

# TECNOCULTURA

Investigación - Ciencia - Tecnología - Cultura

Año 3, N° 5, septiembre -diciembre del 2003

**Las políticas de apoyo  
a la Investigación,  
Ciencia y Tecnología**

**Las dificultades en el  
aprendizaje del idioma inglés**

**El concepto.  
El punto de referencia  
para enseñar y aprender**

**El uso del ácido  
dinitrosalicílico  
para la determinación  
de azúcares reductores**

# Información para los autores

La revista **TECNOCULTURA** es un órgano de difusión del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec (TESE), su publicación es cuatrimestral, e incluye artículos de divulgación y notas sobre avances científicos, tecnológicos, culturales y otras áreas del saber humano. Los trabajos que se propongan para ser publicados en **TECNOCULTURA** deben enviarse a:

Director Editorial, **TECNOCULTURA**

Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec  
Departamento de Relaciones Institucionales y Difusión  
Av. Tecnológico s/n, esq. Av. Carlos Hank González (Av. Central)  
Col. Valle de Anáhuac, Ecatepec de Morelos,  
Estado de México C.P. 55210.  
Tel: 5710 45 60 Ext.: 251  
tecnocultura@tese.edu.mx

Puesto que el objetivo principal de la revista es la difusión del pensamiento científico, tecnológico y humanístico, ya sea que se genere en las diferentes áreas académicas del TESE o de origen externo, pero que pueda ser de interés general. La información podrá presentarse en forma de artículo, ensayo, reportaje, reseña, traducción, o monografía.

Igualmente, las conferencias o presentaciones deberán adaptarse para su divulgación escrita. En todos los casos, se buscará que su contenido sea ameno y novedoso.

Los textos deberán ser elaborados en computadora, en hoja tamaño carta, a doble espacio, con tipografía Arial de 11 puntos, márgenes de 2.5 cm por lado y extensión máxima de 10 cuartillas. Los procesadores de texto útiles para este propósito son: Microsoft Word o Word Perfect, guardando el documento con la extensión.doc.

Entregar en disquete de 3 1/2" o en disco compacto, junto con una copia impresa del mismo.

Los materiales serán evaluados por especialistas seleccionados por el Consejo Editorial.

El lenguaje debe ser accesible a estudiantes de licenciatura, sin perjuicio de la información científica o académica contenida en el artículo. Cuando sea necesario el uso de tecnicismos, deberá explicarse su significado con la amplitud necesaria. Se recomienda la inclusión de recuadros que aclaren el significado de conceptos de difícil comprensión.

Dentro de lo posible, se evitará el uso de fórmulas y ecuaciones. Los artículos pueden tener subtítulos o incisos y un resumen introductorio, no mayor de cinco líneas, que atraiga el interés del lector. Las referencias bibliográficas aparecerán completas al final del documento; cuando se mencionen en el texto, deberán indicarse con un número en superíndice y por orden de aparición.

Deberán incluirse los originales de las ilustraciones o fotografías que acompañen el artículo. Las figuras y gráficas se deben elaborar en computadora a línea, sin pantallas, o dibujos en tinta china sobre papel albanene, con buena calidad. Los autores recibirán las pruebas de planas de sus artículos, con la debida anticipación, para su visto bueno.



**E**n este número, el Dr. Manuel Méndez Nonell, Director Adjunto de Ciencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), hace un diagnóstico sobre la condición que guarda hoy día la investigación científica y tecnológica en México, y describe cuál ha sido el papel representado por el CONACYT, desde su creación en 1970 hasta el presente, dentro de las políticas gubernamentales adoptadas en esta materia.

En el tema de bioquímica, se incluyen artículos de sumo interés, dos de ellos se refieren a la aplicación del ácido dinitrosalísílico (DNS) como técnica de laboratorio, en el primer caso para la cuantificación los azúcares reductores que se generan durante el proceso de fermentación o también los productos de una reacción enzimática. El otro de ellos es también una técnica de cuantificación, pero en este caso para establecer de manera rápida y precisa los microgramos de proteína en la etapa de purificación de la misma.

Los dos siguientes se enfocan al tema de la regeneración de suelos o biorremediación, la manera en que se involucran las enzimas como agentes activos, y el análisis del fenómeno biológico denominado cometabolismo, dentro del restablecimiento de suelos contaminados con sustancias xenobióticas, como los plásticos.

Por su parte, el Dr. Hugo Rodríguez diserta en esta ocasión sobre la importancia de que los estudiantes de posgrado, y en general quienes se involucran en una formación profesional superior, manejen con precisión y razonamiento lógico y científico los conceptos propios de su materia, para lo cual hace una descripción sobre la forma en que el hombre adquiere el conocimiento en su búsqueda por trascender del saber mundano al intelectual, y los conflictos formativos, académicos y orgánicos que el individuo enfrenta en este proceso.

Ya ubicados en el plano educativo, en otro artículo se explican igualmente las problemáticas que impiden a los estudiantes de habla hispana, particularmente al mexicano, el aprendizaje rápido y fácil del idioma inglés, con base en la experiencia docente de los autores.

En lo referente al binomio economía-sociedad, se presenta una monografía sobre cuáles son los cuatro paradigmas que habrán de regir la operación de las Organizaciones empresariales del siglo XXI, si es que pretenden ser competitivas y sobrevivir en un mundo globalizado, esquema que finalmente recae en el liderazgo de quienes las dirigen o tendrán su futuro en las manos.

Por último, destacamos la sección Promotores de la Ciencia y la Tecnología, que en esta ocasión presenta al Dr. Manuel V. Ortega Ortega, quien en marzo de 2003 fue nombrado Asesor para la Creación de la Fundación del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).



## DIRECTORIO

LIC. ARTURO MONTIEL ROJAS  
Gobernador Constitucional  
del Estado de México

ING. AGUSTÍN GASCA PLIEGO  
Secretario de Educación, Cultura y Bienestar  
Social del Estado de México

M. EN C. CARLOS LEÓN HINOJOSA  
Subsecretario de Educación  
Media Superior y Superior

## AUTORIDADES DEL TESE

M. EN A. URIEL GALICIA HERNÁNDEZ  
Director General

DR. VÍCTOR MANUEL LÓPEZ LÓPEZ  
Director Académico

C. P. ANÍBAL PACHECO GÓMEZ  
Director de Administración y Finanzas

M. EN C. MARIO QUEZADA ARAGÓNEZ  
Director de Vinculación y Extensión

LIC. JAVIER VILLEGAS ALTAMIRANO  
Abogado General

LIC. REYNALDO MONTUFAR OCHOA  
Contralor Interno

## CONSEJO EDITORIAL

DR. ADOLFO GUZMÁN ARENAS

DR. JUAN JOSÉ SALDAÑA

DR. FELICIANO SÁNCHEZ SINENCIO

DR. MANUEL MÉNDEZ NONELL

DR. CARLOS ORNELAS



Las políticas de apoyo  
a la Investigación,  
Ciencia y Tecnología

*Dr. Manuel Méndez Nonell*



Tecnohumor 40

4

37

Paradigmas  
de la Organización  
del siglo XXI

*Lic. René*

*Francisco Palma Avendaño*

34

Las dificultades  
en el aprendizaje del idioma inglés

*Prof. Miguel Ávalos Camino*

*Prof. Juan Carlos Sapien Medina*



Composición Portada: A la velocidad  
del mundo, Fernando Rubio Orozco

*Tecnocultura*, revista de divulgación del conocimiento científico, tecnológico y cultural del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, es una publicación cuatrimestral. El número corresponde a septiembre-diciembre de 2003, y se terminó de imprimir en enero de 2004. El tiraje es de 1000 ejemplares. *Editor responsable*: Lic. María Isabel Arroyo Pérez. *Corrección de estilo*: Lic. Rafael Ortiz Hernández. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Av. Tecnológico s/n esq. Av. Carlos Hank González, Col. Valle de Anáhuac C.P. 55210, Ecatepec, Estado de México, Tel. 5710 45 60, Fax Ext. 300, Correo electrónico: [tecnocultura@tese.edu.mx](mailto:tecnocultura@tese.edu.mx). Número de certificado de litud de título y Reserva al título de derechos de autor, en trámite. Imprenta: Creatividad Gráfica, Secc.10 Mz.1, L. 11, Col. Río de Luz, Ecatepec, Estado de México. Se autoriza la reproducción total o parcial del material publicado en *Tecnocultura*, siempre y cuando cite la fuente. Los artículos son responsabilidad de los autores. Número de Autorización del Comité Editorial de la Administración Pública Estatal CEAPE A: 205/4/024/03-3.

<http://tecnocultura.tese.edu.mx>

DNS: una técnica decuantificación de azúcares reductores utilizada en el laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE

*Mtra. Aurora Martínez Trujillo*



7

## *contenido*

El concepto.  
El punto de referencia  
para enseñar y aprender

*Dr. Hugo Rodríguez Uribe*

10

Un método rápido  
y sensible para la cuantificación  
de microgramos de proteína

*Marion M. Bradford*

16

20

Ingeniería de enzimas para  
una mejor biorremediación

*Jemie Trombly*



24

El uso del ácido  
dinitrosalicílico

*Gail Lorenz Miller*

28

El cometabolismo  
y la biorremediación  
de suelos

*Dra. Ma. del Rosario*

*Peralta Pérez*

31

Incremento de la  
transferencia de masa

*Dra. Mayola García Rivero*



# Las políticas de apoyo a la investigación, ciencia y tecnología

Conferencia

Dr. Manuel Méndez Nonell\*



“México destina hoy día el 0.4% del PIB a investigación y desarrollo experimental, es decir, en un país de más de 100 millones de personas, sólo 45 mil se dedican al quehacer científico y tecnológico, de éstos se considera que sólo 25 mil son investigadores, de los cuales 16 mil están registrados en el Sistema Nacional de Investigadores. De ellos, sólo mil están en el área de ingeniería civil, industrial, eléctrica, electrónica, mecatrónica, química, física, etcétera”, destacó el Dr. Manuel Méndez Nonell, durante su conferencia titulada “Políticas de apoyo a la investigación, ciencia y tecnología”, celebrada en el marco del XIII aniversario del TESE.

El Dr. Méndez Nonell es ingeniero Químico Metalúrgico, egresado de la Facultad de Química de la UNAM, con doctorado en Ciencias por la Universidad de Inglaterra. Ha publicado más de 70 artículos científicos en revistas especializadas y ha impartido conferencias en diversos foros nacionales.

