

REVISTA

CITECOSA

Ciencia Tecnología Sociedad y Ambiente

Barrancabermeja - Colombia

ISSN: 2027 6745



UNIPAZ
Instituto Universitario de la Paz

Revista para la difusión y divulgación de avances de investigación

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE LA PAZ

UNIPAZ

Oscar Orlando Porras Atencia
Rector

Kelly Cristina Torres Angulo
Vicerrectora

Fabian Aristóbulo Rico Suárez
Director de Investigación y Proyección Social

REVISTA CITECSA

Editor

Yanis Ricardo Espinosa Silva

Comité Editorial

Jaime Fernando Martinez Suarez
Zuly Yuliana Delgado Espinosa
Carlos Andrés Rodriguez Peña
Román David Castañeda Serrano
Jorge Eliecer Franco Rodriguez
Natalia Terán Acuña
Jaime Fernando Corena Parra

Soporte técnico

Sandra Lisbeth Castro Ariza
Wilfredo Jose Palencia Alvarado

Dirección web

<http://revistas.unipaz.edu.co/ojs/index.php/revcitecsa>

Correo electrónico: citecsa@unipaz.edu.co; revcitecsa@gmail.com

Dirección: Centro de investigaciones Santa Lucía Km 14 vía Bucaramanga vereda el Zarzal.
Barrancabermeja, Santander, Colombia.

Teléfonos: 057 - 6032701

Portal institucional: www.unipaz.edu.co

Periodicidad: Semestral

Diseño de Portada: Lizette Fernanda García Robles

Aspectos técnicos y económicos de la sustitución parcial de alimento comercial con morera (*Morus alba*) en la alimentación de cerdos de levante y ceba

Technical and economic aspects of the partial substitution of commercial food with morera (Morus alba) in the feeding of lifting and fattening pigs

Recibido 14 Junio 2018,
Aceptado 26 Agosto 2018

www.unipaz.edu.co

Miguel Alfonso Vergara Tamayo^{†a}, Gilliam Bravo Torres^b

Resumen: Aumentar la productividad para la consolidación económica de una empresa agropecuaria se convierte en un reto sobre todo cuando de eliminar las relaciones de dependencia con el mercado externo y el alimento comercial se trata, dado que son dos factores que representan altos costos especialmente para los pequeños y medianos productores. Para ello es necesario buscar nuevas fuentes de energía y proteína para la elaboración de alimentos. Es por ello que surge como una alternativa la suplementación con forraje de morera para alimentación de cerdos debido a sus características de adaptación, a diversos ecosistemas y su excelente valor nutricional por sus altos niveles de proteína y digestibilidad que lo hacen comparable a los valores de los concentrados comerciales. Por las razones anteriormente expuestas, se realiza una revisión de diferentes estudios científicos con el objetivo de describir y comparar aspectos técnicos y económicos de la sustitución parcial de alimento comercial con morera (*Morus alba*) en la alimentación de cerdos de levante y ceba. Demostrando que la inclusión de morera en la dieta de los cerdos representa una reducción en el costo promedio de la alimentación y su factibilidad técnica confirma que este producto es una alternativa para las explotaciones porcinas especialmente en etapa de crecimiento. **Palabras claves:** Morera, suplementación, cerdos, rentabilidad, análisis técnico-financiero.

Abstract: Increasing productivity for the economic consolidation of an agricultural enterprise becomes a challenge especially when eliminating dependency relations with the external market and commercial food, since these are two factors that represent high costs especially for small and medium producers. For this, it's necessary to look for new sources of energy and protein for food production. This is why supplementation with mulberry forage for feeding pigs is an alternative because of its adaptation characteristics, to diverse ecosystems and its excellent nutritional value due to its high levels of protein and digestibility that make it comparable to the values of commercial concentrates. For the reasons mentioned above, a review of different scientific studies is carried out with the aim of describing and comparing the technical and economic aspects in the partial supplementation of mulberry (*Morus alba*) in the feeding of lifting and fattening pigs. Demonstrating that the inclusion of mulberry in the diet of pigs represents a reduction in the average cost of feeding and its technical feasibility confirms that this product is an alternative for pig farms especially in the growth stage. **Key words:** Mulberry, supplementation, pigs, profitability, technical-financial analysis.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, Colombia cuenta con una población porcina de 5'327.460 animales¹. De allí que nuestro sector porcícola está aumentando día a día su oferta de porcinos, (...) “De acuerdo con los resultados del Sistema Nacional de Recaudo (SNR) de Porkcolombia - FNP, en el primer mes del año

se evidenció un crecimiento del orden del 9.9% en el nivel de beneficio frente al mismo mes de 2017, pasando de 319.455 cabezas (cb) a 350.975 cb respectivamente”².

Tal incremento en la producción porcina implica aumento en la demanda de alimentos balanceados, como granos, pastas o semillas de oleaginosas, los que son de importación y se incorporan en forma integral³. Generando la dependencia del mercado internacional y

^a. Escuela de M.V.Z, Instituto Universitario de la Paz

[†] miguel.vergara@unipaz.edu.co

^b. Universidad de Cundinamarca.

asimismo la necesidad de buscar e incorporar de manera estratégica recursos alternativos, para sustituir total o parcialmente las materias primas que tradicionalmente se emplean en la fabricación de alimentos balanceados⁴. Los cuales en la mayoría de los casos no se encuentran al alcance de “pequeños y medianos porcicultores... bien porque no se producen ó se producen en cantidades insuficientes. Por consiguiente, el disminuir la dependencia por el uso de materias primas de origen foráneo, reduciría los costos y permitiría a la mayoría de los porcicultores mantenerse en esta actividad productiva”⁵.

Teniendo en cuenta que en la alimentación de cerdos se debe garantizar una dieta apropiada que depende en gran forma de la asesoría de nutriólogos, para alcanzar un período máximo de 170 días, con un peso vivo de 90 a 105 kilogramos, a menos que cuente con líneas genéticas magras, el tiempo se reduce de 10 a 20 días; con una ganancia promedio diaria de peso que sea mayor a 600 gramos desde el nacimiento hasta el mercado, y la conversión alimenticia no sea mayor a 3. Generando dependencia de alimentos comerciales y altos costos en la producción⁶.

Para obtener eficiencia económica, en la producción debe proporcionar el cerdo una ración o dieta en la que se mezclen diferentes materias primas, que satisfagan sus requerimientos nutricionales. Por esta razón es importante el campesino o porcicultor conozca y domine algunas técnicas sobre balanceo de raciones para reducir en gran medida los costos de alimentación⁷.

Como una alternativa está la utilización de forrajes de morera que además de ser una excelente opción para el mejoramiento de suelos y como sistema agroforestal también se considera una estrategia viable en alimentación para especies menores⁸ como cerdos, dado que trae “consigo ventajas nutricionales y fisiológicas que favorecen el comportamiento porcino, y que la inclusión de follaje de morera en las dietas mejora el comportamiento de los indicadores productivos de los cerdos”⁹. Dado que su contenido nutricional se encuentra entre 15 y 25 % para la proteína bruta (N x 6.25), y 15 y 20 % para la fibra cruda, en una

biomasa que, en base fresca, puede contener entre 25 y 35 % de materia seca¹⁰.

Dentro de los principales problemas que afrontan los sistemas de producción basados en el confinamiento está el suministro de alimentos, tanto en cantidad como en calidad, así como también la utilización exclusiva de alimento balanceado elaborado a base de granos y pastas de oleaginosas; lo cual origina que los costos de producción se incrementen de manera considerable, motivo por el cual la correcta administración de este insumo se constituye como el pilar fundamental en la obtención de niveles rentables y óptimos de producción, particularmente en las explotaciones porcinas, el alimento balanceado representa del 70 al 80% de los costos de producción, por lo que una reducción en dichos costos resultaría de mayor utilidad para los productores¹¹. Considerando que de los costos de producción depende el éxito o fracaso de una granja porcícola¹². Haciendo necesario un análisis financiero con el fin de gestionar y maximizar el valor de la empresa¹³.

En el presente trabajo se realiza una revisión de diferentes estudios científicos con el objetivo de describir y comparar los aspectos técnicos y económicos en la suplementación parcial de morera (*Morus alba*) en alimento comercial “que por su adaptación al medio tropical, y el buen perfil nutricional, puede contrarrestar los costos de producción”¹⁴ en la alimentación de cerdos de levante y ceba, teniendo en cuenta que es en este periodo donde se “termina todo el complejo proceso de producción, es la etapa en la que los cerdos (...) manifiestan todo su potencial de crecimiento y de calidad de carne, y es donde se pone de manifiesto la implementación de un buen plan de alimentación”¹⁵ dicho estudio se basara en los resultados de los índices de ganancia de peso, conversión alimenticia y consumo de alimento, además del análisis económico que es determinar la viabilidad y factibilidad de dichas propuestas alimenticias¹⁶.

METODOLOGÍA

El presente trabajo se llevó a cabo partir de un estudio bibliográfico en el que se recopiló, analizo, sintetizo y se realizó una discusión en torno a la información publicada¹⁷ sobre los aspectos técnicos y económicos de la sustitución parcial de alimento comercial con morera (*Morus alba*) en la alimentación de cerdos de levante y ceba, a partir de la comparación de dicha información.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aumentar la productividad para la consolidación económica de una empresa agropecuaria se convierte en un reto sobre todo cuando de eliminar las relaciones de dependencia con el mercado externo y el alimento comercial se trata, dado que son dos factores que representan altos costos para dichas empresas. Para ello es necesario buscar nuevas fuentes de energía y proteína para la elaboración de alimentos. Como alimentos no convencionales que deberán ser analizados para descartar la presencia de sustancias antinutricionales o tóxicas y sus efectos sobre la calidad de la canal obtenida¹⁸.

“En toda explotación pecuaria la alimentación representa el mayor porcentaje en los costos de producción, y la calidad del alimento que se ofrece a los animales en toda sus etapas, influye directamente en el aspecto productivo y reproductivo en una crianza”¹⁹. Considerando la alimentación como un factor fundamental no sólo por el costo sino porque determina también el crecimiento del animal, estado de salud, reproducción y la calidad de la canal y la carne²⁰. Es necesario tener en cuenta los nutrimentos que deben recibir los cerdos en la dieta como proteínas, minerales, vitaminas y la energía. Unos se requieren en mayor o en mayor cantidad, sin embargo, todos son importantes y la falta de uno de ellos afectará los rendimientos productivos de los cerdos²¹.

Anteponiendo el hecho que existe un déficit de disponibilidad de fuentes tanto proteicas como de fibra convencionales en el trópico, pone en consideración el uso de los recursos arbóreos para

ser incluidos en las dietas de cerdos, por ser éstos abundantes en las dos fracciones alimentarias arriba mencionadas²². Gracias a los resultados obtenidos con la alimentación de gusano de seda, caracterizado por poseer un sistema digestivo relativamente simple, abre la posibilidad de usarse en como alimento para monogástricos, por lo menos como un ingrediente en su dieta²³.

“El follaje de la morera tiene un excelente valor nutricional debido a sus altos niveles de proteína (de 20 a 24%) y de digestibilidad (de 75 a 85%) que lo hacen comparable a los valores de los concentrados comerciales”²⁴. Teniendo en cuenta que posee muy bajos niveles de factores antinutrientes o ninguno, y así como ha sido domesticada siglos atrás abre las posibilidades de que la morera se convierta en uno de los árboles más adaptados para ser una fuente alimentaria muy útil para muchas especies animales monogástricos. Por otra parte, autores como Ly²⁵, Murgueitio²⁶, Benavides²⁷ y Sánchez²⁸, han señalado a la morera como una de las especies arbóreas aptas para ser incorporadas a la alimentación de cerdos. Lo cual ha generado en los últimos años diferentes estudios enfocados en la evaluación de factores técnico-financieros para su utilización en la alimentación de cerdos.

Entre tanto en Colombia como en países de Latinoamérica se han desarrollado estudios teniendo en cuenta los principales parámetros zootécnicos, buscando mayor productividad y mejor calidad, a menor costo²⁹. En los cuales se pretendió realizar un análisis técnico y económico adoptando como alternativa el uso de la morera (*Morus alba*). En 2010 Ordoñez³⁰ evalúa tres niveles de adición de *M. alba* en alimentación para cerdos de engorde, a través de su respuesta en ganancia de peso, conversión alimenticia, eficiencia alimenticia, factor de eficiencia europeo y relación costo beneficio de las dietas implementadas utilizando la metodología de presupuestos parciales. En 2012 el autor en mención³¹ evaluó los efectos sobre las variables técnicas y económicas en cerdos de levante con mezcla de balanceado comercial y forraje de morera. Posteriormente en 2013, evalúa el efecto

que se produce al suministrar a cerdos en la etapa de ceba una mezcla de balanceado comercial y *Morus alba*.

En cada uno de los estudios se adicionó el forraje de Morera en proporciones de 25, 30 y 35%. Además del tratamiento testigo con 100% de balanceado comercial. Así también en Latinoamérica encontramos autores como Osorto⁴, Cotino³² y Ly²⁰, los cuales realizaron estudios sobre las variables técnicas y económicas con diferentes porcentajes de sustitución de morera, en la alimentación de cerdos. A partir de las cuales se determina que las “características nutricionales, de producción de biomasa, versatilidad agronómica, palatabilidad, tolerancia a la sequía y disponibilidad mundial que posee la morera, en comparación con otros forrajes utilizados tradicionalmente, hacen de esta planta una opción importante” para la alimentación de porcinos³³.

Forraje de morera

A nivel mundial existe gran cantidad de información que corrobora que la morera es un árbol o arbusto de gran valor forrajero. Según informe del Servicio de Producción Animal (AGAP) del departamento de Agricultura de la FAO la morera (*Morus spp*) produce más elementos nutritivos digeribles que la mayoría de los forrajes tradicionales³⁴. La morera es un árbol o arbusto perteneciente al orden de las *Urticales*, familia *Moraceae* y género *Morus*, del cual se conocen más de 30 especies y alrededor de 300 variedades. Se propaga fácilmente, es de crecimiento rápido y responde a la poda periódica con rebrotes vigorosos³⁵.

Una de las especies más conocidas es la *Morus alba*, parece tener su origen al pie del Himalaya y a pesar de que su origen es de climas templados, ha demostrado capacidad de adaptación a diferentes climas y altitudes²². “Los rangos climáticos para su cultivo son: temperatura de 18 a 38 °C; precipitación de 600 a 2500 mm; fotoperiodo de 9 a 13 horas/día y humedad relativa de 65 a 80% (Ting-Zing et al., 1988). Se cultiva desde el nivel del

mar hasta 4000 m de altitud y se reproduce por semilla, estaca, acodo e injerto”³⁶. Este tipo de arbusto forrajero presenta características de adaptación a diversos ecosistemas y su fácil integración como cultivo a los sistemas de producción pecuaria³⁷. Ofreciendo innumerables perspectivas como solución biológica, práctica y económicamente viable para la alimentación animal⁴. De tal manera que “constituye una alternativa viable de alimentación en países tropicales pues facilita sustituir elementos de la dieta como el maíz y la soya los que encarecen el costo de las dietas”³⁸.

Aunque inicialmente el principal uso de “la morera (*Morus alba*) a nivel mundial ha sido como alimento del gusano de seda, a partir de la década de los ochenta en América Central comenzó a evaluarse su potencial forrajero y se recomendó su uso en la alimentación de monogástricos.”¹⁰ Pues representa excelente valor nutricional debido sus altos niveles de proteína (de 20 a 24%) y digestibilidad (de 75 a 85%) que lo hacen comparable a los valores de los concentrados comerciales²². “Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estas fuentes no convencionales en general poseen altas concentraciones de fibra y los tejidos ricos en nitrógeno están ligados a compuestos antinutricionales, por lo que deben emplearse con precaución en las dietas destinadas a monogástricos.”⁴ Debido a sus variables y características nutritivas es posible utilizar su follaje, fresco o en harina, para reemplazar fuentes de proteína convencional en dietas de cerdos³. De manera que el follaje de la morera es utilizado como un forraje de alta calidad, considerada igual o superior a la de los concentrados comerciales³⁹.

De acuerdo a las formas de utilización de la morera en la alimentación animal, una forma sencilla es estableciendo un sistema silvopastoril, donde el animal cosecha su alimento y la consume a libre acceso. Otra forma de utilización de la morera es en concentrado, como complemento o como un ingrediente activo. Como complemento se debe deshidratar y moler la hoja de morera hasta obtener una fina harina adicionando a los animales de la misma forma que con otros complementos

comerciales⁴⁰. Sirve para suplir las necesidades de conservación de forraje durante las épocas de penuria nutricional⁴¹.

Análisis técnico

La conversión alimenticia es un indicador de producción muy importante en la producción tecnificada de cerdos y determinante en la evaluación técnica y económica de la granja porcina. Es la relación que se da entre el consumo de alimento y la ganancia de peso que tiene los cerdos en un periodo de tiempo determinado pudiendo ser dicho período semanal, mensual, anual, por etapas etc⁴². La ganancia de peso “Se refiere a la totalidad de kilos de peso ganados por un animal durante el período de levante y ceba”⁴³. El consumo de alimento es el factor más crítico que afecta los rendimientos productivos⁴⁴ de los cerdos.

Ganancia de peso en cerdos en etapa de engorde

Estudios realizados con cerdos en etapa de engorde arrojaron los siguientes resultados en la variable de ganancia de peso. Para empezar Ordoñez²⁸, encontró que dicha variable no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes tratamientos; en el tratamiento testigo se obtuvo en promedio la mayor ganancia de peso con 746,5 g/día. Con el tratamiento con adición de morera al 25%, se logró una ganancia promedio de 707 g/día. En el tratamiento con adición del 30% de morera, los cerdos obtuvieron una ganancia de peso promedio de 702 g/día, y finalmente, el tratamiento con adición del 35% de morera, fue con el que se obtuvo la menor ganancia de peso promedio con 649 g/día.

En estudios posteriores realizados por el mismo investigador, el análisis de varianza de esta variable presentó diferencias altamente significativas ($p > 0,01$) entre el tratamiento testigo con la mayor media de ganancia de peso, mientras la menor se obtuvo en el tratamiento con 35% de follaje verde de Morera, razón por la cual se

realizó la prueba de Tukey con la que se pudo identificar que es posible que esta diferencia se deba al aumento en el consumo de fibra en la dieta porque el tránsito del alimento se hace más rápido, ocasionando que el tiempo del alimento en el tracto gastrointestinal sea menos de lo normal, lo que evita que se aprovechen los nutrientes necesarios del alimento²⁷. Sumado a los resultados de otras investigaciones que demostraron de igual manera que “la diferencia en el incremento total del peso vivo durante la ceba fue mínima, 2,43 kg/cerdo... con una tendencia a la superioridad en el grupo que consumió solo concentrado, en relación con el grupo experimental”³⁰ tendencia que reafirma Ly²⁰, que también adiciono follaje en la dieta de los cerdos en ceba con resultados similares.

Ganancia de peso en cerdos en etapa de levante

De acuerdo a los resultados obtenidos por Ordoñez y Benavides²⁹, esta etapa en los índices de ganancia de peso no se encontró diferencias estadísticas altamente significativas ($p \leq 0,01$) entre los tratamientos. Sin embargo, las mejores ganancias de peso se obtuvieron en el tratamiento con adición del 30% de Morera con una ganancia de peso promedio por animal de 671 gr/día, mientras que el tratamiento con adición de 35% de morera fue el de menor ganancia de peso promedio por animal con 609 gr/día, es conveniente referir que los grupos con adición de morera estuvieron por encima de los alcanzados por el grupo testigo, y también con los alcanzados por Contino¹⁰ donde los mejores niveles de uso se encontraron al 25% (636 gr/día) y 30% (671 gr/día). De tal manera es preciso indicar que un nivel óptimo de uso de la morera puede estar alrededor del 30%²⁹. Sin embargo, vale señalar los resultados que obtuvo Osorto³ con la mayor ganancia de peso en la adición de 15% de morera, cabe aclarar que en su experimento trabajo con adiciones de 5%, 10% y 15%.

Conversión alimenticia en cerdos en etapa de engorde

Estudios desarrollados en países de Latinoamérica como Cuba, con adición de morera en porcentajes de 5%, 10% y 15%, además del tratamiento testigo, indican que la dieta o tratamiento más favorables para el índice de conversión alimenticia es la adición de 15% con (1,58), seguida de las adiciones de 5% y 10% con resultados similares 1,83 y 1,70 respectivamente y por último la dieta o tratamiento testigo con los valores más altos de la conversión alimenticia (2,23)³ a diferencia de estudios posteriores realizados en Colombia, en tiempo de la investigación los tratamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Se evidencio en el tratamiento con adición del 30% de morera, el mejor comportamiento productivo 2,43 comparado con el tratamiento con adición del 25% de morera, con (2,48), siendo los índices de conversión alimenticia más altos los datos de 2,64 y 2,61 para el tratamiento con adición del 35% y testigo respectivamente. Los valores son aceptables como parámetros productivos²⁸. Mientras que nuevas investigaciones con resultados donde los valores de los cuatro tratamientos aplicados fueron muy similares. No se encontraron diferencias significativas, los valores para el tratamiento testigo, el tratamiento con adición de 35% de morera y el tratamiento con adición de 30% de morera, presentaron el mismo índice de conversión alimenticia (2,9), siendo el tratamiento con adición de 25% de morera el que presentó el mejor valor (2,8)²⁷. El índice de conversión alimenticia en cerdos en etapa de engorde de los diferentes estudios muestra evidente disparidad en los resultados.

Conversión alimenticia en cerdos en etapa de levante

El análisis de varianza no detectó diferencias estadísticas altamente significativas ($p \leq 0.01$) los valores de índice de conversión alimenticia se ubicaron entre 2,2 y 2,5 donde el mejor índice de conversión alimenticia se obtuvo para niveles de

uso de 30% de morera (2,2) y de acuerdo al contraste realizado por Ordoñez y Benavides²⁹, con otros estudios similares. Esta variable parece no coincidir porque mientras¹⁰, para niveles de uso del 27 al 30% de morera, encontró conversiones de 1,71 para el tratamiento testigo y 1,94 para el grupo experimental; la conversión más baja (2,4) suministrando hojas frescas de morera ad libitum. Esto parece indicar el nivel óptimo para el uso de la morera en la alimentación de cerdos en levante, puede ser ubicado alrededor del 30%²⁹. A diferencia de los resultados obtenidos por Osorto³, que indican que la mejor conversión alimentaria ($P < 0.05$) se observó en los cerdos alimentados con 15 % de morera.

Consumo de alimento en cerdos en etapa de engorde

Las dietas convencionales con diferentes niveles de adición 25%, 30% y 35% de morera (*M. alba*) no afecta el comportamiento de consumo de alimento balanceado, ya que los animales en todos los tratamientos consumieron el alimento por encima del valor recomendado (189,3 kg por periodo). El testigo consumió 218,6 kg, al 25% de adición de morera (*M. alba*) consumió, 197,88 kg, en el 30% de adición su consumo fue de 193,2 kg y al 35% de adición el consumo total de alimento balanceado por cerdo fue de 187,2 kg²⁸.

En estudios posteriores también se determinó que la adición de la morera a las dietas convencionales no afectó el consumo de alimento balanceado comercial, ya que los animales en todos los tratamientos consumieron la cantidad de alimento suministrada. En contraste con la investigación de Domínguez⁴⁵ donde se evidencia que al suministrar hojas frescas de morera a los cerdos, el consumo voluntario de alimento balanceado comercial se vio afectado negativamente, resultados similares a los obtenidos por Osorto³ donde las restricción de alimento convencional, complementado con la adición de morera fresca picada ad libitum, no representa una alternativa en la alimentación de cerdos de engorde, debido a

que el consumo total de alimento es similar y se extiende el tiempo de engorde³.

Consumo de alimento en cerdos en etapa de levante

En cuanto al consumo de alimento en cerdos en etapa de levante estudios determinaron que la mezcla de morera con las dietas convencionales no afectaron el consumo de alimento balanceado comercial, ya que los animales en todos los tratamientos consumieron la cantidad de alimento suministrada²⁹. Mientras que Trigueros y Villalta⁴⁶ indicaron que entre cero 0 y 20% de harina de

morera en la ración existía aparentemente una respuesta curvilínea evidente en el consumo voluntario de alimento en cerdos en crecimiento, con un deterioro importante en otros rasgos de comportamiento cuando la morera constituía un 20% de la dieta. Lo cual podría deberse a la baja palatabilidad que se puede considerar determinante en el consumo de alimento⁴⁷ y además podría llegar a causar afectaciones para la conversión alimenticia y la ganancia de peso.

