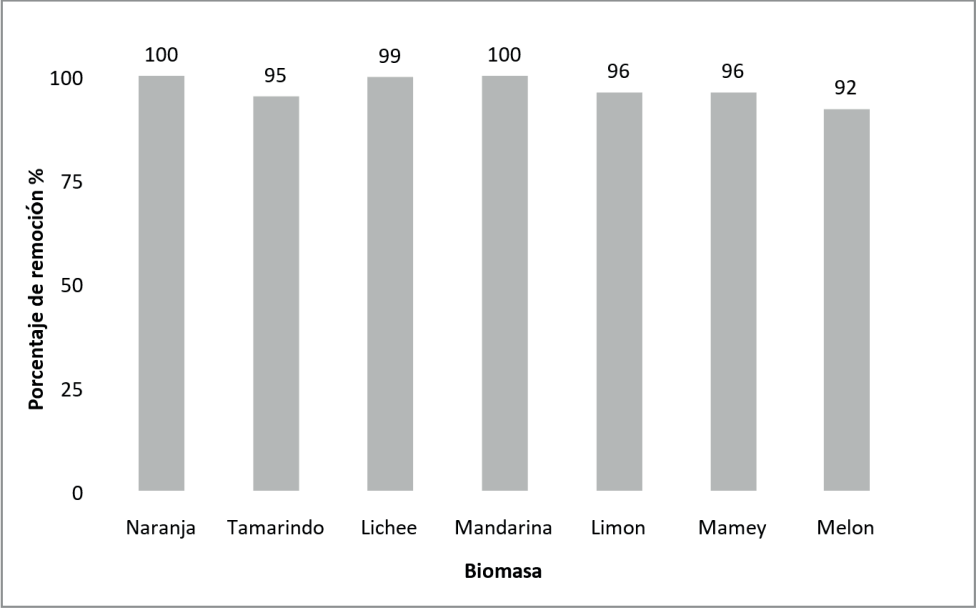
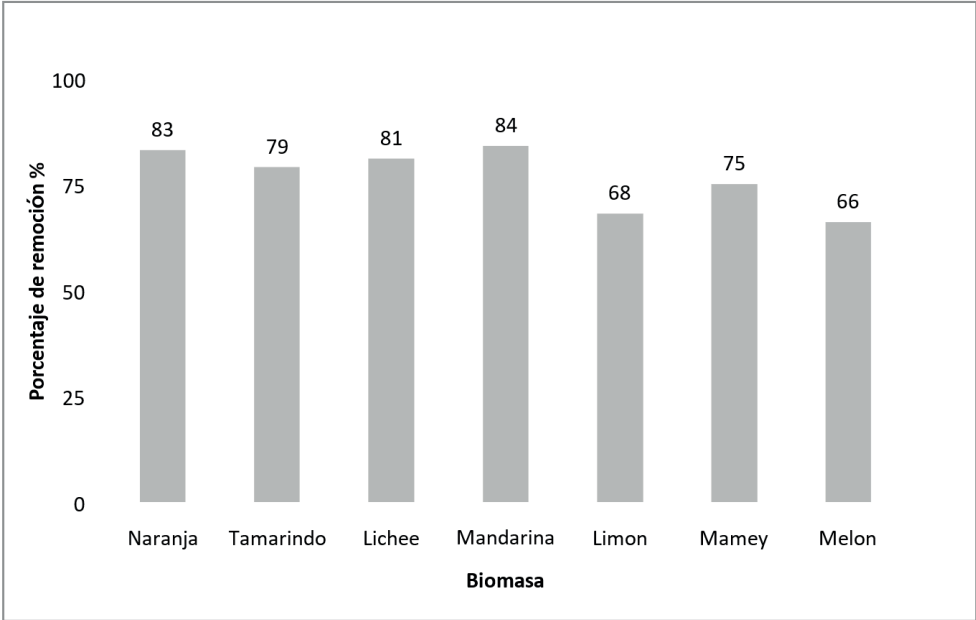


Figura 6.- Desorción de 250 mg/L de Cr VI durante 7 días de incubación utilizando NaOH 1 N a 28°C y 1g de biomasa a 100 rpm.



4. CONCLUSIONES

Las biomásas de las diferentes cáscaras analizadas, remueven eficientemente el Cromo (VI) en solución, por lo que pueden utilizarse para eliminar el metal presente en sitios contaminados como aguas residuales industriales, pues presentan una mayor capacidad a otras biomásas reportadas en la literatura. La aplicación de estas tecnologías para la remoción de metales pesados en solución, así como para la purificación de aguas residuales presenta un gran potencial, pues las biomásas son naturales, se pueden obtener en grandes cantidades, son económicas, y pueden remover selectivamente diferentes iones metálicos de soluciones acuosas (Kratochvil y Volesky, 1998).

REFERENCIAS

- Acevedo-Aguilar, F., Espino-Saldaña, A. A., León-Rodríguez, I., Rivera-Cano, M. E., Ávila-Rodríguez, M., Wrobel, K., Lappe, P., Ulloa, M., and Gutierrez-Corona, J.F. 2006. Hexavalent chromium removal in Vitro and from industrial wastes, using chromate resistant strains of filamentous fungi indigenous to contaminated wastes. *Can. J. Microbiol.* 52 (9): 809-815.
- Acosta, I., Cárdenas, J.F., Alvarado-Hernández, D. y Moctezuma-Zárate, M.G. 2008. Remoción de cromo (VI) en solución acuosa por la biomasa celular de *Paecilomyces* sp. *Rev. Inf. Tecnol.* 19 (1):69-74.
- Acosta, I., Rodríguez, A., Cárdenas, J.F., Martínez, V.M., Torre, M.E. 2024. Cadmium Removal from Aqueous Solutions Using Differents Biosorbents. In: Jha, A.K., Kumar, N. (eds) *Cadmium Toxicity in Water*. Springer Water. Springer, Cham. Print ISBN978-3-031-54004-2, Online ISBN: 978-3-031-54005-9. Chapter 8, pp. 175-192. https://doi.org/10.1007/978-3-031-54005-9_8. 26 de abril. 2024.
- Agarwal, G.S., Kumar, H., and Chaudari, S. 2006. Biosorption of aqueous chromium (VI) by *Tamarindus indica* seeds. *Biores. Technol.* 97: 949-956.
- Aranda González, D.C., Hernández Terán, A.C., Rodríguez Pérez, A., Cárdenas González, J.F., Acosta Rodríguez, I. 2024. El uso de la biomasa de la cáscara de caña azúcar (*Saccharum officinarum*) para la eliminación de Cromo (VI) en solución acuosa. En: *Ingenierías en Perspectiva; Ciencia, Tecnología e Innovación 3*. Atena Editora. Organizadores: Mariana Natale Fiobelli Fabiche y Joao Henrique de Freitas. Cap. 1. 1-10. DOI:<https://doi.org/1022533/at.ed>.
- Bai RS and Abraham TE. 2001. Biosorption of Cr (VI) from aqueous solution by *Rhizopus nigricans*. *Biores. Technol.* 79: 73-81.
- Cárdenas-González, J.F. and Acosta-Rodríguez, I. 2010. Hexavalent chromium removal by a *Paecilomyces* sp. fungal strain isolated from environment. *Bioinor. Chem. Appl.* 2010: 1-6.
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Lozano-Talavera, H., Torres-Guzmán, J.C., and Moreno-Sánchez, R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 333-347.
- Cimino, G, Passerin,i A., and Toscano, G. 2000. Removal of toxic cations and Cr (VI) from aqueous solution by hazelnut shell. *Wat. Res.* 34 (11): 2955-2962.
- Cotton, F.A. and Wilkinson, G. 1980. *Advanced Inorganic Chemistry*: 4a Ed. Chichester, U.K.; John Wiley & Sons. pp. 376-379.

Dakiki, M., Khamis, M., Manassra, A., and Mereb, M. 2002. Selective adsorption of chromium (VI) in industrial wastewater using low cost abundantly adsorbents. *Adv. Environ. Res.* 6: 533-540.

Elangovan, R., Ligy, P. and Chandraraj, K. 2010. Hexavalent chromium reduction by free and immobilized cell-free extract of *Arthrobacter rhombi*-RE. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160,1 81-97.

Guillen-Jiménez, F.M., Morales-Barrera, L., Morales-Jiménez, J., Hernández-Rodríguez, C.H. and Cristiani-Urbina, E. 2008. Modulation of tolerance to Cr (VI) and Cr (VI) reduction by sulfate ion in a *Candida* yeast strain isolated from tannery wastewater. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 1277- 1287.

Greenberg, A.E., Clesceri, L.S. and Eaton, A.D. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18^a ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 3.58-3.60.

Huang, C.P. and Wu, M.H. 1977. The removal chromium (VI) from dilute aqueous solution by activated carbon. *Wat. Res.* 11: 673-679.

Ilham, S., Nourbakhsh, M.N., Kilicarslan, S. and Ozdag, H. 2004. Removal of chromium, lead and copper ions from industrial waste waters by *Staphylococcus saprophyticus*. *Turk. Electron. J. Biotechnol.* 2: 50-57.

Jeyasingh, J. and Philip, L. 2005. Bioremediation of chromium contaminated soil: optimization of operating parameters under laboratory conditions. *J. Hazard. Mater.* 118(1-3): 113-120.

Khambhaty, Y., Mody, K., Basha, S. & Jha, B. 2009. Kinetics equilibrium and thermodynamic studies on biosorption of hexavalent chromium by dead fungal biomass of marine *Aspergillus niger*. *Chem. Eng. J.* 145: 489-495.

Rodríguez Pérez, A., Cárdenas González, J.F., Martínez Juárez, V.M., Contreras Briones, D.S., Martínez Rodríguez, C.M., Acosta Rodríguez, I. 2025. Eliminación de Cromo (VI) de aguas contaminadas por la biomasa de la cascara de cacahuete (*Arachys hypogaea*). En: Estudos em biociências e biotecnologia [livro eletrônico]: desafios, avanços e possibilidades V/Organizador Manuel Simões. – Curitiba, PR: Artemis. Cap. 5, 47-53. https://doi.org/10.37572/EdArt_0812_257_345. 09/12/2025.

CAPÍTULO 9

REMOCIÓN DE ROJO BÁSICO 46 MEDIANTE *Trichoderma asperellum* EN SOLUCIÓN ACUOSA

Data de submissão: 07/09/2026

Data de aceite: 21/09/2026

Angie Nicole Rios López

Universidad Autónoma del

Estado de Morelo

Escuela de Estudios

Superiores de Xalostoc

Ayala, Morelos, México

Esteban Montiel Palacios

Universidad Autónoma del

Estado de Morelos

Escuela de Estudios

Superiores de Xalostoc

Ayala, Morelos, México

<https://orcid.org/0000-0001-8949-4112>

David Antonio Moreno Medina

Universidad Autónoma del

Estado de Morelos

Escuela de Estudios

Superiores de Xalostoc

Ayala, Morelos, México

<https://orcid.org/0000-0003-1035-6935>

Veronica Arellano Solis

Centro de Bachillerato Tecnológico

Agropecuário 39

Temoac, Morelos, México

<https://orcid.org/0009-0009-3257-2066>

Jose Luis Gadea Pacheco

Universidad Autónoma del

Estado de Morelos

Escuela de Estudios

Superiores de Xalostoc

Ayala, Morelos, México

<https://orcid.org/0000-0001-9341-9289>

RESUMEN: La contaminación por colorantes sintéticos constituye un importante problema ambiental en cuerpos de agua afectados por las descargas de la industria textil. El azocolorante Rojo Básico 46 (RB46) destaca por su elevada persistencia y toxicidad. El uso de microorganismos surge como una opción prometedora para la remoción de estos contaminantes. En este trabajo se evaluó la capacidad de *Trichoderma asperellum* para remover RB46 en solución acuosa y se analizó su comportamiento de crecimiento durante el proceso. La cepa de *T. asperellum* proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Zacatepec, Morelos, México, fue utilizada para preparar un inóculo en extracto de levadura (EL, 5 g L⁻¹), incubado durante 24 h a 28 °C. Posteriormente, se evaluó el crecimiento del hongo en presencia de RB46 a una concentración inicial de 1.2 mM. Se utilizaron como condiciones de referencia el medio de cultivo sin microorganismo y *T. asperellum* cultivado en el mismo medio sin RB46. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. La

cinética de crecimiento se determinó mediante conteo directo en cámara de Neubauer y la concentración residual de RB46 se monitoreó por espectrofotometría UV-Vis a 523 nm a las 0, 12, 24, 36 y 48 h. Después de 48 horas, la concentración del colorante disminuyó a 0.23 mM, correspondiente a una remoción aproximada de 81%. Entre las 12 h y 36 h, dicha concentración permaneció constante, lo que sugiere un periodo de adaptación al xenobiótico. Durante las primeras 36 h, el RB46 inhibió el crecimiento de *T. asperellum*; sin embargo, a las 48 h se registró una concentración de 8.4×10^7 esporas ml^{-1} , superando la obtenida en el medio con extracto de levadura, el cual ya se encontraba en fase de muerte (4.3×10^7 esporas ml^{-1}). Estos resultados demuestran el alto potencial de *T. asperellum* para la biorremediación de soluciones acuosas contaminadas con RB46.