En el año 2001 recibió la medalla al mérito metalúrgico, otorgada por la Universidad de Cracovia, en Polonia. Las líneas de investigación que ha cultivado se relacionan con el tratamiento del metal líquido y procesamiento de solidificación en metal. Ocupó los cargos de secretario académico y secretario de planeación del CINVESTAV de 1995 al 2001, y actualmente es Director Adjunto de Ciencia del CONACYT.

“Todo el mundo, científicos, gobernantes, industriales, políticos y la sociedad en general de cualquier país, reconocen a la ciencia y la tecnología como elementos sustanciales en las transformaciones políticas, económicas y sociales de cualquier nación, México desde lue-

\*Director Adjunto de Ciencia del CONACYT

go, no es la excepción, ocupa diversos lugares predominantes en el Consejo Mundial de Naciones por Población”, señaló el expositor, quien apoyado con material audiovisual, presentó el siguiente cuadro comparativo que muestra los sitios ocupados por México a nivel global:

Concepto	Lugar Mundial
Población	8°
PIB	9°
Territorio	11°
Exportación Bienes	12°
Inversión en Ciencia y Tecnología	25°
Competitividad	46°
Urbanización	49°
Desarrollo Humano	54°

“Como pueden ver, vamos disminuyendo desde un buen lugar en población y riqueza nacional hasta un vergonzoso lugar 54 en términos de desarrollo humano; de este tamaño es el reto que como país tenemos, y en los términos de ciencia y tecnología creemos que se juega un papel importante en el desarrollo del país, pues en esta nueva sociedad global, el conocimiento es el capital humano que hace la gran diferencia”, destacó el Dr. Manuel Méndez.

Añadió que “hay una relación profundamente estudiada, desde el punto de vista académico, entre la inversión, la investigación, el desarrollo y el gasto que hace un país en ciencia y tecnología, con la competitividad y la calidad de vida reflejada en términos de ingreso *per cápita* de la población. Estados Unidos por ejemplo, con cerca de un 2.7% en gasto del PIB en ciencia y tecnología, se ubica en una posición competitiva primaria, número uno a nivel mundial, con un ingreso *per cápita* varias veces mayor al que tiene un país como el nuestro. Vemos que países como España, que hace 30 años tenía un desarrollo económico y social más rezagado que el nuestro, ahora ha marcado, junto con Corea y Brasil, una enorme diferencia con países como México, en donde con un 0.4% del PIB ocupamos el lugar 33 y tenemos ingresos *per cápita* de poco más de cinco millones de dólares al año”.

“Mucha gente –continuó– cree que solamente los países ricos invierten en ciencia y tecnología, y es exactamente al revés, los países que en algún momento hicieron inversiones importantes en este rubro han alcanzado riquezas, como Japón o Corea, que no cuentan con recursos natu-

rales ni petróleo pero han logrado la supremacía mundial en tecnología. En nuestro país, tenemos una composición del aparato productivo distribuido de la siguiente manera: el 39% de nuestra manufactura se encuentra en una industria de baja capacidad tecnológica, un 29% de media a baja y el 24% entre mediana y alta, con sólo el 7% considerado de alta capacidad tecnológica”.

El Dr. Méndez Nonell mencionó que en los últimos 20 años, con la entrada de México al GAT, la inversión extranjera, la industria maquiladora y la firma de tratados de libre comercio, el país evolucionó en diferentes ámbitos, pero el gasto destinado a la investigación, que hace 40 años era de un 0.2%, sólo se elevó a un 0.25% y la necesidad de gasto para el 2025 es de por lo menos 2.0% para ubicar a nuestro país en el selecto grupo de naciones con inversiones sustantivas en el desarrollo científico.

En cuanto al rubro de la investigación, el expositor puntualizó: “México se ha distinguido históricamente por sus condiciones petroquímicas y minero-metalúrgicas, sin embargo, en el Sistema Nacional de Investigadores tenemos sólo un investigador en metalurgia y siete en petroquímica; de los 15,000 estudiantes becarios del CONACYT en todas las áreas del conocimiento, únicamente seis estudian Ingeniería Minera y sólo ocho Ingeniería Petroquímica, uno o dos son doctores y los demás, Maestros en Ciencias; esto es grave en un país con tanta riqueza, con tanto potencial petrolero y minero”.

Destacó también, que “en términos de publicaciones científicas y tecnológicas, estamos produciendo cerca de cinco mil artículos al año, publicados en revistas internacionales. En cuanto a las patentes, en el país son registradas poco más de seis mil anualmente, pero sólo el 10% son de inventores mexicanos. En el padrón de posgrados, tenemos 650 en todo el país y en todas las áreas del conocimiento; existen cuatro mil programas de posgrado, pruebas de maestría, pruebas de especialidad y pruebas de doctorado. De esos cuatro mil programas registrados ante la Secretaría de Educación Pública, sólo 650 son de calidad, y como un dato adicional, existen cerca de 12 mil instituciones y empresas dedicadas a la ciencia y la tecnología en todo el país.

Respecto al apoyo que se ha dado en México a la ciencia y la tecnología, el Dr. Méndez dijo: “El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), se fundó en 1970 para apoyar y promover la investigación científica y tecnológica, la formación de recursos humanos y la divulgación. Durante los primeros 30 años, el CONACYT venía operando con un modelo dirigido a la oferta del conocimiento; mediante una convocatoria anual

se invitaba a la comunidad científica a realizar propuestas sobre lo que los investigadores hacían en ciencia básica, en ciencia orientada, en investigación aplicada y en el desarrollo de la tecnología; esto operó durante todo ese tiempo, además del apoyo a la formación de nuevos científicos y nuevos tecnólogos. Sin embargo, los estudiantes eran respaldados para estudiar lo que quisieran, en donde quisieran, sin observar si tales estudios estaban realmente enfocados a las necesidades de desarrollo del país e incluso a las posibilidades de empleo. Históricamente, el modelo fue justificado porque apoyó a mucha gente para estudiar maestrías, especializaciones y doctorados, siendo la base del aparato científico nacional en ese momento; pero ahora el modelo de apoyo a la investigación está orientado a atender y articular este aparato científico nacional y a cubrir las necesidades de los usuarios del conocimiento.


“Para modificar el modelo —explicó el ponente— fue menester contar con estrategias y etapas para todo el sistema nacional de ciencia y tecnología; la primera etapa del cambio fue la emisión del Programa Nacional Especial de Ciencia y Tecnología, documento por medio del cual el gobierno federal rige la ruta a seguir en los próximos seis años, es un ejercicio de planeación estratégica de la mayor importancia para la política de México y tiene tres objetivos fundamentales: uno, contar con una política de estado en materia de ciencia y tecnología estable que permita a los programas de largo plazo culminar sus objetivos, sin verse afectados por cambios en las políticas de cada administración; dos, incrementar la capacidad científica de nuestro país, y tres, incrementar el espíritu de innovación y competitividad tecnológica del aparato productivo nacional.

“Durante los anteriores tres años, los diputados, legisladores y el Ejecutivo Federal han coadyuvado a la transformación de la ciencia y la tecnología en México, a través de la regulación de leyes de la Ciencia y la Tecnología que involucran a las secretarías de Estado, al CONACYT y a todas aquellas instancias vinculadas con el quehacer científico, pues en realidad éste es un asunto de la sociedad entera. Ahora se incentiva a los empresarios a participar en el desarrollo de la ciencia y la tecnología por medio de reducciones fiscales aplicables a los ejercicios inmediatos a la presentación de todos los gastos que éstos realizan en dicha materia; todo ello se suma al esfuerzo realizado en materia de cooperación internacional, con agencias, instituciones e investigadores que pueden potenciar su trabajo con otros investigadores.

“Debemos también —enfaticó— evaluar el impacto en cien-

cia y tecnología, para determinar si los trabajos realizados están incidiendo directamente en la sociedad; por último, es necesario incrementar notablemente la cantidad de investigadores en nuestro país, y de los centros de investigación y de posgrados”.

Para concluir, el Dr. Manuel Méndez se refirió a los mecanismos de financiamiento: “los fondos CONACYT están presididos por los gobernadores de cada estado, quienes tienen la capacidad de determinar cuáles son las necesidades básicas propias de su entidad, pues cada una de ellas tiene problemas muy específicos. Los fondos mixtos son otra variante de subsidio que actualmente ofrece el CONACYT, aunque para conseguir un equilibrio en las capacidades científicas del país, debemos regular la cantidad de investigadores con que cuentan los estados, pues nos encontramos ante diferencias abismales”.

“Con esta nueva fórmula se ha logrado reunir cerca de dos mil millones de pesos, a diferencia de los 700 millones de pesos que se invertían anteriormente en materia de ciencia y educación, además de enfocar las investigaciones a trabajos que repercutirán directamente en el desarrollo de nuestro país. (...) Creemos que con un modelo orientado a las necesidades de México, se van a poder aprovechar mejor nuestros recursos humanos y financieros en apoyo a la investigación”, finalizó. 





# DNS: una técnica de cuantificación de azúcares reductores

Utilizada en el Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE

Mtra. Aurora Martínez Trujillo\*

Como ingenieros bioquímicos, irremediablemente llegamos a enfrentarnos con el montaje de técnicas que nos permitan analizar las muestras resultantes de los experimentos que realizamos, y poder así generar las conclusiones adecuadas a ese respecto. Una de las técnicas analíticas que aprendemos desde que estamos estudiando, es la desarrollada por Miller (1959). Esta técnica sirve para cuantificar los azúcares reductores producidos durante una fermentación o para cuantificar los productos de una reacción enzimática.

Con el paso del tiempo y el vertiginoso desarrollo de la tecnología, después de casi 50 años, esta técnica ha sufrido algunas modificaciones, sin embargo, en esencia sigue siendo lo mismo. Cada laboratorio que la emplea, debe respetar la composición del reactivo DNS, aunque puede modificar las cantidades de reactivo y de muestra que empleará. Es importante recordar que siempre que hagamos una modificación, debemos comprobar que no se está afectando la linealidad del método. El presente trabajo describe detalladamente la técnica utilizada por el Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE, para la cuantificación de azúcares reductores de las muestras generadas durante el desarrollo de los diversos proyectos de investigación que se trabajan.

## Preparación del reactivo DNS

La composición de este reactivo, en g/l es: Es importante recalcar que, para po-

der disolver el ácido dini-trosalicílico, el hidróxido de sodio deberá estar completamente disuelto.

Una vez preparado, el reactivo deberá almacenarse en un recipiente color ámbar, a temperatura ambiente. Este reactivo dura aproximadamente un mes antes de mostrar precipitación de los reactivos o vestigios de descomposición. Debido a lo anterior, se recomienda hacer los cálculos adecuados para preparar sólo la cantidad requerida de reactivos y evitar el desperdicio.

