

Póster: biotecnología

BUENAS PRÁCTICAS DE LABORATORIO EN BIOTERIO Y LECCIONES APRENDIDAS

*Manuel Jesús Moya Acosta^{1,2} / Heisel Virginia Urosa Sánchez^{1,3}

¹ Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. Caracas -Venezuela

² Instituto de Medicina Experimental. Sección Bioterio Facultad de Medicina. UCV. Caracas -Venezuela

³ Facultad de Farmacia- UCV. Cátedra Microbiología Aplicada. Caracas -Venezuela

mvmanuelmoya@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), surgieron en la década de 1970 con el propósito de regular el trabajo de los laboratorios; busca generar confianza en los resultados obtenidos en determinados tipos de investigaciones o estudios que impliquen el uso de animales de laboratorio. En un bioterio son fundamentales para garantizar la seguridad, la calidad y el bienestar de los animales utilizados en investigaciones científicas. Por otra, contar con un Sistema de Gestión de Calidad que busca garantizar que las actividades de una organización estén enfocadas hacia la mejora continua; por lo que, en función de ello y de la complejidad de los sistemas biológicos es necesario, continuar con el mantenimiento de un programa institucional de cuidado y uso de animales de laboratorio que abarque todos los aspectos básicos con un amplio fundamento científico de cuidado animal.

Buenas prácticas.



a)



b)



c)

Malas prácticas.



d)



e)



f)

Buenas Prácticas: a) Mantener las salas de animales limpias y ordenadas. b) Tomar las muestras de los lotes de alimento balanceado para el análisis de control de calidad c) Utilizar la indumentaria apropiada.

Malas Prácticas: d) Exceso de alimento en los dispositivos destinados a tal fin e) Uso de equipos electrónicos (celulares) dentro de las salas de animales de experimentación f) Jaulas por encima de la capacidad de visión y restos de alimento en rejillas.

METODOLOGÍA

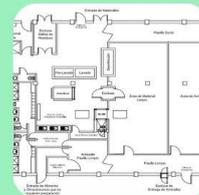
Materiales

- Normativas nacionales e internacionales
- Libros, revistas científicas e investigaciones

Métodos de Recolección de datos

- La técnica de recolección de datos fue la observación
- Revisión y análisis de bibliografía

PRINCIPIOS DE LAS BPL



FACTORES AMBIENTALES DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN: MICROAMBIENTE Y MACROAMBIENTE



CONCLUSIONES

- Los animales de laboratorio, son elementos imprescindibles en la investigación biomédica actual, y la aplicación de las BPL, permite alcanzar los objetivos, así como también un manejo eficiente de los recursos y espacios propiciando el crecimiento y ganancias de los laboratorios.
- Las BPL contribuyen a garantizar la competencia técnica del personal que trabaja en un bioterio de producción o de experimentación, a través de la calificación y capacitación, procedimientos operativos normalizados controlados en el Sistema de Gestión de Calidad.
- El uso de los equipos de protección del personal, los procedimientos estandarizados de limpieza y sanitización de materiales e instalaciones, conjuntamente con los flujos adecuados de personal y material, constituyen una verdadera barrera sanitaria.
- Las lecciones aprendidas son fundamentales para repetir resultados exitosos y evitar errores en proyectos futuros, aprender de la experiencia es clave para el éxito continuo.

Bibliografía

1. European Animal Research Association (EARA). (2021). Cuarenta razones para defender la investigación con animales. European Animal Research Association. [Fecha de consulta: 08/01/2024]. Disponible en <https://www.eara.eu/cuarenta-razones-para-defender-la-i>. 2. Organización Mundial de la Salud Serie de Informes Técnicos de la OMS, No. 957, 2010. Informe 44 anexo 1. [Fecha de consulta: 11/01/2024]. Disponible en: <https://www.studocu.com/latam/document/universidad-central-de-venezuela/microbiologia/bpl-informe-44-oms-anexo-1/41754315> 3. Banco Interamericano de Desarrollo (2011) Sector de Conocimiento y Aprendizaje Lecciones Aprendidas y Buenas Prácticas [Fecha de consulta: 19/02/2024] Disponible en <https://publications.iadb.org/publications/spanish/viewer/Lecciones-aprendidas.pdf>

Póster: biotecnología



Desarrollo de biocontroladores: *Lysinibacillus sphaericus* como alternativa para el control de mosquitos



Salazar Machado, Brenda ^{a,c}; Pinto Power, Fabiola ^{a,c}; Leal, Luis ^b; Hernández, José ^b; Dorta, Blas ^{a,c}

^a Universidad Central de Venezuela - IBE Laboratorio de Procesos Fermentativos; ^b Universidad Simón Bolívar, Laboratorio de Ecología de Química del Compartimiento; ^c CODECYT

Introducción

Lysinibacillus sphaericus, previamente conocida como *Bacillus sphaericus*, es una bacteria Gram positiva mesófila que se encuentra comúnmente en el suelo. Fue inicialmente aislada en China en 1987, a partir de un sitio de cría de mosquitos. Esta bacteria ha captado la atención por su potencial como agente de control biológico de mosquitos portadores de enfermedades, gracias a su capacidad para producir tanto una toxina proteica intracelular durante su fase vegetativa como una toxina cristalina parasporal durante la esporulación.

Este interés en *Lysinibacillus sphaericus* ha llevado a explorar su cultivo óptimo y la maximización de su virulencia, especialmente en el ámbito de la biotecnología. Los medios de cultivo utilizados a escala de laboratorio tienden a ser definidos, con cada reactivo siendo de grado técnico, lo que resulta en costos significativos, viables a esta escala, pero no a nivel industrial.

Por esa razón, se promueve la formulación de medios de cultivo a partir de subproductos agroindustriales y otros insumos de bajo costo. Estos medios alternativos tienen como objetivo fomentar el desarrollo de esta bacteria entomopatógena de manera rentable a gran escala.

Metodología

La biomasa de *Lysinibacillus sphaericus* y sus toxinas se obtuvieron mediante cultivos sumergidos utilizando un matraz Erlenmeyer de 500 mL como biorreactor. Se diseñaron medios de cultivo formulados a partir de materiales de bajo costo que actúan como fuentes complejas de carbono y energía, nitrógeno y sales, tomando como referencia el medio definido NYSM. La composición de cada medio se detalla en la tabla 1. Las condiciones de cultivo se mantuvieron constantes con un pH de 7, una temperatura de 30 °C y una velocidad de agitación de 200 rpm, hasta alcanzar la esporulación de la bacteria en cada medio de cultivo formulado.