PALABRAS CLAVE: azocolorante; biodegradación; lacasas.

REMOVAL OF BASIC RED 46 BY *Trichoderma asperellum* IN AQUEOUS SOLUTION

ABSTRACT: Synthetic dye pollution constitutes a major environmental problem in water bodies affected by textile industry discharges. The azo dye Basic Red 46 (RB46) stands out due to its high persistence and toxicity. The use of microorganisms emerges as a promising option for the removal of these pollutants. In this work, the capacity of *Trichoderma asperellum* to remove RB46 in aqueous solution was evaluated, and its growth behavior during the process was analyzed. The *T. asperellum* strain, provided by the National Institute of Forestry, Agricultural, and Livestock Research (INIFAP), located in Zacatepec, Morelos, Mexico, was used to prepare an inoculum in yeast extract (YE, 5 g L^{-1}), which was incubated for 24 h at 28 °C. Subsequently, fungal growth was evaluated in the presence of RB46 at an initial concentration of 1.2 mM. A culture medium without the microorganism and *T. asperellum* cultured in the same medium without RB46 were used as reference conditions. All assays were performed in triplicate. Growth kinetics were determined by direct counting in a Neubauer chamber, and the residual concentration of RB46 was monitored by UV-Vis spectrophotometry at 523 nm at 0, 12, 24, 36, and 48 h. After 48 hours, the dye concentration decreased to 0.23 mM, corresponding to a removal of approximately 81%. Between 12 and 36 h, the RB46 concentration remained constant, suggesting a period of adaptation to the xenobiotic. During the first 36 h, RB46 inhibited the growth of *T. asperellum*; however, at 48 h, a concentration of 8.4×10^7 spores ml^{-1} was recorded, surpassing that obtained in the medium with yeast extract, which was already in the death phase (4.3×10^7 spores ml^{-1}). These results demonstrate the high potential of *T. asperellum* for the bioremediation of aqueous solutions contaminated with RB46.

KEYWORDS: azo dye; biodegradation; laccases.

1. INTRODUCCIÓN

Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) y la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA), los colorantes se consideran contaminantes peligrosos. Debido a que diversos colorantes sintéticos y sus productos de degradación presentan efectos carcinogénicos y tóxicos, incluso su presencia en

bajas concentraciones puede ocasionar un impacto ambiental significativo. En este contexto, resulta necesario desarrollar tecnologías de tratamiento que sean eficientes, económicamente viables, fáciles de implementar y ambientalmente sostenibles. En el tratamiento de aguas residuales que contienen colorantes se emplean diversos procesos fisicoquímicos y biológicos, entre los que destacan la adsorción, la precipitación, la coagulación-floculación, el intercambio iónico, la separación por membranas, la filtración, la oxidación química y la degradación microbiana (Kumar *et al.*, 2025).

No obstante, estas tecnologías presentan limitaciones importantes, entre ellas una eficiencia variable, elevados costos de operación, procedimientos complejos, una alta generación de lodos y dificultades para su escalamiento a nivel industrial. Bajo estas condiciones, la biorremediación ha surgido como una alternativa prometedora para el tratamiento de aguas residuales con colorantes, ya que emplea microorganismos capaces de degradar la estructura química de estos compuestos, favoreciendo su transformación, degradación y, en algunos casos, su mineralización completa. Entre los colorantes sintéticos de mayor interés ambiental se encuentra el Rojo Básico 46 (RB46), cuya elevada estabilidad química, toxicidad y persistencia favorecen su permanencia en los cuerpos de agua, particularmente en aquellos receptores de descargas de la industria textil (Hernández-Melchor *et al.*, 2019).

Trichoderma asperellum es un hongo filamentosos con capacidad para degradar compuestos orgánicos complejos mediante la producción de enzimas ligninolíticas, como lacasas, peroxidasas y manganoso peroxidasas, las cuales catalizan la oxidación de estructuras aromáticas presentes en dichos compuestos. Además, produce enzimas hidrolíticas, entre ellas celulasas y quitinasas, que favorecen la descomposición de materia orgánica y su establecimiento en ambientes contaminados (Singh *et al.*, 2023). Asimismo, se ha reportado que *T. asperellum* es capaz de remover colorantes mediante procesos de biosorción sobre su micelio, contribuyendo así a su decoloración (Dahliaty *et al.*, 2025).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia de *Trichoderma asperellum* en la remoción del colorante sintético Rojo Básico 46.

2. METODOLOGÍA

La cepa de *Trichoderma asperellum* fue proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Zacatepec, Morelos, México. Inicialmente, se preparó el inóculo de *T. asperellum* en un medio de extracto de levadura (5 g L⁻¹), el cual se mantuvo en incubación durante 24 h a 28 °C. Las unidades experimentales constaron de matraces Erlenmeyer. A partir del inóculo, se

evaluó el crecimiento del hongo en presencia del azocolorante Rojo Básico 46 (RB46) a una concentración inicial de 1.2 mM. Se utilizó, como blanco, el medio de extracto de levadura sin inóculo y se comparó el crecimiento celular bajo dos variantes: con adición suplementaria de extracto de levadura (EL) y sin este. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

La cinética de crecimiento del hongo se determinó mediante conteo directo en cámara de Neubauer. La concentración residual del RB46 se monitoreó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 523 nm, retirando previamente la biomasa en filtros whatmann 12 y utilizando un espectrofotómetro HACH DR 3900. La concentración del colorante se calculó a partir de la curva de calibración descrita por la ecuación $U.A. = 0.955C + 0.0212$, donde U.A. corresponde a las unidades de absorbancia y C a la concentración del colorante expresada en mM ($R^2 = 0.9995$). Las mediciones se realizaron a las 0, 12, 24, 36 y 48 h de incubación.

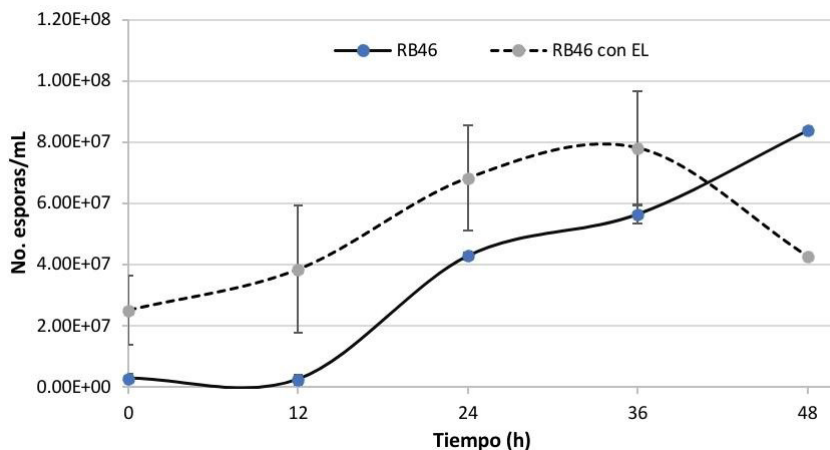
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 muestra que ambas condiciones presentan comportamientos diferentes lo que indica que la presencia de extracto de levadura modifica la respuesta fisiológica de *Trichoderma* en presencia de RB46. En la condición de RB46 sin suplemento de EL, durante las primeras 12 h se observa una fase de adaptación o crecimiento vegetativo en la que aún no se induce la esporulación de forma masiva. A partir de las 24 h se observa un incremento pronunciado en el número de esporas (4.3×10^7 esporas ml^{-1}), seguido de un aumento gradual hasta 5.7×10^7 esporas ml^{-1} a las 36 h y un máximo de 8.4×10^7 esporas ml^{-1} a las 48 h. Este comportamiento sugiere que el hongo mantiene un proceso continuo y estable de formación de esporas conforme avanza el tiempo de cultivo.

Por el contrario, la adición suplementaria de EL (RB46 con EL) genera una producción inicial considerablemente mayor, registrando 2.5×10^7 esporas ml^{-1} desde el inicio del bioensayo. La esporulación en esta curva alcanza un máximo cercano a 7.8×10^7 esporas ml^{-1} a las 36 h. Sin embargo, a las 48 h se observa una disminución drástica hasta alcanzar las 4.3×10^7 esporas ml^{-1} , lo que indica que el efecto positivo del EL sobre la producción de esporas es transitorio y acelera la entrada a una fase de muerte celular. Así, el EL anticipa el proceso de diferenciación celular, pero propicia condiciones que limitan la estabilidad de las esporas al final del cultivo, posiblemente debido al agotamiento acelerado de nutrientes o a la acumulación crítica de metabolitos secundarios.

Si el objetivo es maximizar la densidad celular y mantener la viabilidad al término de las 48 h, los datos demuestran que el sistema con RB46 libre de EL alcanza un rendimiento superior y sostenido. El patrón de crecimiento doble sigmoide observado en la curva sin suplemento podría estar asociado con cambios en el metabolismo de *T. asperellum* durante la adaptación a la presencia de RB46.

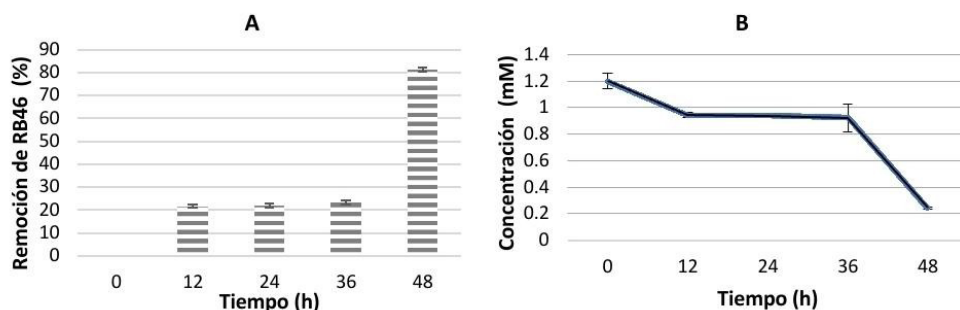
Figura 1. Cinética de crecimiento de *T. asperellum*.



A nivel de remoción, se logró degradar el 81% del RB46 al término de las 48 h, alcanzando una concentración final de 0.23 mM (Figura 2A). En la Figura 2B se observa que durante las primeras 12 horas, se registró una disminución inicial hasta aproximadamente 0.95 mM, equivalente a una reducción cercana al 20 %. Posteriormente, entre las 12 y 36 horas, la concentración permaneció prácticamente constante en torno a los 0.92 mM, lo que coincide con el periodo de estabilización y adaptación metabólica del hongo frente al xenobiótico descrita en la cinética celular.