## Elaboración de la curva patrón

Según la ley de Lambert y Beer, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del material que absorbe la luz, al que generalmente conocemos como analito (Rubinson y Rubinson, 2000). Siempre que se utiliza un método espectrofotométrico para cuantificar la concentración de analito presente en una muestra proble-



\*Profesora investigadora del Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE.

ma, es necesario relacionar la concentración de dicho analito con la cantidad de luz que absorbe del haz que le incide. Sabiendo que ésta es una relación aproximada-

Hidróxido de sodio granular	10
Ácido dinitrosalicílico	10
Sulfito de sodio anhidro	0.5
Fenol	0.2

mente lineal, lo más recomendable es preparar una solución estándar, con una concentración conocida de analito y hacer diversas diluciones de la misma, para poder obtener dicha relación y expresarla matemáticamente con la ayuda de la ecuación de la recta,  $Y = mX + b$ . En este caso,  $m$  será la pendiente de esta recta,  $b$  la ordenada al origen,  $X$  será la concentración de analito, y  $Y$  la absorbancia observada para cada concentración. La técnica de DNS cuantifica, como máximo, una concentración de azúcar de un mg/ml. Por lo tanto, la solución estándar deberá tener esa concentración.

A partir de esta solución se deberán realizar las diluciones correspondientes para construir una curva patrón, con la que se determinará la concentración del analito en la muestra problema, a partir de la ecuación de la recta antes mencionada. Las diluciones que servirán para la construcción de la curva deberán realizarse por duplicado, a fin de construir la curva con los promedios de las dos lecturas obtenidas por cada dilución. Además, deberá indicarse dentro de la gráfica la desviación estándar de las lecturas, para poder así validar la precisión en el trabajo del analista. Por tal razón, cada vez que se prepare el reactivo DNS es necesario construir una curva patrón, con la que se cuantificará el analito de las muestras tratadas con ese reactivo en específico.

Es importante mencionar que, si se tiene la sospecha de que la muestra problema posee una concentración mayor a un mg/ml, será necesario realizar una dilución de la misma, previa a la determinación, para asegurar que las lecturas podrán ser interpoladas en la curva patrón.

### Reacción del azúcar con el DNS

Todas las muestras, tanto las que componen a la curva patrón como las que constituyen el problema, deberán tratarse utilizando el procedimiento que se describe a continuación:

*Paso 1.* Se deberá tener un ml total de muestra. Cuando se requiera de una dilución, se pondrá una cantidad ade-

cuada (menor a un ml) de la muestra que contiene el azúcar, y se completará a un ml utilizando agua destilada. De tal forma que, si se utilizan 0.5 ml de muestra, se deberá agregar 0.5 ml de agua, para completar a un ml.

*Paso 2.* Una vez completado el volumen, se agregarán tres ml del reactivo DNS y se someterán a ebullición durante cinco minutos. Los tubos se podrán enfriar al chorro del agua o bien podrán dejarse enfriar por sí solos hasta que alcancen la temperatura ambiente.

*Paso 3.* Se deberán agregar seis ml de agua, para completar un volumen final de 10 ml, y se agitarán en el vórtex.

*Paso 4.* Los tubos deberán leerse a 550 nm, calibrando con el blanco, el cual contiene todos los reactivos, excepto el problema. Es decir, contiene un ml de agua, tres ml de DNS y seis ml de agua.

### Se propone un ejemplo

En el Laboratorio de Catálisis Enzimática se montó una práctica en la que se requería conocer el comportamiento de una levadura durante una fermentación aerobia, con respecto a su crecimiento y consumo de sustrato. El azúcar utilizado en el medio de cultivo fue glucosa, en una concentración de dos g/l. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se analizó la cantidad de azúcar presente.

Lo primero que se elaboró fue la curva patrón, para ello se preparó una solución de glucosa anhidra con una concentración de cuatro mg/ml, y por duplicado se hicieron las diluciones indicadas en la tabla 1.

A cada uno de estos tubos se les agregó tres ml del reactivo DNS y se sometieron a ebullición durante cinco minutos. Cuando los tubos alcanzaron la temperatura ambiente, se les agregó seis ml de agua y se leyeron en el espectro a 550 nm. La figura 1 nos muestra la relación lineal que existe entre la concentración de la glucosa en las muestras y la absorbancia obtenida. Como puede observarse, la gráfica es lineal en todo el rango probado, y la desviación estándar es pequeña en cada concentración, lo que nos indica un buen trabajo del analista.

Tubo	Solución patrón (ml)	Agua (ml)	Concentración de glucosa (mg/ml)
0	0.0	1.0	0.0
1	0.2	0.8	0.2
2	0.4	0.6	0.4
3	0.6	0.4	0.6
4	0.8	0.2	0.8
5	1.0	0.0	1.0

Tabla 1. Preparación de la curva patrón para cuantificación de azúcares utilizando el reactivo DNS

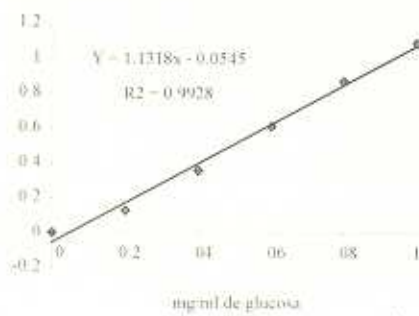


Figura 1. Curva patrón de glucosa

Debido a la concentración de glucosa en el medio de cultivo, fue necesario hacer una dilución 1:10 de las muestras tomadas, antes de determinarles su contenido de azúcar. Para ello se tomó un ml de la muestra y se agregó 0.9 ml de agua, para completar un ml. Una vez hecha la dilución, a cada muestra se añadió el DNS (tres ml). Los tubos se dejaron en ebullición durante cinco minutos, inmediatamente se dejaron enfriar para agregarles seis ml de agua, completando así el volumen a 10 ml. Estos tubos se leyeron en el espectrofotómetro a 550 nm, calibrando el equipo con un blanco, preparado con todos los reactivos, excepto el problema.

La tabla 2 muestra las lecturas obtenidas después del tratamiento con DNS.

Tiempo (h)	Lectura 1	Lectura 2
0	0.444	0.385
2	0.355	0.387
4	0.323	0.315
6	0.298	0.275
8	0.256	0.262
10	0.243	0.256
22	0.131	0.163
24	0.102	0.105
26	0.014	0.015
28	0.013	0.017

Tabla 2. Lecturas de las muestras de azúcar de la cinética

Las lecturas obtenidas al analizar las muestras en el espectro (Abs), se sustituyeron en la siguiente ecuación:

$$X = \frac{Y - b}{m} = \frac{\text{Abs} + 0.0545}{1.1318}$$

Con esta ecuación, se tenía la cantidad de azúcar, en g/l. Considerando la dilución, era necesario multiplicar por 10 todos los resultados, y así se obtuvo la concentración de glucosa en cada tiempo de la fermentación. La tabla 3 muestra la concentración por cada lectura, así como los promedios y la desviación estándar de los azúcares.

Al graficar el promedio de las lecturas (Figura 2), observamos el consumo de sustrato de la levadura durante la fermentación.

Tiempo	Azúcares 1 (g/l)	Azúcares 2 (g/l)	Azúcares promedio (g/l)	Desviación estándar
0	4.404	3.887	4.146	0.365
2	3.618	3.905	3.761	0.203
4	3.339	3.264	3.302	0.053
6	3.118	2.911	3.015	0.146
8	2.750	2.801	2.776	0.036
10	2.632	2.743	2.688	0.078
22	1.643	1.926	1.784	0.199
24	1.389	1.412	1.400	0.016
26	0.610	0.609	0.610	0.0006
28	0.602	0.636	0.619	0.024

Tabla 3. Cálculos de la glucosa contenida en el medio de cultivo a diferentes tiempos de la cinética

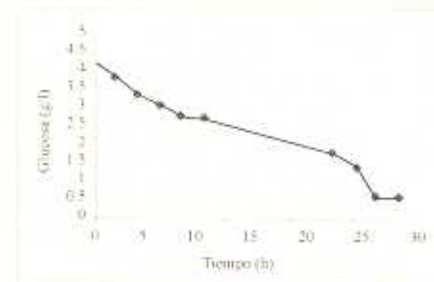


Figura 2. Cinética del consumo de sustrato de *Saccharomyces cerevisiae* durante una fermentación aerobia

## Agradecimientos

A los alumnos: María del Carmen Domínguez Reyes, Martha Elena Escalona Domínguez, Noemí Negrete Valenzuela, Ernesto Rocha López y Nancy Aurora Rosales Toledo, estudiantes del sexto semestre de Ingeniería Bioquímica, quienes participaron en el desarrollo del trabajo que se presentó como ejemplo en este artículo.

## Bibliografía

- Miller, G. L. 1959. "Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar". *Anal. Chem.*, Vol. 31, No. 3, 426-428.
- Rubinson, J. F. y Rubinson, K. A., 2000, *Química Analítica Contemporánea*, Edit. Prentice Hall Hispanoamericana, 1ª edición, México, D. F., pp. 331-333.

# El concepto.

## El punto de referencia para enseñar y aprender

Dr. Hugo Rodríguez Uribe\*

demia?, ¿cómo le afecta el entorno? Son preguntas que nos ocupan para elucidar un derrotero factible en el largo decurso de su actualización formativa.

En su apertura al mundo, encontramos a un estudiante que se deja envolver en la lectura, sin mediar un saber previo que posibilite su reflexión crítica. En la interpretación del texto no se hace evidente su déficit por sí o desde la exterioridad crítica; de ahí que omita recuperar un contenido esencial. En realidad, el saber del estudiante no reporta alternativa circunscrita en la teoría del conocimiento. Como se sabe, la epistemología es argumento vital para elucidar el modo como se construye un corpus teórico. Sin ese pertrecho medular, la lectura languidece.

El problema se ensancha cuando revisamos el apoyo bibliográfico que comúnmente se ofrece como el fondo de la consulta. La bibliografía que acompaña al alumno es mínima y no pertinente, en ocasiones es mediación de pensamiento o carece de valor académico. Ese mar de confusión no debería ser obstáculo para la conciencia, si ésta sabe navegar. Las técnicas no son aquí la respuesta como un modo de edificar el saber. Sin pertrechos para sortear aguas turbias el estudiante queda sin juicio para refutar. Así llega a suponer lo impropio: hace referencia a ese marco de lectura (que a la postre algo ha de servirle), empero no está en posibilidades de discernir el valor de ese residuo. Ignora que en la aproximación al texto, cuenta más cómo se construye el conocimiento, y no el qué o la nominación genérica de la cosa.