Tabla 1. Composición de medios de cultivo formulados con insumos de bajo costo.

Medio	Torta de maíz	Glucosa	Melaza	Extracto de harina de carne	Extracto de harina de pluma	Fuente de nitrógeno definida	Fuente de sales definida
TM	+	-	-	-	-	-	-
TMS	+	-	-	-	-	+	-
TMP	+	-	-	-	-	-	-
GP	-	+	-	+	-	-	-
C	-	-	-	+	-	-	-
CP	-	-	-	+	-	-	-
PM	-	-	+	-	-	-	-

Legenda: + presente; - ausente. La fuente de nitrógeno definida está constituida por: Extracto de carne, peptona y extracto de levadura. La fuente de sales definida se constituye de: NaCl, CaCl₂ y MgCl₂ x 6 H₂O.

En la primera fase del estudio, se evaluó el crecimiento de *L. sphaericus* y el rendimiento de esporas obtenidas a partir de cada medio diseñado. Posteriormente, se determinó el porcentaje de mortalidad en larvas en estadio III y IV temprano de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller, al ser tratadas con una suspensión estándar de esporas, cristalinas y toxinas producidas por *L. sphaericus* en los diferentes cultivos.

En la segunda etapa, se procedió a optimizar el medio preseleccionado mediante la incorporación de nuevos elementos, como fertilizante NPK 15:15:15, NaHCO₃ y melaza de caña de azúcar clarificada, con el objetivo de reducir el tiempo de esporulación y mejorar la respuesta esporulativa de la bacteria. Como objetivo final, se desarrolló un producto basado en las esporas, cristalinas y toxinas producidas por *L. sphaericus* en el medio seleccionado. Este producto se formuló utilizando como vehículo tusas de maíz molida acondicionada en dos granulometrías diferentes. Se evaluó la eficacia del producto en larvas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller para comprobar su efectividad.

Referencias

Powell JF, Hunter JR. The sporulation of *Bacillus sphaericus* stimulated by association with other bacteria: an effect of carbon dioxide. J Gen Microbiol [Internet]. 1955;13(1):54-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-13-1-54>

Charles J-F. *Bacillus sphaericus* Toxins: Molecular Biology and Mode of Action. Annu Rev Entomol [Internet]. 1996;41(1):451-72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.41.1.451>

Resultados

Los resultados obtenidos en el bioensayo de la primera etapa se presentan en la figura 1.

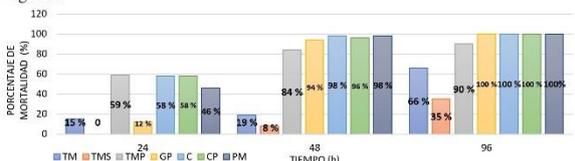


Figura 1. Porcentaje de mortalidad (%) en larvas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller en el tiempo al ser tratadas con una suspensión del complejo espora cristal generado por *Lysinibacillus sphaericus* en los distintos medios formulados. La concentración de todos los tratamientos fue estandarizada a un valor de 1×10^7 esp/mL.

Los resultados a las 96 h indicaron que los medios TM, TMS y TMP mostraron diferencias estadísticas significativas al generar una mortalidad inferior en comparación con los demás medios. Por tanto, se seleccionaron los 4 medios restantes para comparar la mortalidad en larvas a las 24 horas, dado que es crucial alcanzar altos niveles de mortalidad en el menor tiempo posible (ver figura 2).



Figura 2. Porcentaje de mortalidad (%) en larvas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller a las 24 h de iniciado el ensayo al ser tratadas con una suspensión del complejo espora cristal generado por *L. sphaericus* de 1×10^7 esp/mL. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,050 al realizar el análisis estadístico Kruskal-Wallis.

Con el objetivo de reducir el tiempo de esporulación de la bacteria *L. sphaericus* en el medio C, seleccionado debido a su bajo costo de producción, se incorporaron algunos elementos que podrían favorecer el proceso de esporulación. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Rendimiento en términos de concentración de esporas y tiempo de esporulación alcanzados por la bacteria *L. sphaericus* al ser cultivada en los distintos medios diseñados.

Medio de cultivo	Concentración de esporas (esp/mL)	Tiempo de esporulación (días)
C	$1,41 \times 10^8 \pm 2,95 \times 10^7$	7±5
CM	$1,86 \times 10^8 \pm 4,19 \times 10^7$	10±3
C-NPK	$2,70 \times 10^8 \pm 4,67 \times 10^7$	10±3
CB	$1,48 \times 10^8 \pm 8,26 \times 10^7$	4±1

Una vez seleccionado el medio óptimo, se procede con la formulación del producto en un vehículo capaz de generar una liberación paulatina de las esporas y toxinas impregnadas.

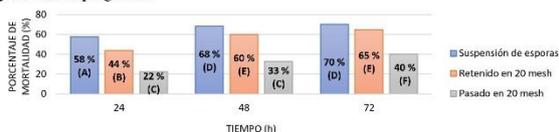


Figura 3. Porcentaje de mortalidad (%) en larvas de *Aedes aegypti* cepa Rockefeller en el tiempo al ser tratadas con una suspensión del complejo espora cristal generado por *L. sphaericus*, y dos formulaciones del producto empleando como vehículo tusa de maíz en dos granulometrías. La concentración de los tratamientos fue estandarizada a un valor de 5×10^6 esp/mL. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas para un nivel de significancia de 0,050 al realizar el análisis de varianza ANOVA.

Conclusión

El medio CB puede considerarse una alternativa eficiente para la producción a escala industrial de *L. sphaericus* debido a su tiempo de esporulación y su costo de producción. Además, utilizar tusa de maíz con granulometría retenida en 20 mesh como vehículo de las esporas y toxinas resulta ser eficiente, ya que produce una mortalidad del 65% a las 72 horas.

Póster: biotecnología



EFFECTO DE CONSORCIOS MICROBIANOS SOBRE LA CALIDAD DEL AGUA DE PROCESO DE UNA EMPRESA DE ELABORADOS VEGETALES.