A partir de las 36 h se presentó el cambio más importante del experimento, observándose una disminución abrupta hasta las 48 h. Esta reducción representa el mayor pico de actividad del proceso. Una vez que el hongo completó su adaptación y alcanzó su máxima densidad en la curva sigmoidea, el sistema incrementó drásticamente su capacidad de biodegradación, apoyado por mecanismos combinados de bioadsorción en el micelio y la secreción de enzimas ligninolíticas como lacasas y NADH reductasas (Moreno-Medina *et al.*, 2014).

Figura 2. Remoción de azocolorante RB46. **A)** Porcentaje de remoción. **B)** Cinética de remoción.



Dahliaty *et al.* (2025) determinaron que la mayor tasa de decoloración por *Trichoderma asperellum* fue de 85 % en 24 h. La biodegradación enzimática fue el factor que más contribuyó a la decoloración, en comparación con la biosorción por el micelio. En su estudio la actividad de la lacasa fue inducida por el azul de metileno (50 mg l^{-1}), registrándose el nivel más alto a pH 4.5. Singh *et al.* (2023) obtuvieron niveles máximos de decoloración para naranja de metilo, el verde de malaquita y el violeta cristal del 88.89 %, 71.09 % y 92.75 %, respectivamente, utilizando una concentración de colorante de 100 mg l^{-1} , un pH de 6.5 y una temperatura de 25°C . Mencionan que el aislado fúngico *Trichoderma asperellum* suele producir quitinasas, celulasas y lacasas.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran concordancia además con Wimalasena *et al.* (2025) quienes evaluaron la capacidad de algunos hongos para degradar colorantes comúnmente usados en laboratorios: rojo congo, cristal violeta, verde de malaquita y safranina. Reportan que *Trichoderma* sp. logra decolorarlos hasta en un 60 %, a excepción de rojo congo. Algunas especies fúngicas son capaces de producir enzimas lignolíticas incluyendo lacasas, manganoso peroxidasas y lignino peroxidasas (Borham *et al.*, 2023).

Trichoderma spp. están bien documentados por su capacidad de biorremediación, particularmente en la degradación de diversos contaminantes (Racić *et al.*, 2023; Voloshchuk *et al.*, 2024; Conte *et al.*, 2025). Por ejemplo *Trichoderma harzianum* (AUMC14897) realiza decoloración eficiente de colorantes en el tratamiento de aguas residuales mediante la producción de la enzima lacasa, degradando eficazmente el Novatic Green XBN, el Red 4BL y el Reactive T. Blue G (Salem *et al.*, 2024). Además, *T. viride* muestra eficiencias de decoloración del 36 %, 73 % y 87 % para los colorantes Synozol Red, Yellow y Navy Blue, respectivamente (Ali *et al.*, 2023). Al-Hawash *et al.* (2018) reportan que *T. harzianum* demuestra un potencial significativo para la degradación de hidrocarburos, principalmente a través de la producción de la enzima lacasa.

4. CONCLUSIONES

Trichoderma asperellum mostró una alta eficiencia en la remoción del Rojo Básico 46, alcanzando un 81% de eliminación en 48 horas. Su capacidad para crecer en presencia del colorante, incluso superando al testigo en condiciones adversas, lo posiciona como un candidato prometedor para estrategias de biorremediación de efluentes contaminados con colorantes sintéticos.

REFERENCIAS

Al-Hawash, A. B., El-Kady, M. Y., Ghanem, K. M., and Mansour, M. P. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. Egypt. J. Aquat. Res. 44 (2), 71-76. doi: 10.1016/j.ejar.2018.06.001

Ali, E., Amjad, I., and Rehman, A. (2023). Evaluation of azo dyes degradation potential of fungal strains and their role in wastewater treatment. Saudi J. Biol. Sci. 30, 103734. doi: 10.1016/j.sjbs.2023.103734

Borham, A., Okla, M. K., El-Tayeb, M. A., Gharib, A., Hafiz, H., Liu, L., Zhao, C., Xie, R., He, N., Zhang, S., Wang, J., & Qian, X. (2023). Decolorization of textile azo dye via solid-state fermented wheat bran by *Lasiodiplodia* sp. YZH1. J. Fungi. 9, 1069. doi: 10.3390/jof9111069.

Conte, E. D., da Rosa, E. J., Silvestrini, G. R., Motta, D. D. S., de Oliveira, C. F., Cocco, C., Pauletti G.F., Silvestre W.P., Dal Magro T., Schwambach J. (2025). Can *Trichoderma* spp. contribute to the bioremediation and biostimulation of plants in soil contaminated with herbicides? ACS Omega. 10 (2), 2243-2252. doi: 10.1021/acsomega.4c09197

Dahliaty, A. Nurulita Y., Ismawati, Wulandari N., Kurniati D., Yanti, Tjandrawati N.T. (2025). Bioremediation and Detoxification of the Textile Dye Methyl Blue by *Trichoderma asperellum* LBKURCC1 with Laccase Activity. Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology, 10(2), jtbb16121. doi: 10.22146/jtbb.16121

Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: Importancia agrícola, biotecnológica y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences, 35(1), 98-112.

Kumar, M.; Mishra, A.; Patel, S.K.; Kushwaha, J.; Singh, S.; Mishra, V.; Singh, D.; Singh, V.; Giri, B.S.; Singhania, R.R.; Singh D. 2025. Environmental Impacts and Strategies for Bioremediation of Dye-Containing Wastewater. Bioengineering, 12, 1043. <https://doi.org/10.3390/bioengineering12101043>

Moreno-Medina, D. A., Sánchez-Salinas, E., & Ortiz-Hernández, M. L. (2014). Removal of methyl parathion and coumaphos pesticides by a bacterial consortium immobilized in *Luffa cylindrica*. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 30(1), 51-63.

Racić, G., Vukelić, I., Kordić, B., Radić, D., Lazović, M., Nesić, L., & Panković, D. (2023). Screening of native *Trichoderma* species for nickel and copper bioremediation potential determined by FTIR and XRF. Microorganisms 11, 815. doi: 10.3390/microorganisms11030815

Salem, M. M., Mohamed, T. M., Shaban, A. M., Mahmoud, Y. A. G., Eid, M. A., and El-Zawawy, N. A. (2024). Optimization, purification, and characterization of laccase from a new endophytic *Trichoderma harzianum* AUMC14897 isolated from *Opuntia ficus-indica* and its applications in dye decolorization and wastewater treatment. Microb. Cell Fact. 23, 266. doi: 10.1186/s12934-024-02530-x

Singh, S., Khan, N. A., López-Maldonado, E. A., Narasimhappa, P., & Kumar, S. (2023). Bioremediación de colorantes azoicos y triphenilmetano utilizando una cepa indígena de *Trichoderma asperellum*: Evaluación de mecanismos y eficacia. *International Journal of Membrane Science and Technology*, 10(4), 462-471.

Voloshchuk, N., Irakoze, Z., Kang, S., Kellogg, J. J., and Wee, J. (2024). Three ecological models to evaluate the effectiveness of *Trichoderma* spp. for suppressing aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Toxins* 16, 314. doi: 10.3390/toxins16070314.

Wimalasena M.K., Wijayawardene N.N., Dharmarathne S.B., Gunasekara N.M., Ekanayake M.S., Jayalal R.G.U., Bhat J.D., Dawoud T.M., Zhang G-Q., Weerasinghe D.C., de Zoysa H.K.S., Dai D-Q., Wang H. and Bamunuarachchige T.C. (2025). *In-vitro* evaluation of synthetic dye decolourisation by filamentous ascomycetous fungi isolated from freshwater environments in Sri Lanka and development of a prototype for addressing environmental pollution from synthetic dye contamination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 15: 1650835. doi: 10.3389/fcimb.2025.1650835.

CAPÍTULO 10

¿EVOLUCIÓN O CREACIÓN? DARWIN, CREACIONISMO Y LOS LÍMITES DE LA CONTROVERSIAS CIENTÍFICA

Data de submissão: 26/08/2026

Data de aceite: 10/09/2026

Humberto Álvarez Sepúlveda

Universidad Católica de la

Santísima Concepción

Concepción – Chile

<https://orcid.org/0000-0001-5729-3404>

enseñar esta controversia exige distinguir entre respetar la pluralidad de creencias y atribuir igual validez científica a explicaciones epistemológicamente diferentes.

PALABRAS CLAVE: evolución biológica; creacionismo; Darwinismo; naturaleza de la ciencia; demarcación científica.

EVOLUTION OR CREATION? DARWIN, CREATIONISM AND THE LIMITS OF SCIENTIFIC CONTROVERSY

ABSTRACT: This chapter critically analyzes the controversy between evolution and creationism and its implications for understanding the nature of scientific knowledge. The analysis is organized around three axes: the consolidation of evolution as a scientific explanation for biological diversity; the examination of creationism and intelligent design as proposals with different epistemological statuses; and the criteria that allow us to distinguish a scientific controversy from a social, religious, or philosophical one. Methodologically, it is based on a comprehensive review of specialized literature, developed from a qualitative-interpretive approach and through a narrative topic design. It argues that evolution and creationism do not constitute equivalent scientific theories because they differ in their relationship to evidence, testing, and cumulative research. In conclusion, teaching this controversy requires distinguishing

RESUMEN: Este capítulo examina críticamente la controversia entre evolución y creacionismo y sus implicancias para comprender la naturaleza del conocimiento científico. El análisis se organiza en tres ejes: la consolidación de la evolución como explicación científica de la diversidad biológica; el examen del creacionismo y del diseño inteligente como propuestas de diferente estatuto epistemológico; y los criterios que permiten distinguir una controversia científica de una controversia social, religiosa o filosófica. Metodológicamente, se sustenta en una revisión de alcance de literatura especializada, desarrollada desde un enfoque cualitativo-interpretativo y mediante un diseño narrativo de tópicos. Se sostiene que evolución y creacionismo no constituyen teorías científicas equivalentes, porque difieren en su relación con la evidencia, la contrastación y la investigación acumulativa. En conclusión,

between respecting the plurality of beliefs and attributing equal scientific validity to epistemologically different explanations.

KEYWORDS: biological evolution; creationism; Darwinism; nature of science; scientific demarcation.

1. INTRODUCCIÓN

Pocas cuestiones científicas han alcanzado una repercusión cultural comparable con la teoría de la evolución. Desde la publicación de *On the Origin of Species* en 1859, las explicaciones evolucionistas sobre el origen de la diversidad biológica han generado discusiones que exceden ampliamente los límites de la biología. La propuesta de Darwin no solo ofreció un mecanismo natural – la selección natural – para explicar la adaptación y diversificación de los organismos, sino que contribuyó a transformar la manera de comprender la historia de la vida. La evolución adquirió posteriormente un respaldo mucho más amplio mediante la genética, la paleontología, la biogeografía, la sistemática y la biología molecular, hasta convertirse en uno de los marcos integradores fundamentales de las ciencias biológicas (National Academy of Sciences, 2008; Futuyma y Kirkpatrick, 2017).

La oposición religiosa a determinadas implicancias de la evolución tampoco puede reducirse a una reacción uniforme iniciada con Darwin. El término creacionismo comprende posiciones heterogéneas que van desde interpretaciones literales del Génesis y propuestas de una Tierra joven hasta concepciones que aceptan una Tierra antigua, procesos evolutivos parciales o incluso la evolución biológica bajo dirección divina (Numbers, 2006). Esta diversidad resulta importante porque evita construir artificialmente una oposición absoluta entre «ciencia» y «religión». Numerosos creyentes y tradiciones religiosas aceptan la evolución, mientras que la biología evolutiva, como disciplina científica, no necesita pronunciarse acerca de la existencia o inexistencia de Dios para investigar los procesos naturales que producen cambios en las poblaciones (National Academy of Sciences, 2008).