La escritura, al margen de ese conocimiento necesario, declina en igual forma. Citar y operar la cita de intelectuales es, al parecer, un acto mecánico. Dejamos de lado nuestro propio juicio, la duda que bien podemos sostener sobre el pensamiento escrito, el subsidio que podamos hacer a ese pensamiento. El sesgo o postura hipotética que nos proponemos para dar una columna vertebral a las ideas, no es registro posible. La intelectualidad se precipita en su caída. Si no es evidente el dominio en el manejo

### I. ¿Con quién tratamos?

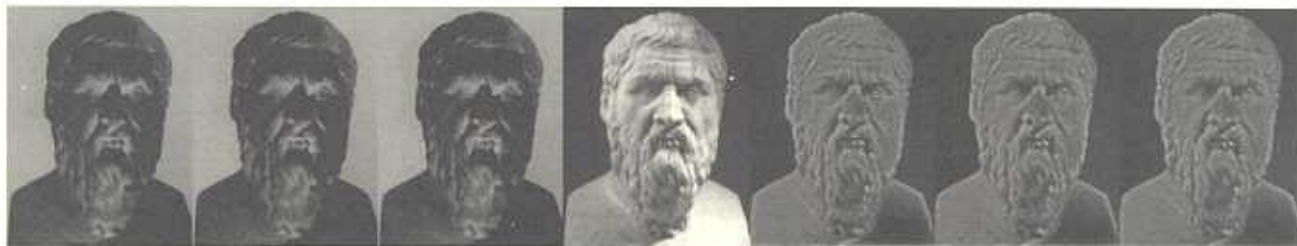
Hablar de la necesidad intelectual del estudiante de posgrado y del mundo que le rodea, es enunciar las condiciones que hacen posible su actualización. Es lo que ha de considerarse como un factor ontológico, ineludible para comprender la situación limitativa del discípulo y los factores que posibilitan su ascenso académico. El estudiante es apertura al mundo, pero también reciente el influjo de ese mundo ¿Cómo se muestra ante la aca-

\*Profesor catedrático de la División de Posgrado del Colegio de Estudios de Posgrado de la Ciudad de México. [cvposgrados@prodigy.net.mx](mailto:cvposgrados@prodigy.net.mx) [colposgrados@starmedia.com.mx](mailto:colposgrados@starmedia.com.mx)



de la cita, ¿qué ha de hacer el estudiante para re-crear y fundar su saber?

Una conciencia carente de modos o estilos para desestructurar el texto, o bien para construir la escritura, sufre dificultades para adelantar en el entendimiento de la metodología científica y de sus criterios de comprobación. Sin conocer qué es el objeto de estudio, sin andamiaje para soportar la estructuración de una idea propia, sin saber cómo puede subsidiarnos el pensamiento de un intelectual o cómo lo habremos de subsidiar, el derrotero científico se torna escabroso. Si el déficit se padece en la base misma del saber, ¿cómo problematizar la ciencia?, ¿cómo esclarecerla en términos hipotéticos y en apego a la sistematización del conocimiento? La dificultad aflora antes de abordar la metodología científica; la problemática emerge asociada con las habilidades previas, esto es, en el acto de leer y escribir.



Cuando eso ocurre, el método para conocer y construir el predicado científico amanece en el desconcierto. Podemos afirmar, en esa medida, que es poco probable alcanzar expectativas de investigación o de aplicación de la ciencia, en cuanto es un recurso de la modernidad educativa, si entre tanto se ignoran las bases para realizar hermenéutica o estructura textual.

¿Qué causalidad gesta ese estado del arte? Sin la menor duda, un modo o estilo de conocer que es ajeno a la academia. Se precisa entender que una cuestión es tratar las cosas o los objetos que nos rodean, al modo como lo hacemos en la cotidianidad, y muy otra, construir el saber sobre los objetos o los sujetos con el rigor académico. El estudiante que nos proponemos formar se encuentra impregnado de saber mundano, del saber que se da en la vida, lo cual no es en realidad contenido innecesario. El vínculo dialógico reclama esa condición como base del intercambio. En la relación con el otro, no nos desenvolvemos con estricto saber científico, todo lo contrario, la apariencia nos es consustancial e indispensable.

Decir lo fenoménico de la cosa: el qué de su existencia, sus partes constitutivas, las características distintivas, las fun-

ciones de las partes, la nominación genérica, el cómo se desenvuelve, e incluso llegar a señalar su lugar en la vida, no es en rigor amar el concepto. Sin embargo, eso es vital cuando se trata del lenguaje ordinario. La conversación fluida requiere un mínimo de intuición conceptual. Saber en la inmediatez el sentido de los términos, en cuanto son inacabados o imperfectos, posibilita que nos comuniquemos y obtengamos entendimiento. Así ocurre la vida en su estación fenoménica.

La problemática que arrastramos emerge cuando el lenguaje cotidiano es constitutivo del discurso escolar, o cuando es contenido de las fuentes escritas.

El corpus teórico no surge ajeno a nuestras pretensiones formativas, nos es accesible porque administra nuestro léxico, nuestra particular forma de definir y comprender. El entorno textual no es por tanto excluyente, nos ajusta a un

marco de conformidad. Si el texto no edifica conceptos con el rigor epistémico, si éstos son en lo general intuiciones, tal y como las usamos en la comunicación, es seguro que el contenido de una obra nos resulte ajeno a nuestro entendimiento.

El problema que ya se deja entrever, radica en la distancia que tomamos respecto del rigor académico. Como ya se expresó, el orden de la vida no es el orden de la academia. Si los libros o el discurso son lenguaje mundano, si no consiguen plantear un mundo ajeno, si son en lo general el lenguaje que no se atiene a conceptos académicos, son en esencia lenguaje que nos concierne. Empero, esa accesibilidad no es progreso en el rigor epistémico, si bien en ese otro territorio se amerita una racionalidad distinta, y es seguro que por ser distinta nos resulte menos posible conseguirla.

En tal circunstancia, las estructuras de la conciencia no sólo requieren cimientos nuevos, también han de fundarse complejas. El racionalismo de Spinoza y Leibniz ya planteaba, en el contexto de la abstracción matemática, la complejidad de una estructura que se proponía comprender la realidad. De las estructuras estáticas se transitó a la conceptualización del movimiento y, no obstante, el racionalismo fue insuficiente. La vida habló de mayor complejidad y sobre todo de contingencia.

Lo que se dice y lo que entendemos es complemento que desdeña todo acto hermenéutico, si entre tanto no comprendemos con saber alternativo. Si el lenguaje de la vida es contenido del libro y si para leer ocupamos ese lenguaje, es seguro que entremos en un *circulus vitiosus*. Suponemos entonces que leer es tan simple como aprender a decodificar símbolos lingüísticos y que no es requerido un ejercicio ulterior para cuestionar el texto o bien para interpretarlo. La pretensión reproductiva es el acto primario y a la postre el medular.

Escribir es en igual forma un acto tecnológico, carente de reflexión. ¿Cómo ocurrió esa conformidad acrítica? Sin duda por un saber que no es, en modo alguno, alternativo. Si nos aproximamos al texto con el lenguaje mundano, es seguro que no lo encontremos extraño, porque demanda ocupar esa sintaxis lógica. Puede decirse, en respaldo de lo precedente, que el texto no se atiene al fundamento conceptual. Cuando no ocurre así, la propuesta discursiva es distante de la academia, difícil de desentrañar. Las máximas o la retórica discursiva se resumen indecifrables, porque no son correlato de lo esencial en cuanto es objetivo o concreto.

Decir que la calidad educativa implica fundar la reflexión o la mejora académica, es invocar la nada. ¿Qué significa reflexionar?, ¿cómo opera la conciencia frente al objeto que es reflexionado?, ¿cuáles son los supuestos que le dan curso?, ¿qué elementos son esenciales en el contenido de una obra para dar pie a la reflexión?, ¿cuándo o bajo qué condiciones es posible conseguir un estado pleno de reflexión? En el otro aspecto: ¿qué es lo académico?, ¿qué criterios dan sustento a una calidad aceptable en la academia?, ¿cuál es el origen de esos criterios?, ¿por qué es deseable una miríada de criterios y no otra?, ¿cómo se propician esos criterios? Puede afirmarse que proferir la sentencia genérica es colocarse en un vórtice de dudas; desentrañar respuestas a los cuestionamientos esenciales que subyacen a esa sentencia, es aproximarse al entendimiento y al concepto que es posible asignar a los fenómenos educativos. Por ahora, en el discurso oficial y en buena parte de la obra escrita, tal pareciera que esa preocupación intelectual no es fundamental.

El pensamiento filosófico, en cuanto es teoría de conocimiento o epistemología, por ser complejo no consigue

eco en el aula. Así, el proceso de enseñar y aprender se distancia de su mejor soporte. Si no averiguamos cómo se consigue el saber sobre las cosas, que en esencia es la base constructiva del libro, ¿cómo habremos de soportar la enseñanza?, ¿qué habilidades intelectivas hemos desdeñado por esa circunstancia?

Las estructuras cognitivas –no se entienden como las asume la psicogénesis del estudiante– reportan la carencia de contenidos alternativos y de la metódica que les subyace. El tener y el conocer previos, son el andamiaje que se habrá de posibilitar para fundar la habilidad intelectual del estudiante. Se presume, en esa medida, que la revolución intelectual no provendrá de la tecnología educativa, de cursos de actualización que no son, en esencia, academia o ciencia, o de mayor equipamiento como lo serían las bibliotecas o la cibernética. El imperativo de nuestro quehacer radica en provocar las condiciones para que el estudiante acceda

al saber por sí mismo, no en ajustarlo a lo sabido. De ahí que nos hagamos la pregunta que sigue: ¿qué papel se reserva al docente en esa postura?



## II. El vínculo ético académico de docente y discente.

Antes de inaugurar cualquier debate sobre el "deber ser" del catedrático, ha de argumentarse la condición que le agobia. Se objetan los pertrechos de un ser que se orienta por el mecanicismo de la enseñanza, aquello que reprime toda réplica o cuestionamiento ante un presupuesto orientador. La reproducción esconde toda oportunidad de inventiva, de indagación vital. Hegel asume al hábito en cuanto es origen de una normalidad acrítica. El ser que se siente a comodidad con una fórmula o método para conseguir los objetivos del aprendizaje, deja de lado una valiosa oportunidad de reflexión, si bien ha de entenderse que el recurso procedimental es objeto de la crítica.