Tabla 1: Aspectos técnicos de la sustitución parcial de alimento comercial con morera (*Morus alba*) en la alimentación de cerdos de levante y ceba.

	ETAPAS		AUTORES	
		(Osorto, et al., 2007)	(Ordoñez y Benavides, 2012)	
Ganancia de peso	Levante o crecimiento	Se realizó el estudio con adiciones de 5, 10 y 15% con la mayor ganancia en la adición de 15%.	30%:671 gr/día 25%: 636 gr/día T: 612 gr/día 35%: 609 gr/día	
		(Contino, et al., 2008)	(Ordoñez, 2010)	(Ordoñez y Hernández, 2013)
	Ceba o engorde	T: 636 gr/día 27 y 30%:623 gr/día	T: 746,5 g/día 25%: 707g/día 30%: 702 g/día 35%: 649 g/día	T: 44,97 Kg/Periodo 25%: 39,02 Kg/ Periodo 30%: 36,71 Kg/ Periodo 35%: 34,35 Kg/ Periodo
Conversión alimenticia	Levante o crecimiento	15%: 1,58 10%: 1,70 5%: 1,83 T: 2,23	T: 1,71 27 al 30%: 1,94	30%: 2,2 25%: 2,3 35%: 2,4 T: 2,4
		(Osorto, et al., 2007)	(Ordoñez, 2010)	(Ordoñez y Hernández, 2013)
	Ceba o engorde	15%: 1,58 5%: 1,83 10%: 1,70 T: < 15, 5 y 10 %	30%: 2,43 25%: 2,48 T: 2,61 35%: 2,64	25%: 2,8 30 y 35%: 2,9
Consumo de alimento	Levante o crecimiento	(Trigueros y Villalta, 1997) T: 229,56 Kg/Periodo 6%: 232,31 Kg/Periodo 12%: 235,72 Kg/Periodo 18%: 228,01 Kg/Periodo 24%: 234,55 Kg/Periodo	(Ordoñez y Benavides, 2012) Todos los animales en todos los tratamientos consumieron la cantidad de alimento suministrado *	
		(Dominguez, 2007)	(Osorto, et al., 2007)	(Ordoñez, 2010)
	Ceba o engorde	Las adiciones de morera disminuyeron el consumo de alimento en todos los tratamientos *	T: 2,23 Kg/día 5%: 1,23 Kg/día 10%: 1,10 Kg/día 15%: 1,16 Kg/día	T: 218,6 kg/Periodo 25%: 197,88 kg/Periodo 30%:193,2 kg/Periodo 35%:187,2 kg/Periodo

Fuente: Adaptado por Miguel Vergara y Gilliam Bravo, 2018.

* Los autores de estas investigaciones no proporcionan los valores de consumo de alimento.

Análisis económico

En cuanto a la viabilidad en términos económicos de diferentes estudios con cerdos en etapa de engorde con adición de follaje de morera en las dietas experimentales, se observa que a mayor porcentaje de adición es menor el costo de alimentación. Con el 30 y 35% de adición, se generó una reducción de costo de un 21,8 y 14,3% respectivamente contra el tratamiento testigo y la inclusión del 25% una reducción del 12,3% en el costo de producción²⁸. Sin embargo, en estudios posteriores en la misma etapa, el margen de utilidad favoreció al tratamiento testigo (alimento balanceado comercial) con un 18.38%, al igual que en la relación Beneficio/Costo que favoreció al tratamiento testigo (alimento balanceado comercial) con un 1,23 y la utilidad neta por animal U.N.A presentó mayor ganancia en el tratamiento testigo (alimento balanceado comercial) con \$83.480. Ordoñez y Hernández²⁷, confirmando los hallazgos que señalan que la restricción de alimento convencional, complementado con morera fresca picada ad libitum, no representa una alternativa en la alimentación de cerdos de engorde, ya que el consumo total de alimento es similar y se alarga el tiempo de engorde³.

En la etapa de levante, en investigaciones recientes al comparar los costos totales de todos los tratamientos, se observa que, excepto el grupo testigo, los mayores egresos quedaron asignados al grupo experimental con el cual se usó el nivel del 35% de morera. Corroborando que el nivel óptimo de uso de este forraje puede ubicarse cerca al 30% que fue el nivel que mejores resultados determinó²⁹. En el tratamiento con adición de 30% de morera, "con respecto al tratamiento testigo fue donde se obtuvo las mejores variables económicas utilidad neta efectiva (U.N.E), margen de utilidad (M.U) con 5,11, relación beneficio/costo (B/C) con valores de 1,05, venta de animal V.V/A, consumo de alimento (C/A), utilidad neta por animal (U.N.A) y factor de eficiencia europea (FEEP)."²⁹

De acuerdo a los resultados mencionados la inclusión de morera en la dieta de los cerdos

representa una reducción en el costo promedio de la alimentación y su factibilidad técnica confirma que este producto es una alternativa para las explotaciones porcinas³ corroborando de tal manera que la rentabilidad en una explotación porcina no solamente se debe a factores genéticos, sino también a factores nutricionales y ambientales⁴⁸. Teniendo en cuenta que alimentación representa la mayor parte de los recursos en la producción animal, su eficiencia y costos económicos determinan el éxito de la producción porcina⁴⁹.

CONCLUSIONES

El comportamiento de la variable de ganancia de peso en cerdos en etapa de ceba no fue muy favorable, debido a que los resultados de los diferentes estudios evidenciaron que los diferentes porcentajes de sustitución de morera se encontraron por debajo de los valores de los tratamientos testigos y el incremento total del peso vivo durante la ceba fue mínimo.

En cerdos en etapa de crecimiento la variable de ganancia de peso mostro que un nivel óptimo de uso de la morera puede estar alrededor del 30% de adición.

En la variable de conversión alimenticia de cerdos en etapa de engorde los diferentes estudios muestran resultados dispares con los mejores valores de conversión alimenticia en las proporciones de adición del 15 al 30%. Para cerdos en etapa de levante, tal parece indicar que el nivel óptimo para el uso de la morera en la alimentación, puede ser ubicado alrededor del 30% de adición.

El índice de consumo de alimento para cerdos en ceba no muestra resultados representativos de tal manera que no representa una alternativa en la alimentación de cerdos de engorde, debido a que el consumo total de alimento es similar y se extiende el tiempo de engorde al igual que en los cerdos en etapa de crecimiento.

En términos económicos los resultados que muestran mejor viabilidad se encuentran en

las proporciones de adición de 30% de morera. La inclusión de morera en la dieta de los cerdos representa una reducción en el costo de la alimentación y su factibilidad técnica confirma su productividad como una alternativa para la producción porcina, especialmente en etapa de crecimiento.

Finalmente es evidente que la morera puede ser considerada como un recurso alimentario de gran utilidad para los medianos y pequeños productores. Lo cual sugiere que se continúe investigando y poniendo en práctica los resultados que se obtienen para incrementar la eficiencia de los sistemas de producción porcina mediante la integración del componente arbóreo, como un subsistema imprescindible⁵⁰.

REFERENCIAS

1. ICA (2017). Censo Pecuario Nacional 2017. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/Areas/Pecuaría/Servicios/Epidemiología-eterinaria/Censos-2016/Censo-2017.aspx>
2. Asociación PorkColombia. (2018). Fondo Nacional de la Porcicultura. Boletín Económico, Febrero del 2018. https://asociados.porkcolombia.co/porcicultores/images/porcicultores/informes/2018/Boletin%20Feb_2018.pdf
3. Osorto, W. A., Lara, P. E., Magaña, M. A., Sierra, A. C., & Sanginés, J. R. (2007). Morera (*Morus alba*) fresca o en forma de harina en la alimentación de cerdos en crecimiento y engorde. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 41(1).
4. González, C. (2007). Alimentación alternativa de cerdos en Venezuela. In Conferencia en Instituto de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, El Limón, Maracay, Venezuela.
5. González, D & González, C. (2004). Jugo de caña y follajes arbóreos en la alimentación no convencional del cerdo. *Revista computadorizada de producción porcina*, 11(3).
6. Benítez-Meza, A., Gómez-Gurrola, A., Hernández-Ballesteros, J., Navarrete-Méndez, R., & Moreno-Flores, L. (2015). Evaluación de parámetros productivos y económicos en la alimentación de porcinos en engorda. *Abanico veterinario*, 5(3), 36-41.
7. Carrero, H. (2005). Manual de producción porcícola. Ministerio de protección social. Servicio Nacional de Aprendizaje SENA. *Centro Latinoamericano. México. Pág, 113.*
8. Morales, I, (2014) Experiencia sobre el uso de plantas forrajeras en la alimentación de cerdos. *Boletín Camino al Desarrollo. Boletín FUNDESYRAM*, edición N° 44.
9. Estupiñán, K., & Vasco, D. (2009). Evaluación de Harina de Forraje de Morera (*Morus alba*) en un Sistema de Levante–Ceba de Porcinos en Confinamiento. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 22(1).
10. Ly, J. (2014). Utilización del follaje de morera en la alimentación del ganado porcino en sistemas integrados tropicales. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(1).
11. Contino, Y., Ojeda, F., Herrera, R., Altunaga, N., Pérez, G., & Moliner, J. L. (2008). Comportamiento productivo de cerdos en ceba alimentados con follaje fresco de *Morus alba* como sustituto parcial del concentrado. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 9(8), 1-9.
12. Bobadilla-Soto, E. E., Rebollar-Rebollar, S., Rouco-Yáñez, A., & Martínez-Castañeda, F. E. (2013). Determinación de costos de producción en granjas productoras de lechón. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 17(32).
13. Prieto Hurtado, C. A. (2010). Análisis financiero. Bogotá DC:
14. Casamachin, M. L., Lopez, F. J., & Ortiz, D. (2015). Evaluación de tres niveles de inclusión de morera (*Morus alba*) en alimento para pollos de engorde. *INGRESAR A LA REVISTA*, 5(2), 64-71. P 64
15. Fundación. Producción de Pequeños Rumiantes y Cerdos – FCV – UNNE <https://ppryc.files.wordpress.com/2012/06/desarrollo-y-engorde.pdf>
16. Pérez, Herrera, Contino, Altunaga, Hernández, Reyes, Iglesias, Saucedo. (2011) Empleo de dos arbustivas forrajeras proteicas y el sorghum bicolor como complemento de la ración en la preceba y ceba de porcinos
17. Bruguera, M. C., Alonso, G. D., & Martínez, A. G. D. (1996). CENTRO NACIONAL DE INFORMACION DE CIENCIAS MÉDICAS. *Resumed*, 9(2), 86-96.

18. Campagna, A. M. D. Alimentación. Requerimientos Nutricionales y Aportes Alimenticios.
19. Huahuarunta Noriega, J. (2015). Determinación del valor nutritivo de la morera (*Morus alba*) a los 45 y 60 días de rebrote para su uso en la alimentación animal. P 8
20. Bhat P, Mohan N and Deo S, (2010) Pig Production, Global Media, Delhi, India.
21. Campabadal, C. (2009). Guía técnica para alimentación de cerdos. Costa Rica: Asociación Americana de Soya-IM.
22. Ly, J. (2005). Uso del follaje de árboles tropicales en la alimentación porcina. Pastos y Forrajes, 28
23. Castro, A, Y., Orozco, E. (2011) Cultivo de morera (*morus spp*) y su uso en la alimentación animal. INTA Costa Rica. Sector Agro Alimentario.
24. Benavides, J. (1995). Manejo y utilización de la morera (*Morus alba*) como forraje.
25. Ly, J, (2004), Árboles tropicales para alimentar cerdos. Ventajas y desventajas, Instituto de Investigaciones Porcinas, Gaveta Postal No. 1, Punta Brava, La Habana, Cuba.
26. Murgueitio, E., Rosales, M. y Gómez, M.E. (1999). Agroforestería para la Producción Animal Sostenible. Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria. Cali, 67.
27. Benavides, J.E. (1999). Utilización de la morera en sistemas de producción animal. In: Agroforestería para la Producción Animal en América Latina (M.D. Sánchez y M. Rosales, editores). Estudios FAO de Producción y Sanidad Animal No. 143. Roma, p 275-281.
28. Sánchez, M.D. (1999). Comentarios generales. In: Agroforestería para la Producción Animal en América Latina (M.D. Sánchez y M. Rosales, editores). Estudios FAO de Producción y Sanidad Animal No. 143. Roma, p 363-365
29. Ordoñez Hermes & Hernández Aura Cristina. (2013) Efecto de una mezcla de balanceado comercial y Morera (*Morus alba*) en diferentes proporciones en los indicadores técnicos y económicos de cerdos en ceba. REVISTA CITECSA, vol. 3, no 5, p. 19-31
30. Ordoñez. (2010). Evaluación técnica y económica de tres niveles de adición de morera (*Morus alba*) en alimento para cerdos. *Revista Citecsa*, 1(1), 19-26.
31. Ordoñez, Hermes & Benavides, Fabio. (2012) Evaluación de variables técnicas-económicas en cerdos en levante alimentados con mezcla de balanceado comercial y forraje de Morera en diferentes proporciones. REVISTA CITECSA, vol. 3, no 4, p. 4-18.
32. Contino, Y. (2007). Estudio de la inclusión del follaje fresco de *Morus alba* Linn. Var. Acorazonada en dietas porcinas (Doctoral dissertation, Tesis presentada en opción al título académico de Máster en Pastos y Forrajes. EEPF «Indio Hatuey». Matanzas, Cuba).
33. Monter, J. V. (2009). Tecnologías alimenticias a base de morera (*Morus spp.*) en los sistemas de producción animal. Tópicos Selectos de sericultura, 41.
34. Manterola, A. H. (2000). La morera, una interesante alternativa forrajera para la ganadería mayor y menor en Chile.
35. Boschini, C., Dormond, H., & Castro, A. (1998). Producción de biomasa de la morera (*Morus alba*) en la meseta central de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 9, 31-40.
36. Boschini, C. (2003). Sustitución de alimento concentrado, con morera fresca (*Morus alba*), en la dieta de vacas lecheras. *Agronomía Mesoamericana*, 14(2).
37. Pérez, Y., & García, J. (2017) Efecto de la inclusión de 20% de harina de Morera (*Morus alba*) o Moringa (*Moringa oleífera*) en la dieta sobre los rasgos de comportamiento, calidad de la canal y la carne de cerdos cebados de 40 a 85 kg de peso.
38. Maza, A. V., Viveros, F. M. L., & Muhammad, E. (2012). Uso de morera (*Morus alba*) en sistemas de agricultura de conservación (AC): una propuesta agroforestal para el estado de Hidalgo. TÓPICOS SELECTOS DE SERICULTURA, 2009, 57.
39. Leyva, (2012) Morigicultura Manual Para la Producción y Utilización forrajera. Reporte del servicio social. Departamento de enseñanza, investigación y servicio en zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Disponible en: <http://zootecnia.chapingo.mx/assets/ftmorigicultura.pdf>
40. González, J. G. (1996). Evaluación de la calidad nutricional de la morera fresca y ensilada con bovinos de engorde (Doctoral dissertation, Tesis MSc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. 65p).
41. Castellanos, E, (2017) Conversión alimenticia en la granja porcina. Más Porcicultura.

42. Morales González, A. V. (2010). Evaluación del bienestar animal en porcinos de levante y ceba en dos explotaciones en Cundinamarca.
43. Solórzano, R. (2005) Alimentación básica del cerdo. Vademécum Avícola. Edifarm
44. Domínguez, H.A. La morera (*Morus alba*) en la alimentación de los cerdos en crecimiento. En: Revista computarizada de producción porcina. 2007. Vol. 14, no 1
45. Trigueros, R. O., & Villalta, P. (1997). Evaluación del uso de follaje deshidratado de morera (*Morus alba*) en alimentación de cerdos de la raza Landrace en etapa de engorde. En: Resultados de Investigación, CENTA, El Salvador p150-155.
46. Solà-Oriol, D., Torrallardona, D., & Pérez, F. J. (2012). Influencia de la percepción sensorial sobre el consumo voluntario en lechones: palatabilidad de las materias primas en piensos de iniciación. *XVIII Cuso de especialización FEDNA*.
47. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (México) Universidad Nacional Autónoma de México (México) Swiss College of Agriculture (Switzerland) y Coordinado por la FAO. (2002) Reporte de la Iniciativa de la Ganadería, el Medio Ambiente y el Desarrollo (LEAD) - Integración por Zonas de la Ganadería y de la Agricultura Especializadas (AWI) - Opciones para el Manejo de Efluentes de Granjas Porcícolas de la Zona Centro de México.
48. Germán, C. G., Camacho, J. C., & Gallegos, J. (2005). Producción de Cerdos, manual del participante. *Secretaría de la Reforma Agraria. Colegio de Postgraduados. Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencia Agrícolas*.
49. Cué Brugueras, Manuel, Díaz Alonso, Guillermo, Díaz Martínez, Ana Gloria, & Valdés Abreu, Manuela de la C. (2008). El artículo de revisión. Digestibilidad y comportamiento de cerdos de preceba alimentados con harina de morera. [cd-rom]. V Taller Internacional Silvopastoril y I Reunión Regional de Morera. EEPF "Indio Hatuey". *Revista Cubana de Salud Pública*, 34(4). Matanzas, Cuba.
50. Ly, J. (2014). Utilización del follaje de morera en la alimentación del ganado porcino en sistemas integrados tropicales. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(1).

Una breve aproximación a las características de los materiales orgánicos empleados como semiconductores en dispositivos electrónicos

An approach to the characteristics of the organic materials used as semiconductors in electronic devices

Recibido 1 Septiembre 2018,
 Aceptado 20 Octubre 2018

www.unipaz.edu.co

J. F. Martínez Suárez^{†a}

Resumen: En este trabajo se realiza una breve descripción de las características de los materiales orgánicos empleados como semiconductores en dispositivos electrónicos. La electrónica orgánica es una tecnología emergente y fascinante que será aplicada en dispositivos novedosos y competitivos en un futuro cercano. Aun son varios los retos que existen para llegar a tal fin, por ejemplo, se requiere alcanzar valores de movilidad electrónica mayores con materiales estables bajo condiciones atmosféricas reales (humedad, temperatura y resistentes a la oxidación). Por otro lado, se espera que con materiales altamente solubles la técnica de impresión convencional se convierta en una forma de procesamiento eficaz para obtener circuitos flexibles. **Palabras claves:** materiales orgánicos, semiconductores, dispositivos electrónicos.

Abstract: In this work, a brief description of the characteristics of the organic materials used as semiconductors in electronic devices is made. Organic electronics is an emerging and fascinating technology that will be applied to innovative and competitive devices in the near future. There are still several challenges to reach this end, for example, it is required to achieve higher electronic mobility values with stable materials under real atmospheric conditions (humidity, temperature, and resistance to oxidation). On the other hand, it is expected that with highly soluble materials the conventional printing technique will become an efficient way of processing to obtain flexible circuits. **Key words:** organic materials, semiconductors, electronic devices.

Muchas de las actividades cotidianas implica el uso de dispositivos electrónicos (Ejemplo: Celulares, computadoras, etc.). En las últimas décadas, los componentes de los dispositivos electrónicos se han basado en semiconductores inorgánicos y, en particular, en silicio^{1,2}. Sin embargo, debido a las limitaciones tecnológicas del silicio, actualmente se está dedicando un gran esfuerzo científico al desarrollo de la electrónica molecular^{3,4}. Los dispositivos electrónicos orgánicos ofrecen propiedades muy interesantes como son flexibilidad, bajo peso, sintonizabilidad química, procesabilidad, bajo costo y bio-compatibilidad⁵⁻¹¹. Por estos motivos, existe un gran interés en explotar las tecnologías a escala molecular que eventualmente podrían reemplazar a los dispositivos de silicio. Sin embargo, la utilización

de moléculas orgánicas en electrónica posiblemente no sustituirá completamente a los circuitos de silicio cristalino de alta densidad y velocidad, sí que se usará para algunas aplicaciones donde ahora se utilizan chips de silicio amorfo (por ejemplo en células solares y pantallas electrónicas) y, además, dará lugar a una gran variedad de nuevos usos y aplicaciones^{12,13}.

Las moléculas orgánicas y los polímeros que tienen un sistema conjugado (Figura 1), presentan enlaces covalentes dobles/triples y sencillos de forma alternada que permiten la deslocalización de electrones a través de la estructura molecular, permitiendo el transporte de cargas eléctricas y la interacción de manera eficiente con la luz¹⁴.

^a INIFTA, CONICET, 1900. La Plata-Argentina.

[†] fer18400@inifta.unlp.edu.ar

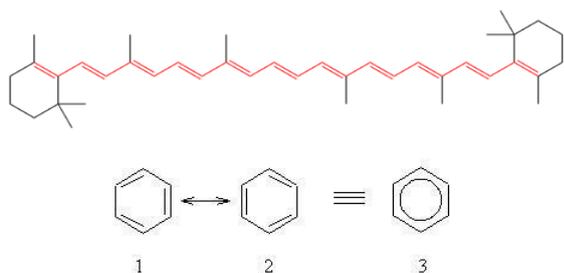


Fig. 1: Ejemplos de sistemas conjugados

Estas moléculas son principalmente heterociclos o cadenas aromáticas y representan la familia de polímeros, oligómeros, sales o complejos orgánicos conductores y/o semiconductores (Figura 2).

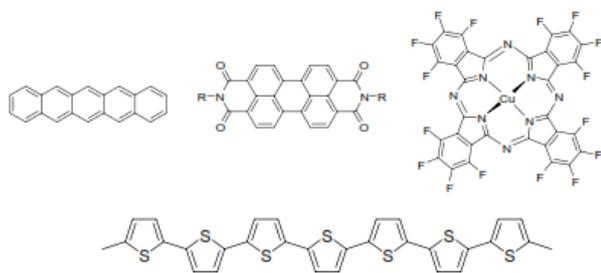


Fig. 2: Ejemplos de semiconductores orgánicos

Los dispositivos electrónicos para el desarrollo de materiales orgánicos conductores y semiconductores son los transistores de efecto de campo (*OFETs*), los dispositivos emisores de luz (*OLEDs*), las celdas solares (*OPVs*) y los sensores. Entre algunos de los ejemplos de aplicaciones en circuitos integrados de bajo costo con estos dispositivos se tiene: pantallas flexibles a base de *OLEDs*, papel electrónico, tarjetas inteligentes e identificadores de radio frecuencia¹⁵⁻²⁰.

Clasificación

Los semiconductores orgánicos, dependiendo del tamaño de la molécula que constituye la capa semiconductor se puede distinguir entre polímeros (y copolímeros) y moléculas pequeñas (Figura 3). Los sistemas conjugados presentan ventajas en el contexto de la electrónica molecular, la extensión del sistema conjugado favorece el transporte de carga a través de la deslocalización intramolecular o intermoleculares

de los electrones o huecos, por este motivo la investigación abarca moléculas relativamente pequeñas hasta estructuras poliméricas que presenten esta característica estructural. Ambos materiales tienen ventajas e inconvenientes dependiendo de sus características.

Los materiales poliméricos son moléculas grandes, o macromoléculas, compuestas de muchas subunidades repetidas (monómeros), que presentan un restringido desorden por estar unidas mediante enlaces covalentes. La deslocalización de carga se encuentra favorecida por su extensa estructura conjugada. Sin embargo, la poli-dispersidad de los materiales poliméricos debido a los métodos de síntesis es un serio inconveniente. El material polimérico muy frecuentemente no presenta idéntica composición debido a la mezcla de compuestos que lo constituyen, lo cual dificulta la reproducibilidad y el posterior empleo en dispositivos electrónicos. Además, algunos polímeros presentan una menor movilidad de carga con respecto a moléculas de menor tamaño, esto se debe a la baja cristalinidad y defectos en las cadenas. Por otro lado, su elevado peso molecular facilita la formación de películas finas al aplicarlos en disolución, a modo de tintas, lo cual representa un menor costo en la producción de dispositivos.