La controversia se vuelve epistemológicamente significativa cuando determinadas explicaciones creacionistas pretenden adquirir el mismo estatuto científico que la evolución. Durante el siglo XX, especialmente en Estados Unidos, distintos movimientos buscaron introducir el denominado «creacionismo científico» en las clases de ciencias y, posteriormente, el diseño inteligente como alternativa a la evolución (Pennock, 1999; Numbers, 2006). En este punto aparece un problema que trasciende el caso concreto: ¿Qué convierte una explicación en científica?. Invocar observaciones, emplear vocabulario técnico o cuestionar una teoría aceptada no basta

para constituir una alternativa científica. La ciencia supone prácticas de formulación de hipótesis, contrastación, argumentación pública, revisión, modificación y acumulación de evidencias que permiten someter las explicaciones a evaluación intersubjetiva.

El problema resulta particularmente relevante para la enseñanza. Presentar «evolución versus creación» como si se tratara simplemente de dos explicaciones competidoras puede transmitir una concepción distorsionada de la ciencia. Una controversia social no se convierte automáticamente en dilema científico por el hecho de que existan personas que sostengan posiciones contrapuestas. Dentro de la biología actual se discuten intensamente los ritmos evolutivos, la importancia relativa de distintos mecanismos, los procesos de especiación, la evolución del desarrollo o determinados acontecimientos de la historia de la vida; pero esas discusiones ocurren dentro de un marco que reconoce la evolución como fenómeno ampliamente respaldado. Confundir tales debates con la oposición entre evolución y creación altera la naturaleza real del desacuerdo científico (Scott, 2009).

En este contexto, el presente ensayo busca responder a la siguiente pregunta: ¿Por qué la evolución y el creacionismo no poseen el mismo estatuto epistemológico y qué permite distinguir una auténtica controversia científica de una disputa religiosa, filosófica o social sobre la ciencia? Para responder a esta interrogante, la discusión se organiza en tres ejes complementarios. En primer lugar, se examina cómo la evolución pasó de ser una hipótesis histórica sobre la transformación de las especies a constituirse en un marco explicativo respaldado por múltiples evidencias independientes. En segundo término, se analizan el creacionismo y el diseño inteligente, prestando especial atención a sus pretensiones de científicidad. Finalmente, se estudia el problema de la demarcación científica y sus implicancias educativas, evitando tanto la falsa equivalencia epistemológica como la innecesaria confrontación entre ciencia y fe.

2. METODOLOGÍA

Este ensayo se sustenta en una revisión de alcance de literatura especializada, siguiendo los lineamientos generales formulados por Arksey y O'Malley (2005). Esta estrategia resulta pertinente porque el problema estudiado atraviesa distintos campos: biología evolutiva, historia de la ciencia, filosofía de la ciencia, educación científica y estudios sobre ciencia y religión. El objetivo no consiste en realizar un metaanálisis ni cuantificar las actitudes hacia la evolución, sino identificar los principales argumentos utilizados para establecer el estatuto científico de las explicaciones evolutivas y contrastarlos con las pretensiones epistemológicas del creacionismo y del diseño inteligente. La revisión

se orientó, por tanto, hacia una pregunta conceptual: cuáles son las características que justifican considerar científica una explicación sobre el mundo natural.

La búsqueda bibliográfica se realizó en Scopus, Web of Science, SciELO y Google Scholar, complementada con catálogos y repositorios institucionales. Se privilegió literatura especializada en biología evolutiva, filosofía e historia de la ciencia, educación científica y relaciones entre ciencia y religión. Entre las obras centrales se incluyeron *On the Origin of Species* de Darwin (2009), estudios contemporáneos de biología evolutiva (Futuyma y Kirkpatrick, 2017), investigaciones históricas sobre el creacionismo (Numbers, 2006), análisis filosóficos sobre diseño inteligente (Pennock, 1999) y trabajos relativos al problema de la demarcación (Resnik, 2000; Popper, 2005). Se incorporaron además documentos de la National Academy of Sciences para examinar específicamente las relaciones entre evolución, creación y enseñanza científica.

Los principales descriptores considerados fueron *biological evolution*, *Darwinism*, *creationism*, *intelligent design*, *demarcation problem*, *nature of science*, *methodological naturalism*, *evolution education* y *science and religion*. La selección se concentró en literatura capaz de aportar información sobre cuatro dimensiones: evidencias empíricas de la evolución; características epistemológicas de las teorías científicas; argumentos utilizados por el creacionismo y el diseño inteligente; e implicancias educativas de presentar ambos planteamientos como alternativas equivalentes. Se consideraron asimismo perspectivas críticas sobre la utilización de un único criterio de demarcación, pues la filosofía contemporánea de la ciencia ha mostrado que ninguna regla aislada – por ejemplo, la falsabilidad – describe por sí sola toda la complejidad de las prácticas científicas (Resnik, 2000).

El corpus fue organizado mediante un enfoque cualitativo-interpretativo y un diseño narrativo de tópico estructurado en tres categorías analíticas. La primera, evidencia y construcción de la teoría evolutiva, examina cómo distintas disciplinas producen resultados convergentes que permiten explicar la transformación histórica de los seres vivos. La segunda, creacionismo, diseño inteligente y pretensión de científicidad, analiza las diferencias entre una afirmación religiosa y una explicación susceptible de investigación científica. La tercera, demarcación y controversia científica, estudia criterios como contrastabilidad, poder explicativo, relación con la evidencia, capacidad predictiva y disposición a la revisión. Esta organización permite pasar desde un caso científico concreto hacia el problema epistemológico general que el debate revela.

Finalmente, la revisión adopta una precaución interpretativa fundamental: distinguir la evaluación epistemológica de una proposición de la valoración cultural o

personal de quien la sostiene. Afirmar que el creacionismo no posee el mismo estatuto científico que la teoría evolutiva no equivale a demostrar que toda creencia religiosa sea falsa, del mismo modo que reconocer los límites metodológicos de la ciencia no obliga a aceptar como científicas explicaciones sobrenaturales. La pregunta relevante es más específica: qué afirmaciones pueden investigarse mediante los procedimientos públicos y revisables característicos de las ciencias. Esta distinción evita convertir una cuestión epistemológica en un enfrentamiento simplificado entre creyentes y no creyentes.

3. DE DARWIN AL ADN: ¿POR QUÉ LA EVOLUCIÓN ES UNA TEORÍA CIENTÍFICA?

Cuando Darwin publicó *On the Origin of Species*, la idea de que las especies podían transformarse no era completamente nueva. Su contribución decisiva consistió en articular un mecanismo capaz de explicar cómo podían acumularse cambios adaptativos sin recurrir a una planificación externa: la selección natural. Si dentro de una población existen variaciones heredables y algunos organismos dejan más descendencia que otros debido a esas diferencias, determinadas características pueden aumentar progresivamente su frecuencia. Darwin reunió observaciones procedentes de la biogeografía, la selección artificial, la anatomía comparada, la embriología y el registro fósil para argumentar que la diversidad de los seres vivos podía comprenderse como resultado de descendencia con modificación a lo largo de extensos períodos (Darwin, 2009).

Una de las fortalezas epistemológicas de la evolución es que su aceptación actual no depende exclusivamente de los argumentos formulados por Darwin. El propio Darwin desconocía los mecanismos moleculares de la herencia. La integración de la genética mendeliana con la selección natural durante la síntesis evolutiva moderna permitió explicar la evolución en términos de cambios en las frecuencias génicas de las poblaciones. Posteriormente, la biología molecular proporcionó evidencias que Darwin nunca pudo conocer. Las semejanzas y diferencias entre secuencias de ADN permiten reconstruir relaciones filogenéticas y contrastarlas con inferencias obtenidas independientemente mediante fósiles, anatomía o biogeografía. La convergencia entre evidencias producidas mediante procedimientos distintos constituye una característica particularmente robusta de la investigación evolutiva (Futuyma y Kirkpatrick, 2017).

El registro fósil ofrece un ejemplo concreto. La teoría evolutiva no exige que aparezca una secuencia perfecta de todos los organismos que hayan existido; la fosilización es un proceso excepcional y el registro necesariamente incompleto. Sin embargo, permite formular expectativas históricas contrastables. El descubrimiento de *Tiktaalik roseae*, por ejemplo, fue precedido por una búsqueda dirigida hacia rocas

del Devónico tardío, porque la teoría y los fósiles previamente conocidos indicaban que allí podía encontrarse un organismo con una combinación de características de peces y primeros tetrápodos. Su hallazgo en estratos de aproximadamente 375 millones de años mostró precisamente una combinación de rasgos relevante para comprender esa transición evolutiva (Daeschler et al., 2006). La teoría no se limitó, por tanto, a explicar retrospectivamente un fósil encontrado al azar: contribuyó a orientar dónde y qué buscar.

La evolución puede observarse además en escalas temporales mucho más breves. La resistencia bacteriana a los antibióticos constituye un ejemplo particularmente claro. En una población bacteriana pueden existir variantes genéticas que confieren distintos grados de resistencia. La utilización de un antibiótico modifica las presiones selectivas: las bacterias susceptibles disminuyen mientras aquellas que poseen mecanismos de resistencia sobreviven y se reproducen diferencialmente. Mutación, selección y transferencia horizontal de genes permiten así explicar la emergencia y expansión de poblaciones resistentes. El fenómeno posee consecuencias médicas inmediatas y demuestra que los procesos evolutivos no son únicamente reconstrucciones sobre un pasado remoto, sino mecanismos observables y experimentalmente investigables (Davies y Davies, 2010).

Lo anterior permite precisar qué significa llamar «teoría» a la evolución. En el lenguaje cotidiano, teoría puede significar conjetura; en ciencia, una teoría es un marco explicativo sistemático capaz de organizar evidencias, generar preguntas y conectar fenómenos diferentes. La evolución contiene aspectos sometidos permanentemente a revisión, como cualquier campo científico, pero ese proceso no significa que todas sus proposiciones posean el mismo grado de incertidumbre. La descendencia común, la transformación de poblaciones y la acción de mecanismos evolutivos cuentan con evidencias procedentes de disciplinas independientes. La fortaleza científica de la evolución no deriva, entonces, de la autoridad de Darwin ni de una supuesta imposibilidad de cuestionarla, sino precisamente de que sus afirmaciones han sido sometidas durante más de un siglo y medio a contrastaciones que podrían haber revelado incompatibilidades graves y, en cambio, han producido una estructura explicativa crecientemente integrada (National Academy of Sciences, 2008).

4. DEL GÉNESIS AL DISEÑO INTELIGENTE: ¿PUEDE EL CREACIONISMO CONVERTIRSE EN CIENCIA?

El creacionismo posee una historia considerablemente más compleja de lo que sugiere la oposición simplificada entre Darwin y la Biblia. Numbers (2006) ha mostrado

que los movimientos creacionistas contemporáneos se desarrollaron mediante procesos históricos específicos y que no todas las tradiciones cristianas han interpretado del mismo modo los relatos bíblicos de la creación. Algunas posiciones aceptan una Tierra de miles de millones de años, pero rechazan determinados aspectos de la evolución; otras sostienen que los principales grupos de organismos fueron creados separadamente; otras aceptan la evolución como mecanismo mediante el cual habría actuado Dios. Hablar de «el creacionismo» como una doctrina única oculta, por consiguiente, diferencias teológicas y epistemológicas sustanciales.

El problema científico aparece cuando una afirmación basada en revelación o intervención sobrenatural pretende operar como explicación científica del mundo natural. Una proposición como «Dios creó la vida» puede poseer significado teológico para un creyente, pero su amplitud dificulta establecer qué observación permitiría contrastarla científicamente. Si organismos semejantes comparten estructuras, esa semejanza podría atribuirse a un diseñador común; si son diferentes, la diferencia también podría atribuirse a decisiones del mismo diseñador. Cuando resultados opuestos pueden acomodarse igualmente a una explicación, disminuye su capacidad discriminadora. Esta premisa no demuestra la inexistencia de un creador; muestra que una afirmación formulada de ese modo no proporciona por sí misma un programa empírico capaz de decidir entre resultados alternativos.