Según Heidegger morir no es físicamente, es en vida por causa de una conciencia que ha dejado de inquirir. Es lo que nombra como el no poder "curarse de". La oportunidad de la cura es, en otros términos, devolver al ser su condición natural, esto es, su esencia como ser que explora. En nuestros días, a la par de un docente que deja al estudiante sin oportunidad de conocer por sí mismo, existe un mundo mediático que no deja de ser

absoluto, en cuanto se reserva para sí y desde sí la oportunidad de la información y de la verdad última. El mundo que nos rodea es cada vez más absorbente, nos hace suponer que investigar por nosotros mismos no es necesidad de la conciencia, así, nos repliega a un orden tecnocrático, en el que basta con hacer de conformidad a los modos establecidos.

El mecanicismo de la enseñanza tiene asidero en múltiples manifestaciones que a la postre son comodidad, nunca intelectualidad. La clase se repliega al uso de tecnología, no siendo objeto de reflexión ese soporte tecnológico. Es esto en cuanto pueda discutirse el porqué y el para qué de los equipos, de las fórmulas, de los hábitos, de los programas y en general de la conducta reproductiva. Mejor sería si ese apoyo mecánico tiene cabida en un debate metareflexivo.

El sentido unívoco que caracteriza a ciertas instituciones educativas, hace descansar la cátedra en referentes teóricos (obras o partes de obras) sin juicio ni prejuicio. La elección de contenidos no compete al estudiante, es atributo del docente. Empero, ¿sobre qué bases eligió?, ¿cuál es el rigor epistemológico que le respalda?, es acaso el imperativo de su conciencia lo que se esconde detrás de una cátedra que se nombra "libre". Si la elección de contenidos en la cátedra es consustancial al ejercicio del poder, ¿qué oportunidad de reflexión se reserva para el estudiante? Si el ser ha de sufrir un proceso formativo, ¿no es deseable que reflexione sobre los supuestos que dan pie a ese saber?, esto es, sobre los criterios que determinan la elección de un autor o de partes de su obra. Ha de inquirirse en qué medida ese aporte es sustancial para la formación del estudiante, debe preocuparnos ¿cómo ha de fundarse la reflexión?, ¿cuáles son los criterios académicos que gobiernan en la desestructuración de una obra?, ¿en qué medida es factible disentir del contenido del libro?, ¿cómo operacionalizar la cita?, ¿cómo subsidiar el pensamiento de un intelectual?

Como puede deducirse, el cuestionamiento sobre lo que leemos se abre en espacios de reflexión que en esencia plantean la complejidad intelectual. Lo que ha de quedar como comentario de esa apertura, es la necesidad de hacer hincapié en la capacidad crítica, en el fortalecimiento de las habilidades intelectivas, de modo que el estudiante no quede postrado en el acto de leer como de hinojos ante su dios. No obstante el cúmulo de saber que ya reporta el proceso civilizatorio por mediación de la obra escrita, el estudiante anda a tientas, los libros son báculo del ascenso académico, pero no los puede comprender. En esa medida se plantea el fracaso del sistema educativo mexicano.

Así, un estudiante que se propone mostrar lo sabido, no sufre la reflexión en torno a sus propios pasos, por sí mismo o con ayuda del profesor. Un docente que deja de lado el acto reflexivo, no es seguro que pueda aducir crítica a su práctica escolar, tampoco podrá acarrear agua al molino del otro. Si el programa de estudios amanece sin crítica, se ha desdeñado una valiosa oportunidad para averiguar la estructura gnoseológica de la cátedra.

Desagregar los criterios que gobiernan en la constitución del saber y en la orientación formativa, es desentrañar y debatir lo que bien puede beneficiar, ser parcial o de plano nulo en el desenvolvimiento académico del estudiante. Si hemos ignorado el supuesto epistémico que nos da origen y sentido, ¿qué ha de esperarse de la intervención del profesor?, ¿sobre qué bases orientará su práctica docente? La respuesta no es oculta o difícil de encontrar, se mira por doquier. El docente padece su biografía; como fue formado enseña. Eso incluye la clase de obras que revisó, el modo como las auscultó y los mecanismos disciplinares que sufrió en propia persona. Reproduce los elementos de la alienación. Empero ha de señalarse que no reproduce porque así lo desee, nuestra conciencia padece el rescoldo del maltrato o del despotismo, por lo mismo, somos conscientes de esa anomalía.

En muchos de nosotros campea un espíritu que se propone reparar el daño. Ese ser de espíritu elevado, es el que nos ocupa. Digamos sobre él que reproduce por impotencia, porque ha quedado en la marginalidad del saber, por los timos que se asumen como formas de actualización, porque se conforma con ese estado del arte, porque no es desde sí mismo apertura al mundo, porque sucumbe ante expectativas carentes de rigor académico, en términos mínimos: porque desconoce vías alternas para identificar o construir el conocimiento.

Indagar con los recursos de la inteligencia o del saber previo, más aún, degustar las obras y el porqué de su presencia en nuestro ser, no aparece como aliento en nuestros días.

El despotismo del acto educativo deriva, en el ocaso de la razón y del placer, por el conocimiento. Así, se sufre la escuela y en caso extremo se refuta. Se olvida aquí que maestro y alumno se han dado a la tarea común de conocer lo que les rodea con mediación del libro, del contenido escolar o del discurso. Es la cooperación entre maestro y alumno el mecanismo más próximo para adentrarnos en el pensamiento complejo. Conocer un fenómeno educativo, al sujeto —en cuanto es referente ontológico—, o un hecho social, nos obliga a usar múltiples recursos: el intercambio dialógico,



la interpretación del libro –bajo recursos hermenéuticos–, o la observación directa, de modo que se alcance un consenso académico.

Dicho en otros términos: una relativa certeza sobre la realidad. Podemos incluso operar la ciencia, aunque estaríamos en el punto de hablar de una formación basada en la investigación. Como sea, una formación con el rigor de la academia o con el apoyo de la ciencia, es deseable. Las bases de la cooperación entre docente y alumno, no yacen en la superposición del saber al deseo de conocer. Quien más sabe, no por ello es determinante de un deseo de conocer en el otro. Ni conduce ni ajusta a una racionalidad o metodología, ni elucida para el otro un contenido, ni por todo ello, uno merece obediencia de otro.

No saber, saber al modo unívoco o con el rigor de la academia, no es excusa para superponer nuestro juicio a la alteridad. El respeto que el docente procura, deviene de poner coto a los influjos del poder, al prejuicio, o a la biografía que nos delata.

La solidaridad manifiesta en el acto de acceder al conocimiento, radica en un decurso reflexivo que impreca y funda habilidades para ejecutar el ascenso académico. El docente está inmiscuido en un conocimiento que, aunque académico o científico, siempre será parcial. El saber previo de que dispone el hombre, le permite formular su postura a la par de otros puntos de vista. Cuando el punto de vista de un ser choca con la perspectiva de otro ente, deviene en resistencia o en la necesidad de un trastrocamiento de estructuras previas. En el vínculo dialógico la oferta de saber sufre modificación o cambio de perspectiva, si bien es afectada por un contenido que le es ajeno y diferente. Entender esa condición como

causa del ensanchamiento gnoseológico, es desvelar el resorte del saber.

La transformación de una estructura gnoseológica previa –reiteramos, no la entendemos al modo como la concibe la psicología cognitiva, sino bajo el supuesto de la fenomenología de Hegel o Heidegger– por una nueva, ocurre por la intelección que se ejecuta frente a un contenido que viene de fuera. Recibir el saber como contenido o método no es un acto pasivo, implica auscultación para desentrañar el conocimiento exógeno y rectificar la estructura gnoseológica previa.

La cosa (el saber) que nos es exterior, manifiesta elementos y conexión esencial entre éstos que la posibilitan como concepto; empero sus elementos y la relación esencial entre éstos, nunca es expuesta del modo más nítido. La apariencia que es propia de los fenómenos reales, trastoca y engaña cuando observamos. El desmerecimiento del rendimiento escolar, un entorno social sin valores, no saber interpretar, desconocer cómo se investiga o cómo se escribe, son todos fenómenos educativos aparentes. Esto último significa que puedan ser reales o no y algo muy importante: la apariencia no es recurso suficiente para construir el concepto, empero es orientadora de la búsqueda. ¿Puede plantearse la ausencia de valores en una comunidad estudiantil? ¿será acaso que no reconocemos la alteridad como manifestación valorar, porque es ajena a nuestro prejuicio? Contestar a esos cuestionamientos, posibilita averiguar al fenómeno aparente como real o irreal. Como sea, la apariencia es el principio de la auscultación, si a ésta subyacen elementos y fuerzas responsables de vincularlos en una relación funcional (orgánica) o causal.

La cosa contiene en sí misma la vitalidad orgánica o causal, lo que ha de servirnos para edificar conceptos. Esclarecerlos no es, sin embargo, un saber dado, la conciencia se obliga a la intelección de la realidad para traducirla en saber académico. En esa condición, el docente y el estudiante no son ni determinante ni determinado; ambos se siguen por el derrotero que se desvela a partir de una corriente de pensamiento, incardinada en la teoría del conocimiento. La vía de acceso no es, sin embargo, el decurso mecánico o el seguimiento acrítico de pasos, es el debate en la conciencia para recuperar el saber de los objetos que nos rodean. La razón encuentra aquí su mejor referencia.

Una lectura unívoca puede ser además enfoque ideológico, la enseñanza puede tomarse en el privilegio de una determinada teoría. La psicologización de la educación es, en esa medida, un factor que lejos de resolver modos



alternativos a la enseñanza y al aprendizaje, oscurece el panorama. Suponer que la opción a una educación secular se encuentra exclusivamente en la psicología cognitiva o dialéctica, es ingrediente del fracaso escolar.

La colonización de espacios educativos por la psicología, emerge porque ofrece el atractivo de un lenguaje metódico e inesencial, esto es, como lenguaje ordinario. Se propone sin la necesidad del concepto. Como bien arguye Husserl, la psicología carece de conceptos que puedan aflorar al modo como se obtienen de objetos reales, o sea, como entidades orgánicas, según plantea Hegel.

La pregunta que todavía se hace a la psicología cognitiva, tiene que ver con el concepto de estructura cognitiva. ¿Si no sabemos qué es la cosa, podemos añadir un predicado que le concierna? Recuérdese el propósito que orienta en esa corriente de pensamiento: ... radica en identificar, propiciar y fortalecer estructuras. Si desconocemos qué es la estructura, ¿cómo la identificaremos para fortalecerla? Esas dudas son válidas para extremar precaución con el constructivismo, si como entendemos tiene soporte en esa teoría del aprendizaje.

No añadiremos más sobre el particular, nos ocupa la necesidad de esclarecer equívocos asociados con la asunción unívoca de toda teoría de la enseñanza. Se quiere afirmar que todo referente teórico no reposa en el automatismo, como en un acto reflexivo de cara a los supuestos que le originan. El movimiento pensante, según plantea Hegel, ha de configurar nuestra razón de ser, es esto, una sempiterna búsqueda. Si la esencia de las cosas y de los sujetos se modifica, ¿por qué habremos de conformarnos con el contenido dado, con la postura acrítica?