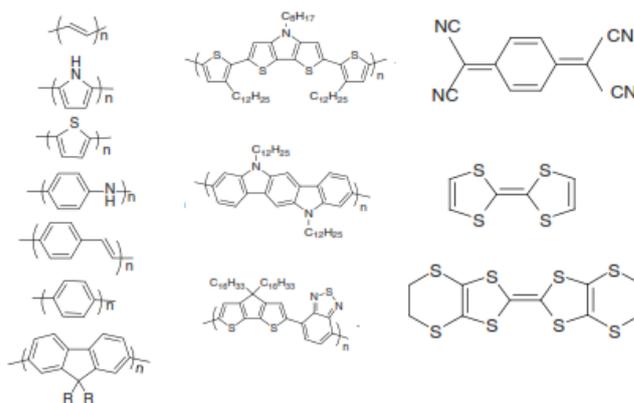


Fig. 3: Ejemplos de polímeros (y copolímeros) y moléculas pequeñas

La estructura conjugada de las moléculas pequeñas se encuentra constituida por anillos aromáticos o hetero-aromáticos que se

encuentran unidos a través de enlaces sencillos, dobles, o fusionados para formar sistemas policíclicos. La reproducibilidad de sus propiedades se puede garantizar debido a la metodología de síntesis, esto permite obtener un compuesto de pureza y composición conocida.

El procesamiento se puede realizar por película fina en solución o por sublimación a alto vacío, debido al bajo peso molecular. La formación de películas finas en solución permite un menor costo en la producción de dispositivos electrónicos. Por otro lado, las películas delgadas formadas a partir de sublimación de alto vacío permiten la obtención de *films* más ordenados en estado sólido, favoreciendo el transporte de carga.

Dependiendo del tipo de portador se tiende a denominar a los semiconductores transportadores de electrones (tipo-n) y semiconductores transportadores de huecos (tipo-p), por analogía con la terminología procedente de los materiales inorgánicos. Los semiconductores orgánicos transportadores electrones (Figura 4), deben tener un orbital molecular no ocupado de más baja energía (*LUMO*) que corresponda energéticamente con la función trabajo del electrodo de Ag o Al (cátodo), generalmente baja, y con los materiales adyacentes. Las moléculas orgánicas con altos valores del orbital *LUMO* presentan poca estabilidad frente a condiciones ambientales, tales como oxígeno o vapor de agua, conduciendo a la formación de trampas, esto se debe a la reacción entre portador de carga negativa y el agente ambiental. Por otro lado, los semiconductores orgánicos transportadores de huecos (Figura 4) deben tener una energía del orbital molecular ocupado de más energía (*HOMO*) bien alineada con la función de trabajo del electrodo (ánodo) y con los otros materiales empleados en la fabricación del dispositivo electrónico. El Óxido de Indio-Estaño (*ITO*) es un electrodo comúnmente empleado como ánodo, con función trabajo de aproximadamente 4.7 eV. La mayoría de los semiconductores orgánicos pertenecen a este grupo.

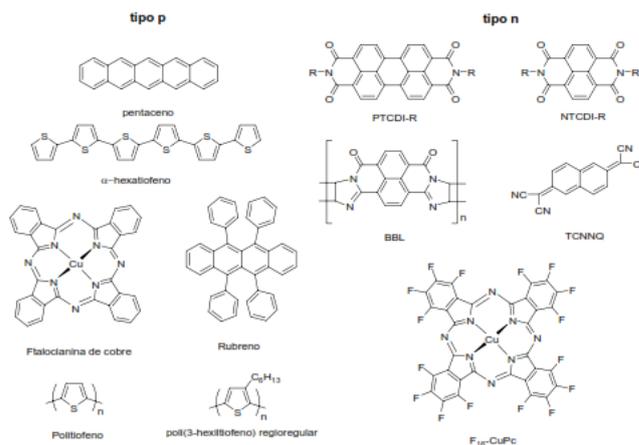


Fig. 4: Ejemplos de semiconductores orgánicos tipo p y n.

Requerimientos generales de los materiales semiconductores

Las características principales que deben cumplir los semiconductores orgánicos para ser implementados en dispositivos electrónicos se dividen en dos grupos, propiedades necesarias²¹⁻²⁴ y propiedades deseables²⁵⁻³².

Dentro de las propiedades necesarias podemos destacar:

- Moléculas π -conjugadas con bajo potencial de oxidación para el caso de semiconductores tipo p o con alta afinidad electrónica para semiconductores tipo n. Los sistemas π -conjugadas proporcionan orbitales *HOMO* y *LUMO* energéticamente accesibles para el transporte eléctrico. Además, permiten una deslocalización intramolecular eficiente de la carga y facilitan la cesión o transporte entre moléculas al maximizar el solapamiento espacial de la carga deslocalizada con los estados electrónicos de una molécula adyacente. En los materiales tipo p es necesario además un potencial de ionización bajo, en torno a 5 eV, para facilitar la inyección de carga positiva (huecos) desde los electrodos metálicos al *HOMO*. Por el contrario, en materiales semiconductores tipo n, es la afinidad electrónica la que debe ser suficientemente alta, de forma que permita la inyección eficiente de electrones en el *LUMO*.

Esta afinidad electrónica tiene un límite superior de 3-4 eV por problemas de estabilidad ambiental.

- Solapamiento electrónico intermolecular de los orbitales *HOMO* o *LUMO* de moléculas adyacentes. Esto depende del tipo de interacción entre las moléculas del semiconductor, del tamaño de las mismas, de la simetría molecular y de la estructura del cristal.
- Buena formación de películas delgadas. Para conseguir un transporte de carga eficaz se requiere una lámina semiconductor continua, ordenada y compacta. Se obtienen buenas movilidades en láminas policristalinas altamente orientadas, en las que las direcciones de transporte en los granos son paralelas a la superficie del dieléctrico.
- La pureza química del semiconductor. Las impurezas son sitios de atrapamiento y eliminación de carga móvil en las láminas del semiconductor.
- Estabilidad frente al O₂ y H₂O del ambiente.

Dentro de las propiedades deseables cabe destacar las siguientes:

- Buena solubilidad. Existen modificaciones a la cadena conjugada que pueden mejorar la solubilidad. Sin embargo, es necesario analizar el efecto de la modificación evitando provocar cambios perjudiciales en el empaquetamiento del cristal y como consecuencia, en las propiedades de la lámina semiconductor.
- Baja densidad de vacantes, lo que se consigue mediante la optimización de la cristalinidad de la película delgada. Por esta razón, es muy importante controlar la calidad morfológica de la película generada sobre la superficie del dieléctrico en caso de un *OFET*.
- Contactos óhmicos o fenómenos de resistencia a la inyección de carga, asociados a la diferencia de energía entre el *LUMO* del semiconductor y el nivel de Fermi del metal para materiales tipo n y entre el *HOMO* del semiconductor y el nivel de Fermi del metal para materiales tipo p.

CONCLUSIONES

En los últimos años, muchos aspectos de la investigación en electrónica orgánica han progresado, y el ritmo del progreso ha continuado acelerándose. Los nuevos enfoques de materiales, dispositivos y fabricación continúan apareciendo en la bibliografía. En este sentido, Las empresas, universidades e institutos de todos los tamaños están involucradas en diversos aspectos de la investigación y dedican muchos esfuerzos para ampliar nuestra comprensión del campo de la electrónica orgánica.

REFERENCIAS

1. Garlapati SK, Divya M, Breitung B, Kruk R, Hahn H, Dasgupta S. Printed Electronics Based on Inorganic Semiconductors: From Processes and Materials to Devices. *Adv Mater.* 2018;1707600:1707600. [doi:10.1002/adma.201707600](https://doi.org/10.1002/adma.201707600)
2. Yu KJ, Yan Z, Han M, Rogers JA. Inorganic semiconducting materials for flexible and stretchable electronics. *npj Flex Electron.* 2017;1(4):1-14. [doi:10.1038/s41528-017-0003-z](https://doi.org/10.1038/s41528-017-0003-z)
3. Xiang D, Wang X, Jia C, Lee T, Guo X. Molecular-Scale Electronics: From Concept to Function. *Chem Rev.* 2016;116(7):4318-4440. [doi:10.1021/acs.chemrev.5b00680](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00680)
4. Mas-torrent M, Rovira C. Transistores de efecto de campo basados en moléculas orgánicas (OFETs). *An Quím.* 2009;105(1):18-24.
5. Zheng G, Cui Y, Karabulut E, Wågberg L, Zhu H, Hu L. Nanostructured paper for flexible energy and electronic devices. *MRS Bull.* 2013;38(4):320-325. [doi:10.1557/mrs.2013.59](https://doi.org/10.1557/mrs.2013.59)
6. Kaltenbrunner M, White MS, Głowacki ED, et al. Ultrathin and lightweight organic solar cells with high flexibility. *Nat Commun.* 2012;3. [doi:10.1038/ncomms1772](https://doi.org/10.1038/ncomms1772)
7. Henson ZB, Müllen K, Bazan GC. Design strategies for organic semiconductors beyond the molecular formula. *Nat Chem.* 2012;4(9):699-704. [doi:10.1038/nchem.1422](https://doi.org/10.1038/nchem.1422)
8. Irimia-Vladu M, Głowacki ED, Voss G, Bauer S, Sariciftci NS. Green and biodegradable electronics. *Mater Today.* 2012;15(7-8):340-346. [doi:10.1016/S1369-7021\(12\)70139-6](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(12)70139-6)
9. Brenner TM, Egger DA, Kronik L, Hodes G, Cahen D. Hybrid organic - Inorganic perovskites: Low-cost semiconductors with intriguing charge-transport properties. *Nat Rev Mater.* 2016;1(1). [doi:10.1038/natrevmats.2015.7](https://doi.org/10.1038/natrevmats.2015.7)

10. Irimia-Vladu M. "Green" electronics: Biodegradable and biocompatible materials and devices for sustainable future. *Chem Soc Rev.* 2014;43(2):588-610. [doi:10.1039/c3cs60235d](https://doi.org/10.1039/c3cs60235d)
11. Ruiz C, García-Frutos EM, Hennrich G, Gómez-Lor B. Organic Semiconductors toward Electronic Devices: High Mobility and Easy Processability. *J Phys Chem Lett.* 2012;3(11):1428-1436. [doi:10.1021/jz300251u](https://doi.org/10.1021/jz300251u)
12. Ahmad S. Organic semiconductors for device applications: Current trends and future prospects. *J Polym Eng.* 2014;34(4):279-338. [doi:10.1515/polyeng-2013-0267](https://doi.org/10.1515/polyeng-2013-0267)
13. Mishra A, Bäuerle P. Small molecule organic semiconductors on the move: Promises for future solar energy technology. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51(9):2020-2067. [doi:10.1002/anie.201102326](https://doi.org/10.1002/anie.201102326)
14. Murry JM. *Química Orgánica*. 8th ed. Cengage Learning; 2012.
15. Swist A, SOŁODUCHO J. Organic semiconductors – materials of the future? *Chemik.* 2012;66(4):293-296.
16. Liu J, Zhang H, Dong H, et al. High mobility emissive organic semiconductor. *Nat Commun.* 2015;6(May):1-8. [doi:10.1038/ncomms10032](https://doi.org/10.1038/ncomms10032)
17. Wager JF, Keszler DA, Presley RE. *Transparent Electronics*. 1st ed. Springer US; 2008.
18. Chamorro Posada P, Martín Gil J, Pablo MR, Navas Gracia LM. *Fundamentos de La Tecnología Oled*. Mata Digital; 2008.
19. Tsujimura T. *OLED Display Fundamentals and Applications*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc.; 2017.
20. Logothetidis S, ed. *Handbook of Flexible Organic Electronics. Materials, Manufacturing and Applications*. 1st ed. Woodhead Publishing; 2015.
21. Facchetti A. Semiconductors for organic transistors. *Mater Res.* 2007;10(3):28-37. [doi:10.1146/annurev.ms.08.080178.000531](https://doi.org/10.1146/annurev.ms.08.080178.000531)
22. Costa JCS, Taveira RJS, Lima CFRAC, Mendes A, Santos LMNBF. Optical band gaps of organic semiconductor materials. *Opt Mater (Amst).* 2016;58:51-60. [doi:10.1016/j.optmat.2016.03.041](https://doi.org/10.1016/j.optmat.2016.03.041)
23. Anthony JE, Facchetti A, Heeney M, Marder SR, Zhan X. N-Type organic semiconductors in organic electronics. *Adv Mater.* 2010;22(34):3876-3892. [doi:10.1002/adma.200903628](https://doi.org/10.1002/adma.200903628)
24. Katz HE, Lovinger AJ, Johnson J, et al. A soluble and air-stable organic semiconductor with high electron mobility. *Nature.* 2000;404(6777):478-481. [doi:10.1038/35006603](https://doi.org/10.1038/35006603)
25. Afzali A, Dimitrakopoulos CD, Breen TL. High-performance, solution-processed organic thin film transistors from a novel pentacene precursor. *J Am Chem Soc.* 2002;124(30):8812-8813. [doi:10.1021/ja0266621](https://doi.org/10.1021/ja0266621)
26. Pramanik C, Li Y, Singh A, et al. Water soluble pentacene. *J Mater Chem C.* 2013;1(11):2193-2201. [doi:10.1039/c3tc00278k](https://doi.org/10.1039/c3tc00278k)
27. Bai X, Zong K, Ly J, et al. Orientation Control of Solution-Processed Organic Semiconductor Crystals to Improve Out-of-Plane Charge Mobility. *Chem Mater.* 2017;29(17):7571-7578. [doi:10.1021/acs.chemmater.7b02771](https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.7b02771)
28. Diao Y, Shaw L, Bao Z, Mannsfeld SCB. Morphology control strategies for solution-processed organic semiconductor thin films. *Energy Environ Sci.* 2014;7(7):2145-2159. [doi:10.1039/C4EE00688G](https://doi.org/10.1039/C4EE00688G)
29. Jiang BY, Vegiraju S, Chiang AST, Chen MC, Liu CL. Low-voltage-driven organic phototransistors based on a solution-processed organic semiconductor channel and high: K hybrid gate dielectric. *J Mater Chem C.* 2017;5(38):9838-9842. [doi:10.1039/c7tc03455e](https://doi.org/10.1039/c7tc03455e)
30. Zorai S, Bourguiga R. Contact Resistance in Organic Thin Film Transistors: Application to Octithiophene (8T). *Int J Mod Phys Appl.* 2015;1(4):131-138.
31. Roh J, Lee T, Kang CM, et al. Injection-modulated polarity conversion by charge carrier density control via a self-assembled monolayer for all-solution-processed organic field-effect transistors. *Sci Rep.* 2017;7(December 2016):1-8. [doi:10.1038/srep46365](https://doi.org/10.1038/srep46365)
32. Wehenkel DJ, Koster LJA, Wienk MM, Janssen RAJ. Influence of injected charge carriers on photocurrents in polymer solar cells. *Phys Rev B.* 2012;85(125203):1-12. [doi:10.1103/PhysRevB.85.125203](https://doi.org/10.1103/PhysRevB.85.125203)

Un vistazo biofísico-funcional a los sistemas redox tiorredoxina y glutaredoxina

A biophysical-functional glance to the thioredoxin and glutaredoxin redox systems

Diego S. Vazquez ^{†a}

Recibido 17 Septiembre 2018,
 Aceptado 1 Noviembre 2018

www.unipaz.edu.co

Resumen: En este artículo de revisión discutimos aspectos centrales sobre las proteínas que componen al sistema tiorredoxina (TRX). En primera instancia se contextualiza al sistema TRX en el marco del balance redox celular y su relación con el estrés oxidativo. Posteriormente ahondamos en aspectos biofísicos y funcionales de las proteínas componentes del sistema utilizando las proteínas de *Escherichia coli* como sistema modelo, que son la tiorredoxina reductasa, la tiorredoxina y las peroxirredoxinas, una de las proteínas *target* del sistema TRX. Además introducimos brevemente a las glutaredoxinas como el otro sistema proteico implicado en la mantención del balance redox celular. **Palabras claves:** balance redox, estrés oxidativo, dinámica proteica e interacción proteína-proteína.

Abstract: In this review, we discuss central aspects of the thioredoxin system (TRX). First, the TRX system is contextualized within the framework of the cellular redox balance and its relationship with oxidative stress. Later we delve into the biophysical and functional aspects of the components of the TRX system using the *Escherichia coli* proteins as a model, such as thioredoxin reductase, thioredoxin and peroxiredoxin as one of the target proteins. We also briefly introduce the glutaredoxin system as the other protein system involved in the maintenance of cellular redox balance. **Keywords:** redox balance, oxidative stress, protein dynamics, and protein-protein interaction.

EL DESTINO CELULAR: BALANCE REDOX Y ESTRÉS OXIDATIVO

En un trabajo pionero en el campo de la bioquímica de proteínas realizado a fines de los años '60s, McCord y Fridovich relacionaron por primera vez la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) de eritrocitos bovinos – enzima que cataliza en presencia de Cu^{2+} , la dismutación del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) – con diversos procesos de detoxificación celular de especies reactivas¹. Este hecho fue el puntapié inicial para el surgimiento de numerosas investigaciones sobre los denominados *radicales libres* y *metabolitos reactivos no-radicalarios* derivados del oxígeno (ROS, de *reactive oxygen species*) como el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, y del nitrógeno² (RNS, de *reactive nitrogen species*) como el óxido nítrico (NO^{\cdot}) y el

peroxinitrito ($\text{ONOO}^{\cdot-}$), este último considerado uno de los más potentes oxidantes biológicos³.

Estudios realizados a comienzos del 1900 por Moses Gomberg en reacciones químicas sobre compuestos inorgánicos de halogenuros de trifenilmetano sobre iones metálicos⁴ y posteriormente por Paneth y Hofeditz en la producción del radical metilo⁵, demostraron fehacientemente la existencia de los radicales libres y, más importante aún, que otras reacciones químicas de origen orgánico podrían involucrar un intermediario radicalar. Los radicales libres suelen generarse en pasos intermedios de ciertas reacciones químicas y se caracterizan por tener un electrón desapareado, otorgándole una alta inestabilidad y reactividad química^{6,7}. Además poseen un tiempo de vida media muy corto que oscila en el orden de los pocos milisegundos.

El radical superóxido, como muchos otros radicales libres, es un producto de la respiración aeróbica celular y, en eucariotas, la mitocondria es la principal fuente de ROS⁸. Tanto ROS como RNS son fisiológicamente necesarios y a la vez

^aLaboratorio de Expresión y Plegado de Proteínas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Saenz Peña 352 (1876), Buenos Aires, Argentina.

†dsvazquez86@gmail.com

potencialmente destructivos⁹. Niveles bajos o moderados de estas especies químicas desempeñan roles específicos en la modulación de diversos procesos celulares como transducción de señales, proliferación celular y expresión de genes. Por el contrario, altos niveles de ROS/RNS pueden causar daños irreversibles a diversas biomoléculas esenciales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos¹⁰, lo que posiblemente lleve a la muerte celular¹¹. El desbalance óxido-reductor celular producto de concentraciones anormales de especies reactivas es lo que se conoce como **estrés oxidativo** y está vinculado con diversas patologías humanas como cáncer^{12,13}, enfermedades neurodegenerativas¹⁴ y diabetes^{15,16}.

Durante muchos años, el H₂O₂ fue vinculado de manera casi exclusiva al daño oxidativo en células¹⁷. Sin embargo, hoy en día existen numerosas evidencias que indican que el H₂O₂ producido es parte esencial de los complejos sistemas de señalización celular y media importantes procesos como la proliferación, diferenciación y migración celular. Para contribuir con la homeostasis celular y evitar el estrés oxidativo, diversas maquinarias celulares han evolucionado para contrarrestar los efectos nocivos de especies reactivas, tanto de origen proteico como la SOD, las hidropoxidases, la tiorredoxina reductasa, la tiorredoxina, las glutaredoxinas, la catalasa, y las peroxirredoxinas; y no proteico, como el ácido ascórbico, flavonoides, α -tocoferol, y el glutatión (GSH, γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), este último un tripéptido no proteico con un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo del glutamato que lo protege de la degradación por aminopeptidasas^{18,19}.

ROL DEL SISTEMA TIORREDOXINA EN EL BALANCE REDOX CELULAR

El sistema tiorredoxina (TRX) es el principal sistema molecular en la célula con actividad disulfuro reductasa²⁰. Su rol es proveer equivalentes de electrones para un número importante de enzimas *target*, y está involucrado de manera directa o indirecta en la síntesis de

ADN, defensa contra el daño oxidativo, el correcto plegado de proteínas *in vivo*, el proceso carcinogénico y manifestación del fenotipo invasivo de diferentes tipos de cánceres, entre otros importantes roles fisiológicos.

En la mayoría de los organismos, el sistema TRX está compuesto por la tiorredoxina reductasa (TR), una flavoproteína dependiente de NADPH y la propiamente tiorredoxina (TRX), una óxido-reductasa dependiente de cisteína la cual es reducida por TR (Figura 1). La TRX en su estado reducido biológicamente activo funciona como agente reductor de numerosas proteínas *target*, entre ellas una muy importante son las peroxirredoxinas (PRDXs) las cuales describiremos en detalle en las siguientes secciones.

En el interior celular el ambiente redox es principalmente reductor gracias a la presencia del GSH el cual está presente en una concentración aproximada de 5 mM, tanto en células bacterianas como de mamíferos, donde más del 99% se encuentra en su forma reducida gracias a la acción de una proteína constitutiva denominada glutatión-disulfuro reductasa²¹. De todas maneras, las células necesitan de sistemas reductores específicos y altamente eficientes y uno de ellos involucra a las TRX. El nombre *tiorredoxina* fue introducido en 1964 por Peter Reichard por ser el sustrato reductor de la ribonucleótido reductasa, enzima esencial en la síntesis *de novo* de 2'-desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos. Las TRX son proteínas ubicuas y se expresan en todas las formas de vida conocidas, desde arqueas hasta mamíferos y plantas y cumplen un enorme repertorio de roles fisiológicos intracelulares tales como el ya mencionado control del estrés oxidativo, protección de la agregación oxidativa y regulación de la muerte celular programada (apoptosis) mediante mecanismos de desnitrosilación. Además, poseen actividad chaperona al promover el correcto plegado de proteínas mediante el intercambio tiol/disulfuro y juegan un rol importante en el ciclo infectivo de algunos virus y fagos. Las TRX tienen además actividades extracelulares, una muy importante es la activación de canales transientes de potencial

químico dependientes de cationes los cuales actúan putativamente como sensores químicos celulares. En las siguientes secciones describiremos más en detalle cada una de las proteínas de la vía TRX.

Además introduciremos a otro miembro importante en el balance redox celular como son las glutaredoxinas.

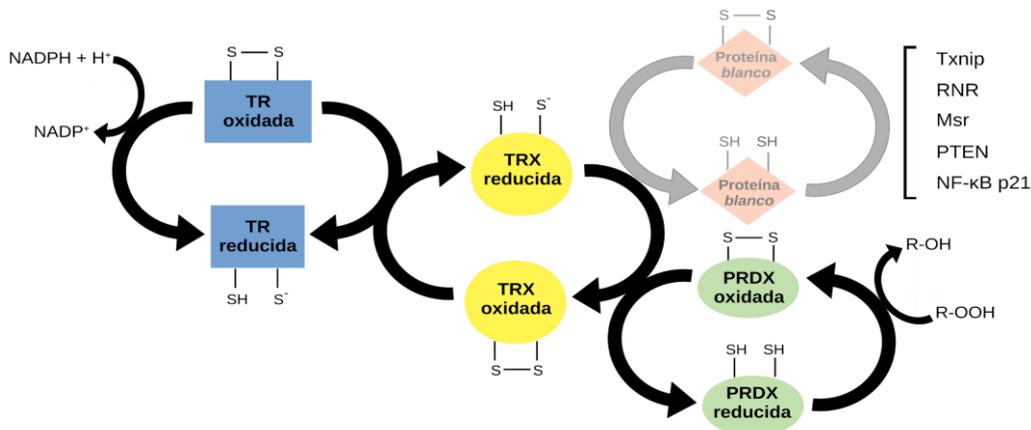


Fig. 1: Esquema del flujo de electrones de la vía tiorredoxina. La tiorredoxina (TRX) reduce proteínas oxidadas (e.g. PRDXs) utilizando equivalentes de electrones provenientes del NADPH a través de la tiorredoxina reductasa (TR). Algunos otros ejemplos de proteínas *target* de la TRX son las proteínas interactuantes con TRX (Txnip), la ribonucleótido reductasa (RNR), la metionina sulfóxido reductasa (Msr), ciertas fosfatasas (PTEN) y el factor de transcripción NF-κB, entre otras.