El diseño inteligente intentó reformular esta discusión evitando referencias explícitas a una determinada escritura sagrada. Sus defensores sostuvieron que algunas estructuras biológicas exhibirían características que serían explicadas más adecuadamente mediante una causa inteligente que mediante procesos evolutivos no dirigidos. Uno de los argumentos más conocidos fue el de la «complejidad irreducible»: determinados sistemas poseerían varias partes interdependientes y dejarían de funcionar si alguna desapareciera, lo que supuestamente dificultaría su evolución gradual. El flagelo bacteriano y mecanismos de coagulación sanguínea fueron utilizados recurrentemente como ejemplos. No obstante, señalar una dificultad explicativa en un modelo evolutivo no demuestra automáticamente una hipótesis alternativa de diseño; para ello, como argumenta Pennock (1999), sería necesario aportar evidencias independientes capaces de identificar y caracterizar causalmente el supuesto proceso de diseño.

El juicio *Kitzmiller v. Dover Area School District* de 2005 convirtió esta cuestión en un caso especialmente ilustrativo. El distrito escolar de Dover, Pensilvania, había dispuesto que los estudiantes fueran informados acerca del diseño inteligente como alternativa a la evolución. Durante el proceso judicial se examinaron su historia conceptual,

sus argumentos y su relación con versiones anteriores del creacionismo. La sentencia concluyó que el diseño inteligente no constituía ciencia y que su incorporación de esa manera al currículo público representaba una posición religiosa. Aunque una decisión judicial no determina por sí misma la verdad de una cuestión científica, el caso resulta epistemológicamente interesante porque obligó a hacer explícitos criterios normalmente implícitos: producción de investigación, contrastación, relación con la comunidad científica y capacidad de generar explicaciones susceptibles de evaluación (Kitzmiller v. Dover Area School District, 2005).

La diferencia fundamental no reside, por tanto, en que la evolución explique absolutamente todo mientras el creacionismo no pueda plantear ninguna pregunta relevante. Tampoco consiste en que la ciencia posea una demostración metafísica de que no puede existir intervención divina. El contraste se encuentra en el funcionamiento de los respectivos programas explicativos. La teoría evolutiva conecta observaciones, genera hipótesis específicas, permite investigar mecanismos, admite correcciones y puede confrontarse con datos potencialmente problemáticos. Una explicación basada en una voluntad sobrenatural indeterminada carece normalmente de condiciones equivalentes para establecer qué resultados contarían en su contra. Por ello, excluir el creacionismo del mismo nivel explicativo en una clase de biología no requiere ridiculizar la religión: exige distinguir entre una afirmación que puede poseer significado teológico y otra que funciona como explicación científicamente contrastable.

5. ¿QUÉ HACE CIENTÍFICA A UNA EXPLICACIÓN? LOS LÍMITES DE LA CONTROVERSIA

La discusión entre evolución y creacionismo conduce al denominado problema de la demarcación: cómo distinguir ciencia de no ciencia o pseudociencia. Una respuesta históricamente influyente fue proporcionada por Popper (2005), quien destacó la falsabilidad. Una teoría científica debería asumir riesgos empíricos: debe existir algún estado posible de cosas incompatible con sus afirmaciones. Este criterio posee una intuición poderosa. Si una explicación puede acomodarse indefinidamente a cualquier observación imaginable, resulta difícil ponerla a prueba. No obstante, la filosofía de la ciencia posterior ha mostrado que la práctica científica es demasiado compleja para reducirla a una única regla. Las teorías se evalúan mediante redes de hipótesis, instrumentos, conocimientos auxiliares y programas de investigación, de modo que un resultado inesperado rara vez determina automáticamente el abandono de una teoría.

Por ello, resulta más adecuado considerar un conjunto de características que funcionan conjuntamente. Las explicaciones científicas mantienen relaciones sistemáticas con evidencia públicamente verificable; generan problemas susceptibles de investigación; permiten derivar expectativas; deben ser compatibles con conocimientos sólidamente establecidos o proporcionar razones suficientes para revisarlos; y permanecen abiertas a modificación frente a evidencia adversa. También importa la fecundidad: una teoría robusta no se limita a responder una única anomalía, sino que abre nuevas líneas de investigación. La teoría evolutiva cumple esta función en genética, ecología, paleontología, medicina, biogeografía y biología molecular. Para Resnik (2000), la científicidad no se identifica así con una etiqueta institucional, sino con prácticas colectivas de producción, evaluación y corrección del conocimiento.

El naturalismo metodológico ocupa un lugar central en esta discusión y continúa siendo objeto de análisis en la filosofía contemporánea de la ciencia, particularmente respecto de su alcance y de su distinción frente al naturalismo metafísico (Donahue, 2025). Las ciencias buscan causas que puedan investigarse mediante relaciones observables, modelos, mediciones y contrastaciones públicas. Este itinerario no equivale necesariamente al naturalismo metafísico, según el cual solo existe la realidad natural. Un biólogo puede ser teísta, agnóstico o ateo y utilizar los mismos métodos para estudiar una población. La ciencia no necesita demostrar que Dios no existe antes de estudiar la resistencia bacteriana, del mismo modo que no necesita resolver metafísicamente la libertad humana antes de investigar procesos cognitivos. El naturalismo metodológico funciona como una regla de investigación: exige formular explicaciones que puedan continuar siendo examinadas por otros investigadores con independencia de sus compromisos religiosos personales (National Academy of Sciences, 2008).

Esta distinción permite comprender por qué no toda «controversia» pública representa un dilema científico. El cambio climático, las vacunas, la evolución o la forma de la Tierra pueden ser objeto de intensas disputas sociales, aunque determinados aspectos centrales cuenten con consensos científicos muy robustos. Inversamente, puede existir una auténtica controversia científica desconocida para el público. En evolución, por ejemplo, investigar la importancia relativa de selección, deriva genética, restricciones del desarrollo o diferentes mecanismos de especiación constituye una discusión científica porque las posiciones competidoras trabajan con evidencias susceptibles de contrastación. Preguntar si las especies cambian históricamente o fueron creadas de manera independiente e inmutable no posee hoy un equilibrio empírico comparable. La existencia de desacuerdo social no basta para producir simetría epistemológica.

La enseñanza de este problema debería evitar dos extremos. El primero consiste en presentar evolución y creacionismo como teorías científicas equivalentes en nombre de una supuesta neutralidad; esto confunde pluralismo democrático con equivalencia epistemológica, pues el reconocimiento educativo de posiciones creacionistas no exige atribuirles el mismo estatuto epistémico que a las explicaciones científicas (Bellolio, 2023). El segundo consiste en enseñar evolución como un instrumento para desacreditar convicciones religiosas, confundiendo los límites metodológicos de la ciencia con conclusiones metafísicas que exceden su campo. Una estrategia educativa más rigurosa puede utilizar precisamente la controversia para enseñar naturaleza de la ciencia: preguntar qué evidencia respalda una explicación, qué observaciones podrían cuestionarla, qué predicciones permite formular, cómo se modifica ante anomalías y por qué el consenso científico no equivale a votación o dogma. La cuestión pedagógicamente más fecunda deja entonces de ser «¿Darwin o Dios?» y pasa a ser «¿cómo sabemos científicamente lo que afirmamos saber?».

6. CONCLUSIÓN

La oposición entre evolución y creación resulta intelectualmente atractiva porque parece enfrentar dos respuestas a una misma pregunta: de dónde procede la diversidad de la vida. Sin embargo, el análisis epistemológico muestra que esta formulación es incompleta. Las explicaciones pueden abordar cuestiones semejantes desde marcos de conocimiento diferentes y, por ello, no competir necesariamente bajo las mismas reglas. La teoría evolutiva intenta reconstruir mediante mecanismos naturales contrastables cómo las poblaciones cambian, divergen y se relacionan históricamente. Las doctrinas creacionistas, cuando apelan a la voluntad o acción de una entidad sobrenatural, introducen afirmaciones cuya evaluación no puede realizarse de la misma manera mediante los procedimientos habituales de las ciencias empíricas.

Darwin ocupa un lugar fundamental en esta historia, pero la validez actual de la teoría de la evolución no depende de asumir su obra como infalible. Por el contrario, la posibilidad de revisar, corregir y ampliar las explicaciones existentes constituye una característica esencial del conocimiento científico. Aspectos de la explicación darwiniana fueron corregidos, ampliados o reformulados a partir de conocimientos inexistentes en 1859. La genética mendeliana, la genética de poblaciones, la biología molecular y la secuenciación genómica transformaron profundamente la comprensión de la evolución. Lejos de debilitarla, esta capacidad de modificación muestra cómo funciona una tradición científica productiva: conserva aquellos componentes

respaldados por evidencia, abandona otros y formula problemas que generaciones posteriores pueden investigar.

El creacionismo y el diseño inteligente permiten observar el problema desde el extremo contrario. Su dificultad epistemológica principal no consiste simplemente en su asociación histórica con la religión, pues el origen religioso de una idea no bastaría para determinar su falsedad. El problema surge cuando las explicaciones sobrenaturales no establecen mecanismos contrastables ni condiciones claras bajo las cuales podrían considerarse refutadas. El diseño inteligente intentó formular sus argumentos utilizando conceptos científicos y señalando supuestas insuficiencias de las explicaciones evolutivas. No obstante, demostrar que un problema permanece abierto para una teoría no equivale a demostrar una explicación alternativa. La ausencia de una explicación completa nunca constituye, por sí sola, evidencia positiva de diseño.

La pregunta orientadora puede responderse, por tanto, sin recurrir a una definición rígida y única de ciencia. Evolución y creacionismo no poseen el mismo estatuto epistemológico porque no mantienen la misma relación con la evidencia, la contrastación, la predicción, la revisión y la investigación acumulativa. Esta premisa no significa que la ciencia pueda resolver todas las preguntas humanas ni que las afirmaciones religiosas carezcan necesariamente de significado. Significa algo más limitado: no toda afirmación significativa pertenece al dominio de la investigación científica. La ciencia posee límites, y reconocerlos no la debilita; impide que su autoridad sea extendida indebidamente a cuestiones para las cuales sus métodos no fueron concebidos.

Por consiguiente, el mayor valor educativo de la controversia no reside en organizar un debate destinado a decidir si «gana» Darwin o el creacionismo. Su potencial consiste en enseñar a distinguir entre desacuerdo social y controversia científica, entre hipótesis y evidencia, entre crítica y alternativa explicativa, y entre naturalismo metodológico y afirmaciones metafísicas. Una educación científica rigurosa puede respetar la libertad de conciencia sin presentar como equivalentes explicaciones que no satisfacen los mismos estándares epistemológicos. La pregunta decisiva no es solamente qué creemos acerca del origen de la diversidad biológica, sino qué tipo de evidencia necesitaríamos para justificar científicamente aquello que afirmamos. En esa diferencia entre creer, argumentar y demostrar radica uno de los aprendizajes fundamentales que la controversia entre evolución y creación puede ofrecer.

REFERENCIAS

Arksey, H., & O'Malley, L. (2005). Scoping studies: Towards a methodological framework. *International Journal of Social Research Methodology*, 8(1), 19-32. <https://doi.org/10.1080/1364557032000119616>

- Bellolio, C. (2023). Creationism is not special. *Educational Philosophy and Theory*, 55(1), 68-76. <https://doi.org/10.1080/00131857.2022.2061949>
- Daeschler, E., Shubin, N., & Jenkins, F. (2006). A Devonian tetrapod-like fish and the evolution of the tetrapod body plan. *Nature*, 440, 757-763. <https://doi.org/10.1038/nature04639>
- Darwin, C. (2009). *On the origin of species by means of natural selection*. Cambridge University Press.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- Donahue, M. (2025). Methodological naturalism, analyzed. *Erkenntnis*, 90, 1981-2002. <https://doi.org/10.1007/s10670-024-00790-y>
- Futuyma, D., & Kirkpatrick, M. (2017). *Evolution*. Sinauer Associates.
- Kitzmiller v. Dover Area School District (2005). 400 F. Supp. 2d 707. <https://law.justia.com/cases/federal/district-courts/FSupp2/400/707/2414073/>
- National Academy of Sciences (2008). *Science, evolution, and creationism*. The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/11876>
- Numbers, R. (2006). *The creationists: From scientific creationism to intelligent design*. Harvard University Press.
- Pennock, R. (1999). *Tower of Babel: The evidence against the new creationism*. MIT Press.
- Popper, K. (2005). *The logic of scientific discovery*. Routledge.
- Resnik, D. (2000). A pragmatic approach to the demarcation problem. *Studies in History and Philosophy of Science Part A*, 31(2), 249-267. [https://doi.org/10.1016/S0039-3681\(00\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0039-3681(00)00004-2)
- Scott, E. (2009). *Evolution vs. creationism: An introduction*. University of California Press.