Los rigores de la ciencia y de la filosofía son vía necesaria para decir desde sus propios referentes, cómo ha de edificarse un corpus teórico o un saber sobre las cosas. Orientar la cátedra con apego al lenguaje fenoménico no deviene en superación intelectual. Cuenta aquí la ausencia de la hermenéutica, en cuanto es lograda por el tener y el saber previos. El presupuesto de que dispone el docente, cuando tiene báculo en territorios del saber reconocidos por la academia, le coloca en el punto de esclarecer posturas alternativas, así funda una expectativa de crítica con sentido.

El docente de cara al alumno, no pocas veces tiene argumentos para señalar el equívoco. Esclarecer la duda o la distorsión, es asunto que atañe al ser que se propone saber. El argumento que subyace al equívoco, es un saber previo que se consigue en el largo decurso académico.

No se reduce al carácter ni a la apreciación fenoménica del sujeto que nos alecciona, es algo a lo que nos remitimos como hilo conductor de nuestra búsqueda. Bien puede ser que el docente haya encontrado elementos valiosos de ese hilo conductor, de ser así, muestra sus hallazgos en clase para orientar nuestros pasos.

Mostrar es aquí elucidar la metodología y el modo como consiguió el contenido, es argüir lo encontrado como lo propio, como experiencia intelectual singular, nunca como peritrocho unívoco. Lo descubierto no inaugura referente para ajustar la conciencia del discente. Propicia las condiciones para que el alumno alcance su propia razón. Es remitente que muestra el tipo o la forma de acceso que es factible edificar para que el ser construya conocimiento, es presupuesto orientador en ese sesgo. Lo encontrado deja implícita la factibilidad de otras vías, no es cristalización del saber. Volver hábito la vía de acceso o el contenido logrado, es precipitar la caída en el acto educativo.

Ambos, docente y alumno, se encuentran en una búsqueda sempiterna, se soportan mutuamente para ascender en el conocimiento. Esa circunstancia esclarece una condición: el docente no ocupa sus hallazgos para lacerar a un ser que se deja orientar. No está en la responsabilidad del docente el perfil formativo, no es quien para decir cómo habrá de ser el estudiante en cuanto ente que desea conocer. Su sentido más elevado se encuentra en propiciar las condiciones para que el estudiante, por sí mismo, levante vuelo. Digamos esto último con una analogía. En un extenso túnel aparecen distintos grados de luminosidad, según penetra luz por el extremo al que se dirigen distintos sujetos.

Algunos individuos se encuentran en apariencia más próximos a la salida, su rostro aparece más iluminado, porque han recorrido más trecho. Esa aparente cercanía con el punto de salida del túnel, puede comprenderse como experiencia. Puede decirse que los sujetos más próximos a la salida disponen de mayor saber. Decimos que se encuentran en apariencia a menos distancia de la salida, porque disponen de mayor bagaje para ofrecer luz al otro. No obstante, saber más no es requisito para abandonar el túnel. Consideremos una cosa: alcanzar el fin del túnel es imposible. Si el término del túnel lo entendemos como objeto de estudio, puede merodearse desde innumerables posiciones y no sólo eso, muta en el tiempo, lo que ayer sabíamos sobre él, hoy es insuficiente o incorrecto. La certeza que teníamos sobre el concepto de una cosa se desvanece en el aire. ¿Que nos queda ante el concepto que se recupera de lo real?, ni más ni menos que un acto de reflexión e indagación sin reposo. ☺

# Un método rápido y sensible

para la cuantificación de microgramos de proteína utilizando el principio de unión de la tintura a la proteína\*

Marion M. Bradford\*

**D**urante la purificación de proteínas, se requiere generalmente de un método rápido y sensible para la cuantificación de proteína.

Los métodos disponibles hasta el momento, cubren parcialmente los requerimientos para este tipo de cuantificación. El procedimiento estándar de Lowry<sup>1</sup> presenta cierta interferencia por compuestos como iones de potasio,<sup>2</sup> iones de magnesio,<sup>3</sup> EDTA<sup>4</sup>, Tris,<sup>5</sup> reactivos thiol<sup>2</sup> y carbohidratos.<sup>5</sup>

La relativamente insensible reacción de biuret<sup>6</sup> puede tener interferencia por Tris<sup>7</sup>, amonio<sup>8</sup> y glicerol<sup>9</sup>. Aun modificando dichos procedimientos para eliminar los problemas,<sup>10,11</sup> existen otras complicaciones y se requiere invertir mucho tiempo. Las técnicas de unión a la tintura que ofrece la literatura, son en su mayoría ensayos poco sensibles, que involucran la unión del reactivo anaranjado G a la proteína.<sup>12,16</sup> La excepción a esta regla es el ensayo de unión Amidoschwartz 10-B.<sup>17</sup> Este procedimiento también tiene sus inconvenientes, ya que se requiere precipitar la proteína con ácido tricloroacético y filtrarlo con membrana millipore.

El ensayo para proteínas que describe el presente trabajo, elimina la mayoría de los problemas descritos anteriormente, y es ampliamente utilizado para procesar grandes cantidades de muestras, siendo además fácilmente adaptable a la automatización. Se basa en la observación de que el Azul de Coomassie G-250 existe en dos diferentes formas coloridas: rojo y azul.<sup>18</sup>

\* Bradford, M. M. (1976), *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Traducido por: Mtra. Aurora Martínez Trujillo, profesora investigadora en el Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE.

La forma roja se convierte en azul cuando este reactivo se liga a la proteína.<sup>18</sup> El complejo proteína-tintura tiene un alto coeficiente de extinción, que le confiere elevada sensibilidad durante la medición de la proteína. La unión de la tintura a la proteína es un proceso muy rápido (aproximadamente dos minutos), y el complejo proteína-tintura permanece en solución por un tiempo relativamente largo (aproximadamente una hora), haciendo el procedimiento muy rápido.

## Materiales y métodos

**Reactivos.** El azul de Coomassie G-250 se obtuvo de SIGMA y se utilizó como fue proporcionado. El 2-Mercaptoetanol se obtuvo de SIGMA. El triton x-100 se obtuvo de Schwartz/Mann. El dodecil sulfato de sodio se obtuvo de BDH Químicos Ltd., Pooles England. El hemasol se obtuvo de productos científicos. Todos los demás reactivos fueron grado analítico de la mayor pureza posible.

**Preparación de la proteína.** La seroalbumina (BSA) bovina (cristalizada 2x), el quimiotripsinogeno (QTA) A y el citocromo (Cc) c (de corazón de caballo) se obtuvieron de Schwartz/Mann. La hemoglobina (HG) y la seroalbumina (SAH) humana se obtuvieron de Corporación de Bioquímicos Nutricionales. Las soluciones de proteína se prepararon en NaCl 0.15 M. Se determinaron las concentraciones de BSA,  $\mu_{280} / 1/4 =$  QTA y Cc espectrofotométricamente en un espectro Spectronic 200 UV de Bausch & Lomb, con 6.6,<sup>19,20</sup> 5.3,<sup>19,21</sup> 20<sup>19,22</sup> y 17.1,<sup>23,24</sup> respectivamente. Las soluciones de hemoglobina se prepararon gravimétricamente.

**Preparación del reactivo de Coomassie.** Se disolvió el azul de Coomassie G-250 (100 mg) en 50 ml de etanol al 95%. A esta solución se le adicionaron 100 ml de ácido fosfórico al 85% (p/v). La solución resultante se diluyó a un volumen final de un litro. Las concentraciones

nes finales del reactivo fueron 0.01% (p/v) de azul de Coomassie G-250, 4.7% (p/v) de etanol y 8.5% (p/v) de ácido fosfórico.

**Ensayo de proteína (metodología estándar).** Se pipeteó una solución de proteína que contenía de 10 a 100  $\mu\text{g}$  de proteína en un volumen superior a 0.1 ml en tubos de 12x100 mm. Se ajustó el volumen de los tubos a 0.1 ml con el buffer apropiado. Se adicionaron cinco ml del reactivo de Coomassie y el contenido se mezcló, ya fuera por inversión o con la ayuda de un vortex. Se midió la absorbancia a 595 nm después de dos minutos y antes de una hora en celdas de tres ml, contra un blanco de reactivo, que contenía 0.1 ml del buffer apropiado y cinco ml del reactivo de Coomassie. Se graficó el peso de la proteína contra su correspondiente absorbancia, obteniéndose una estándar que se utilizó para determinar la proteína en muestras cuya concentración se desconocía.

**Ensayo de microproteína.** Una solución de proteína, con 1 a 10  $\mu\text{g}$  de proteína en un volumen superior de 0.1 ml se pipeteó en tubos de 12x100 mm. El volumen de los tubos de prueba se ajustó a 0.1 ml con el regulador adecuado. Se adicionó un ml del reactivo de Coomassie a los tubos y el contenido se mezcló como se hizo en el método estándar. Se midió la absorbancia a 595 nm como en el método estándar, excepto en las celdas de un ml, contra un blanco de reactivo preparado con 0.1 ml del buffer apropiado y un ml del reactivo de Coomassie. Se prepararon las curvas patrón y se utilizaron como en el método estándar.

## Resultados

**Reproducibilidad, sensibilidad y linealidad del ensayo.** Ensayos estándar elaborados por triplicado, utilizando seroalbumina bovina como estándar resultaron en un patrón de respuesta altamente reproducible. El análisis estadístico dio una desviación estándar, de 1.2% del valor medio para el ensayo. Hay sensibilidad extrema en el ensayo con 25  $\mu\text{g}$  de muestra, dando un cambio de absorbancia de 0.275 unidades. Lo anterior corresponde a 5  $\mu\text{g}$  de proteína/ml en el volumen final de la determinación. Hay una ligera carencia de linealidad en el patrón de respuesta. La fuente de no linealidad se debe al reactivo por sí mismo, debido a que no existe un translate en el espectro de las dos formas de color de la tintura. El valor de fondo para el reactivo está en continuo decremento a medida que se liga más tintura a la proteína. Esto no representa un problema real, debido a que el grado de curvatura es muy ligero. Es posible obtener resultados satisfactorios si se corre el ensayo con una

serie de estándares y se hacen mediciones de muestras de concentración desconocida contra la curva de respuesta de los estándares, en vez de utilizar la Ley de Beer.