EL EXTREMO REDUCTOR DE LA VÍA TRX: LA TIORREDOXINA REDUCTASA

Las TRs son flavoproteínas homodiméricas dependientes de flavin adenín dinucleótido (FAD) las cuales utilizan además nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como donador de electrones y pertenecen a la familia de las piridina nucleótido-disulfuro óxido-reductasas²².

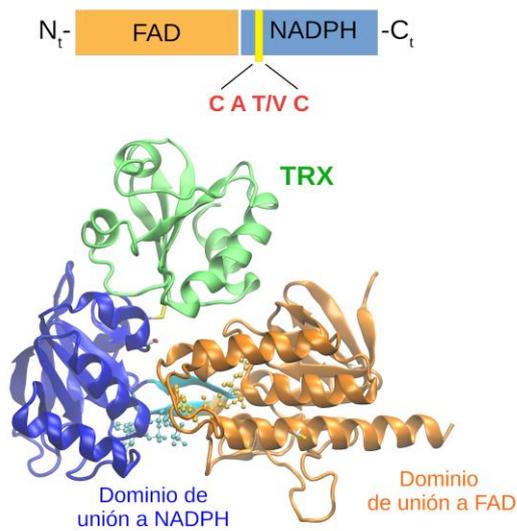
Estructuralmente, las TRs se clasifican en dos grupos: de bajo peso molecular (*low-Mr*, ~35 kDa por subunidad) y de alto peso molecular (*high-Mr*, >55 kDa por subunidad). Si bien la principal función de ambos grupos es reducir a la tiorredoxina, tanto la estructura, el sitio activo como el mecanismo de reducción son bien distintos. Las TR de bajo peso molecular se encuentran en arqueas, bacterias, hongos y plantas y contienen dos dominios globulares conocidos como dominio de unión al cofactor FAD y dominio de unión a la coenzima NADPH²². Estos dominios globulares se encuentran conectados por dos hebras beta antiparalelas (Figura 2). El sitio

activo, contenido en el dominio de unión a NADPH, incluye al motivo CxxC, ampliamente distribuido y presente en numerosas enzimas con actividad redox, incluyendo las tiorredoxinas²². Por otro lado, las TR de alto peso molecular se encuentran principalmente en mamíferos²³ y son dependientes de selenocisteína de forma obligada²⁴ ya que mutaciones de selenocisteína (U o Sec) por cisteína dan como resultado una proteína disfuncional²⁵.

LA TIORREDOXINA COMO CENTRO DE DISTRIBUCIÓN DE EQUIVALENTES REDOX

Recientemente, el grupo del Dr. J. M. Sánchez-Ruiz de la Universidad de Granada y colaboradores lograron reconstruir mediante la construcción de árboles filogenéticos de secuencias actuales de más de 200 tiorredoxinas, secuencias de nodos precámbricos de los linajes *bacteria*, *arquea* y *eucariota* que datan de entre 1 y 4 mil millones de años atrás²⁶.

TR de bajo peso molecular



TR de alto peso molecular

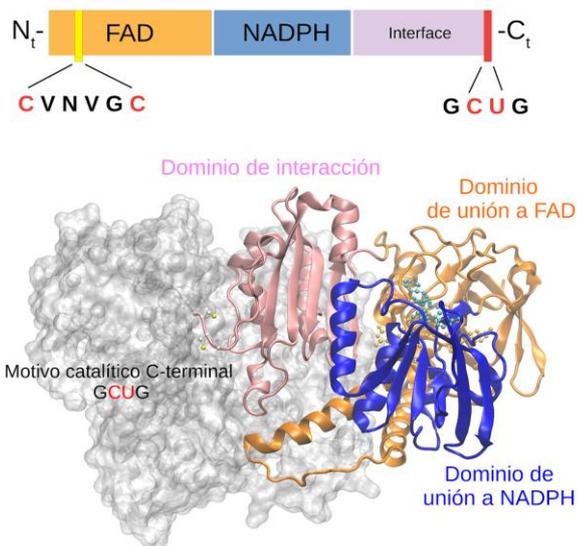


Fig. 2: Estructura de TR de bajo y alto peso molecular. Estructura de una TR de bajo peso molecular bacteriana (*E. coli*, PDB ID 1F6M, arriba) y una alto peso molecular de mamífero (Rata parda, PDB ID 1H6V, abajo) donde los dominios de unión a FAD y NADPH están marcados en naranja y azul, respectivamente. Adicionalmente se muestra el dominio denominado interfase (rosa) en las TR de alto peso molecular involucrado en el proceso de dimerización. Además, se muestra la localización secuencial de los residuos del sitio activo en ambos tipos de TR.

Sorprendentemente las proteínas ancestrales “resucitadas” en el laboratorio mostraron una

mayor temperatura media de desplegamiento (T_m) con un incremento cercano a los 32 °C en relación a la TRX silvestre moderna de *E. coli*. Más aún, las TRXs más antiguas en el árbol filogenético mostraron una actividad marcadamente superior con respecto a las actuales a pH 5 y similares a los obtenidos para las TRXs actuales a pH neutro. Estos resultados son compatibles con las condiciones geológicas tempranas (altas temperaturas y océanos ácidos) de la historia de la Tierra²⁷. Las estructuras tridimensionales de las TRXs con secuencias precámbricas comparten el plegado prototípico TRX lo cual sugiere fuertemente que tanto el plegado como la actividad óxido-reductasa surgieron tempranamente y con éxito en la historia evolutiva y fue adaptándose progresivamente a las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas (fuerza iónica, temperatura, presión, etc.) que se conocen de los organismos actuales^{26,28}.

Las TRXs son óxido-reductasas pequeñas de alrededor de 100-110 residuos de aminoácidos con una topología α/β característica que consiste en un núcleo β rodeado de hélices α (Figura 3 panel A). En particular, *E. coli* posee dos tiorredoxinas denominadas TRX1, la cual denominaremos *EcTRX* a lo largo de este trabajo, y TRX2 que están codificadas por los genes *trxA* y *trxC*, respectivamente²⁹. *EcTRX* es la isoforma más utilizada históricamente en estudios biofísicos y enzimáticos. Experimentos realizados por diversos grupos indican que, tanto en experimentos de desplegamiento inducido por agentes caotrópicos o por temperatura, *EcTRX* es una proteína altamente estable³⁰ con una energía libre de desplegamiento (ΔG_{NU}^0) de $\sim 8 \text{ kcal mol}^{-1}$ en su estado oxidado y una T_m de $\sim 88 \text{ }^\circ\text{C}$, lo cual la convierte en una proteína mesófila con cierto carácter termófilo a nivel de estabilidad termodinámica. En su estado reducido, las TRXs suelen mostrar en general una menor estabilidad termodinámica³¹ respecto al estado oxidado, que en el caso particular de la *EcTRX* es de $\sim 3 \text{ kcal mol}^{-1}$. Además, la constante cinética de desplegamiento de la *EcTRX* silvestre en su estado oxidado extrapolada a cero concentración de desnaturante es de 9.5×10^{-8} lo cual da

tiempo de vida medio de aproximadamente cuatro meses, indicando que *EcTRX* es también una proteína cinéticamente estable.

EcTRX parece ser un proceso complejo, incluyendo fases correspondientes a isomerizaciones *cis/trans* de prolinas y particularmente una fase muy rápida que podría deberse al colapso hidrofóbico del núcleo β de la proteína. Si bien diversos trabajos han caracterizado al desplegamiento cinético mediante una única fase correspondiente al desplegamiento global de la proteína^{32,33}, existe un intermediario de alta energía en experimentos cinéticos solo identificable a altas concentraciones de cloruro de guanidinio³⁰, un agente caotrópico fuerte comúnmente utilizado en protocolos biofísicos. En este sentido, Hamid Wani y Udgaonkar detectaron mediante experimentos en equilibrio y cinéticos, la presencia de un intermediario estable y parcialmente desestructurado en la ruta de desplegamiento a pH ácido³⁴. Sin embargo, este intermediario es indetectable en condiciones neutras de pH, por lo que los autores sugieren que el intermediario es lo suficientemente inestable para poblarse significativamente y ser detectable, y por ello, el proceso de desplegamiento puede caracterizarse mediante un modelo de dos estados en equilibrio y cinético a pH neutro³⁴.

Importantes estudios han sido realizados en la comprensión del rol que juega la hélice C-terminal (CTH, ver Figura 3) en el correcto plegado y funcionalidad de las TRXs. Santos y colaboradores^{35,36} desarrollaron un sistema de complementación entre la CTH y el módulo comprendido por los residuos 1-93 (TRX1-93) de la *EcTRX*. Estos sistemas han arrojado evidencias claras sobre la importancia de la CTH en la consolidación del ensamblaje nativo y la funcionalidad enzimática de la *EcTRX*. Además se demostró que la construcción carente de la región 94-108 (módulo TRX1-93) posee alteraciones estructurales significativas las cuales anulan su actividad catalítica³⁵. Un efecto similar fue observado en TraF, una proteína esencial para el correcto ensamblaje del pilus-F bacteriano, donde la delección de la hélice C-terminal en la variante TraF Δ_4 podría conducir a la desestabilización global de la proteína incluso en la interacción con otras proteínas como TraH³⁷.

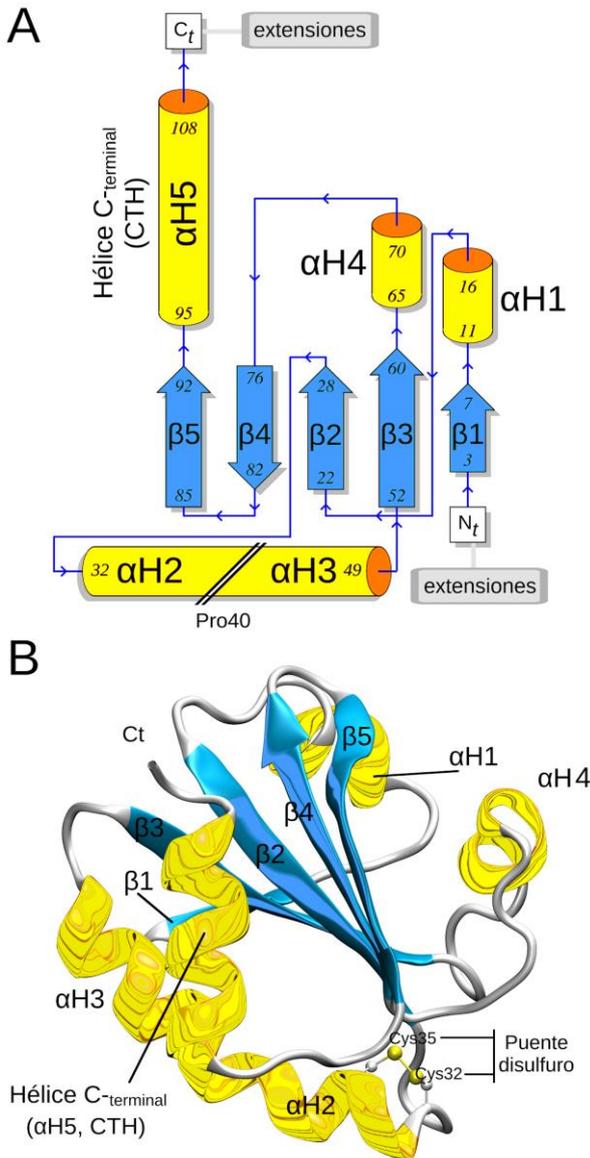


Fig. 3: Topología de la *EcTRX*. Diagrama de la topología 2D (panel A) y estructura tridimensional (panel B) de la *EcTRX* basada en el PDB ID 2TRX. Además se muestran las cisteínas Cys32 y Cys35 responsables de la actividad oxidoreductasa en CPK.

En el equilibrio, *EcTRX* se comporta como una proteína de dos estados N-U donde únicamente coexisten los estados nativo y desplegado. Desde el punto de vista cinético, el replegado *in vitro* de

Hace ya 50 años, Arne Holmgren determinó por primera vez la secuencia primaria completa de la *EcTRX*³⁸ y desde entonces se convirtió en una proteína modelo de estudios biofísicos como mecanismos de plegado, actividad enzimática, estabilidad termodinámica y cinética, interacción proteína-proteína y dinámica proteica. A mediados de los '70s, la primer estructura tridimensional de la variante silvestre de *EcTRX* fue resuelta por cristalografía de rayos X en su estado oxidado a 2.8 Å de resolución³⁹, hecho que permitió establecer las primeras relaciones funcionales con la estructura tridimensional. Casi veinte años más tarde, Katti y colaboradores⁴⁰ resolvieron la estructura de la *EcTRX* a 1.68 Å de resolución. En ese mismo tiempo, la estructura fue elucidada también por resonancia magnética nuclear (RMN) en los estados reducido y oxidado⁴¹ lo que permitió por primera vez el análisis de los cambios conformacionales y dinámicos que acompañan al estado de oxidación de la proteína⁴².

Si bien en términos generales, *EcTRX* presenta una estructura considerablemente rígida, existen diferencias en su dinámica interna en diferentes escalas temporales. En los pico- y nanosegundos se observan movimientos significativos de (I) ambos extremos N- y C-terminales, (II) los residuos 20-22 que conectan la hélice α H1 con la segunda hebra β

y (III) los residuos 73-75/93-94 que se localizan cerca del sitio activo en la estructura tridimensional. Por el contrario, sólo en el estado reducido, la región 73-75 muestra una dinámica mayor en los micro- y milisegundos en experimentos de relajación de ¹³C-RMN, lo cual puede ser asociado con un rol funcional⁴³.

Mecanísticamente, la actividad catalítica óxido-reductasa de las TRXs (Figura 4) implica en primera instancia el acercamiento y unión a una proteína *target* estableciendo una red de interacciones entre ambas cadenas principales que alteran el microambiente y la energética del puente disulfuro de la proteína *target*²⁰. Los mecanismos de la catálisis de *EcTRX* y otras TRXs representativas de los diferentes reinos de la vida han sido estudiados recientemente en detalle a nivel de molécula única utilizando espectroscopía de tipo *force-clamp*⁴⁴. Las TRXs procariontas utilizan un par redox ditiol/disulfuro involucrado en reacciones de 2-electrones con los *targets* oxidante (e.g. PRDXs) y reductor (TR, ver Figura 1). Este proceso es llevado a cabo por dos mecanismos diferentes: por medio de una sustitución nucleofílica bimolecular de tipo SN₂ o mediante una reacción de transferencia de 1-electrón tal como ocurre en las TRX eucariotas⁴⁴.

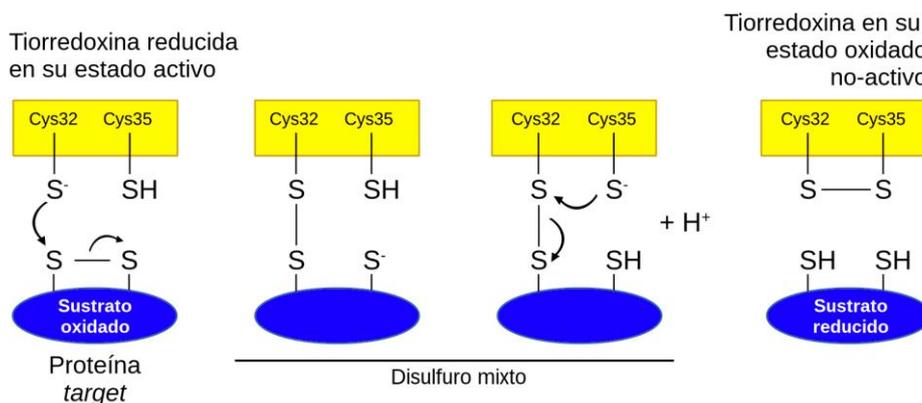


Fig. 4: Mecanismo de reducción de sustratos por TRX. La reacción involucra la reducción de un enlace R-S-S-R de una proteína *target* de TRX, llevando en última instancia a la formación de un puente disulfuro entre las cisteínas catalíticas Cys32 y Cys35. *Adaptado de Vazquez et al. 2015.*

En *EcTRX*, la secuencia –Cys₃₂GPCys₃₅– responsable de la actividad óxido-reductasa se localiza en la base de la hélice α H2 con Cys32 expuesta al solvente y con un carácter altamente reactivo. Por

su parte, Cys35, actuando como cisteína resolutive, se encuentra ocluida del solvente y rodeada de una serie de residuos altamente conservados en secuencia de los cuales se

presume participan de la actividad catalítica. La reacción entre TRX y su sustrato comienza cuando Cys32, que exhibe un bajo pK_a que oscila entre 6.7–7.4 unidades, desencadena un ataque nucleofílico sobre uno de los átomos de azufre del enlace disulfuro de la proteína *target*. La forma reactiva desprotonada de Cys32 (tiolato, $R-S^-$) da lugar a la formación de un enlace disulfuro mixto (donde uno de los azufres pertenece a la TRX y el otro a la proteína *target*) que es atacado posteriormente por la Cys35 que actúa como cisteína resolutive, cuyo valor de pK_a es estimado entre 8.0-9.0 unidades, la cual se cree contribuye a la estabilización de la forma desprotonada de Cys32. Es interesante destacar que como Cys35 debe encontrarse en forma desprotonada para resolver el disulfuro mixto, es necesario que se produzca una alteración transitoria clave en su entorno químico que disminuya su pK_a y de lugar a los pasos finales de la reacción. Para ello se ha especulado que el residuo Asp26, completamente conservado en secuencia⁴⁵ y ocluido del solvente tanto en TRXs procariontas^{40,46} como eucariotas⁴⁷, juega un rol clave en la desprotonación de Cys35, hecho que es soportado por el alto valor de pK_a del aspartato de 7.3-7.5 obtenido independientemente mediante espectroscopía Raman⁴⁸, RMN⁴⁹ y cálculos computacionales⁵⁰, que dan cuenta que el grupo carboxilato está correctamente posicionado para la desprotonación de la Cys35. En este sentido, se han analizado las mutaciones puntuales de *EcTRX* D26N y D26L, las cuales muestran similitudes estructurales con la variante silvestre.

La estabilidad termodinámica de *EcTRX* se encuentra vinculada al cambio en el estado de protonación del Asp26^{51,52} y su sustitución por alanina aumenta significativamente la estabilidad de la variante con respecto a la proteína silvestre⁵¹. Es importante destacar que la estructura, la carga superficial y la hidrofobicidad del sitio activo no se ve alterada en las mutantes, ya que la actividad de la ADN polimerasa del fago T7 en el complejo – donde la TRX funciona como proteína conectora sin involucrar la actividad redox y es esencial para la procesividad de la

polimerasa⁵³ – con las mutantes de *EcTRX* muestran valores de afinidad similares entre ellos y con la proteína silvestre⁵⁴. En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que la presencia de un aspartato ocluido del solvente en la vecindad del sitio activo de la TRX es necesaria principalmente para la función biológica implicada en reacciones redox más que para el correcto plegado o la estabilidad termodinámica. Sin embargo, Vohník y colaboradores⁵⁵ determinaron mediante espectroscopía Raman que tanto la variante silvestre como la mutante D26A muestran patrones similares en la conformación de las cadenas laterales de Cys32 y Cys35 y en las interacciones que estas establecen por lo que quedaría descartado que el bajo valor de pK_a de ambas cisteínas se deba a una interacción tipo puente de hidrógeno. Más aún, las bandas Raman de los triptófanos Trp28 y Trp31 localizados muy cerca del sitio activo, responden a cambios en el pH en experimentos de titulación ácido-base, lo que implicaría que existen sutiles cambios conformacionales en el sitio activo que harían que Asp26 juegue un rol preponderantemente conformacional⁵⁵. Además, se investigó el rol de otro aminoácido conservado y ocluido de la TRX y cercano espacialmente a Asp26: la lisina 57. Para ello se estudió la variante K57M la cual posee un residuo de metionina cuyo tamaño de cadena lateral es similar a la lisina pero sin la carga del grupo $N\epsilon$. Al contrario que el Asp26, Lys57 se encuentra conservada únicamente en secuencias procariontas y en algunas proteínas de mamíferos con plegado tipo TRX como la disulfuro isomerasa⁵⁶. En principio, es esperable un valor modificado del pK_a , respecto a los valores estándar de los aminoácidos aislados en solución, tanto para el Asp26 como para la Lys57 por el hecho de hallarse ocluidos del solvente acuoso^{57,58}. La presencia de Lys57 disminuye significativamente el pK_a del Asp26 en la proteína silvestre como pudo observarse en la mutante K57M donde el valor de pK_a disminuye de 9 a 7.5 unidades, lo cual refuerza la idea que ambos residuos en el núcleo de la *EcTRX* actúan en conjunto mejorando las velocidades de intercambio tiol/disulfuro a pH

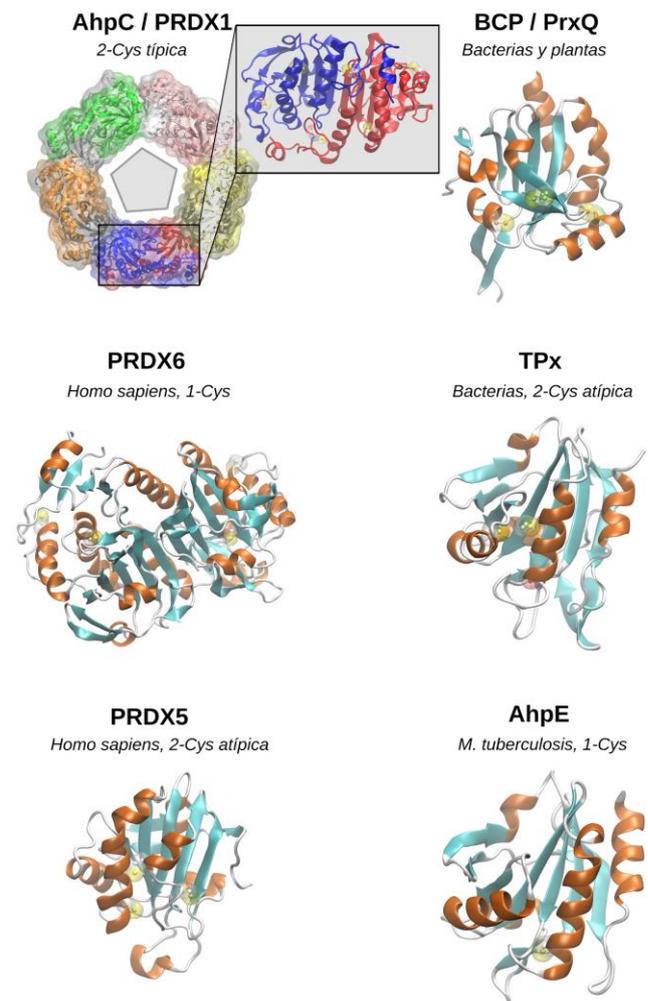
neutro, hecho que se ve reflejado en la casi nula actividad redox de la doble mutante D26A/K57M⁵⁴.

Otro aspecto interesante de las TRXs es su promiscuidad funcional, es decir su capacidad de ejercer una función secundaria⁵⁹. Las tres actividades redox básicas asociadas en general con el plegado TRX son: I) la reducción (actividad primaria), II) la oxidación y III) la isomerización (reorganización) de puentes disulfuro de proteínas *target*. Las actividades II) y III) están relacionadas con los procesos de plegado oxidativo proteico *in vivo* y recuperación de proteínas con puentes disulfuro formados incorrectamente los cuales, en el periplasma de las bacterias, son llevadas a cabo por la DsbA y DsbC, respectivamente. En el retículo endoplásmico de células eucariotas, estos procesos son catalizados por la proteína disulfuro isomerasa (PDI). Las PDIs son proteínas multidominio que contienen por lo menos un subdominios TRX, aunque pueden variar en longitud respecto a las típicas TRXs bacterianas⁶⁰ y las reacciones de reducción de disulfuros *in vivo* son comúnmente catalizados por un monodominio, que también suelen mostrar niveles basales de actividades promiscuas. En este escenario, es tentador especular que los bajos niveles de estas actividades secundarias o promiscuas ya se encontraban presentes en las primeras TRXs ancestrales y que, en algún punto de la historia evolutiva, divergieron para el surgimiento de nuevas funciones implicadas en la actividad óxido-reductasa reversible y también otras funciones que no implican la actividad redox.