CAPÍTULO 11

¿EXISTIÓ EL PRIMER SER HUMANO? EL PROBLEMA DE BUSCAR UN «ADÁN BIOLÓGICO»

Data de submissão: 26/08/2026

Data de aceite: 10/09/2026

Humberto Álvarez Sepúlveda

Universidad Católica de la
Santísima Concepción
Concepción – Chile

<https://orcid.org/0000-0001-5729-3404>

PALABRAS CLAVE: evolución humana; Homo sapiens; especiación; paleoantropología; genética de poblaciones.

**DID THE FIRST HUMAN BEING EXIST?
THE PROBLEM OF SEARCHING FOR A
«BIOLOGICAL ADAM»**

ABSTRACT: This chapter critically examines the question of the existence of a “first human” from the perspectives of evolutionary biology, paleoanthropology, and population genetics. The analysis is organized around three main themes: the gradual and population-based nature of evolution; the difficulties in establishing a precise boundary between Homo sapiens and its ancestors; and the significance of genetic concepts such as “Mitochondrial Eve” and “Y-chromosomal Adam”. Methodologically, it relies on a scoping review of specialized literature, developed from a qualitative-interpretive approach and using a narrative topic design. It argues that searching for an individual who was the first human confuses current taxonomic categories with the continuity of evolutionary processes. In conclusion, Homo sapiens has an identifiable evolutionary origin in population terms, but the available evidence does not allow us to transform that process into the biography of a first human individual.

KEYWORDS: human evolution; Homo sapiens; speciation; paleoanthropology; population genetics.

RESUMEN: Este capítulo examina críticamente la pregunta por la existencia de un «primer ser humano» desde la biología evolutiva, la paleoantropología y la genética de poblaciones. El análisis se organiza en tres ejes: el carácter gradual y poblacional de la evolución; las dificultades para establecer una frontera precisa entre Homo sapiens y sus antepasados; y el significado de conceptos genéticos como «Eva mitocondrial» y «Adán cromosómico-Y». Metodológicamente, se sustenta en una revisión de alcance de literatura especializada, desarrollada desde un enfoque cualitativo-interpretativo y mediante un diseño narrativo de tópico. Se sostiene que buscar un individuo que haya sido el primer humano confunde las categorías taxonómicas actuales con la continuidad de los procesos evolutivos. En conclusión, Homo sapiens posee un origen evolutivo identificable en términos poblacionales, pero la evidencia disponible no permite convertir ese proceso en la biografía de un primer individuo humano.

1. INTRODUCCIÓN

Pocas preguntas sobre la evolución humana parecen tan sencillas como preguntar quién fue el primer ser humano. Si todas las personas actuales pertenecen a la especie *Homo sapiens* y esta especie tuvo un origen, podría suponerse que en algún momento debió nacer el primer individuo que mereciera ser llamado humano. La intuición resulta poderosa porque estamos acostumbrados a pensar los comienzos mediante acontecimientos definidos: una persona nace en una fecha determinada, una ciudad es fundada en un momento concreto y una institución comienza formalmente su existencia. Sin embargo, trasladar esa lógica a la evolución biológica genera un problema. Las especies no suelen aparecer de manera instantánea y la evolución no transforma de pronto a un progenitor de una especie en un descendiente perteneciente inequívocamente a otra. Por el contrario, las poblaciones acumulan cambios heredables a lo largo de numerosas generaciones (Darwin, 2009; Futuyma y Kirkpatrick, 2017).

El problema se vuelve particularmente interesante en el caso de nuestra propia especie. La paleoantropología reconoce actualmente a *Homo sapiens* como una especie surgida en África hace aproximadamente 300.000 años, pero esta afirmación no significa que exista un fósil correspondiente al «primer humano». Los restos de Jebel Irhoud, en Marruecos, datados en aproximadamente 315 ± 34 mil años, presentan una combinación de rasgos: su morfología facial, mandibular y dental se aproxima a la de *Homo sapiens*, mientras que el neurocráneo conserva características más arcaicas (Hublin et al., 2017; Richter et al., 2017). Precisamente este mosaico muestra que aquello que denominamos anatomía humana moderna no necesariamente apareció como un conjunto completo en una única generación. La evidencia disponible favorece, por tanto, la interpretación de una transformación evolutiva prolongada antes que la hipótesis de un surgimiento repentino de nuestra especie.

La dificultad aumenta porque tampoco existe una característica única cuya aparición permita identificar inequívocamente al primer humano. El bipedismo es muchísimo más antiguo que *Homo sapiens*; la fabricación de herramientas antecede ampliamente a nuestra especie; el aumento del volumen cerebral ocurrió gradualmente; y diversas conductas complejas poseen historias evolutivas diferentes. La evolución humana se asemeja, por ello, menos a la instalación simultánea de un conjunto de atributos que a un mosaico cuyos componentes aparecieron y se transformaron en momentos distintos. Incluso características consideradas emblemáticamente humanas pueden encontrarse, en grados diferentes, entre otros homínidos. La imagen tradicional de una sucesión lineal que conduce inevitablemente desde un antepasado simiesco hasta el humano moderno

ha sido reemplazada por un árbol evolutivo ramificado en el que coexistieron diferentes especies y poblaciones humanas (Stringer, 2016).

Esta cuestión obliga además a diferenciar entre dos preguntas que suelen confundirse: cuándo podemos reconocer retrospectivamente a los primeros representantes de *Homo sapiens* y si existió un individuo biológicamente delimitable como «el primer humano». La primera pertenece legítimamente a la paleoantropología y puede abordarse mediante fósiles, dataciones, genética y arqueología. La segunda presupone una frontera individual que quizá nunca existió en la naturaleza. Los conceptos de especie permiten clasificar organismos y reconstruir linajes, pero sus límites temporales pueden resultar difusos cuando se observa una transformación evolutiva continua. Como ha señalado De Queiroz (2007), distintos criterios utilizados para delimitar especies capturan propiedades que pueden aparecer en diferentes momentos durante la divergencia de linajes. Por consiguiente, la clasificación taxonómica no debe confundirse automáticamente con un acontecimiento biológico instantáneo.

En este contexto, el presente ensayo busca responder a la siguiente interrogante: ¿Tiene sentido científico hablar de un «primer ser humano» individual o el origen de *Homo sapiens* debe entenderse como un proceso gradual y poblacional en el que resulta imposible establecer una frontera generacional absoluta?. Para responder a esta pregunta, la discusión se organiza en tres ejes complementarios. En primer lugar, se examina por qué la evolución y la especiación dificultan la búsqueda de un primer individuo humano. En segundo término, se analizan los fósiles y modelos actuales sobre el origen africano de *Homo sapiens*. Finalmente, se estudia por qué la denominada «Eva mitocondrial» y los ancestros del cromosoma Y no constituyen una pareja primordial ni equivalen a los primeros seres humanos.

2. METODOLOGÍA

Este ensayo se sustenta en una revisión de alcance de literatura especializada, siguiendo los lineamientos generales formulados por Arksey y O'Malley (2005) y por Tricco et al. (2018). Esta modalidad resulta pertinente porque el problema del «primer ser humano» atraviesa campos que utilizan evidencias y escalas de análisis diferentes: biología evolutiva, filosofía de la biología, paleoantropología, taxonomía, genética de poblaciones y arqueología prehistórica. El propósito no consiste en realizar un metaanálisis ni establecer una fecha exacta para la aparición del primer *Homo sapiens*, sino identificar las principales evidencias utilizadas para reconstruir el origen de nuestra especie y analizar qué permiten afirmar realmente acerca de la posibilidad de individualizar un comienzo biológico.

La búsqueda bibliográfica consideró literatura especializada disponible en bases de datos y repositorios académicos, principalmente Web of Science, Scopus, PubMed y Google Scholar, con especial atención a artículos revisados por pares, obras de síntesis sobre evolución y trabajos paleoantropológicos y genéticos de referencia. Se privilegiaron investigaciones relacionadas con el concepto de especie y la especiación; el registro fósil africano del Pleistoceno medio; los modelos sobre el origen de *Homo sapiens*; y la reconstrucción de ancestros comunes mediante ADN mitocondrial y cromosoma Y. Entre los trabajos centrales se encuentran De Queiroz (2007), Stringer (2016), Hublin et al. (2017), Scerri et al. (2018) y Ragsdale et al. (2023), complementados por estudios genéticos clásicos como Cann et al. (1987) y Poznik et al. (2013).

Los principales descriptores utilizados fueron *human evolution*, *origin of Homo sapiens*, *first human*, *speciation*, *species concept*, *Jebel Irhoud*, *African origin of Homo sapiens*, *population structure*, *mitochondrial Eve*, *Y-chromosomal Adam* y *human common ancestor*. La selección privilegió trabajos capaces de aportar información sobre cuatro dimensiones: mecanismos de cambio evolutivo; criterios empleados para reconocer especies; cronología y distribución de los primeros fósiles atribuidos a *Homo sapiens*; y significado genealógico de los ancestros comunes reconstruidos mediante marcadores genéticos. Se excluyeron interpretaciones que identifican personajes religiosos con individuos paleogenéticos sin proporcionar argumentos biológicos susceptibles de evaluación científica.

El corpus fue organizado mediante un enfoque cualitativo-interpretativo y un diseño narrativo de tópico articulado en tres categorías analíticas. La primera, continuidad evolutiva y delimitación de especies, examina por qué una especie puede poseer un origen histórico sin requerir un primer individuo inequívocamente diferente de sus progenitores. La segunda, origen poblacional de *Homo sapiens*, contrasta el registro fósil con los modelos que sitúan la evolución de nuestra especie dentro de poblaciones africanas conectadas. La tercera, genealogía genética y ancestros comunes, analiza las interpretaciones de la Eva mitocondrial y de los ancestros patrilineales. Esta organización permite avanzar desde el problema conceptual hacia sus manifestaciones fósiles y genéticas.

Por último, la revisión adopta una precaución interpretativa fundamental: distinguir entre categorías científicas legítimas y representaciones excesivamente literales de esas categorías. Afirmar que *Homo sapiens* apareció aproximadamente hace 300.000 años no significa que un individuo perteneciente a otra especie engendrara súbitamente un hijo idéntico a nosotros. Del mismo modo, reconstruir el ancestro común más reciente de determinados segmentos del genoma no equivale a identificar a la primera mujer o

al primer hombre. Por esta razón, es necesario distinguir entre el origen de una especie, su delimitación taxonómica, el ancestro genealógico y el ancestro genético, nociones estrechamente relacionadas, pero conceptualmente diferentes. En esta distinción radica, precisamente, el núcleo epistemológico del problema.

3. DE PADRES NO HUMANOS A HIJOS HUMANOS: LA PARADOJA DEL PRIMER INDIVIDUO

Imagínese una cadena genealógica hipotética que retrocede desde una persona actual durante cientos de miles de generaciones. Cada individuo tuvo progenitores biológicamente muy semejantes a él y sus hijos fueron igualmente semejantes. No obstante, si el recorrido retrocede millones de años, se llega finalmente a organismos que nadie clasificaría como *Homo sapiens*. Aparece entonces una paradoja: si en cada generación padres e hijos fueron casi indistinguibles, ¿en qué generación desaparece el humano y aparece el antepasado no humano? La respuesta proporcionada por la evolución es que no necesariamente existe una generación privilegiada. Pequeñas diferencias acumuladas durante periodos prolongados pueden producir grandes divergencias sin que ninguna transición generacional particular constituya una ruptura biológica absoluta (Futuyma y Kirkpatrick, 2017).