Matute-Almeida, Lenis¹; Hernández-Muñoz, Luis; Román-Rojas, Hazel¹; Rumbos-Escalona, Nohants²

1 Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial; 2 Laboratorio de Microbiología. Instituto de Química y Tecnología. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.

lenis.matute.ucv@gmail.com; lenis.matute@ucv.ve



Introducción: Uno de los mayores desafíos del S.XXI, es asegurar la suficiente agua y energía para el bienestar de la humanidad, manteniendo al mismo tiempo, la salud ecológica, integridad y capacidad de recuperación de las cuencas hidrográficas. El agua es empleada en la industria alimentaria bien sea en los procesos de limpieza diaria y lavado de manos, hasta como ingrediente de algunos productos (Muñoz-Lucas y Sánchez-García, 2017). El mayor uso de agua generaría en última instancia mayores efluentes de aguas residuales. Aunque más del 70% de la tierra está cubierta de agua, sólo el 3% es apta para el consumo humano, y el 97% restante es agua salada (Rashid *et al.*, 2021). El agua potable es importante para los seres humanos, las plantas y los animales, así que, una vez que el agua ha sido contaminada, debe ser tratada antes de que pueda ser consumida. La contaminación del agua ocurre debido a algunos factores clave, es decir, descarga de efluentes industriales y de aguas residuales, actividades de la industria agrícola, entre otros (Hasan y Muhammad, 2020), por lo que es imprescindible el desarrollo de tecnologías sostenibles para el tratamiento del agua que se basan en procedimientos naturales de depuración que emplean vegetación acuática, el suelo y microorganismos (Morato *et al.*, 2006). Con base en estos antecedentes, en este trabajo se estudió el efecto del empleo de consorcios microbianos sobre la calidad del agua de proceso proveniente de una fábrica de productos vegetales, de manera de seguir impulsando nuevas tecnologías para el tratamiento de aguas y contribuir a la conservación y reúso de este recurso.

Materiales y métodos: Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, del Instituto de Química y Tecnología (Fagro-UCV). Se aplicó un diseño completamente al azar, con cuatro replicas para cada análisis y consorcio. Se conformaron 2 consorcios microbianos (C1 y C2) constituidos por *Bacillus subtilis* (Figura 1) y *Saccharomyces cerevisiae*; Además, en el consorcio C1 se inoculó un aislado de *Lactobacillus* sp. denominado como Q₁₂ y en el C2, otro aislado de *Lactobacillus* (Q₁₃). Los consorcios fueron inoculados en vasos Erlenmeyers (Figura 1) que contenían agua de proceso de una empresa de vegetales procesados (enlatados), incubando durante 72 h a 37 °C y con 300 rpm de agitación. Se recolectaron muestras cada 24 h y se determinó el efecto de los consorcios sobre la salinidad (ppm) y sólidos totales disueltos (STD), reportados en mg/L, y la conductividad eléctrica (CE) expresada en µS/cm (Matute-Almeida *et al.*, 2022). Asimismo, se midieron el pH (Olmos, 1987), el color en unidades UPC (Martínez, 2006) y la turbidez expresada en NTU (Matute-Almeida *et al.*, 2012) del residuo líquido.



Figura 1. *Bacillus subtilis* creciendo en medio de agar nutritivo y vasos Erlenmeyer inoculados con C1 y C2 (muestra a las 24 h).

Resultados: Los resultados demostraron que ambos consorcios fueron capaces de mejorar la calidad del agua de proceso ($p < 0.05$): pH (7-8), conductividad (902 µS/cm), STD (733-721 mg/L) y salinidad (119-117 ppm). Con respecto a la salinidad, los STD y la CE en los tratamientos estudiados, se observó (Figura 2) que estos parámetros están estrechamente relacionados, ya que las sales disueltas en el agua forman parte de los STD y las primeras influyen directamente sobre la CE de las aguas (Cirelli, 2012). Con respecto al pH, este aumentó para C1 (7,1) y C2 (8,1), ($p < 0.05$). La alcalinización del medio es una ventaja adicional en el tratamiento de agua ya que promueve la precipitación de elementos como el fósforo en forma de fosfatos y de metales en forma de hidróxidos o sales insolubles (CENTA, 2008), sin la adición de cal.

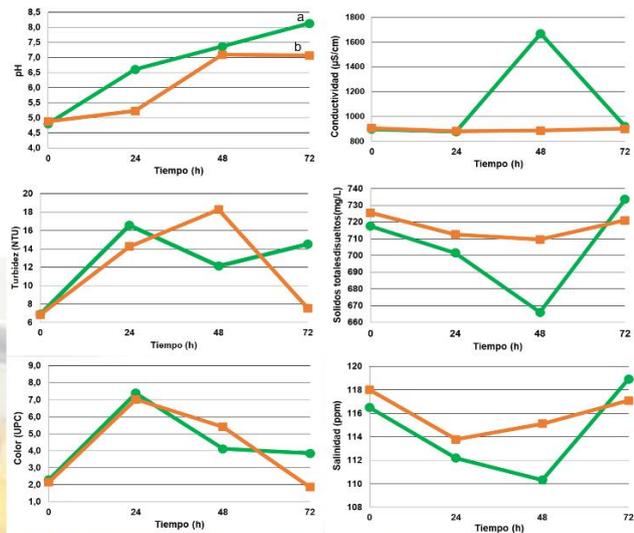


Figura 2. Efecto de los consorcios C1 (●) y C2 (■) sobre los parámetros estudiados en el residuo líquido de la empresa de vegetales procesados.

Conclusión: Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que ambos consorcios demostraron mejorar el pH (pasó de 4,5 a 7-8, sin adición de carbonato de calcio u otro reactivo, los cuales suelen ser empleados en estos tratamientos para ajustar el pH a los límites establecidos por las normas vigentes), y los sólidos totales disueltos del agua de proceso, cumpliendo con los parámetros establecidos en la Gaceta Oficial 5.021 (1995), y en los criterios ecológicos de calidad del agua (CE-CCA-001/89)