Mediante un análisis bioinformático de optimización multi-objeto de Pareto⁶¹, se postuló una nueva posible actividad promiscua de las TRXs. Utilizando la actividad catalítica y la “*plegabilidad*” (medida como la estabilidad termodinámica en equilibrio en experimentos clásicos de desplegamiento inducido por caótrofos) se determinó que una triple mutante (W28K/A39H/K57E) de residuos cercanos espacialmente al sitio activo le otorga actividad hidrolasa de enlaces éster⁶². Sorprendentemente, esta mutante no solo mostró

actividad esterasa sino que además no mermó su actividad primaria⁶². Estos aspectos hacen de la TRX de *E. coli* un excelente modelo en ingeniería proteica y optimización y montaje de nuevas actividades catalíticas con potencial uso biotecnológico.

EL EXTREMO OXIDANTE DE LA VÍA TRX: LAS PEROXIRREDOXINAS COMO EJEMPLO DE PROTEÍNAS TARGET



Como se mencionó anteriormente, las células están dotadas de numerosos sistemas proteicos y no proteicos para controlar las ROS, entre las que se encuentra una importante familia de proteínas

denominadas peroxirredoxinas (PRDXs). Las PRDXs pertenecen a la superfamilia TRX y está compuesta por seis subfamilias⁶³: AhpC, BCP/PRXQ, PRXD6, TPx, PRDX5 y AhpE (Figura 5).

Las PRDXs son responsables de la reducción de más del 90% del H₂O₂ producido por las células durante la respiración celular^{64,65}. Las PRDXs son enzimas dependientes de cisteína y reducen tanto H₂O₂ como alquil hidropéroxidos a través de una cisteína reactiva y completamente conservada en secuencia denominada cisteína peroxidática (C_P), la cual se encuentra además en un contexto espacial (estructura terciaria) altamente conservado en todas las subfamilias de las PRDXs y definido por los residuos Pro, Thr y Arg⁶⁶. Las PRDXs se clasifican en 1-Cys o 2-Cys basado en la ausencia o presencia de una segunda cisteína catalítica denominada cisteína resolutive (C_R) la cual forma un puente disulfuro con C_P. La posición de C_R en la secuencia primaria de las 2-Cys las divide además en PRDXs típicas y atípicas dependiendo si esta se encuentra en una cadena polipeptídica adyacente o en la misma cadena, respectivamente.

El mecanismo catalítico de reducción de peróxidos de las 1-Cys y PRDX 2-Cys es común en el primer paso de la reacción (Figura 6) el cual implica el ataque nucleofílico de la cisteína C_P al sustrato para formar un intermediario reactivo ácido sulfénico, (Cys-SOH) liberando una molécula de agua en el caso que el sustrato sea H₂O₂ o el correspondiente alcohol derivado si el sustrato es un hidropéroxido orgánico. La resolución del intermediario Cys-SOH distingue a las 1-Cys de las 2-Cys típicas y atípicas.

En las PRDXs 1-Cys, la resolución depende de otra proteína o de una molécula de bajo peso molecular como el GSH y el ácido ascórbico⁶⁷ - los cuales están presentes en altas concentraciones en el interior celular - para reducir a C_P de ácido sulfénico a tiol. Por su parte, en las PRDXs 2-Cys, la resolución de la Cys-SOH es llevada a cabo por el ataque de la cisteína resolutive C_R localizada en la misma subunidad polipeptídica que C_P. En el caso

de las 2-Cys atípicas, C_R reacciona con C_P-SOH para condensar un enlace disulfuro estable (R-C_P-S-S-C_R-R). Esta reacción depende de un evento de desplegamiento local de las hélices αH2 y αH3 denominado comúnmente como completamente plegado a localmente desplegado (FF→LU, de *fully folded to locally unfolded transition*) clave para la restitución de la enzima funcional (Figuras 6 y 7). Dado que en las 2-Cys típicas, C_R se encuentra localizada en la hélice C-terminal de la subunidad adyacente a C_P y no en la misma cadena polipeptídica, la formación del puente disulfuro R-C_P-S-S-C_R-R es intermolecular y estabiliza el homodímero. Finalmente, el puente disulfuro es reducido usualmente por una TRX a través de una reacción típica de intercambio tiol-disulfuro (ver Figura 4). El evento FF→LU, si bien varía entre las diferentes subfamilias implicando diferentes segmentos de estructura secundaria, es universal en la familia PRDX. A modo de ejemplo profundizaremos en el análisis estructural y funcional de la subfamilia TPx de *E. coli*, una PRDX 2-Cys atípica.

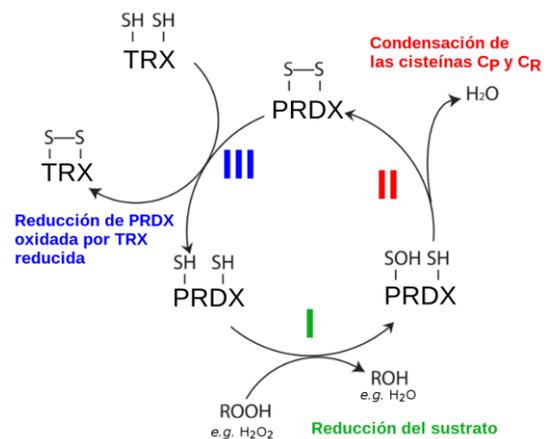


Fig. 6: Esquema de ciclo catalítico de reducción de grupos peróxidos (ROOH) de una PRDX 2-Cys la cual consta de tres pasos: I) oxidación de C_P a ácido sulfénico (Cys-SOH), II) cambio conformacional y condensación del puente disulfuro entre C_P y C_R y III) reducción del puente disulfuro por una TRX para devolverla a su estado reducido funcional.

Los miembros de esta subfamilia, originalmente denominadas p20^{68,69}, pertenecen casi exclusivamente a las 2-Cys atípicas bacterianas y son una de las subfamilias filogenéticamente menos diversas. Desde el punto de vista

estructural, la TPx de *E. coli* (*EcTPx*) es una proteína relativamente pequeña de 167 residuos (~17 kDa), que comparte el prototipo plegado TRX caracterizada por un núcleo central β de siete hebras rodeadas por cuatro hélices α (Figuras 5 y 7), con la cisteína C_P situada en la base de la hélice $\alpha H2$ mientras que la cisteína C_R en el centro de la hélice $\alpha H3$. La larga cadena N-terminal se pliega en una hebra β haciendo que la estructura general sea compacta y globular. En su estado reducido biológicamente activo, las cisteínas C_P y C_R se encuentran a una distancia de 12 Å entre los átomos de azufre S^γ . En este escenario, la reacción de condensación del puente disulfuro implica una transición conformacional obligada, donde el estado plegado reactivo debe sufrir un desplegamiento local para acercar ambas cisteínas y permitir la formación del puente disulfuro. En la *EcTPx*, el evento FF→LU, implica un desplegamiento local de la región C-terminal de la hélice $\alpha H3$, un cambio en la accesibilidad al solvente y de rotámeros φ/ψ de C_P acompañado por un desplegamiento local en la región N-terminal de la $\alpha H2$ y del *loop* precedente que la conecta con la hebra $\beta 5$.

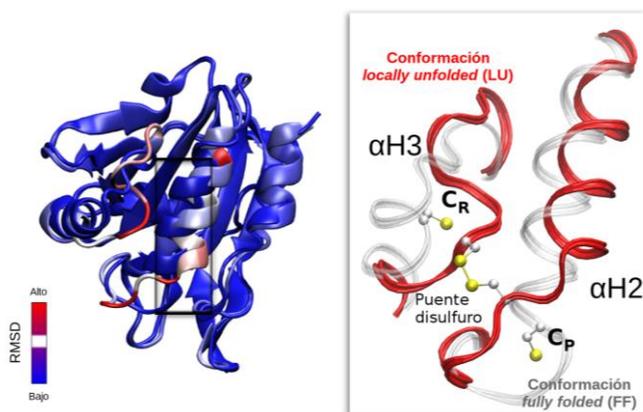


Fig. 7: Cambios conformacionales acoplados a la transición FF→LU en la *EcTPx*. A la izquierda se muestra la superposición de los subestados reducido (FF) y oxidado (LU) coloreado por el RMSD. Obsérvese que para la mayoría de los residuos el desplazamiento de la cadena principal es bajo (RMSD bajo, azul) mientras la zona de mayor movilidad (RMSD alto, rojo) se localiza entre las hélices $\alpha H2$ y $\alpha H3$. A la derecha se muestra más en detalle la región implicada en la transición conformacional. El cálculo del RMSD fue realizado en VMD 1.9.2⁷⁰.

Algunas PRDXs 2-Cys atípicas poseen además una tercer cisteína totalmente ocluida del solvente localizada en la lámina β del núcleo de la proteína. Se ha demostrado experimentalmente que la variante C81S es ligeramente menos activa⁷¹ por lo que no se la considera una cisteína redox esencial para la actividad peroxidasa⁷². Los parámetros cinéticos para la reducción de H_2O_2 y varios alquil hidroperóxidos han sido bien establecidos experimentalmente⁷¹. La K_M varía casi tres órdenes de magnitud entre el hidroperóxido de cumeno y el H_2O_2 . Sin embargo la eficiencia catalítica k_{cat} , dentro del error experimental, se mantiene inalterada, sugiriendo que la eficiencia global de reducción depende de diversos factores, entre ellos:

- I) La afinidad y la reacción química de C_P a sustratos de diferente topología y naturaleza química.
- II) El reordenamientos conformacionales para alcanzar la transición FF→LU.
- III) La formación del puente disulfuro intrahelicoidal y
- IV) La reducción de la forma oxidada de *EcTPx* retornar a su forma reducida funcionalmente activa.

LAS GLUTAREDOXINAS: MUCHO MÁS QUE UN SISTEMA *BACKUP* DE LAS TIORREDOXINAS

Las glutaredoxinas (GRXs), el otro miembro de suma importancia en la familia de las TRXs, son proteínas con actividad redox y dependientes de GSH como agente reductor para ejercer su actividad reductora^{73,74}. Las GRXs fueron descubiertas a mediados de los años '70s en variantes modificadas de *E. coli* carentes de TRXs que, de todas maneras, eran capaces de donar electrones a la ribonucleótido reductasa⁷⁵. A la fecha, con más de 1770 artículos en *PubMed* – de los cuales más de 580 fueron publicados en los últimos cinco años – con la palabra clave “*glutaredoxin*”, las GRXs son hoy en día un sistema de intensos estudios dada su implicancia en numerosas vías de señalización y regulación celular^{76–79} y procesos fisiológicos^{80–82}.

Originalmente, las GRXs fueron clasificadas según el orden cronológico en su descubrimiento (Grx1, Grx2, etc.). Dado que esta clasificación no refleja ninguna propiedad biofísicoquímica, hoy en día se las clasifica en base a la secuencia aminoacídica de su sitio activo como: mono- (Cys-Gly-Phe-Ser) y ditiolicas (Cys-Gly-Phe-Cys). De manera similar al mecanismo de reducción de las TRXs, las GRXs ditiolicas requieren de ambas cisteínas para reducir un puente disulfuro de la proteína *target*. Pero a diferencia de las TRXs, el puente disulfuro intramolecular de las GRXs es reducido por una molécula de GSH para dar un intermediario GRX-S-SG el cual es posteriormente reducida por la acción de la glutatión reductasa (GR) con electrones provenientes del NADPH⁸³. Una de las características más sobresalientes de las GRXs es su capacidad de unir y utilizar GSH como sustrato. A diferencia de las TRXs, las GRXs tienen una alta afinidad por los disulfuros mixtos.

Mecanismo de las GRXs monotolicas



Mecanismo de las GRXs ditiolicas

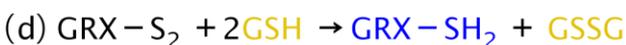


Fig. 8: Mecanismo catalítico de las GRXs mono- y ditiolicas. PSSG es un disulfuro mixto entre una proteína P y el GSH y GSSG son dos GSH unidos por un puente disulfuro.

El sistema GRX ditiolico es capaz de reducir de manera eficiente algunos disulfuros de proteínas como el de la RNR de *E. coli* con un mecanismo catalítico similar al descrito anteriormente para las TRXs (ver Figuras 4 y 8-cd). Sin embargo, la principal acción de las GRXs parecería ser la de reducir disulfuros mixtos entre una proteína *target* y el GSH – en un proceso de desglutathionilación^{84,85} – utilizando un mecanismo de una cisteína⁸⁶ (Figura 8-ab). Con más de 120 estructuras depositadas en la RCSB *Protein Data Bank*⁸⁷, las GRXs han sido intensamente estudiadas a nivel estructural tanto por cristalografía de rayos X como por RMN y comparten el prototípico plegado

TRX⁸⁸. Tanto en las GRXs monotolicas como ditiolicas, el motivo CxxC/S se localiza en la base de la hélice α H2 (en referencia a la estructura prototípica de las TRXs, Figura 9) con la cisteína N-terminal expuesta al solvente y exhibiendo un bajo valor de pK_a y la cisteína resolutive (en las ditiolicas) ocluida y con un alto valor de pK_a.

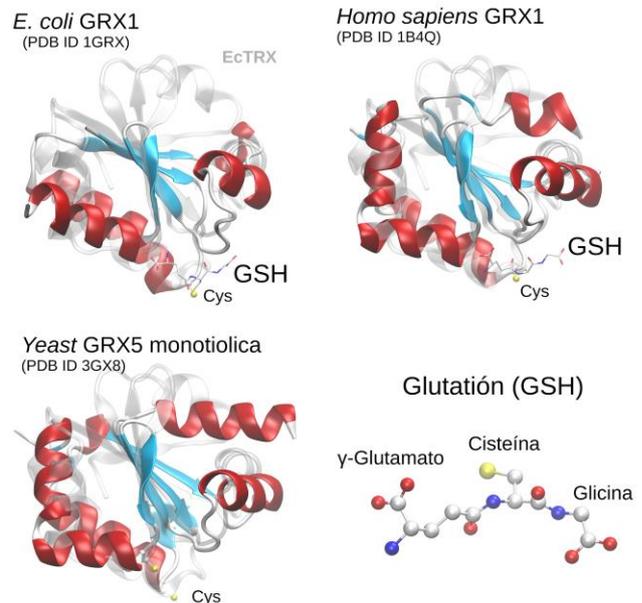


Fig. 9: Topología estructural de diferentes GRXs. Estructuras tridimensionales de la GRX1 de *E. coli* (PDB ID 1GRX) y humana (PDB ID 1B4Q) en complejo con GSH (representado en licorice) y la GRX5 de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID 3GX8) como ejemplo de una GRX monotolica. En todos los casos en gris se muestra superpuesta la estructura de la TRX de *E. coli* (PDB ID 2TRX cadena A) como ejemplo del plegado TRX. Además se muestra la composición aminoacídica del glutatión (abajo) con su inusual enlace y entre el grupo carboxilo del glutamato y el grupo amino de la cisteína.

CONCLUSIONES

Desde finales de los ‘60s, la investigación en biofísica de proteínas, basada principalmente en la TRX de *E. coli*, ha sentado los cimientos fundamentales en la comprensión de la relación estructura-función proteica. Desde entonces y hasta el día de hoy, la vasta cantidad de conocimiento estructural y funcional recabado sobre las proteínas constituyentes de los sistemas TRX/GRX, no es suficiente para comprender cabalmente cómo los módulos interaccionan entre sí, cuán plástico es el sistema desde el punto de vista de la variedad de sustratos proteicos

admisibles en cada una de las reacciones (ver Figura 1) o qué propiedades asociadas a la interacción entre componentes – cambios estructurales y/o estabilización de subestados conformacionales, e.g. PRDXs – modulan la reactividad y el flujo de electrones de la vía.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo financiero. DSV es becario postdoctoral de la ANPCyT.

REFERENCIAS

- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049–6055
- Gutteridge, J.M. & Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**, 136–147
- Schöpfer, F., Riobó, N., Carreras, M.C., Alvarez, B., Radi, R., Boveris, A., Cadenas, E. & Poderoso, J.J. (2000). Oxidation of ubiquinol by peroxynitrite: implications for protection of mitochondria against nitrosative damage. *Biochem. J* **349**, 35–42
- Gomberg, M. (1900). An Instance of Trivalent Carbon: Triphenylmethyl. *J. Am. Chem. Soc.* **22**, 757–771
- Paneth, F.A., Hofeditz, W. & Wunsch, A. (1935). 82. Free organic radicals in the gaseous state. Part V. The reaction products of free methyl in hydrogen and helium. *J. Chem. Soc.* 372
- Rozantsev, E.G. & Loshadkin, D.V. (2001). The history and modern problems of free radical chemistry. 100 years of free radical chemistry. *Des. Monomers Polym.* **4**, 281–300
- Karogodina, T.Y., Sergeeva, S.V. & Stass, D.V. (2011). Stability and reactivity of free radicals: a physicochemical perspective with biological implications. *Hemoglobin* **35**, 262–275
- Valdez, L.B., Lores Arnaiz, S., Bustamante, J., Alvarez, S., Costa, L.E. & Boveris, A. (2000). Free radical chemistry in biological systems. *Biol. Res.* **33**, 65–70
- Di Meo, S., Reed, T.T., Venditti, P. & Victor, V.M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1245049
- Dickinson, B.C. & Chang, C.J. (2011). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 504–511
- Ryter, S.W., Kim, H.P., Hoetzel, A., Park, J.W., Nakahira, K., Wang, X. & Choi, A.M.K. (2007). Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 49–89
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H. & Lleonart, M.E. (2013). Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res. Rev.* **12**, 376–390
- Prasad, S., Gupta, S.C., Pandey, M.K., Tyagi, A.K. & Deb, L. (2016). Oxidative Stress and Cancer: Advances and Challenges. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 5010423
- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P. & Mahajan, R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* **7**, 65–74
- Giacco, F. & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* **107**, 1058–1070
- Asmat, U., Abad, K. & Ismail, K. (2016). Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharm J* **24**, 547–553
- Forman, H.J. (2008). Hydrogen Peroxide: The Good, The Bad, and The Ugly. *Oxidants in Biology: A Question of Balance* 1–17
- Bachhawat, A.K. & Kaur, A. (2017). Glutathione Degradation. *Antioxid. Redox Signal.* **27**, 1200–1216
- Lu, S.C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 3143–3153
- Vazquez, D.S., Delfino, J.M. & Santos, J. (2015). Thioredoxin from *Escherichia coli* as a Role Model of Molecular Recognition, Folding, Dynamics and Function. *Protein Pept. Lett.* **22**, 801–815
- Couto, N., Wood, J. & Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.* **95**, 27–42
- Arnér, E.S. & Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102–6109
- Williams, C.H., Arscott, L.D., Müller, S., Lennon, B.W., Ludwig, M.L., Wang, P.F., Veine, D.M., Becker, K. & Schirmer, R.H. (2000). Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6110–6117
- Arnér, E.S.J. (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases—important selenoproteins with versatile functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1790**, 495–526
- Zhong, L. & Holmgren, A. (2000). Essential Role of Selenium in the Catalytic Activities of Mammalian Thioredoxin Reductase Revealed by Characterization of Recombinant Enzymes with Selenocysteine Mutations. *J. Biol. Chem.* **275**, 18121–18128
- Perez-Jimenez, R., Inglés-Prieto, A., Zhao, Z.-M.,

- Sanchez-Romero, I., Alegre-Cebollada, J., Kosuri, P., Garcia-Manyes, S., Kappock, T.J., Tanokura, M., Holmgren, A., Sanchez-Ruiz, J.M., Gaucher, E.A. & Fernandez, J.M. (2011). Single-molecule paleoenzymology probes the chemistry of resurrected enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 592–596
27. Nisbet, E.G. & Sleep, N.H. (2001). The habitat and nature of early life. *Nature* **409**, 1083–1091
28. Ingles-Prieto, A., Ibarra-Molero, B., Delgado-Delgado, A., Perez-Jimenez, R., Fernandez, J.M., Gaucher, E.A., Sanchez-Ruiz, J.M. & Gavira, J.A. (2013). Conservation of protein structure over four billion years. *Structure* **21**, 1690–1697
29. Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A.E., Gustafsson, J. & Spyrou, G. (1997). Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **272**, 30841–30847
30. Vazquez, D.S., Sánchez, I.E., Garrote, A., Sica, M.P. & Santos, J. (2015). The *E. coli* thioredoxin folding mechanism: the key role of the C-terminal helix. *Biochim. Biophys. Acta* **1854**, 127–137
31. Collet, J.-F. & Messens, J. (2010). Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1205–1216
32. Georgescu, R.E., Li, J.H., Goldberg, M.E., Tasayco, M.L. & Chaffotte, A.F. (1998). Proline isomerization-independent accumulation of an early intermediate and heterogeneity of the folding pathways of a mixed alpha/beta protein, *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* **37**, 10286–10297
33. Godoy-Ruiz, R., Ariza, F., Rodriguez-Larrea, D., Perez-Jimenez, R., Ibarra-Molero, B. & Sanchez-Ruiz, J.M. (2006). Natural Selection for Kinetic Stability Is a Likely Origin of Correlations between Mutational Effects on Protein Energetics and Frequencies of Amino Acid Occurrences in Sequence Alignments. *J. Mol. Biol.* **362**, 966–978
34. Hamid Wani, A. & Udgaonkar, J.B. (2006). HX-ESI-MS and Optical Studies of the Unfolding of Thioredoxin Indicate Stabilization of a Partially Unfolded, Aggregation-Competent Intermediate at Low pH. *Biochemistry* **45**, 11226–11238
35. Santos, J., Marino-Buslje, C., Kleinman, C., Ermácora, M.R. & Delfino, J.M. (2007). Consolidation of the Thioredoxin Fold by Peptide Recognition: Interaction between *E. coli* Thioredoxin Fragments 1–93 and 94–108. *Biochemistry* **46**, 5148–5159
36. Santos, J., Sica, M.P., Buslje, C.M., Garrote, A.M., Ermácora, M.R. & Delfino, J.M. (2009). Structural Selection of a Native Fold by Peptide Recognition. Insights into the Thioredoxin Folding Mechanism. *Biochemistry* **48**, 595–607
37. Lento, C., Ferraro, M., Wilson, D. & Audette, G.F. (2016). HDX-MS and deletion analysis of the type 4 secretion system protein TraF from the *Escherichia coli* F plasmid. *FEBS Lett.* **590**, 376–386
38. Holmgren, A. (1968). Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from *Escherichia coli* B. *Eur. J. Biochem.* **6**, 475–484
39. Holmgren, A., Söderberg, B.O., Eklund, H. & Brändén, C.I. (1975). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 2305–2309
40. Katti, S.K., LeMaster, D.M. & Eklund, H. (1990). Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **212**, 167–184
41. Dyson, H.J., Jane Dyson, H., Gippert, G.P., Case, D.A., Holmgren, A. & Wright, P.E. (1990). Three-dimensional solution structure of the reduced form of *Escherichia coli* thioredoxin determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **29**, 4129–4136
42. Dyson, H.J., Holmgren, A. & Wright, P.E. (1989). Assignment of the proton NMR spectrum of reduced and oxidized thioredoxin: sequence-specific assignments, secondary structure, and global fold. *Biochemistry* **28**, 7074–7087
43. Kemple, M.D., Yuan, P., Nollet, K.E., Fuchs, J.A., Silva, N. & Prendergast, F.G. (1994). ¹³C NMR and fluorescence analysis of tryptophan dynamics in wild-type and two single-Trp variants of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biophys. J.* **66**, 2111–2126
44. Perez-Jimenez, R., Li, J., Kosuri, P., Sanchez-Romero, I., Wiita, A.P., Rodriguez-Larrea, D., Chueca, A., Holmgren, A., Miranda-Vizuete, A., Becker, K., Cho, S.-H., Beckwith, J., Gelhaye, E., Jacquot, J.P., Gaucher, E.A., Sanchez-Ruiz, J.M., Berne, B.J. & Fernandez, J.M. (2009). Diversity of chemical mechanisms in thioredoxin catalysis revealed by single-molecule force spectroscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 890–896
45. Eklund, H., Gleason, F.K. & Holmgren, A. (1991). Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins* **11**, 13–28
46. Jeng, M.-F., Patricia Campbell, A., Begley, T., Holmgren, A., Case, D.A., Wright, P.E. & Jane Dyson, H. (1994). High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin. *Structure* **2**, 853–868
47. Qin, J., Marius Clore, G. & Gronenborn, A.M. (1994). The high-resolution three-dimensional solution structures of the oxidized and reduced states of human thioredoxin. *Structure* **2**, 503–522
48. Li, H., Hanson, C., Fuchs, J.A., Woodward, C. & Thomas, G.J., Jr (1993). Determination of the pKa values of active-center cysteines, cysteines-32 and -35, in *Escherichia coli* thioredoxin by Raman spectroscopy. *Biochemistry* **32**, 5800–5808
49. Jeng, M.F. & Dyson, H.J. (1996). Direct measurement of the aspartic acid 26 pKa for reduced *Escherichia*