Un ejemplo cotidiano ayuda a comprender el problema. Entre el rojo y el amarillo puede construirse un gradiente con miles de tonalidades. Los extremos resultan claramente diferentes, aunque entre dos tonalidades inmediatamente contiguas sea imposible establecer una frontera natural indiscutible. La evolución temporal de un linaje puede plantear una dificultad semejante. Dos poblaciones separadas por cientos de miles de años pueden presentar diferencias suficientes para recibir denominaciones taxonómicas distintas, mientras que los individuos pertenecientes a generaciones sucesivas continúan siendo extremadamente parecidos. La analogía no pretende reducir la especiación a un cambio cromático, sino mostrar que una diferencia reconocible entre extremos no exige una discontinuidad equivalente entre cada estado intermedio.

El concepto biológico de especie, asociado especialmente a Mayr (1999), enfatiza la capacidad de las poblaciones para reproducirse entre sí y su aislamiento reproductivo respecto de otros grupos. Sin embargo, aplicarlo al registro fósil resulta problemático porque no podemos observar directamente si dos individuos muertos hace cientos de miles de años podían producir descendencia fértil. Además, como plantean Tagore y Akey (2024), la evidencia genética ha demostrado que linajes humanos reconocidos como diferentes pudieron intercambiar genes. La evidencia genómica demuestra

episodios de flujo génico entre poblaciones de humanos modernos, neandertales y denisovanos, mostrando que la historia evolutiva humana incluye separación, contacto e hibridación. En consecuencia, las especies no siempre funcionan como compartimentos completamente impermeables y la propia delimitación taxonómica depende de qué evidencias y conceptos se utilicen.

De Queiroz (2007) propone entender las especies fundamentalmente como linajes de metapoblaciones que evolucionan separadamente, mientras que propiedades como el aislamiento reproductivo, la diferenciación morfológica o la monofilia pueden considerarse evidencias adquiridas durante el proceso de divergencia. Esta perspectiva resulta especialmente útil para el problema del primer humano. Una población ancestral puede ir diferenciándose durante miles de generaciones hasta que, observada retrospectivamente, una parte posterior de ese linaje sea clasificada como *Homo sapiens*. A pesar de ello, exigir que el primer individuo clasificado de esa manera haya sido radicalmente distinto de sus padres transforma una categoría aplicada a linajes históricos en una frontera que la evolución no necesita producir.

Por ello, la pregunta «¿quién fue el primer humano?» contiene una presuposición discutible. Existieron seres humanos tempranos, y tiene sentido investigar las poblaciones más antiguas que pueden atribuirse razonablemente al linaje de *Homo sapiens*. Lo problemático es convertir esa afirmación poblacional en la existencia necesaria de un individuo inaugural. Ninguna madre perteneciente inequívocamente a una especie ancestral tuvo que dar a luz repentinamente a un bebé que cruzara por sí solo una frontera taxonómica. La evolución modifica poblaciones a través del tiempo, no etiquetas individuales de una generación a la siguiente. El «primer humano» se vuelve así comparable a una línea dibujada por el observador sobre un proceso continuo: útil para clasificar, pero potencialmente engañosa cuando se interpreta como una ruptura ocurrida literalmente en la naturaleza.

4. UN ORIGEN SIN INSTANTE: LOS PRIMEROS HOMO SAPIENS DE ÁFRICA

El registro fósil permite observar materialmente esta dificultad. Durante buena parte del siglo XX, el origen de *Homo sapiens* fue presentado con frecuencia como un acontecimiento relativamente localizado en África oriental hace alrededor de 200.000 años. Los descubrimientos posteriores han vuelto más complejo ese panorama. Los fósiles de Jebel Irhoud (Marruecos) fueron datados en aproximadamente 315.000 años y atribuidos a una fase temprana del clado de *Homo sapiens*. Lo más significativo no es únicamente su antigüedad, sino su combinación anatómica: una cara relativamente

moderna coexistía con una morfología endocraneal más arcaica (Hublin et al., 2017; Richter et al., 2017). Por tanto, en lugar de mostrar un organismo en el que todos los rasgos modernos aparecieron simultáneamente, Jebel Irhoud documenta una evolución en mosaico.

Este ejemplo dificulta cualquier intento de elegir un fósil y proclamarlo «el primer humano». Los restos fósiles constituyen muestras extraordinariamente incompletas de poblaciones que ya poseían largas historias evolutivas. El fósil más antiguo conocido de una especie no equivale al primer individuo de esa especie, del mismo modo que el documento más antiguo conservado sobre una ciudad no coincide necesariamente con el primer día de su existencia. Nuevos descubrimientos pueden ampliar hacia atrás el intervalo conocido. De hecho, el reconocimiento de Jebel Irhoud desplazó sustancialmente la cronología que durante décadas había situado los primeros humanos anatómicamente modernos principalmente en África oriental. El registro fósil identifica poblaciones antiguas y combinaciones morfológicas; no conserva un certificado de nacimiento de nuestra especie.

La distribución geográfica de las evidencias ha modificado también la manera de imaginar nuestros orígenes. Scerri et al. (2018) cuestionaron los modelos excesivamente simples de un único lugar africano de origen y propusieron considerar poblaciones subdivididas distribuidas por diferentes regiones del continente, conectadas de manera variable mediante flujo génico. Bajo esta perspectiva, las características asociadas posteriormente con *Homo sapiens* pudieron formarse dentro de una red de poblaciones cuyos contactos variaron debido a transformaciones climáticas y ecológicas. El origen de nuestra especie sería, por tanto, un proceso panafricano complejo y no necesariamente la expansión de una pequeña población surgida súbitamente en un punto geográfico singular.

Investigaciones genómicas recientes han reforzado la necesidad de abandonar modelos excesivamente lineales sobre el origen de nuestra especie. Ragsdale et al. (2023), mediante modelos demográficos aplicados a genomas africanos, encontraron que determinados patrones de diversidad pueden explicarse a partir de poblaciones ancestrales débilmente estructuradas y conectadas por flujo génico durante cientos de miles de años. Estos resultados no implican que todos los aspectos del origen de *Homo sapiens* estén resueltos; por el contrario, persisten debates sobre la estructura, localización y relaciones entre las poblaciones ancestrales. Precisamente esta complejidad hace menos plausible concebir el origen de la humanidad como un cuello de botella constituido por una única pareja o por un individuo inaugural. La evidencia más reciente

ha profundizado esta perspectiva. Como señalan Jakobsson et al. (2026), el análisis de genomas antiguos del África austral aporta nuevas evidencias sobre la profundidad de la estructuración poblacional africana y refuerza la necesidad de comprender la evolución temprana de *Homo sapiens* a partir de historias demográficas complejas y no mediante el supuesto de una población ancestral homogénea y claramente delimitada.

La pregunta por el primer humano puede reformularse entonces de una manera científicamente más productiva. En lugar de preguntar «¿quién fue?», cabe preguntar cuándo y mediante qué procesos poblaciones ancestrales comenzaron a reunir las características que utilizamos para reconocer a *Homo sapiens*. Esta formulación permite investigar cambios craneales, dentales, genéticos, tecnológicos y conductuales sin exigir que todos aparezcan simultáneamente. La ciencia puede establecer intervalos cronológicos, comparar poblaciones, reconstruir relaciones filogenéticas y modificar clasificaciones ante nuevos descubrimientos. Lo que difícilmente puede proporcionar es el nombre – o siquiera el esqueleto – del individuo exacto en que «comenzó la humanidad», porque esa exigencia presupone una discontinuidad que el propio mecanismo evolutivo vuelve innecesaria.

5. EVA SIN ADÁN: LO QUE LOS ANCESTROS GENÉTICOS REALMENTE SIGNIFICAN

La genética introdujo otra imagen susceptible de interpretaciones equívocas: la denominada «Eva mitocondrial». Cann et al. (1987), al estudiar ADN mitocondrial de individuos pertenecientes a diferentes poblaciones, reconstruyeron un ancestro matrilineal común situado en África. La expresión alcanzó enorme difusión porque parecía proporcionar una sorprendente correspondencia entre genética y relato bíblico. No obstante, su significado biológico es muy distinto. La Eva mitocondrial no fue la primera mujer, no fue la única mujer de su época y no constituye necesariamente el antepasado genealógico femenino más reciente de todas las personas actuales. Es, más precisamente, la mujer de la cual descienden por una cadena ininterrumpida de madres todas las secuencias mitocondriales humanas actuales.

La diferencia puede comprenderse mediante un ejemplo genealógico. Una mujer puede tener numerosos descendientes durante siglos y, sin embargo, dejar de contribuir al linaje mitocondrial si en algún punto todas sus líneas de descendencia continúan exclusivamente a través de hijos varones. Sus genes nucleares pueden permanecer distribuidos entre miles de personas, aunque su ADN mitocondrial deje de transmitirse. Inversamente, otra mujer contemporánea puede mantener una línea materna ininterrumpida hasta el presente. Cuando las líneas mitocondriales se rastrean

hacia atrás, terminan coalesciendo en una mujer; pero alrededor de ella vivieron muchos otros hombres y mujeres que también fueron antepasados de personas actuales. La coalescencia de un marcador genético no representa, por consiguiente, el origen demográfico de la humanidad.

Una cuestión semejante ocurre con el popularmente denominado «Adán cromosómico-Y»: el ancestro común por línea exclusivamente paterna de los cromosomas Y conservados actualmente. Los estudios genéticos permiten estimar cuándo convergen esas líneas, pero sus resultados dependen de las muestras, tasas de mutación y modelos utilizados. Poznik et al. (2013), por ejemplo, estimaron mediante metodologías comparables intervalos de aproximadamente 120-156 mil años para el ancestro común del cromosoma Y y de 99-148 mil años para el ADN mitocondrial en su conjunto de análisis. Estas estimaciones han continuado refinándose con nuevos datos. Lo esencial es que ninguno de esos individuos representa al primer hombre o a la primera mujer de *Homo sapiens*, ya que son puntos de coalescencia de sistemas particulares de herencia.

Tampoco existe ninguna exigencia genética de que la Eva mitocondrial y el Adán cromosómico-Y hayan vivido juntos, se hayan conocido o formado una pareja. Sus denominaciones pueden inducir precisamente esa representación. Si nuevas líneas mitocondriales o cromosómicas desaparecen con el transcurso de las generaciones, la identidad del ancestro común reconstruido puede desplazarse hacia individuos más recientes; y si se descubren linajes profundamente divergentes no considerados anteriormente, las estimaciones pueden cambiar en sentido contrario. El concepto describe la genealogía de marcadores específicos dentro de poblaciones y no un acontecimiento fundacional en el cual dos individuos fueron los únicos progenitores biológicos de todos los humanos posteriores.

Esta distinción permite precisar los límites entre las afirmaciones científicas y otras interpretaciones del origen humano. La genética puede reconstruir relaciones de parentesco, estimar tiempos de coalescencia y estudiar cambios en el tamaño y la estructura de las poblaciones, pero no permite identificar a un ancestro mitocondrial con el personaje histórico de una tradición religiosa. Tampoco necesita pronunciarse sobre el significado teológico de Adán, pues la noción de «primer ser humano» puede adquirir sentidos filosóficos o religiosos distintos del concepto biológico de *Homo sapiens*. El problema surge cuando se pretende establecer una correspondencia directa entre categorías procedentes de tradiciones religiosas y conceptos propios de la genética de poblaciones. Por tanto, un «Adán biológico», entendido como el primer individuo de una especie, no equivale al ancestro patrilineal común reconstruido mediante el cromosoma Y.