BIBLIOGRAFÍA: Centro de las Nuevas Tecnologías del Agua de Sevilla (CENTA). Manual de depuración de aguas residuales urbanas. Monográficos agua en Centroamérica. Ed. Alianza por el Agua. 2008; **Criterios ecológicos de calidad del agua (CE-CCA-001/89)**. Acuerdo por el que se establecen los criterios ecológicos de calidad del agua. Gaceta ecológica. México. D.F. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología. 1990; **Hasan H. A., Muhammad M. H.** A review of biological drinking water treatment technologies for contaminants removal from polluted water resources. *J. Water Process. Eng.* 2020; 33: 101035; **Martínez A.** Métodos de análisis físicos y espectrofotométricos para el análisis de aguas residuales. *Tecnol. Marcha.* 2006; 19(2): 31-40; **Matute-Almeida L., Bedoya C., Feo J.** Determinación de la concentración óptima de floculante a usar en la clarificación de jugos de caña en un central azucarero. *Rev. Fac. Agron (UCV).* 2012; 38(3): 115-122; **Matute-Almeida L., Maldonado-Gómez R., Román-Rojas H., Vargas-Guzmán D.** Microbial mixtures in the treatment of liquid waste from a milking parlor. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím-Biol.* 2022; 25: 1-9; **Morato J., Subirana A., Gris A., Carneiro A., Rosario P.** Tecnologías sostenibles para la potabilización y el tratamiento de aguas residuales. *Rev. Lat. Am. Investig.* 2006; 3(1): 19-29; **Muñoz-Lucas S., Sánchez-García R.** El agua en la industria alimentaria. *Bolet. Soc. Esp. Hidrol. Méx.* 2018; 33(2): 157-171; **Olmos A.** Reportes de biotecnología. *Biotecnología* n.º 5. 1987; **Rashid R., Shafig I., Akter P., Iqbal M. J., Hussain, M.** A state-of-the-art review on wastewater treatment techniques: the effectiveness of adsorption method. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2021; 28: 9050-9066.

Póster: biotecnología



EFFECTOS SOBRE *Staphylococcus aureus* DE LAS COMBINACIONES DE CIPROFLOXACINA/QUERCETINA Y CIPROFLOXACINA/*Hibiscus sabdariffa* INCORPORADAS EN UN HIDROGEL A BASE DE ALGA VERDE *Laurencia dendroidea*



FRANKLIN JESÚS PACHECO COELLO
fpacheco2@uc.edu.ve

Universidad de Carabobo, Departamento de Ciencias Básicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco Triana Alonso" (Biomed), Sección de Bioquímica Farmacológica, Laboratorio de Metales Pesados y Solventes Orgánicos.

INTRODUCCIÓN

La combinación de los antibióticos con extractos de plantas o con sus principios activos, ha sido estudiada con renovado interés, ya que algunos de esos compuestos, incluyendo los flavonoides, han mostrado una interesante actividad antimicrobiana, en especial en *Staphylococcus aureus*. En el presente trabajo se planteó como objetivo principal, evaluar los efectos de las combinaciones de ciprofloxacina (CIP) con quercetina (QCT) y un extracto de *Hibiscus sabdariffa* (HS), incorporadas en un hidrogel a base de alga *Laurencia dendroidea*, sobre una cepa *S. aureus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Paso 1: Preparación del Hidrogel**
- Se pesaron 20 g de alga verde y en una beaker se le añadieron 200 ml de agua destilada.
 - Se procedió a calentar a una temperatura de 80 °C por 15 min y pasadas las 24 h se separó el líquido, añadiéndole 5 ml de solución de quitosano al 5 % dejando en reposo por 48 horas.
- Paso 2: Incorporación de las concentraciones de CIP, QCT e HS en el hidrogel**
- A 1 ml de hidrogel se le añadieron 200µl de:
1. CIP (0,025 a 1 µg/mL)
 2. QCT (0,25 a 24 µg/mL)
 3. HS (5 a 160 mg/mL)

Paso 3: Evaluación del efecto individual y de las combinaciones

- En placas de fondo en U se colocaron 198 µl de cultivo se *S. aureus* (ATCC 25923) y 2µl de hidrogel con los elementos individuales y 1 µl en la combinación.método de reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolol MTT.
- Obtenidas las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI), se procedió a preincubar el microorganismo con las concentraciones que estuviesen por debajo de la CMI. Luego se combinaron 10µl del preincubado con una suspensión de glóbulos rojos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los efectos de las combinaciones se empleó el método basado en el principio del efecto de la mediana. La ecuación del efecto de la mediana correlaciona las dosis de las drogas con sus citotoxicidades y tiene la siguiente forma: $fa/fu = (D/Dm)^m$ en el cual D es la dosis de la droga; Dm la dosis del efecto de la mediana que significa la potencia, determinada a partir del intercepto en el eje de las x del grafico efecto-mediana; fa es la fracción afectada por la dosis; fu es la fracción no afectada que es igual a 1-fa y m es un exponente que cuantifica la sigmoideidad (o forma) de la curva dosis-efecto.

RESULTADOS

Efectos individuales de CIP, QCT, HS

En la figura 1, se puede notar que las concentraciones más bajas de CIP, QCT y de HS estimularon el crecimiento bacteriano. Por otra parte a medida que se incrementó la concentración se evidencia inhibición del crecimiento, es decir, un efecto dependiente de la dosis. La figura 2 muestra un grupo de ensayos independientes de las dosis más bajas que permitieron determinar el efecto estimulante del crecimiento o de hormesis en la fase exponencial (3 a 6 h). Este efecto hormético fue estadísticamente significativo respecto al control de crecimiento.

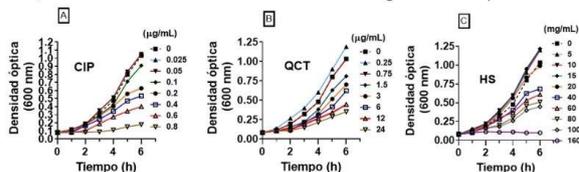


Figura 1. Ensayos preliminares de A) CIP, B) QCT y C) HS, sobre la proliferación de *S. aureus*

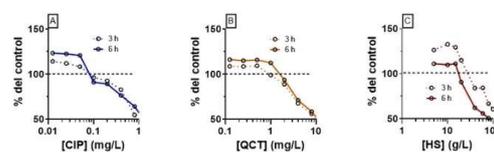


Figura 2. Efecto hormético a bajas concentraciones de CIP, QCT e HS sobre *S. aureus*.

Efectos de las combinaciones binarias

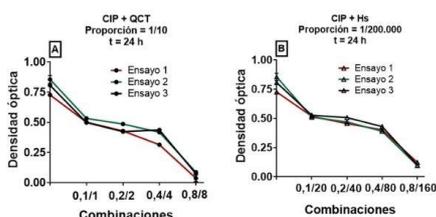


Figura 3. Efectos de las combinaciones CIP/QCT y CIP/HS mediante la reacción del MTT. En todas las gráficas, se muestran los resultados de 3 ensayos independientes.