- coli thioredoxin by ^{13}C NMR. *Biochemistry* **35**, 1–6
50. Dillet, V., Dyson, H.J. & Bashford, D. (1998). Calculations of electrostatic interactions and pKas in the active site of Escherichia coli thioredoxin. *Biochemistry* **37**, 10298–10306
51. Langsetmo, K., Fuchs, J.A. & Woodward, C. (1991). The conserved, buried aspartic acid in oxidized Escherichia coli thioredoxin has a pKa of 7.5. Its titration produces a related shift in global stability. *Biochemistry* **30**, 7603–7609
52. Langsetmo, K., Fuchs, J.A., Woodward, C. & Sharp, K.A. (1991). Linkage of thioredoxin stability to titration of ionizable groups with perturbed pKa. *Biochemistry* **30**, 7609–7614
53. Lee, S.-J., Tran, N.Q., Lee, J. & Richardson, C.C. (2018). Hydrophobic Residue in Escherichia coli Thioredoxin Critical for the Processivity of T7 DNA Polymerase. *Biochemistry* **57**, 5807–5817
54. Dyson, H.J., Jeng, M.F., Tennant, L.L., Slaby, I., Lindell, M., Cui, D.S., Kuprin, S. & Holmgren, A. (1997). Effects of buried charged groups on cysteine thiol ionization and reactivity in Escherichia coli thioredoxin: structural and functional characterization of mutants of Asp 26 and Lys 57. *Biochemistry* **36**, 2622–2636
55. Vohnik, S., Hanson, C., Tuma, R., Fuchs, J.A., Woodward, C. & Thomas, G.J., Jr (1998). Conformation, stability, and active-site cysteine titrations of Escherichia coli D26A thioredoxin probed by Raman spectroscopy. *Protein Sci.* **7**, 193–200
56. Kemmink, J., Darby, N.J., Dijkstra, K., Nilges, M. & Creighton, T.E. (1996). Structure Determination of the N-Terminal Thioredoxin-like Domain of Protein Disulfide Isomerase Using Multidimensional Heteronuclear $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **35**, 7684–7691
57. Isom, D.G., Castañeda, C.A., Cannon, B.R. & García-Moreno, B. (2011). Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5260–5265
58. Harms, M.J., Castañeda, C.A., Schlessman, J.L., Sue, G.R., Isom, D.G., Cannon, B.R. & E., B.G.-M. (2009). The pKa Values of Acidic and Basic Residues Buried at the Same Internal Location in a Protein Are Governed by Different Factors. *J. Mol. Biol.* **389**, 34–47
59. Aharoni, A., Gaidukov, L., Khersonsky, O., McQ Gould, S., Roodveldt, C. & Tawfik, D.S. (2005). The “evolvability” of promiscuous protein functions. *Nat. Genet.* **37**, 73–76
60. Kozlov, G., Määttänen, P., Thomas, D.Y. & Gehring, K. (2010). A structural overview of the PDI family of proteins. *FEBS J.* **277**, 3924–3936
61. Zitzler, E., Knowles, J. & Thiele, L. (2008). Multiobjective Optimization. 373–404
62. Suarez, M., Tortosa, P., Garcia-Mira, M.M., Rodríguez-Larrea, D., Godoy-Ruiz, R., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J.M. & Jaramillo, A. (2010). Using multi-objective computational design to extend protein promiscuity. *Biophys. Chem.* **147**, 13–19
63. Soito, L., Williamson, C., Knutson, S.T., Fetrow, J.S., Poole, L.B. & Nelson, K.J. (2011). PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. *Nucleic Acids Res.* **39**, D332–7
64. Winterbourn, C.C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 278–286
65. Cox, A.G., Winterbourn, C.C. & Hampton, M.B. (2009). Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem. J.* **425**, 313–325
66. Karplus, P.A. & Hall, A. (2007). Structural survey of the peroxiredoxins. *Subcell. Biochem.* **44**, 41–60
67. Monteiro, G., Horta, B.B., Pimenta, D.C., Augusto, O. & Netto, L.E.S. (2007). Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4886–4891
68. Cha, M.K., Kim, H.K. & Kim, I.H. (1995). Thioredoxin-linked “thiol peroxidase” from periplasmic space of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **270**, 28635–28641
69. Zhou, Y., Wan, X.Y., Wang, H.L., Yan, Z.Y., Hou, Y.D. & Jin, D.Y. (1997). Bacterial scavengase p20 is structurally and functionally related to peroxiredoxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 848–852
70. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38
71. Baker, L.M.S. & Poole, L.B. (2003). Catalytic mechanism of thiol peroxidase from Escherichia coli. Sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS61. *J. Biol. Chem.* **278**, 9203–9211
72. Cha, M.K., Kim, H.K. & Kim, I.H. (1996). Mutation and Mutagenesis of thiol peroxidase of Escherichia coli and a new type of thiol peroxidase family. *J. Bacteriol.* **178**, 5610–5614
73. Fernandes, A.P. & Holmgren, A. (2004). Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 63–74
74. Lillig, C.H., Berndt, C. & Holmgren, A. (2008). Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 1304–1317
75. Holmgren, A. (1976). Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 2275–2279

76. Takashima, Y., Hirota, K., Nakamura, H., Nakamura, T., Akiyama, K., Cheng, F.S., Maeda, M. & Yodoi, J. (1999). Differential expression of glutaredoxin and thioredoxin during monocytic differentiation. *Immunol. Lett.* **68**, 397–401
77. Bandyopadhyay, S., Starke, D.W., Mieyal, J.J. & Gronostajski, R.M. (1998). Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation-inactivated nuclear factor I. *J. Biol. Chem.* **273**, 392–397
78. Nakamura, T., Ohno, T., Hirota, K., Nishiyama, A., Nakamura, H., Wada, H. & Yodoi, J. (1999). Mouse glutaredoxin - cDNA cloning, high level expression in *E. coli* and its possible implication in redox regulation of the DNA binding activity in transcription factor PEBP2. *Free Radic. Res.* **31**, 357–365
79. Hirota, K., Matsui, M., Murata, M., Takashima, Y., Cheng, F.S., Itoh, T., Fukuda, K. & Yodoi, J. (2000). Nucleoredoxin, glutaredoxin, and thioredoxin differentially regulate NF-kappaB, AP-1, and CREB activation in HEK293 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**, 177–182
80. Lillig, C.H., Prior, A., Schwenn, J.D., Åslund, F., Ritz, D., Vlamis-Gardikas, A. & Holmgren, A. (1999). New Thioredoxins and Glutaredoxins as Electron Donors of 3'-Phosphoadenylylsulfate Reductase. *J. Biol. Chem.* **274**, 7695–7698
81. Berndt, C., Lillig, C.H., Wollenberg, M., Bill, E., Mansilla, M.C., de Mendoza, D., Seidler, A. & Schwenn, J.D. (2003). Characterization and Reconstitution of a 4Fe-4S Adenylyl Sulfate/Phosphoadenylyl Sulfate Reductase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **279**, 7850–7855
82. Wells, W.W., Xu, D.P., Yang, Y.F. & Rocque, P.A. (1990). Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 15361–15364.
83. Johansson, C., Holmgren, A., Berndt, C., Lönn, M.E., Hudemann, C. & Lillig, C.H. (2005). Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1375
84. Bushweller, J.H., Aaslund, F., Wuethrich, K. & Holmgren, A. (1992). Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14.fwdarw.S) and its mixed disulfide with glutathione. *Biochemistry* **31**, 9288–9293
85. Holmgren, A. & Åslund, F. (1995). [29] Glutaredoxin. *Methods in Enzymology* 283–292
86. Berndt, C., Lillig, C.H. & Holmgren, A. (2007). Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H1227–36
87. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242
88. Martin, J.L. (1995). Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure* **3**, 245–250

Diseño de un sistema piloto para la inyección de gases en biorreactores para la producción de biomasa

Design of a pilot system for the gas injection in bioreactors for the production of biomass

Recibido 20 Julio 2018,
Aceptado 1 Noviembre 2018

www.unipaz.edu.co

Saavedra Said^{a†}, Porras Atencia Oscar Orlando^a, Miranda Jose Vicente^a

Resumen: En este trabajo se desarrolló un sistema piloto de aireación compatible con biorreactores para el cultivo de microalgas de interés en la producción de biocombustibles lo que se conoce como fotobiorreactor de tipo inclinado. A partir de esto, se construyó el fotobiorreactor en material acrílico con un diámetro de 10 cm y una altura de 1,1 m, garantizando la óptima captación de luz solar y una estabilización de la concentración de OD (oxígeno disuelto). Se construyó en un soporte metálico móvil, provisto de un panel solar de 12 V y una batería de 12 V y 12 Amperios-hora, el cual mantiene el funcionamiento las 24 horas del día. Así mismo se le acondicionó un cilindro de almacenamiento de CO₂ de 10,7 litros con un aditamento que permite instalar otra fuente gaseosa, un compresor que le imprime presión al gas para que se desplace eficientemente a la columna de los fotobiorreactores. Las pruebas realizadas del diseño mostraron resultados favorables para el funcionamiento adecuado del sistema. Este diseño resulta versátil, debido a que se le pueden adaptar fácilmente otros dispositivos y equipos de seguimiento y control de diversas variables además de incorporar el uso de tecnologías limpias a partir de energía renovable. **Palabras claves:** fotobiorreactor, microalga, biocombustible.

Abstract: In this work, a pilot aeration system compatible with bioreactors was developed for the microalgae culture of interest in the production of biofuels, which is known as an inclined photobioreactor. From this, the photobioreactor was constructed in acrylic material with a diameter of 10 cm and a height of 1.1 m, guaranteeing the optimal capture of sunlight and a stabilization of the DO (dissolved oxygen) concentration. It was built on a mobile metal support, provided with a 12 V solar panel and a 12 V and 12 Ampere-hour battery, which maintains operation 24 hours a day. A 10.7-liter CO₂ storage cylinder was also fitted with an attachment that allows another gaseous source to be installed, a compressor that presses the gas to move efficiently to the column of the photobioreactors. The design tests showed favorable results for the proper functioning of the system. This design is versatile, due to the fact that other devices and monitoring and control equipment of different variables can be easily adapted to it, as well as incorporating the use of clean technologies based on renewable energy. **Key words:** Photobioreactors, microalgae, biofuels.

INTRODUCCIÓN

Los fotobiorreactores (FBRs) son mecanismos reservados para el cultivo intensivo de microalgas y en general, de producción de biomasa. Por lo que se deben conservar en un medio estable (temperatura, pH, baja concentración de O₂) suministrándose los elementos necesarios para su crecimiento. Existen dos tendencias de diseño opuestas: los reactores abiertos, que priman por su economía, donde hay un pobre control del entorno y los FBR cerrados que consiguen unas condiciones bastante controladas que permiten el

crecimiento de las microalgas a una velocidad inmejorable, a cambio de un costo mayor y de mejor productividad¹.

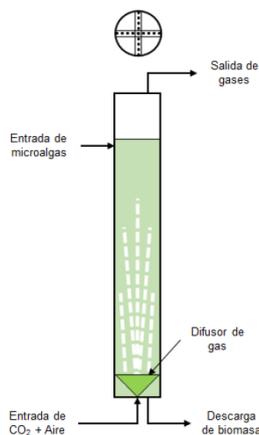
El crecimiento de las microalgas es rápido y requiere como la mayoría de los seres vivos agua y una fuente de carbono para su incorporación, siendo el dióxido de carbono una fuente usada por estos microorganismos durante su crecimiento. El agua usada para tal fin es en su mayoría residual y no potable. Una vez alcanzado cierto nivel de crecimiento en pocos días, se convierten en combustible mediante procedimientos sencillos y cuyas emisiones de CO₂ son prácticamente neutrales. Comparado con otros organismos eutróficos utilizados para producir biodiésel, el fitoplancton parece tener el mejor rendimiento.

^aInstituto Universitario de la Paz. Centro de Investigación Santa Lucía Km 14 Vía Bucaramanga.

† saavedra.said@hotmail.com

Por estas razones, se han ahondado esfuerzos para desarrollar una alternativa sostenible a los biocombustibles tradicionales, planteando la producción de este a partir de algas, agua y el proceso natural de la fotosíntesis. En un fotobiorreactor eficiente incorpora dentro de su diseño parámetros relacionados a la función del organismo que va a ser cultivado².

Debido a que los microorganismos fototróficos son muy diversos en su morfología, alimentación, requerimiento lumínico y resistencia al estrés, los fotobiorreactores son diseñados para manejar organismos particulares y en condiciones específicas. En este sentido las tecnologías utilizadas para el desarrollo de fotobiorreactores incorporan sistemas de aireación con los cuales se ofrecen sistemas versátiles de fácil de transporte y montaje, además del uso de energía solar y almacenamiento, que garantice su funcionamiento las 24 horas del día. (Figura 1)



Fuente: Adaptado de CHISTI, Yusuf. Airlift bioreactors. Londres, Inglaterra. 1989.

Fig. 1: Configuración de un fotobiorreactor tubular.

Los tipos de equipos de aireación más utilizados en biorreactores son los sistemas de aireación difusa o aire comprimido, donde la inyección de gas, aire u oxígeno, bajo presión, se hace por la parte inferior de la superficie libre del fluido³.

Esta aplicación se realiza a través de medios porosos conocidos como difusores, que producen burbujas de diámetros muy pequeños. Los preferidos son los de poro fino (2 a 5 mm),

seguidos por los de poro semifino (6 a 10 mm) y los de burbuja gruesa (>10 mm).

Este tipo de aireadores pueden transferir de 0,3 kg O₂/kW*h a 1,2 kg O₂/kW*h, siendo usados, especialmente en biorreactores y sistemas de tratamiento de aguas residuales pequeños con tanques que tienen profundidades entre 2,5 y 5,0 m. Para este último caso, la relación conveniente de ancho/profundidad de estos tanques debe ser menor a 2, con el fin de asegurar una aireación efectiva y una mezcla apropiada.

MÉTODOS

La presente investigación de carácter descriptivo, se realizó el diseño del sistema piloto para inyección de gases en un biorreactor, teniendo en cuenta aspectos tales como la productividad volumétrica, la conversión de la energía luminosa eficiente y, brindar la viabilidad y estabilidad necesaria para el proceso de cultivo de algas. En la figura 2 se muestran diversas combinaciones de tipos e inclinaciones que existen de fotobiorreactores.

		Orientación e Inclinación		
		Horizontal	Vertical	Inclinado
Tipo de fotobiorreactor	Tubular	Producción Industrial a bajas latitudes		Producción Industrial a altas latitudes
	Plano	Investigación y Desarrollo a bajas latitudes		Estudio de cepas a altas latitudes
	Cilindros, fundas		Producción artesanal, células de estructura delicadas	

Fuente: RONNY BARRA, S. G. Diseño de un Fotobiorreactor Industrial para Cultivo de Spirulina. Revista Tecnológica Espol. Guayaquil, Ecuador. 2010. p. 30.

Fig. 2: Esquema de las combinaciones de diferentes tipos e inclinaciones existentes de fotobiorreactores.

A partir de la revisión bibliográfica se documentó sobre los diseños que se encuentran vigentes en la actualidad, considerando las tecnologías de biorreactores, fotobiorreactores y lagunas, evaluando los componentes, subcomponentes, ventajas, desventajas y otros requerimientos. Asimismo, se estableció una matriz de valoración de la viabilidad para su construcción basados en el riesgo, confiabilidad y seguridad (ver Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de valoración de riesgos.

Valoración	Muy bajo	Bajo	Medio	Alto	Muy alto
Riesgo	1	2	3	4	5
confiabilidad	1	2	3	4	5
Seguridad	1	2	3	4	5

Según los valores o rangos establecidos de los parámetros de evaluación, se definió una escala de ponderación que permitió identificar la alternativa de mayor viabilidad (ver Tabla 2).

Tabla 2. Escala de ponderación.

Escala de ponderación		
3 a 5	Viabilidad baja	
>6≤10	Viabilidad media	
>11	Viabilidad alta	

Teniendo en cuenta lo anterior, se viabilizó la construcción del sistema piloto de inyección de gases en un biorreactor móvil. Se consideraron aspectos tales como las condiciones climáticas de la zona debido a que se puede aprovechar la luz solar, la facilidad de desplazamiento, el poco espacio que ocupa y el mejor aprovechamiento del burbujeo del CO₂ por parte de las microalgas. En el Tabla 3, se presentan, los factores considerados.

Tabla 3. Factores evaluados para la selección de la alternativa tecnológica de mayor viabilidad.

ASPECTO	FACTORES
Técnicos	Tipos de microalgas
Volumen de CO ₂ a trabajar	
Disponibilidad de áreas y terrenos para la ubicación de infraestructura	
Disponibilidad de personal para su operación	
Requerimientos y disponibilidad de energía eléctrica	
Financieros	Valor de la inversión
Costos recurrentes (operación, mantenimiento, administración, reposición, mano de obra, etc.)	
Costos de transporte al sitio del proyecto (infraestructura del sistema de gestión integral de residuos sólidos y a sitios de comercialización de residuos asociados a la distancia y las cantidades de material)	
Disponibilidad de recursos y fuentes de financiación para la inversión y el funcionamiento	
Sostenibilidad del proyecto	
Ambiental	Impactos ambientales (afectaciones al agua, aire, suelo, paisaje, fauna, flora, etc)

A partir de la alternativa tecnológica seleccionada, se realizó la construcción del sistema aireador seleccionado. Para esto se contemplaron las dimensiones establecidas en el plano y cálculos realizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema piloto para inyección de gases compatible con biorreactores para microalgas se construyó para operar con energía solar, con un sistema de recirculación de CO₂ y alternativo para conectar un sistema de recirculación de aire, que a su vez es compatible a un reactor de tipo tubular inclinado, destinado al cultivo de microalgas.

Dimensionamiento. Se tuvieron en cuenta las dimensiones del fotobiorreactor de un radio de 10 cm que sugieren una excelente disponibilidad de luz y una altura de columna de 1,10 m, para garantizar que la concentración de oxígeno disuelto se mantenga constante⁴.

Asimismo, se consideraron aspectos tales como que la tapa superior debe permitir la entrada de medidores de pH y oxígeno disuelto, así como permitir la salida de gases; por la tapa inferior ingresa la corriente gaseosa y permite el descargue de biomasa del fotobiorreactor. Para prevenir el riesgo de contaminación, en el caso de ingresar los gases a partir del aire atmosférico, se debe hacer pasar por un filtro purificador. También se debe hacer pasar la corriente de gas de salida del reactor por un sistema de filtros para evitar la contaminación atmosférica (olores y gases indeseables). El difusor se fabricó con una configuración de tubos en acero inoxidable, plástico o vidrio, con un diámetro óptimo y sugerido para una mejor difusión con orificios es de 1 mm⁵. Se incorporo un cono de plástico en la parte inferior del fotobiorreactor, el cual provoca un flujo suave de retorno al rociador⁶ (ver Figura 3).

Teniendo en cuenta los anteriores aspectos, el sistema de aireador que se construyó, está constituido como se refiere a continuación:

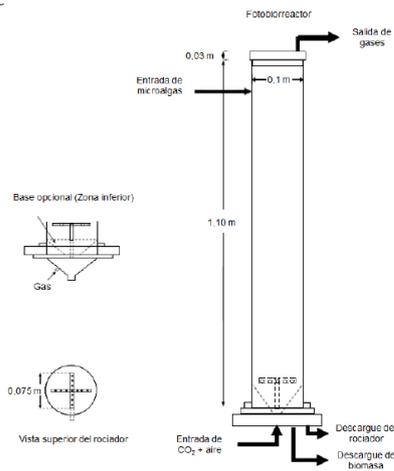


Fig. 3: Dimensiones del fotobiorreactor.

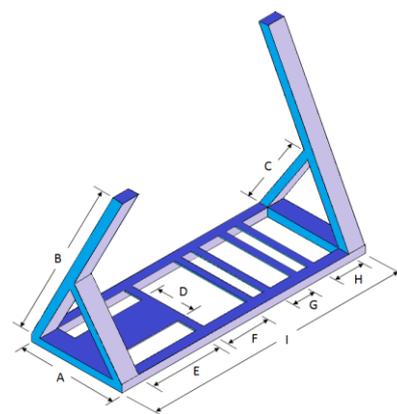
Descripción del sistema. Cuenta con una estructura de soporte (ver Figura 4) en donde se encuentra un tanque en lámina de acero al carbono, el cual tiene como función mantener el volumen de gas requerido para la inyección a los reactores tubulares. En la parte superior el tanque cuenta con una boquilla de ½ pulgada con rosca interna, en el cual se conecta una válvula de bola para su llenado, en su parte lateral se encuentra conectado un indicador de presión (130 psi para visualizar la presión del sistema).

En la parte superior central, se encuentra ubicado el panel solar el cual recibe la energía radiante. Este consta de 36 celdas cada una con 4 buses. En la parte inferior de la celda, se encuentra la caja de conexión. La función del panel es captar la energía lumínica y transformarla en energía eléctrica. Esta energía eléctrica es transferida y almacenada a una batería acumuladora que se encuentra en la parte inferior del sistema. La energía es transportada mediante cables eléctricos de cobre con cubierta protectora aislante. El tipo de energía que se genera es corriente continua.

Delante de la batería se encuentra el controlador de corriente, donde se regula su intensidad. Sobre los extremos inferiores de la estructura se encuentran dos placas que soportan los fotobiorreactores, que son dos tubos en acrílico inclinados en sentido opuestos. Estos tubos son de acrílico de 4 cm de diámetro y 1,1 m de longitud en los que ingresa el gas por la parte inferior,

mediante un sistema de difusores ubicado en la parte inferior de cada columna. El gas es transportado del cilindro a las columnas por medio de mangueras de ¼ pulgada de diámetro interno, resistente a presiones de 150 psi. Para impulsar el gas se dispone de un compresor de 130 psi, que se encuentra en la parte inferior, entre la batería y el cilindro. Este presenta un presostato que interrumpe la presión cuando llega a 70 psi y se activa cuando la presión está en 30 psi.

En la salida del cilindro se conectó una unión en T rosca de ¼ pulgada en acero galvanizado, sobre la cual se instaló, un manómetro con un rango de (0 a 140 psi), y en la segunda, una rosca galvanizada de ¼ pulgada, para instalar un suministro de gas externo con una válvula de bola de ¼ pulgada para regular su salida. La función del manómetro es la de controlar la presión del cilindro. El sistema tiene la versatilidad de instalar otros dispositivos como pH-metro, rotámetro para el tipo de estudio que se desee realizar. La estructura del sistema donde van soportados los componentes del sistema es metálica, diseñada y construida a medida, posee además rodachines de seguridad capaces de soportar el peso de la estructura y sus componentes y de ser transportada y fijada en el lugar de las pruebas (ver Figura 4). Adicionalmente, el interruptor de paro y arranque del sistema, se encuentra en la cara de la sección circular del compresor que está hacia el cilindro.



Sección	Longitud, cm	Sección	Longitud, cm	Sección	Longitud, cm
A	45	D	25	G	16,5
B	120	E	27	H	11,5
C	120	F	8,5	I	101

Fig. 4: Dimensiones de la estructura de soporte.

Compresor Goodyear. Se utilizó un compresor con las siguientes especificaciones: 61 cm de manguera. Adaptador de válvula presta cable alimentador con adaptador para encendedor de 12 V corriente continua. Cable DC de 4,87 metros de largo. Motor de transmisión directa potente, silencioso y rápido. El compresor cuenta con un manómetro analógico que brilla en la oscuridad, su presión máxima es de 130 psi y se conecta a 12 V.