Esta dificultad, siguiendo a Zeberg et al. (2024), se extiende incluso al plano genómico, ya que las comparaciones recientes entre humanos modernos, neandertales y denisovanos sugieren que aquello que caracteriza genéticamente a *Homo sapiens* debe comprenderse como una combinación de rasgos, antes que como la aparición de una única diferencia universal capaz de establecer una frontera biológica absoluta.

6. CONCLUSIÓN

La búsqueda del primer ser humano revela una paradoja producida, en gran medida, por nuestra manera de formular la pregunta. *Homo sapiens* posee una historia evolutiva y, por consiguiente, hubo poblaciones más antiguas que otras dentro del linaje que actualmente denominamos nuestra especie. Sin embargo, de ello no se sigue que haya existido una generación en la que progenitores inequívocamente no humanos produjeran súbitamente un hijo inequívocamente humano. La evolución opera mediante variación heredable, reproducción diferencial, flujo génico, deriva y transformaciones poblacionales acumuladas durante numerosas generaciones. Las diferencias entre puntos temporalmente distantes pueden ser profundas, aunque entre padres e hijos nunca haya existido una ruptura comparable.

El registro fósil confirma esta continuidad. Jebel Irhoud muestra que hace alrededor de 300.000 años existían individuos en África con una combinación de rasgos modernos y arcaicos, mientras que otras evidencias africanas revelan una historia geográficamente amplia y morfológicamente diversa. Por este motivo, establecer una fecha aproximada para los orígenes de *Homo sapiens* constituye una inferencia científica razonable; transformar esa fecha en el nacimiento de un individuo inaugural no lo es. El fósil más antiguo descubierto proporciona un límite mínimo para nuestro conocimiento actual y no la identidad del primer representante biológico de una especie.

La genética profundiza esta conclusión. La Eva mitocondrial y el denominado Adán cromosómico-Y son ancestros comunes de líneas particulares de transmisión genética; por tanto, no constituyen una pareja humana originaria. Ambos coexistieron con poblaciones formadas por muchos otros individuos, y esos contemporáneos pudieron contribuir ampliamente al genoma de las generaciones posteriores, aunque sus líneas estrictamente maternas o paternas se extinguieran. Confundir coalescencia genética con origen de la especie produce una imagen radicalmente distinta de aquello que los estudios genéticos demuestran. La humanidad actual posee ancestros comunes, pero tener ancestros comunes no significa descender biológicamente de una única pareja fundadora.

La pregunta inicial – ¿tiene sentido científico hablar de un «primer ser humano» individual? – puede responderse, por tanto, distinguiendo escalas. En un sentido taxonómico convencional, es posible clasificar ciertos fósiles como los representantes más antiguos conocidos de *Homo sapiens*. En una perspectiva evolutiva estricta, en cambio, resulta problemático identificar un individuo como el punto exacto en que una especie ancestral dejó de existir y comenzó la nuestra. La frontera es retrospectiva y depende de criterios taxonómicos aplicados a poblaciones separadas temporalmente. El proceso biológico fue continuo, aunque nuestras categorías sean discretas. No es la evolución la que debe proporcionar necesariamente un primer humano inequívoco; somos nosotros quienes necesitamos nombres para ordenar etapas de una historia continua.

El problema del «Adán biológico» ofrece así una enseñanza más amplia acerca de la explicación científica. La ciencia no siempre responde una pregunta encontrando aquello que esta presupone; en ocasiones, progresa demostrando que la presuposición debe reformularse. Preguntar quién fue el primer humano supone imaginar la evolución como una sucesión de casillas claramente separadas. Las evidencias fósiles y genéticas describen una cuestión diferente: poblaciones que cambian, se dividen, vuelven a encontrarse e intercambian genes durante enormes periodos. En ese escenario, la ausencia de un individuo inaugural no constituye una laguna que algún fósil futuro necesariamente resolverá. Puede ser, precisamente, lo que deberíamos esperar si nuestra especie nació como nacen los linajes evolutivos: no en un instante, sino a través de generaciones.

REFERENCIAS

- Arksey, H., & O'Malley, L. (2005). Scoping studies: Towards a methodological framework. *International Journal of Social Research Methodology*, 8(1), 19-32. <https://doi.org/10.1080/1364557032000119616>
- Cann, R., Stoneking, M., & Wilson, A. (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325, 31-36. <https://doi.org/10.1038/325031a0>
- Darwin, C. (2009). *On the origin of species by means of natural selection*. Cambridge University Press.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879-886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>
- Futuyma, D., & Kirkpatrick, M. (2017). *Evolution*. Sinauer Associates.
- Hublin, J., Ben-Ncer, A., Bailey, S., Freidline, S., Neubauer, S., Skinner, M., Bergmann, I., Le Cabec, A., Benazzi, S., Harvati, K., & Gunz, P. (2017). New fossils from Jebel Irhoud, Morocco and the pan-African origin of *Homo sapiens*. *Nature*, 546, 289-292. <https://doi.org/10.1038/nature22336>
- Jakobsson, M., Bernhardsson, C., McKenna, J., Hollfelder, N., Vicente, M., Edlund, H., Coutinho, A., Sjödin, P., Brink, J., Zipfel, B., Malmström, H., Lombard, M., & Schlebusch, C. (2026). *Homo sapiens-*

specific evolution unveiled by ancient southern African genomes. *Nature*, 650(8100), 156-163. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-09811-4>

Mayr, E. (1999). *Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist*. Harvard University Press.

Poznik, G., Henn, B., Yee, M., Sliwerska, E., Euskirchen, G., Lin, A., Snyder, M., Quintana, L., Kidd, J., Underhill, P., & Bustamante, C. (2013). Sequencing Y chromosomes resolves discrepancy in time to common ancestor of males versus females. *Science*, 341(6145), 562-565. <https://doi.org/10.1126/science.1237619>

Ragsdale, A., Weaver, T., Atkinson, E., Hoal, E., Möller, M., Henn, B., & Gravel, S. (2023). A weakly structured stem for human origins in Africa. *Nature*, 617, 755-763. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06055-y>

Richter, D., Grün, R., Joannes-Boyau, R., Steele, T., Amani, F., Rué, M., Fernandes, P., Raynal, J., Geraads, D., Ben-Ncer, A., Hublin, J., & McPherron, S. (2017). The age of the hominin fossils from Jebel Irhoud, Morocco, and the origins of the Middle Stone Age. *Nature*, 546, 293-296. <https://doi.org/10.1038/nature22335>

Scerri, E., Thomas, M., Manica, A., Gunz, P., Stock, J., Stringer, C., Grove, M., Groucutt, H., Timmermann, A., Rightmire, G., d'Errico, F., Tryon, C., Drake, N. A., Brooks, A., Dennell, R., Durbin, R., Henn, B., Lee-Thorp, J., deMenocal, P., . . . Chikhi, L. (2018). Did our species evolve in subdivided populations across Africa, and why does it matter? *Trends in Ecology & Evolution*, 33(8), 582-594. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.05.005>

Stringer, C. (2016). The origin and evolution of Homo sapiens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1698), Article 20150237. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0237>

Tagore, D., & Akey, J. (2024). Archaic hominin admixture and its consequences for modern humans. *Current Opinion in Genetics & Development*, 87, 102280. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2024.102280>

Tricco, A. C., Lillie, E., Zarin, W., O'Brien, K. K., Colquhoun, H., Levac, D., Moher, D., Peters, M. D. J., Horsley, T., Weeks, L., Hempel, S., Akl, E. A., Chang, C., McGowan, J., Stewart, L., Hartling, L., Aldcroft, A., Wilson, M. G., Garritty, C., ... Straus, S. E. (2018). PRISMA extension for scoping reviews (PRISMA-ScR): Checklist and explanation. *Annals of Internal Medicine*, 169(7), 467-473. <https://doi.org/10.7326/M18-0850>

Zeberg, H., Jakobsson, M., & Pääbo, S. (2024). The genetic changes that shaped Neandertals, Denisovans, and modern humans. *Cell*, 187(5), 1047-1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.12.029>

SOBRE A ORGANIZADORA

La **Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz** es bióloga, maestra y doctora en Ciencias por la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Desde 1979 desarrolla actividades académicas y de investigación en la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), donde actualmente es Profesora Titular “C” de tiempo completo en el Departamento de Ciencias de la Salud de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Es fundadora y responsable del Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la UAM-I. Sus principales líneas de investigación son: 1) el estudio de los efectos asociados con la desnutrición y la obesidad, con énfasis en alteraciones celulares, citogenéticas y genómicas; y 2) la aplicación de la citometría de flujo en investigación básica y clínica para el análisis de procesos celulares en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas.

Ha dirigido proyectos de investigación, tesis de licenciatura y posgrado, y ha contribuido a la formación de recursos humanos especializados en las áreas de nutrición, genética toxicológica, biología celular y citometría de flujo. Sus investigaciones se han centrado en el estudio de la inestabilidad genómica, la genotoxicidad y la evaluación de biomarcadores celulares en modelos experimentales y poblaciones humanas.

Ha publicado artículos científicos, capítulos de libro y trabajos de divulgación, además de participar activamente en redes de colaboración académica. Fue Presidenta de la Sociedad Mexicana de Genética durante el periodo 2003–2005 y es integrante del Sistema Nacional de Investigadoras e Investigadores desde 1986. Actualmente cuenta con el nombramiento de Investigadora Nacional Nivel III.

Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-2501-2916>

ÍNDICE REMISSIVO

A

Aceite de aguacate 50, 55, 57

Aceite de girasol 50, 53, 54, 56, 57

Aceite de oliva 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 58

Aceite ozonizado 50, 52, 53, 54

Aguas 82, 83, 85, 93, 94, 99, 100, 103, 106

Alcohol polivinílico 38, 39, 40, 42, 46, 47

Ammonium sulfate precipitation 1

Antimicrobiano 13, 24, 50, 52, 53, 55, 56, 57

Azocolorante 101, 102, 104, 106

B

Biocontrol 60, 62, 70, 75, 76, 78, 79

Biodegradación 102, 105, 106

Biomassas naturales 92, 93

Biorremediación 90, 93, 95, 102, 103, 106, 107

C

Células troncales mesenquimales 39, 40, 42, 45, 46, 47

Chili powder 59, 60, 62, 74, 75, 79, 80

Citotoxicidad 22, 25, 27, 33, 35

Contaminación 26, 83, 84, 90, 91, 93, 101, 107

Creacionismo 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 118, 119

Cromo (VI) 92, 93, 94, 99, 100

Cupressaceae 22, 37

D

Darwinismo 109

Demarcación científica 109, 111

E

Eliminación 90, 93, 99, 100, 107

Especiación 111, 117, 121, 123, 124, 125

Evolución biológica 109, 110, 122

Evolución humana 121, 122

Extracción de proteína de plantas 1

F

Fungal pathogens 60, 64, 71

G

Genética de poblaciones 118, 121, 123, 129

Genome sequencing 60, 62, 64, 74, 75, 77, 78

H

Homo sapiens 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132

Hongos contaminantes 83, 84

I

Índice mitótico 22, 27, 28, 29, 33, 34, 35, 36

K

Kosakonia cowanii Ch1 59, 60, 61

L

Lacasas 102, 103, 105, 106

M

Membranas 13, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 46, 47, 48, 103

Metales pesados 82, 83, 84, 85, 86, 90, 91, 93, 94, 99

Morfología 12, 18, 19, 20, 39, 40, 42, 46, 48, 122, 127

N

Nanopartículas 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20

Naturaleza de la ciencia 109, 118

O

Óxido de zinc 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19

P

Paleoantropología 121, 122, 123

Planta medicinal 3, 22

Q

Quitosano 38, 39, 40, 42, 43, 46, 47, 48

S

Síntesis biogénica 12, 18, 20

Suelos 82, 83, 84, 94

T

Taxodium huegelii 22, 37

TCA/acetona 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10

Tierras agrícolas 82, 83

TRI-Reagent 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9

V

Volatile organic compounds 60, 62, 64, 70, 72, 74, 80