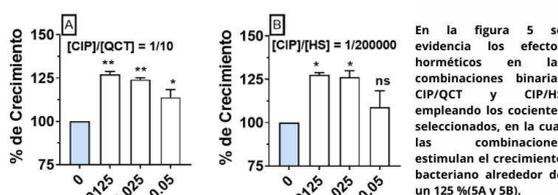


Figura 5. Efecto hormético de las combinaciones abajas dosis de CIP/QCT y CIP/HS.

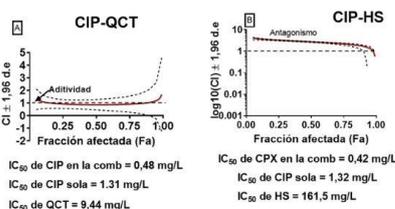


Figura 4. Análisis de efecto sinérgico, aditivo o antagónicos de las combinaciones de CIP/QCT(A) y CIP/HS(B).



ÍNDICES DE COMBINACIÓN
IC PARA CIP-QCT=1
EFFECTO ADITIVO
IC PARA CIP-HS>1
EFFECTO ANTAGÓNICO

Referente al efecto de las combinaciones en la actividad hemolítica se tiene que para CIP vs CIP/QCT hubo disminución de la hemolisis, sin embargo este solo fue significativo en la combinación 0,1/1. Para CIP vs CIP/HS, se observó un comportamiento similar, con significancia estadística en la combinación 0,2/40 (Figura 6).

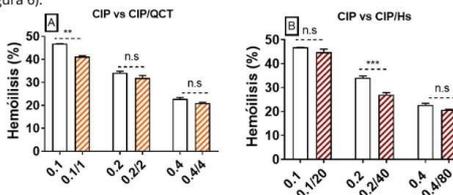


Figura 6. Comparación del efecto de CIP vs CIP/QCT (A), y CIP vs CIP/HS (B) sobre la actividad hemolítica de *S. aureus*.

CONCLUSIONES

Se observó un crecimiento significativo en las concentraciones mas bajas de CIP, QCT y el extracto de HS, este crecimiento a bajas dosis denominado HORMESIS, supone un problema en la búsqueda de nuevos antimicrobianos. La aditividad observada por la combinación CIP/QCT sugiere que esta podría ser evaluada en cepas multiresistentes y considerar la combinación de CIP con otro flavonoides y productos naturales.

REFERENCIAS

1. Tong S, Davis J, Eichenberger E, Holland T, Fowler Y. *Staphylococcus aureus*. Infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Micro Rev. 2015; 28(3): 603-661.
2. Zhang GF, Liu X, Zhang S, Pan B, Liu ML. Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. Eur J Med Chem, 2018; 146(2): 599-612.
3. Singh P, Arif Y, Bajguz A, Hayat S. The role of quercetin in plants. Plant Physiol Biochem. 2021;166(1): 10-19.



Póster: biotecnología



ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ENZIMÁTICA DE AISLADOS DE ASPERGILLUS NIGER PARA USAR DIFERENTES RESIDUOS AGROINDUSTRIALES COMO SUSTRATO EN FERMENTACIONES SUMERGIDAS.

Matute-Almeida, Lenis¹; Román-Rojas, Hazel¹; Sabino-Rojas, Mónica¹; Paredes-García, Ariany¹; Rumbos-Escalona, Nohants²

¹ Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial; ² Laboratorio de Microbiología. Instituto de Química y Tecnología. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. lenis.matute.ucv@gmail.com; lenis.matute@ucv.ve



Introducción: En la industria de alimentos se generan grandes volúmenes de residuos tanto en forma sólida como líquida (Ji *et al.*, 2017; Schieber, 2017). La mayoría de estos residuos son desechados, por lo que su acumulación contribuye a la formación de incendios y a la contaminación ambiental (Ng *et al.*, 2020). Se estima que en Venezuela se producen importantes cantidades de residuos y/o subproductos provenientes del procesamiento industrial del trigo, el girasol (*Helianthus annuus* L.) y la papas (*Solanum tuberosum* L.) (Cheng *et al.*, 2022; FAO, 2021; Fedeaagro, 2021; Petraru *et al.*, 2021, Sánchez-Castelbalco y Heredia-Martín, 2021). A causa de que la mayoría de estos residuos son potencialmente de buena calidad, se han empleado procesos fermentativos inoculando a bacterias o hongos como *Aspergillus niger* (AN), para la obtención de productos con alto valor agregado, tales como las enzimas (Matute *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2020; Putri *et al.*, 2020; Laothanacharon *et al.*, 2021). Es por ello, que en este trabajo se estudió la capacidad enzimática de dos aislados de *A. niger* usando diversos residuos agroindustriales como sustrato fermentable.

Materiales y métodos: Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Agroindustrial, del Instituto de Química y Tecnología (Fagro-UCV). Bajo un diseño anidado se evaluó la capacidad enzimática de 2 aislados de AN identificados como ANM-1 y ANG en fermentaciones sumergidas. Para ello, se caracterizaron fisicoquímicamente los residuos del procesamiento agroindustrial del girasol (harina) y las papas (cáscaras) y el afrechillo de trigo, de acuerdo con la norma Covenin 1878 (1983). Las fermentaciones se llevaron a cabo empleando una solución salina modificada a pH 4,27, esterilizada en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Una vez la solución alcanzó la temperatura ambiente, se inoculó un cultivo de esporas de *A. niger* (ANM-1 o ANG, 1x10⁸ UFC/mL) a razón del 10%. Las fermentaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 37°C con agitación constante de 300 oscilaciones por minuto. Se tomaron muestras en el transcurso de las 72 horas de fermentación y se evaluaron las actividades enzimáticas de las alfa-amilasas (Hopkins y Bird, 1954); xilanasas (Bailey *et al.*, 1991); glucoamilasas, beta-1,4 endoglucanasas, exocelulasas y proteasas de acuerdo con los métodos descritos por Olmos (1987).