Accesorios. Tubería galvanizada. Codo de 90° y T de ¼ pulgada de diámetro interno

Presostato. Este equipo se empleó teniendo en cuenta el control de flujo y para mantener una presión constante, sin afectarse por cambios en las condiciones operativas del proceso, la cual se ajustó a 70 psi.

Fotobiorreactor. Para la construcción del fotobiorreactor, se utilizaron 2 tubos en acrílico de 10 cm de diámetro y 1,1 m de longitud los cuales se ubicaron inclinados 60° con la horizontal, a cada lado de la estructura de soporte del sistema, con vista en direcciones opuestas, en cuya parte inferior ingresa el CO₂ (o el aire, según la necesidad). Esta inclinación permite un mejor aprovechamiento de la luz solar que en los dispositivos verticales y se tiene mayor tiempo de contacto entre el gas y los microalgas o microorganismos que se encuentran dispersos en el agua (ver Figura 5).

Para el difusor, se aprovechó el sistema de regadera utilizada en los baños, para lograr una mejor distribución de las burbujas.

En la parte superior se encuentra un sistema de acople en la tapa para que se puede conectar una manguera y recolectar los gases de salida.

Se utilizaron mangueras de ¼ pulgada de diámetro capaz de resistir presiones de 150 psi. Estas mangueras se son utilizadas para controlar el nivel de los biorreactores por el mecanismo de vasos comunicantes. Por lo cual debe mantenerse sobre el nivel del agua de los fotobiorreactores.

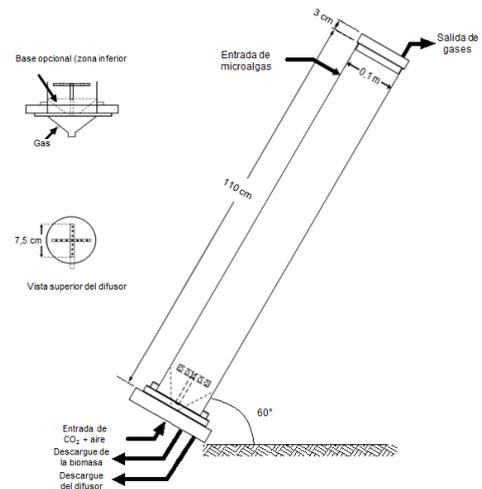


Fig. 5: Fotobiorreactor.

Fuente de energía. Para garantizar la disponibilidad de fuente energética continua y renovable, se instaló un panel solar de 100 W 12 V, es uno de los paneles con más potencia, dados los 12 amperios de corriente de salida por panel que son capaces de generar. El panel solar de 100 W policristalino de 12 V está compuesto por 36 células. Consta de con cuatro buses por célula. En la parte trasera del panel se encuentra la caja de conexiones, además de agujeros para poder atornillar el panel solar a cualquier marco. Este panel hace la recepción de la energía lumínica y la transforma en energía eléctrica.

Batería de almacenamiento. La energía fue almacenada en una batería de 12 V, con una capacidad de almacenamiento de 12 A*h, suficientes para garantizar la disponibilidad de energía eléctrica 24 horas al día. Otra gran ventaja de este sistema es que se puede desplazar a cualquier sitio, siempre que se pueda aprovechar la radiación solar.

Controlador de carga de batería y de carga solar. El controlador de carga administra automáticamente el funcionamiento del panel solar y batería en el sistema solar. Sobrecarga de protección contra cortocircuitos. Invierte la descarga de la protección de polaridad inversa. Bajo tensión y exceso de carga.

Protección. La protección contra el rayo prolonga la vida útil de la batería y mantiene así el trabajo de carga.

Esquema eléctrico del sistema. A continuación, en la Figura 6 se muestra el esquema eléctrico.

Al finalizar el montaje de todos los componentes del sistema, se realizó una prueba de arranque, para verificar el funcionamiento de cada componente del sistema. Esta prueba resultó satisfactoria.

Luego se realizó el cargue de gas al cilindro mediante el compresor. Esta operación duró 2 minutos, y al llegar al valor de 70 psi, el compresor se apagó automáticamente, con lo que se verificó el tope superior de presión.

Al pasar los 10 minutos se verificó que el sistema aún está descargando aire sin necesidad de que el compresor arranque, con lo que se verificó que cumplió con el tiempo mínimo estipulado para su funcionamiento. El compresor arrancó después de 14 minutos.

sentido, se realizó el diseño y construcción de dos biorreactores en acrílico transparente de una longitud de 1,1 m y 10 cm de diámetro lo que permitió una mayor exposición del contenido del biorreactor a la luz solar y así facilitar estudios de absorción de luz y otros posibles estudios.

Asimismo, se diseñó estructura metálica de soporte cubierta con pintura resistente a la corrosión, en donde se ubican los dos fotobiorreactores tubulares, el compresor, el regulador de presión, el controlador, el cilindro de almacenamiento de aire o CO₂, el panel solar y su batería respectiva con los accesorios necesarios para su acople y funcionamiento.

Las pruebas realizadas del diseño mostraron resultados favorables para el funcionamiento adecuado del sistema, en donde el tiempo muerto mínimo de arranque del compresor fue de 10 minutos y se registró un tiempo de 13 minutos, lo que permitió que el sistema consumiera menos energía y aumentando la vida útil del compresor.

El diseño del sistema resulta versátil, debido a que se le pueden adaptar fácilmente otros dispositivos y equipos de seguimiento y control de diversas variables además de incorporar el uso de tecnologías limpias a partir de energía renovable.

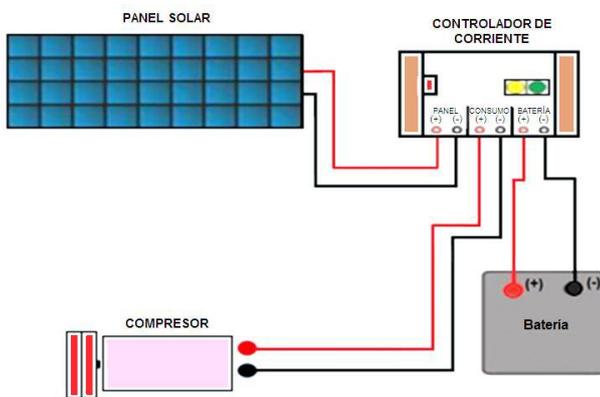


Fig. 6: Diagrama eléctrico del sistema.

CONCLUSIONES

A partir de la revisión bibliográfica referente a los diferentes sistemas de fotobiorreactores, se eligió el diseño correspondiente a los sistemas tubulares inclinados, debido a que ocupan poco espacio, se puede aprovechar de mejor manera la luz solar y retirar los gases producidos con mayor facilidad. En este

REFERENCIAS

1. José María Fernández Sevilla. Ingeniería de procesos aplicada a la biotecnología de microalgas. Cultivo de microalgas. Fotobiorreactores para el cultivo masivo de microalgas. Universidad de Almería (2014). Available at: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-7-fotobiorreactores.html>.
2. Barra, R. & Guartatanga, S. Diseño de un Fotobiorreactor Industrial para el Cultivo de Spirulina (Arthrospira platensis). *Rev. Tecnológica ESPOL* 30–36 (2010).
3. Lozano Rivas, W. A. *Diseño de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales. Módulo didáctico. Equipo de aireadores*. (Universidad Nacional Abierta y a Distancia, 2015).
4. Torzillo, G. *et al.* Production of Spirulina biomass in closed photobioreactors. *Biomass* **11**, 61–74 (1986).

5. Chisti, M. Y. *Airlift bioreactors*. (Elsevier applied science, 1989).
6. Sánchez, A., García, F., Contreras, A., Molina, E. & Chisti, Y. Bubble-Column and airlift photobioreactors for algal culture. *AIChE J.* **46**, 1872–1887 (2000).

Evaluación de la respuesta al uso de undecilinato de boldenona en terneros al momento del destete

Evaluation of the response to the use of boldenone undecylinate in calves at the time of weaning

Recibido 11 Octubre 2018,
 Aceptado 10 Diciembre 2018

www.unipaz.edu.co

Urbano José Villa Ramírez^{†a}

Resumen: El presente estudio está orientado a establecer la relación entre sustancias farmacológicas con propiedades anabólicas y ganancia de peso en terneros en fase de destete, ya que durante este periodo se presenta una marcada acción catabólica, debido a las grandes cantidades de corticoides liberados como respuesta de la glándula suprarrenal. Se procedió a la aplicación de Undecilinato de Boldenona para antagonizar el efecto adverso del estrés, se tomaron dos grupos de animales, experimental y testigo en bloques completamente al azar, en igualdad de condiciones medioambientales y de manejo. Luego del pesaje de los animales se procedió con la aplicación de 0.55 mg/kg del anabólico al grupo experimental, con una frecuencia de aplicación de cada cuatro semanas y una duración total del tratamiento de ciento veinte días, tiempo durante el cual se registró la variación de los pesos cada 28 días. Se utilizó la prueba de chi- (X^2) para estudiar la asociación entre variables categóricas por grupo de estudio, t de Student y ANOVA. Los resultados obtenidos indican que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias del grupo experimental y testigo para la variable peso; igualmente la prueba de t indica que no hay diferencia significativa ya que los promedios de los grupos son menores que la Diferencia Mínima Significativa, sin embargo el análisis económico indica que existe una mayor rentabilidad total por animal al utilizar el Undecilinato de Boldenona al momento del destete. **Palabras claves:** Engorde, Anabólicos, Destete, Ganadería, Estrés.

Abstract: The present study is aimed at establishing the relationship between pharmacological substances with anabolic properties and weight gain in weaning calves, since during this period a marked catabolic action occurs, due to the large amounts of corticosteroids released in response to the adrenal gland. We proceeded to the application of Boldenone Undecylenate to antagonize the adverse effect of stress, two groups of animals were taken, experimental and control in completely random blocks, in equality of environmental conditions and management. After weighing the animals, 0.55 mg / kg of the anabolic was applied to the experimental group, with an application frequency of every four weeks and a total treatment duration of one hundred and twenty days, during which time the variation was recorded. of weights every 28 days. The chi- (X^2) test was used to study the association between categorical variables by study group, Student's t test and ANOVA. The results obtained indicate that there is no statistically significant difference between the means of the experimental and control group for the variable weight; also the test of t indicates that there is no significant difference since the averages of the groups are lower than the Minimum Significant Difference, however the economic analysis indicates that there is a greater total return per animal when using the Boldenone Undecylenate at the time of weaning. **Key words:** Fattening, Anabolics, Weaning, Livestock, Stress.

INTRODUCCIÓN

La presencia o ausencia de estrés constituye un indicador potencial del estado de bienestar animal. Las diferentes especies animales han desarrollado diversos mecanismos tanto fisiológicos como comportamentales para adaptarse en a las etiologías estresantes, por lo cual cuando se modifica la comodidad y vitalidad se produce un cambio biológico significativo que

pone en riesgo la salud y productividad animal¹.

El presente estudio se ha orientado a establecer una relación entre anabólicos y ganancia de peso/día en terneros al momento del destete, ya que este periodo presenta una marcada actividad catabólica en el animal, en detrimento de los parámetros zootécnicos productivos; por esta razón es preciso establecer medidas oportunas y eficaces que de alguna forma disminuyan la

^a. Grupo de investigación CIDICA. Instituto Universitario de la Paz.

[†] urbano.villa@unipaz.edu.co

presentación de estas pérdidas, y una de esas formas constituye la aplicación de medicamentos que contrarresten la disminución de peso en un punto clave del desarrollo como lo es el destete.

El destete provoca cambios neuroendocrinos en los animales, asociados a un incremento en los niveles basales de cortisol, que se agudizarán en la medida de la disponibilidad y calidad del forraje suministrado².

“En 1936, Hans Selye esbozó el concepto de Síndrome General de Adaptación para definir la reacción que el organismo opone a estímulos diferentes (térmicos, tóxicos, infecciosos, traumáticos), en tres etapas a las que denominó fases de alarma (aún sin adaptación), de resistencia (adaptación lograda) y de agotamiento (pérdida de la adaptación y ruptura del estado de salud)”².

El estrés cursa con incremento de cortisol aldosterona y colesterol^{3,4}, lo que conlleva a elevadas hiperglucemias (incluso con glucosuria), que junto a las alteraciones hematológicas son los cambios más típicos del estrés, el resto de las modificaciones incluyen variaciones de analitos que reflejan cambios en los metabolismos lipídico y proteico, desbalances hidroelectrolíticos y hormonales^{2,5}.

La secreción de cortisol aumenta en situaciones de estrés, los glucocorticoides producen una movilización rápida de aminoácidos y grasas de sus depósitos corporales, lo que puede terminar generando disminución en la ganancia de peso, además de predisponer a la aparición de otras patologías asociadas a la inmunosupresión resultante como respuesta al destete⁶.

Dentro de la respuesta neuroendocrina al estrés del destete tienen vital importancia los sistemas simpático/suprarrenal y el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal, y la activación de cualquiera de los dos depende del factor estresante que está produciendo el estímulo; la activación del eje simpático/suprarrenal se denomina "síndrome de emergencia", en donde el organismo se prepara para hacer frente a peligros súbitos generando una respuesta de carácter rápida y breve, que conlleva

a la activación neuronal del hipotálamo y la liberación de adrenalina y noradrenalina desde la médula adrenal^{7, 8, 9, 10}.

Sin embargo estos efectos adversos del estrés pueden antagonizarse con sustancias farmacológicas con efectos anabolizantes sobre el metabolismo celular¹¹.

Los agentes anabólicos constituyen una alternativa para acrecentar la producción de carne, pues corresponden a hormonas que actúan sobre el metabolismo animal, mejorando el balance nitrogenado en el organismo, incrementando la producción de proteína en el mismo (ganancia de peso/día). Los anabólicos que se usan con mayor frecuencia en ganadería bovina, corresponden a análogos de las hormonas gonadales masculinas¹².

El uso de sustancias farmacológicas con propiedades anabolizantes comprende una práctica frecuente en la actividad ganadera.

Los anabólicos tienen propiedades contrarias al cortisol ya que son compuestos que tienen la capacidad de retener nitrógeno, elemento indispensable en la síntesis de proteína, además favorecen la eritropoyesis, la retención de calcio y fósforo que contribuyen a un aumento de peso, favoreciendo la recuperación en enfermedades infecciosas, stress, baja conversión alimenticia y cualquier patología que curse con baja asimilación o pérdida de peso^{3, 13}.

El undecilinato de boldenona comprende uno de los principales anabólicos empleados en veterinaria, posee la acción de retener calcio, fósforo, potasio y cloruros, además estimula el apetito por medio de la regulación metabólica, favorece la absorción de los nutrientes adquiridos por la dieta o suministrados como suplemento, favorece la eritropoyesis en órganos como bazo y médula ósea al estimular la síntesis de eritropoyetina a nivel renal¹⁴.

MÉTODOS

Se utilizaron 20 terneros destetos de 9 meses de edad, los cuales fueron llevados hasta los 13 meses, escogidos mediante bloques completamente al azar (para este estudio cada

uno de los individuos de los grupos constituyó una réplica):

- Grupo control = 10 animales, tipo Cebú comercial y mestizos.
- Grupo experimental = 10 animales, tipo Cebú comercial y mestizos.

Los animales fueron pesados al inicio del experimento y cada 28 días, posteriormente el grupo experimental recibió una aplicación de Undecilinato de Boldenona a dosis de 0,55mg/kg por vía intramuscular cada 28 días por un total de 4 aplicaciones.

Previamente cada grupo, experimental y testigo recibió el siguiente plan sanitario:

- Albendazol al 25% una dosis oral. Dosis 5 mg por kg.
- Cipermetrina al 15% por aspersión cada 20 días. Dosis: 20 cm³ por cada 20 L.
- Vacunación triple (Carbón sintomático, edema maligno, septicemia hemorrágica).

Igualmente cada grupo recibió un suplemento nutricional: (Nutriex®), 4 Kg. / animal/ d, durante el tiempo de estudio (16 semanas).

La información obtenida fue sometida a análisis de varianza por los métodos de chi² y t de student para encontrar el grado de significancia de las hipótesis planteadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con relación al lote testigo, el grupo tratado con Undecilinato de Boldenona ganó 7.5 Kg, es decir 4.3 Kg., más que el grupo no tratado. Se trataron 10 animales con un total de 80.3 mL del anabólico y un total de 4 aplicaciones por animal (Tabla 1).

En la figura 1, se observa el comportamiento del peso de los terneros para cada grupo, experimental y testigo, en cada uno de los pesajes realizados. Además se observa como en el tercer pesaje (Julio 16) los dos grupos presentan un descenso; el cual coincide con la época de mayor

estrés metabólico reportado por diferentes autores como respuesta al destete, lo que se encuentra en concordancia con lo reportado por Coppo, quien encontró que durante este periodo es cuando el ternero sufre el mayor estrés por cuanto se está dando la transformación de lactante a rumiante mediante el cambio de dieta².

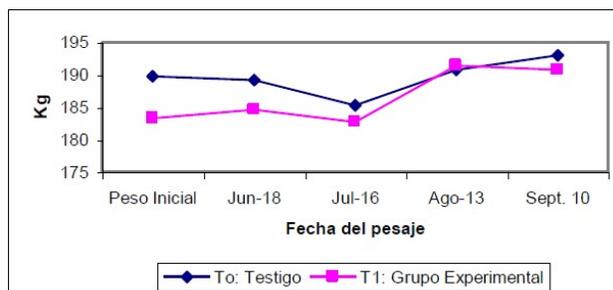


Fig. 1: Comportamiento del peso de los semovientes en cada uno de los pesajes.



Fig. 2: Peso inicial y peso final en kg de los semovientes.

Tabla 1. Parámetros analizados

Parámetros	Grupo Testigo	Grupo Experimental
N° animales	10	10
N° de días	120	120
Peso promedio inicial (Kg)	189.8	183.3
Peso promedio Final (Kg)	193	190.8
Ganancia Promedio de peso (Kg)	3.2	7.5
Ganancia diaria promedio (g)	26.66	62.5

Con relación al lote testigo, el grupo tratado con Undecilinato de Boldenona tuvo una ganancia de 7.5 Kg es decir 4.3 Kg más que el grupo no tratado.

Se trataron 10 animales con un total de 80.3 ml del anabólico y un total de 4 aplicaciones por animal.

- Valor de 80.3 ml de Undecilinato de Boldenona en Colombia para el año 2018 (octubre) es de \$ 27.302

- El precio de la carne en promedio en Colombia para el año 2018 (octubre) es de \$ 4.314/Kg. en pie.

En los 140 días que duró el ensayo los animales ganaron en promedio 7.5 Kg cada uno. La diferencia total promedio de kilos a favor del grupo tratado es de 43 kg extras. Esto quiere decir que 43 Kg extras de carne valen \$ 185.502; conseguidos con una inversión de \$ 27.302

En resumen tenemos:

El valor que se gana por los 43 Kg. extras es \$ 185.502

El valor que se invierte \$ 27.302

Utilidad \$ 130.002

Utilidad por animal \$ 13.002

A esta misma rentabilidad se le debe sumar el valioso tiempo que el animal ahorra en superar el estrés posdestete y reiniciar su actividad metabólica positiva, convirtiéndose este, quizás en el factor más importante máxime si los animales se encuentran en un sistema de levante semiestabulado en donde el tiempo de permanencia de estos en las instalaciones puede aumentar drásticamente los costos de producción, lo cual se encuentra en estrecha relación con los hallazgos de Perrota quién encontró que para lograr mejores resultados económicos de la actividad ganadera durante el destete se hace necesaria la utilización de métodos que optimicen el crecimiento y engorde de los animales en donde los promotores de crecimiento de origen anabólico representan una opción importante¹⁵.

CONCLUSIONES

No existe evidencia estadística suficiente para afirmar que con la aplicación de Undecilinato de Boldenona se incrementa de manera satisfactoria el peso de los terneros al momento del destete, ya que los datos hallados a través del análisis de varianza (ANAVA) indican que la F calculada es menor que la F de la tabla para los niveles de significancia 0.05 y 0.01.

Se observó de manera particular como durante el tercer pesaje los grupos experimental y testigo presentaron un descenso de peso, ratificando de forma innegable el periodo planteado por distintos autores como pico máximo de estrés catabólico originado por los corticoides endógenos como respuesta al destete.

A pesar de que estadísticamente no es significativa esta diferencia de peso entre los grupos experimental y testigo, se puede apreciar que económicamente es rentable utilizar el anabólico al momento del destete, ya que éste brinda la posibilidad de obtener algunos kilos de carne extra, al mismo tiempo que va desapareciendo el estrés, pues los terneros tratados con el anabólico aumentaron en promedio 4.3 kg más con respecto a los no tratados.

REFERENCIAS

1. Odeón, M.M., & Romera, S.A. (2017). Estrés en ganado: causas y consecuencias. Revista veterinaria, 28(1), 69-77. consultado el 20 de octubre de 2018, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-68402017000100014&lng=es&tlng=es
2. Coppo, J.A. (2007) REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 Volumen VIII Número 2. Consultado el 10 de Octubre del 2018, de <http://veterinaria.org/revistas/redvet/n020207/020719.pdf>.

3. Poloni L, Niebylski A, Bertuzzi M, Ashworth G, Bensi N, Yaciuk R. (1999). Influencia de dos prácticas de destete sobre los niveles de cortisol plasmático y la ganancia de peso corporal en cerdos. *Anales de las IV Reunión Latinoam. Fisiol. Vet.*
4. Patterson DJ, Coral LR, Higgins JJ, Kiracope GH, Stevenson JS. Evaluation of reproductive traits in *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred heifers: relationship of age at puberty to length of the postpartum interval to estrus. 1999. *Anim. SCI.* 70: 1994-1999.
5. Chacón, Tony C., Zerpa, Héctor, Cova, Francisco J., & Campos, Gerardo J. (2006). Efecto del estrés asociado al destete sobre variables Clínico-Patológicas y la integridad de la mucosa gástrica en Potros Pura Sangre de Carrera. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 47(2), 79-91. Consultado el 20 de octubre de 2018, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762006000200003&lng=es&tlng=es.
6. Romero Peñuela Marlyn Hellen, Uribe-Velásquez Luis Fernando, Sánchez Valencia Jorge Alberto. (2011). Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne: stress biomarkers as indicators of animal welfare in cattle beef farming. *Biosalud*. Consultado el 20 de octubre del 2018; 10 (1): 71-87, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502011000100007&lng=en.
7. Herskin MS, Munksgaard L, Ladewig J. Effects of acute stressors on nociception, adrenocortical responses and behavior of dairy cows. *Physiol Behav* 2004; 83:41-420.
8. Borell EH. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. *J Anim Sci* 2001; 79:260-267.
9. Sapolsky RM, Romero ML, Munck AU. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocrinol Rev*; 21(1):55-89.
10. Avella RE, Medellín JP. Los esteroides anabolizantes androgénicos, riesgos y consecuencias. *U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 2012;(15).
11. Correal H. Uso de anabólicos en bovinos-Produccion-animal.com.ar. [Online].; 2009, de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotores_crecimiento/27-anabolicos.pdf.
12. Centeno Torres A. (2008). Alternativas para la engorda de bovinos de abasto. Consultado 16 Octubre del 2018, de <http://www.comitepecuario.com/Ponencias/Alternativas%20de%20engorda%20para%20bovinos.pdf>.
13. Tang Ploog F. (2004). Evaluación antihelmíntica y sobre la ganancia de peso de un endectabólico (endectocida y anabólico) sobre la base de ivermectina al 1 % y Boldenona undecilinato en vehículo de larga acción en vacunos de engorde intensivo a nivel del mar. Consultado 28 de octubre del 2018, de <https://www.agrovetmarket.com/pdf/anabolico/Boldemax%20A.P/Boldemec%20L.A. Engorde 2004.pdf>.
14. Patterson DJ, Coral LR, Higgins JJ, Kiracope GH, Stevenson JS. (1999). Evaluation of reproductive traits in *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbred heifers: relationship of age at puberty to length of the postpartum interval to estrus. *Anim. SCI.* 70: 1994-1999.
15. Perrotta A. (2015). Ensayo: El uso de estimulantes del crecimiento en destete precoz bovino. Consultado el 4 de Octubre del 2018, de http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/invernada_promotores_crecimiento/86-destete_precoz_Ensayo.pdf.

Oxidación electroquímica de índigo en medios no acuosos

Electrochemical oxidation of indigo in non-aqueous media

J. F. Martínez Suárez^{†a}

Recibido 30 Octubre 2018,
Aceptado 05 Diciembre 2018

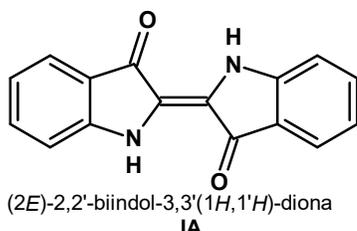
www.unipaz.edu.co

Resumen: El índigo en solución de dimetilsulfóxido se ha oxidado vía electroquímica. Como resultado del análisis de los productos de la electrolisis por HPLC-DAD-MS se detectó la presencia de isatina, anhídrido isatoico, indirubin y triptantrín. La isatina es el producto principal. Se presenta una propuesta mecanística. **Palabras claves:** índigo, oxidación, electroquímica.

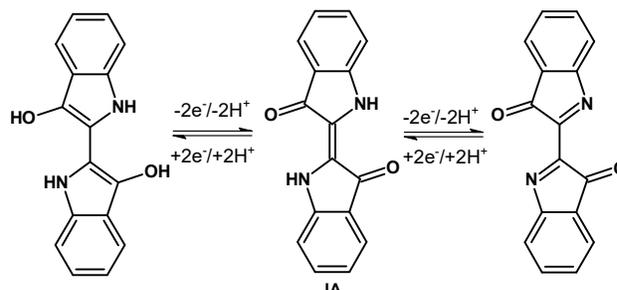
Abstract: Indigo in dimethyl sulfoxide solution has been oxidized by electrochemistry. As a result of analysis of electrolysis products by HPLC-DAD-MS, the presence of isatin, isatoic anhydride, indirubin, and triptantrín was detected. Isatin is the main product. A mechanistic proposal is presented. **Keywords:** indigo, oxidation, electrochemical.

Introducción

El índigo azul (IA) es el colorante orgánico más antiguo y conocido por el hombre, por 5000 años se ha utilizado para el teñido de textiles, principalmente jeans.¹ IA es insoluble en agua, pero soluble en disolventes orgánicos polares.²



El comportamiento electroquímico de IA (Esquema 1) ha sido previamente descrito en medio acuoso a diferentes pH.^{3,4} IA por voltamperometría cíclica se caracteriza por dos procesos reversibles de electrodo en el rango de pH de 3-11. El primer proceso corresponde con la reducción de los grupos carbonilo (C=O) y formación de la especie leuco-índigo. El segundo proceso electroquímico implica la oxidación de IA a través de los grupos -NH de la estructura del indol para producir dehidroíndigo.



Esquema 1. Comportamiento electroquímico de IA en medio acuoso.

La forma reducida de IA (leuco-índigo) soluble en agua presenta una excelente afinidad por las fibras celulosa.⁵ Leuco-índigo se puede obtener por diferentes métodos.^{6,7} Reducción química a partir de ditionito de sodio (Na₂S₂O₄) en medio alcalino,^{8,9} hidrogenación electrocatalítica con electrodos de recubiertos de Ni-Raney¹⁰ y por reducción electroquímica directa^{11,12} e indirecta empleando mediadores redox como glucosa,¹³ antraquinonas,^{14,15} naftoquinonas,¹⁶ complejos de Fe (II).¹⁷⁻¹⁹ La identificación y cuantificación de IA se ha determinado en mezclas de colorantes por voltametría de onda cuadrada,²⁰ en inmunosensores electroquímicos^{21,22} y por sensores voltamétricos en soluciones alcalinas.²³ Por otro lado, la oxidación de IA se ha investigado por vía química.²⁴ En procesos fotoquímicos en solventes orgánicos²⁵⁻²⁷ y líquidos iónicos²⁸.

^a INIFTA, CONICET, 1900. La Plata-Argentina.
[†] fer18400@inifta.unlp.edu.ar

Además, se han empleado microorganismos en procesos biotecnológicos en procesos de descontaminación de aguas.²⁹ Por métodos electroquímicos en el tratamiento de decoloración de aguas residuales de textiles,³⁰⁻³³ empleando electrodos de diamante dopados con boro,^{34,35} por oxidación indirecta con ABTS³⁶ y en mezcla de colorantes empleando sales de Co (II).³⁷ El producto principal de estos procesos es la isatina. En este trabajo parcial, estudiamos la oxidación electroquímica de IA en una solución de DMSO a escala preparativa. La electrólisis (electrólisis potencial controlada, CPE) se realizó a una temperatura de 80 °C. Se presenta una propuesta mecanicista basada en el análisis cualitativo / cuantitativo de productos.

Diseño experimental

Reactivos

IA: procedencia sintética (método de Baeyer). Purificado por lavado con ACN en Soxhlet. Los solventes no acuosos y los compuestos inorgánicos fueron purificados por métodos estándar³⁸. Todos los solventes fueron secados con tamiz molecular 4A recién activado y almacenados en una caja en atmósfera de nitrógeno seco libre de oxígeno.

Ensayos electroquímicos

La Voltamperometría Cíclica (VC) se realizaron dentro de una caja con guantes, en atmósfera de nitrógeno seco libre de oxígeno, en una convencional celda de vidrio Pyrex indivisa empleando como electrodo de trabajo un disco de carbono vítreo de 3 mm de diámetro encapsulado en Teflón, el contra-electrodo una lámina Pt de 2cm² y un electrodo de referencia de Ag/Ag⁺ (0,1 AgNO₃ M en DMSO). La superficie del electrodo se pulió con alúmina (hasta 1 μm) y posterior lavado por ultrasonido.

Electrólisis potencial constante (EPC)

Se disolvieron 0,28mmol de IA (75mg) en 50mL de 0.1M NaClO₄/DMSO seco y se introdujeron en el

compartimiento anódico de una celda dividida en dos por una placa de vidrio sinterizado, como electrodos se usaron: de trabajo C-vítreo, auxiliar una chapa de Platino, y referencia Ag/Ag⁺ (0.1 AgNO₃ M en DMSO). La oxidación se llevó a cabo a una temperatura de 80 °C en baño de silicona, aplicando un potencial de 0.55 V. El avance de las electrólisis se realizó por VC y CCF. La disolución anódica, una vez terminada la EPC, se concentró a presión reducida (presión 4 mmHg y temperatura 80 °C), posteriormente se agregaron 50mL de agua fría, y se almacenó por 24 horas a una temperatura de 4 °C, el precipitado obtenido se filtró, se lavó con 20 mL agua y se secó en una estufa a 50 °C hasta peso constante. Al filtrado se eliminó el disolvente por destilación a vacío. Los productos obtenidos fueron analizados por CCF y HPLC-DAD-MS.

Cromatografía en Capa Fina (CCF)

La CCF se empleó para el seguimiento de los procesos electroquímicos y ensayos de pureza, se utilizaron placas de sílica-gel F₂₅₄ Merck.

HPLC-DAD-MS

Las cromatografías de líquidos se realizaron en un Agilent, modelo 1100, sobre una columna de fase reversa (ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, 5 μm y 4,6 x 150 mm). La fase móvil consistió en un gradiente (60%H₂O-40%ACN) + 0.1% ácido fórmico. El λ seleccionado para el detector UV fue 254 nm. Los espectros en el detector de masas se obtuvieron mediante la técnica APCI modo negativo, con una energía de ionización de 100 eV. La abundancia relativa de cada fragmento se da con respecto al pico base del espectro, con un valor asignado de 100%.

Resultados y discusión

La Figura 1 se muestra el VC de IA en solución electrolítica de NaClO₄/DMF a temperatura ambiente, IA es electroactivo en la ventana de potencial investigada, con dos picos de reducción,

el primero cuasi-reversible a -1.13 V y el segundo irreversible a -1.90 V, y un pico de oxidación a 0.28 V. Los resultados obtenidos concuerdan parcialmente con los informados Bond³⁹ para una solución de IA en DMF en presencia de NBu_4PF_6 como electrolito soporte.

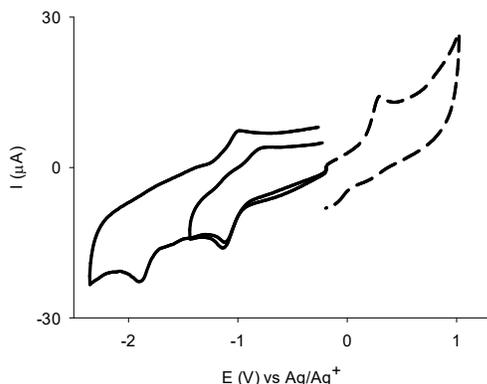


Fig. 1: VC de 0.35 mM IA en 0.1 M $\text{NaClO}_4/\text{DMF}$. Velocidad de barrido: 0.2 V/s. Temperatura ambiente. Barrido catódico (—) y anódico (---)

IA presenta una muy baja respuesta electroquímica en DMSO a temperatura ambiente (Figura 2, línea negra). Sin embargo, cuando el VC se llevó a cabo a la misma solución electrolítica a una temperatura aproximadamente de 80 °C, se observó un incremento de las corrientes de pico (Figura 2, línea roja). Estas corrientes de pico mejoradas se pueden atribuir a un incremento de la transferencia de masa mediante difusión o convección.⁴⁰ Dos cuplas reversibles de reducción a -1.11 y -1.44 V y un pico de oxidación a 0.33 V irreversible son observados con el aumento de la temperatura y se encuentran desplazados a potenciales más catódico con respecto al VC medido a temperatura ambiente (Figura 2, línea roja). Una reducción de la ventana de potencial anódica del solvente también es observada (Figura 2, línea roja).

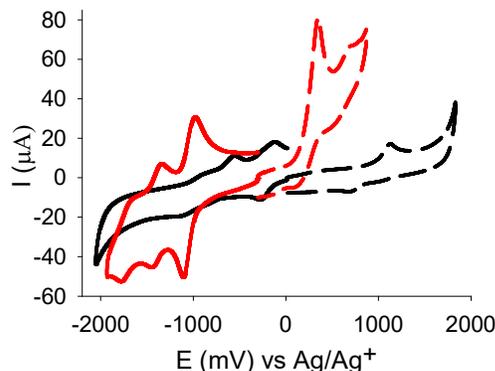


Fig. 2: VC de 5.16 mM de IA/DMSO. NaClO_4 0.1 M. Temperatura ambiente (—). Temperatura de 80 °C (—). Velocidad de barrido: 0.2 V/s.

La oxidación anódica de IA en DMSO a temperatura de 80 °C a escala preparativa presenta un consumo de carga de 4.5 mol e-/mol de IA. El análisis de los productos por HPLC-DAD-MS (Figura 3) después de ser procesada la muestra, indica la presencia de isatina, anhídrido isatoico, indirubin y triptantrín. La cuantificación de la isatina (28,5 mM), el producto principal, se llevó a cabo por el método de estándar externo.

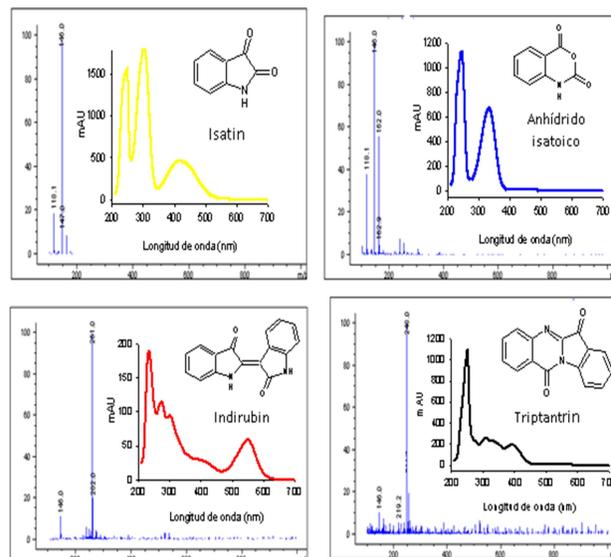
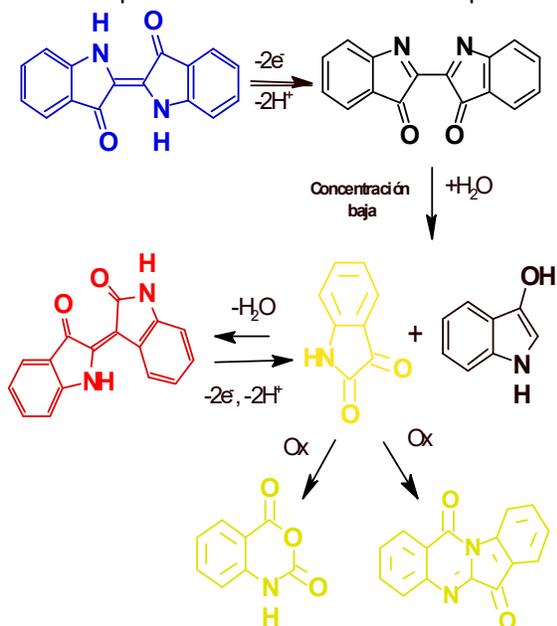


Fig. 3: Espectros de UV-Vis (DAD a 254 nm) y masa (APCI-Neg-Scan a 100 eV) de los productos de oxidación de IA: isatina, anhídrido isatoico, indirubin y triptantrín.

La formación de los diferentes productos se puede racionalizar parcialmente a través del Esquema 2.



Esquema 2. Posible mecanismo de oxidación electroquímica de IA em medio no acuoso.

La oxidación de IA comienza con la pérdida de 2mol e-/mol IA para formar dehidroindigo.³⁹ El dehidroindigo que es mucho más soluble en solventes orgánicos⁴¹ es atacado por los vestigios de agua en la DMSO, ocasionando la hidrólisis del enlace C-C en la posición 2-2' para obtener dos productos indoxil e isatina.⁴² La reacción química en fase homogénea entre indoxil e isatina favorecida por la temperatura produce indirubin.⁴³ La oxidación de indirubin probablemente ocurre al mismo potencial de IA a través de 2mol e-/mol indirubin para producir isatina.⁴⁴ La presencia de anhídrido isatoico y triptantrín está relacionada con un proceso de oxidación química en medio ácido acuoso⁴⁵ o fotoquímica de la isatina.²⁷

CONCLUSIONES

La electroquímica de IA una temperatura de 80 °C en condiciones experimentales isotérmicas permite un incremento del transporte de masa hacia la superficie del electrodo que resulta en un

aumento de las señales de corriente. Este aumento beneficia las mediciones electroanalíticas descendiendo los límites de detección. Las altas temperaturas también son útiles para mejorar la sensibilidad de los sistemas con cinética lenta. Los productos isatina e indirubin detectados por HPLC sugieren que la oxidación electroquímica de IA ocurre a través de varias etapas electroquímicas y químicas. Las reacciones químicas en fase homogénea se ven favorecidas por el incremento de la temperatura. Se propone un mecanismo de reacción para la formación de estos productos.

Referencias

1. *Handbook of Natural Colorants. Handbook of Natural Colorants* (John Wiley & Sons, Ltd., 2009). doi:10.1002/9780470744970
2. Buscio, V., Crespi, M. & Gutiérrez-Bouzán, C. A critical comparison of methods for the analysis of indigo in dyeing liquors and effluents. *Materials (Basel)*. **7**, 6184–6193 (2014).
3. Komorsky-Lovrić, Š. Square-wave voltammetry of an aqueous solution of indigo. *J. Electroanal. Chem.* **482**, 222–225 (2000).
4. Fernández-Sánchez, C. & Costa-García, A. Voltammetric studies of indigo adsorbed on pre-treated carbon paste electrodes. *Electrochem. commun.* **2**, 776–781 (2000).
5. Santhi, P. & Moses, J. J. Study on different reducing agents for effective vat dyeing on cotton fabric. *Indian J. Fibre Text. Res.* **35**, 349–352 (2010).
6. Chavan, R. B. Indigo dye and reduction techniques. in *Denim: Manufacture, Finishing and Applications* 37–67 (Elsevier Ltd, 2015). doi:10.1016/B978-0-85709-843-6.00003-2
7. Blackburn, R. S., Bechtold, T. & John, P. The development of indigo reduction methods and pre-reduced indigo products. *Color. Technol.* **125**, 193–207 (2009).
8. Božič, M. & Kokol, V. Ecological alternatives to the reduction and oxidation processes in dyeing with vat and sulphur dyes. *Dye. Pigment.* **76**, 299–309 (2008).
9. Saikhao, L., Setthayanond, J., Karpkird, T. & Suwanruji, P. Comparison of sodium dithionite and glucose as a reducing agent for natural indigo dyeing on cotton fabrics. *MATEC Web Conf.* **108**, 8–11 (2017).
10. Roessler, A., Dossenbach, O., Marte, W. & Rys, P. Electrocatalytic hydrogenation of vat dyes. *Dye. Pigment.* **54**, 141–146 (2002).
11. Roessler, A., Crettenand, D., Dossenbach, O., Marte, W. & Rys, P. Direct electrochemical reduction of indigo. *Electrochim. Acta* **47**, 1989–1995 (2002).

12. Roessler, A. & Crettenand, D. Direct electrochemical reduction of vat dyes in a fixed bed of graphite granules. *Dye. Pigment.* **63**, 29–37 (2004).
13. Vuorema, A., John, P., Keskitalo, M., Kulandainathan, M. A. & Marken, F. Electrochemical and sonoelectrochemical monitoring of indigo reduction by glucose. *Dye. Pigment.* **76**, 542–549 (2008).
14. Bechtold, T., Fitz-Binder, C. & Turcanu, A. Electrochemical characteristics and dyeing properties of selected 9,10-anthraquinones as mediators for the indirect cathodic reduction of dyes. *Dye. Pigment.* **87**, 194–203 (2010).
15. Turcanu, A., Fitz-Binder, C. & Bechtold, T. Indirect cathodic reduction of dispersed CI Vat Blue 1 (indigo) by dihydroxy-9,10-anthraquinones in cyclic voltammetry experiments. *J. Electroanal. Chem.* **654**, 29–37 (2011).
16. Komboonchoo, S. & Bechtold, T. A study on the dyeing characteristics and electrochemical behaviour of lawsone-indigo mixtures. *Color. Technol.* **127**, 153–158 (2011).
17. Bechtold, T., Burtscher, E., Turcanu, A. & Bobleter, O. Indirect electrochemical reduction of dispersed indigo dyestuff. *J. Electrochem. Soc.* **143**, 2411–2416 (1996).
18. Bechtold, T. & Turcanu, A. Electrochemical reduction in vat dyeing: greener chemistry replaces traditional processes. *J. Clean. Prod.* **17**, 1669–1679 (2009).
19. Xu, Y., Li, H., Chu, C., Huang, P. & Ma, C. Indirect electrochemical reduction of indigo on carbon felt: Process optimization and reaction mechanism. *Ind. Eng. Chem. Res.* **53**, 10637–10643 (2014).
20. Grygar, T., Kučková, Š., Hradil, D. & Hradilová, J. Electrochemical analysis of natural solid organic dyes and pigments. *J. Solid State Electrochem.* **7**, 706–713 (2003).
21. Fernández-Sánchez, C. & Costa-García, A. Competitive enzyme immunosensor developed on a renewable carbon paste electrode support. *Anal. Chim. Acta* **402**, 119–127 (1999).
22. Fernández-Sánchez, C., González-García, M. B. & Costa-García, A. AC voltammetric carbon paste-based enzyme immunosensors. *Biosens. Bioelectron.* **14**, 917–924 (2000).
23. Govaert, F., Temmerman, E. & Kiekens, P. Development of voltammetric sensors for the determination of sodium dithionite and indanthrene/indigo dyes in alkaline solutions. *Anal. Chim. Acta* **385**, 307–314 (1999).
24. Popp, P. D. The chemistry of isatin. *Adv. Heterocycl. Chem.* **18**, 1–58 (1975).
25. Kuramoto, N. & Kitao, T. Communications Contribution of Singlet Oxygen to the Photofading of Indigo. *J. Soc. Dye. Colour.* **95**, 257–261 (1979).
26. Kuramoto, N. & Kitao, T. The contribution of singlet oxygen to the photofading of triphenylmethane and related dyes. *Dye. Pigment.* **3**, 49–58 (1982).
27. Novotna, P., Boon, J. J., van der Horst, J. & Pacakova, V. Photodegradation of indigo in dichloromethane solution. *Color. Technol.* **119**, 121–127 (2003).
28. Gandra, N. *et al.* Possible singlet oxygen generation from the photolysis of indigo dyes in methanol, DMSO, water, and ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. *Tetrahedron* **62**, 10771–10776 (2006).
29. Balan, D. S. L. & Monteiro, R. T. R. Decolourisation of textile dyes indigo dye by lignolytic fungi. *J. Biotechnol.* **89**, 141–145 (2001).
30. Doğan, D. & Türkdemir, H. Electrochemical oxidation of textile dye indigo. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **80**, 916–923 (2005).
31. Haucke, G., Seidel, B. & Graness, A. The photochemistry of isatin. *J. Photochem.* **37**, 139–146 (1987).
32. Cameselle, C., Pazos, M. & Sanromán, M. A. Selection of an electrolyte to enhance the electrochemical decolourisation of indigo. Optimisation and scale-up. *Chemosphere* **60**, 1080–1086 (2005).
33. Sanromán, M. A., Pazos, M., Ricart, M. T. & Cameselle, C. Decolourisation of textile indigo dye by DC electric current. *Eng. Geol.* **77**, 253–261 (2005).
34. Bechtold, T., Turcanu, A. & Schrott, W. Electrochemical decolourisation of dispersed indigo on boron-doped diamond anodes. *Diam. Relat. Mater.* **15**, 1513–1519 (2006).
35. Ammar, S., Abdelhedi, R., Flox, C., Arias, C. & Brillas, E. Electrochemical degradation of the dye indigo carmine at boron-doped diamond anode for wastewaters remediation. *Environ. Chem. Lett.* **4**, 229–233 (2006).
36. Solís-Oba, M., Ugalde-Saldívar, V. M., González, I. & Viniegra-González, G. An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *J. Electroanal. Chem.* **579**, 59–66 (2005).
37. Sanromán, M. A., Pazos, M., Ricart, M. T. & Cameselle, C. Electrochemical decolourisation of structurally different dyes. *Chemosphere* **57**, 233–239 (2004).
38. Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*. (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/S0022-328X(00)82974-5
39. Bond, A. M., Marken, F., Hill, E., Compton, R. G. & Hügel, H. The electrochemical reduction of indigo dissolved in organic solvents and as a solid mechanically attached to a basal plane pyrolytic graphite electrode immersed in aqueous electrolyte solution. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **6**, 1735–1742 (1997).
40. Wildgoose, G. G., Giovanelli, D., Lawrence, N. S. & Compton, R. G. High-temperature electrochemistry:

- A review. *Electroanalysis* **16**, 421–433 (2004).
41. Rondão, R., De Sérgio Seixas Melo, J., Bonifácio, V. D. B. & Melo, M. J. Dehydroindigo, the forgotten indigo and its contribution to the color of Maya Blue. *J. Phys. Chem. A* **114**, 1699–1708 (2010).
 42. He, J. B., Ma, G. H., Chen, J. C., Yao, Y. & Wang, Y. Voltammetry and spectroelectrochemistry of solid indigo dispersed in carbon paste. *Electrochim. Acta* **55**, 4845–4850 (2010).
 43. Muruganandam, A. V., Bhattacharya, S. K. & Ghosal, S. Indole and flavanoid constituents of *Wrightia tinctoria*, *W. tomentosa* and *W. coccinea*. *Indian J. Chem.* **39B**, 125–131 (2000).
 44. Hu, X. W., He, J. B., You, Y. H., Zhang, Y. M. & Zhang, S. L. Spectroelectrochemistry of solid indirubin and its sulfonated form. *Electrochim. Acta* **56**, 1219–1226 (2011).
 45. McClay, K., Boss, C., Keresztes, I. & Steffan, R. J. Mutations of toluene-4-monooxygenase that alter regiospecificity of indole oxidation and lead to production of novel indigoid pigments. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5476–5483 (2005).