Resultados: Los residuos empleados como sustratos se caracterizaron por presentar composiciones bromatológicas significativamente distintas (P<0,01) clasificándose los mismos como: altamente proteico (harina de girasol), altamente energético (harina de residuos de papas) y proteico-energético (afrechillo de trigo), para estimular la expresión de perfiles enzimáticos diferentes en las fermentaciones. Las cinéticas demostraron la capacidad de estos aislados de generar múltiples enzimas para la metabolización de los sustratos. A las 72 h de incubación se obtuvo la mejor combinación de actividades (P<0,05) en las enzimas alfa-amilasa (48,48 UA/mL), glucoamilasa (757,27 UI/mL) y xilanasas (163,02 BXU); Mientras que en las enzimas proteasas, endoglucanasa y exocelulasas, las actividades fueron de 66,19; 3,94 y 7,42 UI/mL, respectivamente (Figura 1).

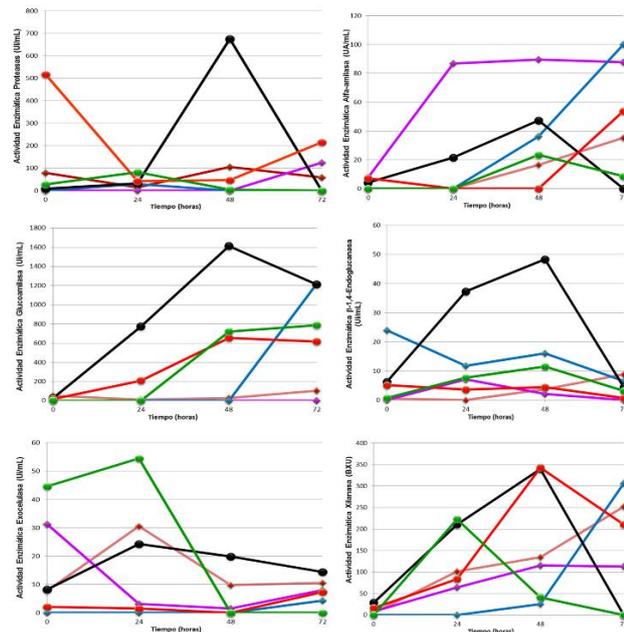


Figura 1. Actividad enzimática del ANM-1 (o) y ANG (o) desarrollada en los sustratos empleados: Afrechillo de trigo (♦, ●), harina de girasol (◆, ●) y residuos de papas (◆, ●)

Conclusión: Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron la capacidad de *A. niger* de excretar complejos enzimáticos que degradaron los residuos agroindustriales estudiados, empleándolos como sustrato fermentable.

BIBLIOGRAFÍA: Cheng W., Sun Y., Fan M., Li Y., Wang L., Qian H. Wheat bran, as the resource of dietary fiber: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2022; 62(26): 7269-7281. Confederación Nacional de Asociaciones de Productores Agropecuarios, Fedeaagro. Estadísticas de Agropecuarias. [Internet]. Consultado 04 Abr 2024. Disponible en: <https://www.fedeaagro.org/>; Li C., Kong CX, Mei ZL, Li J. A Review of the Anaerobic Digestion of Fruit and Vegetable Waste. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017; 183(3): 906-922. Kaur A., Rishi V., Soni S.K, Praveen R. A novel multi-enzyme preparation produced from *Aspergillus niger* using biodegradable waste: a possible option to combat heterogeneous biotins. *AMB Expr.* 2020; 10: 36. Matute L., Bertsch A., Diaz I. Evaluación de la actividad amilolítica en cultivos microbianos en estado sólido y sumergido para la obtención de aditivos enzimáticos. *Rev. Fac. Agron. (UCV).* 2012; 38(1): 9-17. Olmos A. Reportes de biotecnología. *Biotecnología* nº 5, 1987. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. Estadísticas de producción agrícola. FAO-STAT. [Internet]. Consultado 04 Abr 2024. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/en/#home>; Schieber A. Side Streams of Plant Food Processing as a Source of Valuable Compounds. *Selected Examples. Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2017; 8(1): 97-112.

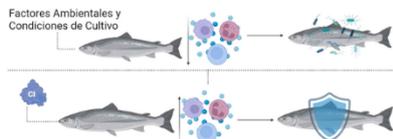
Póster: biotecnología



PRODUCCION DE PROTEINAS RECOMBINANTES NANOESTRUCTURADAS IMUNOESTIMULANTES COMO HERRAMIENTA TERAPEUTICA EN ACUICULTURA

Daniela López¹, Paula Valenzuela¹, Luis Mercado², José Gallardo-Matus¹, Débora Torrealba¹

¹ Laboratorio de Genética y Genómica Aplicada. Escuela de Ciencias del Mar. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile
² Grupo de Marcadores Inmunológicos, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile



INTRODUCCIÓN

Las proteínas recombinantes representan una vía prometedora en el tratamiento de enfermedades infecciosas y relacionadas con el sistema inmunitario en la acuicultura. Sin embargo, su eficacia se ve comprometida por factores ambientales como pH y temperatura, lo que resalta la necesidad de sistemas que preserven su integridad y actividad biológica. Entre estas soluciones, las proteínas nanoestructuradas, formadas por una matriz de β-amiloide, ofrecen robustez mecánica y estabilidad excepcionales. Las proteínas nanoestructuradas, son estables, biofuncionales, biocompatibles, y no tóxicas, por lo que se han propuesto como sistemas de administración de proteínas recombinantes, incluso vía oral, superando la desventaja que presentan las proteínas solubles.

OBJETIVO

Producir una proteína nanoestructurada inmunostimulantes para salmónidos

METODOLOGÍA

- Diseño de Plásmido**
- TRANSFORMACIÓN E. coli BL21 PLYS**
- PRODUCCIÓN**

Medio: LB
 O.D inducción: 0.8
 Inductor: IPTG 1mM, 37°C, 250rpm, 3h
- PURIFICACIÓN**

PMSF: 0.4 mM
 Lisozima: 1 µg/mL
 Triton X-100: 0.4 %
 NP-40: 0.025 %
 MgSO4: 0.6 mM
 DNase I: 0.6 µg/ mL

15,000 × g, 15 min, 4 °C
 Remover Sobrenadante
 Lavar pellet con PBS
 15,000 × g, 15 min, 4 °C
 Almacenar a -80°C
- Cuantificación y Caracterización**

Western Blot (His-Tag)
 Microscopio Electrónico (FESEM)
- Ensayo in vitro**

Medio: L15 + FBS 5%
 Línea Celular: RTS-11 (10⁶)
 Dosis: 5, 10, 20 µg/mL
 Tiempo de inducción: 12h

RT-qPCR:
 il-1β
 il-8
 iNOS
 tnf-α
 il-10

RESULTADO

Se seleccionó Hepcidina como inmunomodulador de *Salmo salar*, y se obtuvo un rendimiento de 30 mg/mL, con un tamaño promedio de 400nm. Los análisis de expresión génica en la línea celular de macrófagos y monocitos RTS-11 permitió determinar la funcionalidad del inmunostimulante. Se observó un aumento significativo en la expresión de genes proinflamatorios como *il-1β*, *tnf-α*, *il-8* en respuesta a la dosis de 5 µg/mL y el gen proinflamatorio *il-10* en respuesta a las dosis de 5 y 20 µg/mL, lo que sugiere una respuesta inmune activada (Fig 1).

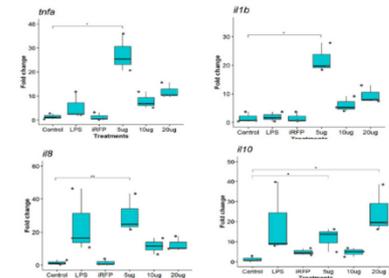


Fig 1. Ensayo de dosis respuesta de las células RTS-11 a diferentes concentraciones de hepcidina (5, 10 y 20 µg/mL). Las diferencias entre tratamiento se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y el Dunn test. Niveles de significancia: * p < 0.05, ** p < 0.01.

CONCLUSIÓN

La producción de proteínas nanoestructuradas tiene un alto rendimiento (30 mg/mL), y la eficacia para estimular vías proinflamatorias del sistema inmune es significativa a los 5 µg/mL.

BIBLIOGRAFÍA

- de Marco, A., Ferrer-Miralles, N., Garcia-Fruitós, E., Mitrali, A., Peternel, S., Rinas, U., ... Villaverde, A. (2019). Bacterial inclusion bodies are industrially exploitable amyloids. *FEMS Microbiol.* 43, 53-72.
- de Groot, N. S., Sabate, R., & Ventura, S. (2009). Amyloids in bacterial inclusion bodies. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(8), 408-416.

Póster: biotecnología

SÍNTESIS DE ÁCIDO HIALURÓNICO A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN MICROBIANA DE LA GLUCOSA PRESENTE EN LAS HOJAS DE LA MAZORCA DE MAÍZ (ZEA MAYS).

CAROLINA DIB, MARÍA ALEJANDRA RODRÍGUEZ, VANESSA BRIZUELA, RICARDO ROBERTO

UNIVERSIDAD METROPOLITANA, FACULTAD DE INGENIERÍA
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA, ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARACAS, VENEZUELA

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente 11 millones de toneladas de maíz fueron cosechadas en Venezuela para el año 2022. Sin embargo, el 50% correspondió a material lignocelulósico, el cual puede ser utilizado para producir distintos compuestos químicos pero no se les da un valor agregado.

Por otra parte, el envejecimiento de la piel genera preocupación a la población de cualquier edad, esto se ve reflejado por la aparición de arrugas, eccemas y deshidratación de la piel; esto es debido a la disminución del ácido hialurónico (AH) que se encuentra de forma natural en el cuerpo humano. Existen diversos métodos de obtención de AH, sin embargo involucran la extracción a partir de tejidos animales y fluidos corporales, que generan un gran impacto ambiental.

Para el presente trabajo, se planeó obtener ácido hialurónico a partir de la fermentación con el microorganismo *Streptococcus zooepidemicus*, utilizando como fuente de carbono la glucosa extraída de las hojas de la mazorca de maíz, aprovechando este residuo generado en las plantaciones.

MATERIALES

- Hojas de mazorca de maíz
- Hidróxido de sodio NaOH
- Ácido Sulfúrico 3M
- Reactivo de Fehling
- Ácido clorhídrico
- Extracto de Levadura
- Sales: $(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- Solución de elementos traza
- Isopropanol
- Acetato de sodio
- Carbón Activado 2%

METODOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO Y COMPARACIÓN CON AH COMERCIAL

Propiedad	Ácido Hialurónico	
	Sintetizado	Comercial
pH (1)	8	7,8
Índice de refracción (1)	1,330	1,330
Solubilidad	agua, etanol	agua, etanol
Viscosidad intrínseca	18 dl/g	49 dl/g
Peso molecular	1.004 kDa	3.085 kDa
Grupos funcionales	Amidas, carbonilos, alcohol	Amidas, carbonilos, alcohol

Grupos Funcionales

- Amidas
- Ácidos carboxílicos
- Alcoholes

Espectroscopia Infrarrojo (IR)

Ácido hialurónico sintetizado y comercial.

RESULTADOS

Peso Molecular

Sintetizado (1.004 kDa)	Comercial (3.085 kDa)
<ul style="list-style-type: none"> Hidratación Producción de colágeno Largo plazo Fácil penetración en la piel 	<ul style="list-style-type: none"> Hidratación en la superficie de la piel Corto plazo Antiinflamatorio

Medio vs **Alto**

Molécula Ácido Hialurónico

ESTUDIO DE MERCADO

Proyección de ventas hasta el 2027: 5.467 L de ácido hialurónico al 1% año

Demanda a cubrir: 10% (547 L/año)

ESTUDIO ECONÓMICO

Precio de venta: 75\$

Demanda a cubrir: 25%

Análisis de rentabilidad	
VFN	\$36.863,42
TIR	6,428%
TMAR	24,85%

DISEÑO DEL PRODUCTO

- Envase cilíndrico de polietileno de 1 L
- Tapa rosca con precinto de seguridad.
- Cajas de cartón para 6 envases cilíndricos de 1L

DISEÑO Y FACTIBILIDAD TÉCNICA

Tamaño de planta: 59 m²

Capacidad estándar de la planta: 623 L/año

CONCLUSIONES

La obtención de 10g de ácido hialurónico es posible utilizando 13,5 g de hojas de maíz, con propiedades similares al comercial y una variación en la viscosidad debido al peso molecular medio. Hasta el momento en Venezuela, no se ha encontrado una planta productora de ácido hialurónico, por lo que el producto es rentable cumpliendo con el 25% de la demanda y un precio de venta de \$75.

RECOMENDACIONES

- Para el proceso de purificación, realizar una diafiltración posterior a la filtración de 0,45 micras, ya que le brindará al producto mayor pureza.
- Continuar el estudio mediante el entrecruzamiento del ácido obtenido para producir inyectables dérmicos.
- Continuar el estudio para realizar formulaciones cosméticas como cremas y serums con el ácido hialurónico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aloia, M., Sarmiento, P. Producción de ácido hialurónico por fermentación microbiana. Universidad Tecnológica (2016).

Han, Y., Li, Q., Wang, L., Bai, Q., Wang, C., Mu, S., Chen, Y. Impact of refractive index increment on the determination of molecular weight of hyaluronic acid by multi-angle laser light scattering technique (2020).

Ferdinán, C. Ingeniería Producción de masa en Venezuela creció 46% durante el 2022. Globalwain. <https://www.globalwain.com/economia/2023/ingenieria-produccion-de-masa-en-venezuela-crecio-46-durante-el-2022> (Accesado el 31/01/2024).

Póster: biotecnología



SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE UN NUEVO COMPLEJO ORGANOMETÁLICO (DIPLATA- α -CETAGLUTARATO)

fpacheco2@uc.edu.ve

Franklin Jesús Pacheco Coello, Patricia Valentina Reinoza Hazkour, Michelina Victoria Rea Rebolledo

Universidad de Carabobo, Departamento de Ciencias Básicas, Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco Triana Alonso" (Biomed), dSección de Bioquímica Farmacológica, Laboratorio de Metales Pesados y Solventes Orgánicos, Laboratorio de Biotecnología "FITOQUÍMICA 20" C.A. Venezuela

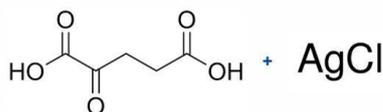


INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevos antimicrobianos ha sido el principal desafío de la biotecnología ante el incremento de la resistencia de diversos patógenos por el uso inadecuado de los antibióticos. El presente trabajo tuvo como objetivos la síntesis, caracterización del compuesto organometálico diplata- α -cetoglutarato y su efecto sobre la viabilidad y formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Se realizó la síntesis empleando ácido- α -cetoglutarato, nicotinamida-adenina-dinucleótido y cloruro de plata, reacción físico-química a 25 °C y en medio acuoso.

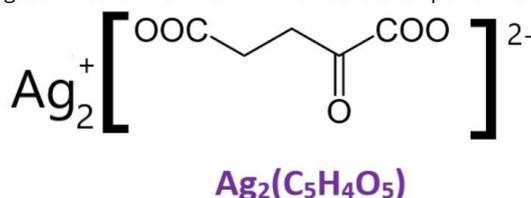


- Usando concentraciones de diplata- α -cetoglutarato en un rango de 0,2 a 1 μM , se evaluó el efecto sobre la viabilidad y formación de biopelículas.
- La viabilidad se determinó empleando la técnica de reducción de una sal de tetrazolio, en este caso Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT).
- Capacidad de formación de biopelículas según el método en microplaca con tinción de cristal violeta.

RESULTADOS

Nuevo compuesto ORGANOMETÁLICO-Patrón IR y EM

Las señales del espectro IR mostraron el correspondientes al estiramiento C-H a 3416 cm^{-1} , C=O a 1324 cm^{-1} Ag-O a 1265 cm^{-1} . En la EM se evidenciaron picos de 81 m/z, 127 m/z y uno más intenso a 267 m/z.



El alfa-cetoglutarato (AGK) es un potente compuesto que desempeña un papel importante en muchos procesos biológicos. Como metabolito del ciclo de Krebs, el alfa-cetoglutarato se produce cuando las células descomponen las moléculas de los alimentos para obtener energía. Si bien existen otras sales de cetoglutarato, la incorporación de la plata hace de este un nuevo compuesto del cual se pueden seguir explorando sus posibles actividades biológicas.

Figura1. Diplata-alfa-cetoglutarato(Ag-AKG)

Efecto antimicrobiano del diplata-alfa-cetoglutarato

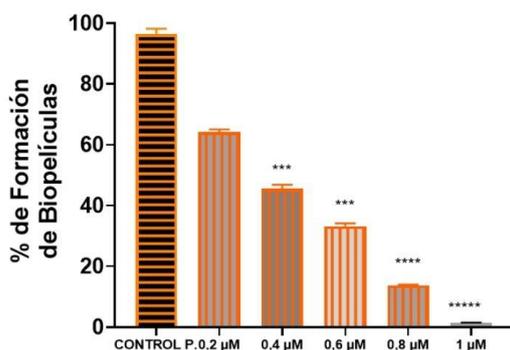


Figura 2. Efecto del Ag-AKG sobre la capacidad de formación de biopelículas. Para todas la concentraciones ensayadas se observó disminución con diferencia estadística a partir de 0,4 ($p < 0,05$).

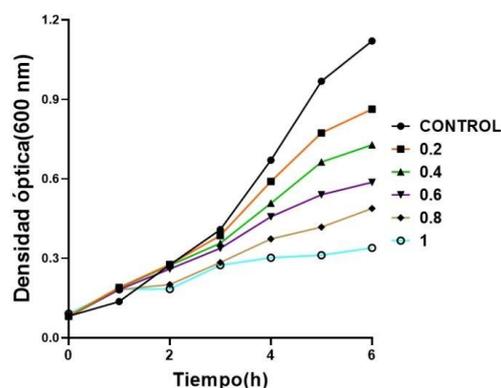


Figura 3. Efecto del Ag-AKG sobre el crecimiento bacteriano. Para todas las concentraciones el Ag-AKG redujo la proliferación celular con una concentración mínima inhibitoria cercana a 0,6. Concentraciones expresadas en μM .



CONCLUSIONES

Estos resultados indican la posibilidad de generar nuevas alternativas antimicrobianas como diplata- α -cetoglutarato y evaluar su efecto en otros patógenos de interés clínico.

REFERENCIAS

- Asadi Shahmirzadi A, Edgar D, Liao CY, et al. Alpha-Ketoglutarate, an Endogenous Metabolite, Extends Lifespan and Compresses Morbidity in Aging Mice. *Cell Metab.* 2020;32(3):447-456.e6.
- Zhang GF, Liu X, Zhang S, Pan B, Liu ML. Ciprofloxacin derivatives and their antibacterial activities. *Eur J Med Chem.* 2018; 146(2): 599-612.
- Naeini SH, Mavaddatiyan L, Kalkhoran ZR, Taherkhani S, Talkhabi M. Alpha-ketoglutarate as a potent regulator for lifespan and healthspan: Evidences and perspectives. *Exp Gerontol.* 2023;175:112154.