**Precisión del ensayo.** La figura 1 muestra los resultados de diversas proteínas ensayadas en el sistema como respuestas individuales. Hay un desplazamiento de puntos alrededor de la línea dibujada en la gráfica. Al parecer, esto se debe a una función multivariable, con dificultades para determinar la cantidad exacta de proteína presente en cierta muestra, debido a la variación en los coeficientes de extinción reportados en la literatura, los métodos utilizados para determinar la cantidad exacta de proteína usados en la medición del coeficiente de extinción, y cierto grado de variación en la eficiencia de unión de la tintura a diversas proteínas. La figura 2 muestra el patrón de respuesta obtenido por el método de Lowry<sup>1</sup> de las mismas proteínas. El grado de desplazamiento en la respuesta de la proteína con el método de Lowry<sup>1</sup> es similar al mostrado en el presente ensayo. La sensibilidad del método de Lowry presenta una absorbancia de 0.110 unidades para los 25  $\mu\text{g}$  del estándar, que responde a 8  $\mu\text{g}$  de proteínas/ml del volumen final del ensayo. Entonces, haciendo ciertos cálculos, el ensayo de unión a la tintura es aproximadamente cuatro veces más sensible que el método de Lowry.<sup>1</sup> El grado de desplazamiento alrededor de la curva obtenida por el método de Lowry señala también la dificultad de establecer un valor cuantitativo para la proteína en solución estándar.

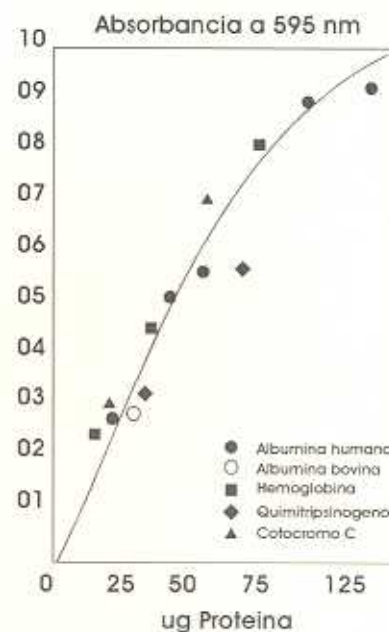


Figura 1. Patrón de respuesta del complejo proteína-colorante para diferentes proteínas.

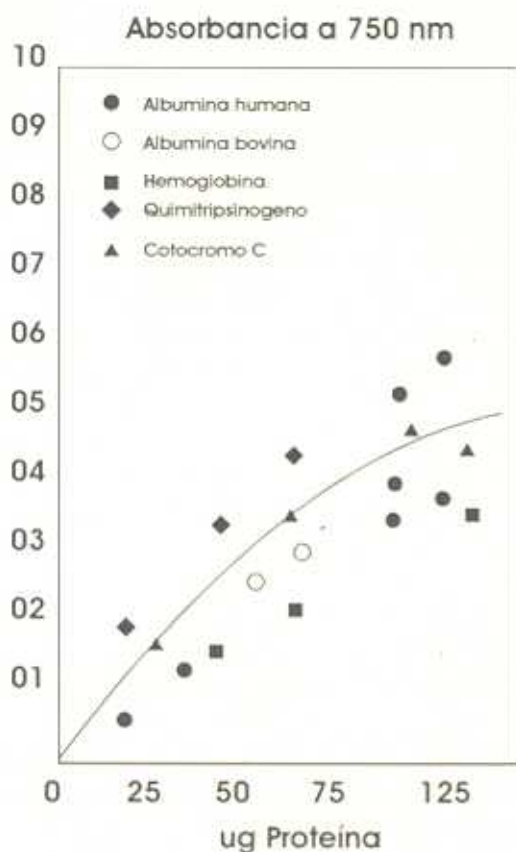
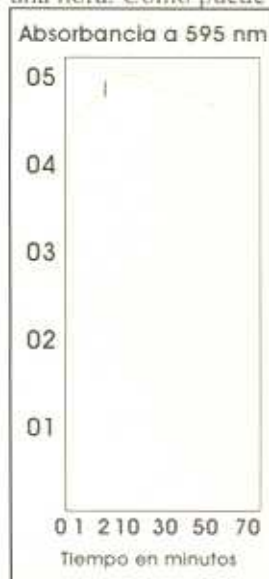


Figura 2. Patrón de respuesta para varias proteínas, utilizando la técnica de Lowry.

**Estabilidad del complejo colorido proteína-tintura.**

La figura 3 muestra la velocidad de formación del complejo proteína-tintura en el sistema de ensayo y la estabilidad del complejo colorido. La absorbancia se monitoreó en intervalos de 7.5 segundos durante dos minutos y luego a intervalos de dos minutos durante una hora. Como puede verse en la gráfica, el desarrollo



del color está prácticamente completo a los dos minutos, y permanece estable,  $\pm 4\%$  por un lapso de una hora. Debido a que el complejo tiene cierta tendencia a agregarse con el tiempo, hay un decremento en el color después de este periodo, simplemente por la terminación muy precisa; el investigador

Figura 3. Velocidad de formación del complejo proteína-colorante y estabilidad del color.

debe tener la precaución de leer la absorbancia de las muestras durante una de las porciones más exaltadas de la curva de estabilidad del color entre cinco y veinte minutos después de adicionar el reactivo. Lo anterior da un margen amplio para leer una gran cantidad de muestras.

**Sensibilidad del microensayo.** Cuando se utiliza seroalbumina bovina como estándar en el microensayo, el grado de no linealidad es similar al presentado en el ensayo estándar. Hay una pérdida en la respuesta del complejo proteína-tintura, comparado con el ensayo estándar, por ejemplo, 5  $\mu\text{g}$  de proteína/ml da un cambio de absorbancia de 0.1 contra 0.27 en el ensayo estándar. Quizá esto sea resultado de la dilución que se hace del reactivo de Coomassie.


**Interferencia por componentes no protéicos.** Como se indicó antes, se presenta interferencia en el sistema de ensayo debido a agentes reguladores extremadamente alcalinos. Esto puede solucionarse corriendo los controles adecuados y sustrayendo el valor del control, ya sea matemáticamente o espectrofotométricamente. Se probó un amplio espectro de componentes para conocer su efecto en el ensayo (tabla 1). Al parecer el ensayo no tiene efecto por cloruro de Magnesio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, etanol y sulfato de amonio. Los pequeños efectos debidos a reactivos como el Tris, el ácido acético, el 2-mercaptoetanol, la sacarosa, el glicerol, el EDTA y cantidades traza de los detergentes Triton x-100 y Dodecil sulfato de sodio pueden eliminarse corriendo los controles adecuados con el ensayo. Sin embargo, la presencia de grandes cantidades de estos detergentes representa anomalías muy grandes, difíciles de solucionar.

Sustancia	Cambio en OD 595	( $\mu\text{g}$ ) Equivalente BSA
KCl 1 M	0.000	0.00
NaCl 5 M	0.000	0.00
MgCl <sub>2</sub> 1 M	0.000	0.00
Tris 2 M	0.026	2.34
EDTA 0.1 M	0.004	0.36
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 M	0.000	0.00
Glicerol al 99%	0.012	1.08
2-Mercaptoetanol 1 M	0.004	0.36
Sacarose 1 M	0.013	1.17
Etanol al 95%	0.000	0.00
Acetona	0.069	6.21
Fenol al 5%	0.046	4.14
Triton x-100 al 0.1%	0.013	1.17
Triton -100 al 1%	0.590	53.10
Dodecil sulfato de sodio al 0.1%	0.011	0.99
Dodecil sulfato de sodio al 1%	0.495	44.55
Hemosol al 0.1%	0.004	0.36
Hemosol al 1%	0.108	9.72

Tabla 1. Efecto de diversos reactivos de laboratorio en el complejo Proteína-Azul brillante de Coomassie G-250<sup>®</sup>.

Una dificultad observada durante el desarrollo del ensayo es la tendencia del complejo proteína-tintura a adherirse a las paredes de las celdas, lo que provoca una celda teñida de azul. La cantidad de adherencia es insignificante a medida que se desarrollan los ensayos, por ejemplo, causan el 1% del error, como lo indica la desviación estándar del triplicado de los ensayos reportados en la sección de reproducibilidad. Lo azuloso de las celdas después del ensayo, presenta problemas cuando se desea utilizar éstas en otras determinaciones. Es por eso que se deben seguir las instrucciones para el limpiado de la celda, como se describe a continuación:

- Método 1: Llenar las celdas con detergente para vidrio y después enjuagarlas con agua y acetona. (Produce la limpieza instantánea de la celda).
- Método 2: Sumergir las celdas en HCl 0.1 M (Remueve el complejo en unas cuantas horas).

Sólo se han observado las adherencias azules del complejo tintura-proteína cuando se utilizan celdas de cuarzo, y deben eliminarse utilizando celdas ya sea de vidrio o de plástico. 

## Bibliografía

- <sup>1</sup> Lowry, O.H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- <sup>2</sup> Vallejo, C. G. y Lagunas, R. (1970), *Anal. Biochem.*, 36, 207-212.
- <sup>3</sup> Kuno, H. and Kthara, H. K. (1967), *Nature (London)*, 215, 974-975.
- <sup>4</sup> Neurath, A. R. (1966), *Experientia*, 22, 290.
- <sup>5</sup> Lo, C. and Stelson, H. (1972), *Anal. Biochem.*, 45, 331-336.
- <sup>6</sup> Mokrasch, L. C., and McGilvery, R. W., (1956), *Biol. Chem.*, 221, 909-917.
- <sup>7</sup> Robson, R. M.; Goll, D. E. and Temple, M. J. (1968), *Anal. Biochem.*, 24, 339-341.
- <sup>8</sup> Gomall, A. G.; Bardawill, C. J., and David, M. M. (1949), *J. Biol. Chem.*, 177, 751-766.
- <sup>9</sup> Zishka, M. D., and Nashimura, J. S. (1970), *Anal. Biochem.*, 34, 291-297.
- <sup>10</sup> Bennet, T. P. (1967), *Nature (London)*, 213, 1131-1132.
- <sup>11</sup> Grassmann, W. and Hanning, K. (1950) *Naturwissenschaften*, 37, 496-497.
- <sup>12</sup> Kaul, A. K., Dhar, R. D., and Raghiviah, P. (1970), *J. Food Sci. Technol.*, 7, 11-16.
- <sup>13</sup> Colenbrander, V. F., and Martin, T. G. (1971), *J. Dairy Sci.*, 54, 531-533.
- <sup>14</sup> Ashwoth, U. S. (1971), *J. Food Sci. Technol.*, 36, 509-510.
- <sup>15</sup> Swaminathan, K.; Sud, K. C. and Kishore, H. (1973), *Indian, J. Exp. Biol.*, 11, 63-64.
- <sup>16</sup> Sherbon, J. W. (1974), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 57, 1338-1341.
- <sup>17</sup> Schaffner, W. and Werssmann, C. (1973), *Anal. Chem.*, 56, 502-514.
- <sup>18</sup> Kershner, A. H.; Nemes, P., and Bucoltz, C. (1975), *Anal. Chem.*, 64, 509-516.
- <sup>19</sup> Kirschenbaum, D. M. (1970), *Handbook of biochemistry, Selected Data for Molecular Biology*, Sober, H. edit., 2<sup>a</sup>ed., pp. C-71-C-98, *Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio*.
- <sup>20</sup> Tanford, C. and Roberts, G. L. (1952), *J. Amer. Chem. Soc.*, 74, 2509-2515.
- <sup>21</sup> Wetlaufer, D. B. (1962), *Advan. Prot. Chem.*, 17, 378-380.
- <sup>22</sup> Guy, O.; Gratecos, D.; Rovey, M., and Desnuelle, P. (1966), *Biochim. Biophys. Acta* 115, 404-422.
- <sup>23</sup> Kirschenbaum, D. M., (1973), *Anal. Biochem.*, 55, 166-192.
- <sup>24</sup> Mayer, M. M. and Miller, J. A. (1970), *Anal. Chem.* 36, 91-100.

\* Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

<sup>a</sup> Los valores mostrados se obtuvieron cuando se hizo reaccionar 0.1 ml de cada sustancia en el ensayo estándar.

# Ingeniería de enzimas para una mejor biorremediación.

Esfuerzos para identificar y manipular estos agentes bioquímicamente activos y hacerlos más efectivos para aplicaciones de biorremediación.

Jenne Trombly\*



Animados por el creciente número de éxitos en la biorremediación, los investigadores ahora se concentran en identificar y optimizar a los agentes bioquímicos activos involucrados en este proceso: las enzimas. El conocimiento acerca de las enzimas con capacidad de degradación que se usan en proyectos de biorremediación –provenientes de bacterias, hongos o plantas– pueden convertirse en conocimientos tan importantes como el pH del suelo, la temperatura, la humedad y la biodisponibilidad de los contaminantes. “Nosotros permanecemos varios años en la oscuridad acerca del conocimiento de la ingeniería de procesos, hasta que identificamos a las enzimas”, dijo Steve McCutcheon, investigador en Ingeniería Ambiental de la EPA, del Laboratorio de Investigaciones Ambientales en Athero, GA.

Muchos investigadores piensan que los proyectos de biorremediación pueden ser más exitosos si se estudia el mecanismo catalítico de las enzimas. El primer paso de este proceso es identificar las enzimas críticas; después los científicos pueden tomar este conocimiento e incorporar los genes que expresan las enzimas en otros organismos. Las enzimas que dan buenos resultados pueden ser incorporadas en plantas y microorganismos comunes en los sitios contaminados, que toleren las frecuentes condiciones extremas de ambientes contaminados mejor que otros organismos no comunes en dichos sitios.

Con base en esta idea, algunos investigadores están utilizando ingeniería de proteínas para resaltar las habilidades cinéticas de las enzimas, mediante el rediseño de la catálisis y el incremento de su capacidad degradativa y velocidad de transformación. “Si nosotros pudiéramos transformar fácilmente las enzimas para la remediación del ambiente, podríamos vivir en un mundo completamente distinto”, observó Peter Huk Nelson, vicepresidente de *Copenhagen Based Novo Nordisk*, la compañía productora de enzimas más grande a nivel mundial.

Los científicos esperan que el crecimiento de las investigaciones y aplicaciones de las enzimas no sólo incremente el éxito de los proyectos de biorremediación, sino también que haga posible la limpieza del

\* Trombly, Jeanne, “Ingeniería de enzimas para una mejor biorremediación”, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 29, No. 12, 1995.

Traducido por: Dra. Ma. del Rosario Peralta Pérez, profesora investigadora en el Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE.



ambiente en sitios donde otros métodos han fallado. “Rediseñar las enzimas puede dar la posibilidad de remediar ciertos lugares, como aquellos donde la contaminación se encuentre en zonas muy profundas, esté muy dispersa o los contaminantes sean recalcitrantes, como los hidrocarburos halogenados”, dijo Rick Oinstein, líder del grupo técnico del Departamento de Energía del Laboratorio del Noroeste del Pacífico.

Una visión crítica sobre la identificación, mejora y rediseño de las enzimas para degradar desechos tóxicos, revela un nuevo mercado. Los costos de este proceso son difíciles de calcular, debido a que sólo pocas empresas nuevas están ofreciendo estos servicios comerciales. Algunas compañías señalan que la biorremediación *ex situ* con enzimas mejoradas, puede tener un costo competitivo.

### Identificación de las enzimas

Las enzimas son generalmente responsables de las transformaciones químicas que tienen lugar en la biorremediación. Dichas transformaciones ocurren cuando la enzima encuentra a su sustrato, el cual sufre una transformación o ruptura. Las enzimas se clasifican en: hidrolíticas, reductoras u oxidantes, dependiendo del tipo de reacciones que catalicen.

Para una mejor comprensión y control de estos procesos, los científicos comenzaron por identificar las enzimas. Reconocen una enzima con características deseables utilizando microorganismos aislados de muestras de agua o suelo; posteriormente, los microorganismos productores de dichas enzimas son cultivados con el fin de incrementar la producción del extracto de enzimas y darles una aplicación.

Esta forma de aprovecharlas es la tradicionalmente usada para encontrar enzimas efectivas de uso industrial. Por ejemplo, una enzima descubierta en una muestra de suelo de un templo en Indonesia, es ahora usada para hidrolizar el almidón a azúcares; otra enzima que se encontró en un cementerio de Copenhague, ahora se usa en detergentes para ayudar a remover manchas.

Otro mecanismo es identificar la actividad enzimática deseada en un organismo conocido que la exprese en forma adecuada. Jean Marc Bollag, codirector del Centro Penn de Biorremediación y Detoxificación, está utilizando plantas de todo el mundo que expresan adecuadamente la actividad de lacasas y tirosinasas, enzimas que planea usar para remover fenoles en agua de desecho. Bollag ha conducido exitosamente experimentos de laboratorio aplicados, usando peróxido como cofactor y

plantas de rábano, que expresan la actividad de la enzima peroxidasa en aguas contaminadas con fenol.<sup>1</sup> Con base en sus resultados, él piensa que las lacasas serán más efectivas en presencia del cofactor.

En contraste, otro grupo de científicos están descubriendo y estudiando sucesos por primera vez identificados, tanto en plantas como en microorganismos, que se encuentran naturalmente degradando desechos tóxicos; posteriormente identificaron las enzimas responsables de la biotransformación.

Hace cinco años, el grupo dirigido por Lee Wolfe, químico investigador de la EPA, se dedicó a buscar por qué algunas familias de compuestos orgánicos tóxicos son degradados más rápidamente bajo ciertas condiciones. Un miembro del grupo asumió que es debido a las enzimas y buscaron descubrir de dónde provenían. Laura Carreira, investigadora en Bioquímica, fue contratada por la EPA para detectar dichas enzimas usando la prueba estándar de ELISA, una técnica de anticuerpos originalmente utilizada para pruebas médicas. “La primera noticia fue que sí se presentaba la degradación, después había que imaginar cómo ocurría dicha degradación. Actualmente se tienen herramientas para hacer esto”, dijo Carreira.

Usando pruebas de ELISA, el grupo de investigación verificó que las enzimas responsables de la biodegradación eran producidas por las plantas y no por los microorganismos.<sup>2</sup> Este fue el primer ejemplo de éxito de fitorremediación de compuestos orgánicos –un paso significativo para hacer más común el uso de plantas para eliminar, por ejemplo, metales del suelo.– “En cualquier parte encontramos significativas actividades enzimáticas, que ocurren en forma natural para la biotransformación de mezclas de contaminantes en sedimentos y suelo. Tenemos que aislar las enzimas de las plantas que causan dicha transformación”, indicaron los investigadores. Los científicos piensan que el desarrollo de las técnicas innovadoras de fitorremediación, serán revolucionarias una vez que se logre descubrir los sistemas enzimáticos que degradan los compuestos químicos involucrados.

Una filosofía similar es guiada por el grupo de investigadores del Servicio de Remediación Ambiental de Dupont. “Siempre se asume que las enzimas están trabajando en nuestros servicios de biorremediación; sin embargo, no siempre conocemos cuáles son”, dijo Dove Ellis, líder del grupo de biorremediación de Dupont que ha desarrollado un proceso, cuya licencia se tiene ahora disponible, en el cual hay bacterias que deshalogenan solventes clorinados en aguas subterráneas. Su colega Martín Oden, monitoreó

un grupo de investigación en Alemania para tratar de identificar las enzimas que se expresaban en bacterias sulfato-reductores. "Una vez que sepamos más, podremos aplicar la enzimología a la biorremediación", dijo Oden. De acuerdo con Steven Aust, profesor de Bioquímica de la Universidad de UTA, la identificación de las enzimas es uno de los pasos más importantes adoptados por su compañía. "Si tú no quieres entender los procesos bioquímicos de las enzimas, tus posibilidades de fallar en un proceso de biorremediación son muy altas", comentó Aust. Su trabajo como líder en el desarrollo de una pequeña compañía, *Intech One-Eighty*, la cual cuenta con una licencia de patente en el proceso de degradación para una amplia variedad de contaminantes tóxicos, usando hongos de la pudrición blanca, dichos contaminantes incluyen TNT y otros explosivos, creosote, así como hidrocarburos poliaromáticos, bifenilos policlorinados (PCBs), y DDT.<sup>1</sup>

### Manipulación genética

La manipulación de las enzimas, a futuro, podrá ser creativa y ayudar a que estos catalizadores sean empleados para la limpieza del ambiente. Los proyectos pueden incluir: extraer las enzimas y aplicar extractos libres de células; insertar el material genético de las enzimas en otros organismos; proponer cómo las enzimas pueden dar mejores resultados que en el organismo original. "Hemos tenido éxito mejorando la capacidad degradativa de un organismo mediante la alteración de la enzima encargada de degradar PCB", dijo Frank Mandella, uno de los líderes del grupo del centro de Investigación y Desarrollo de Energía General (Nueva York). Después de descubrir que dos enzimas degradadoras de PCB eran casi idénticas, pero mostraron dramáticas diferencias en el rango de ataque de los PCB, Mandella y sus colaboradores alteraron específicamente los aminoácidos en los que diferían dichas enzimas. "Esta modificación dio como resultado una nueva cepa que muestra mejores actividades que ambas enzimas, la cual ataca a una gran variedad de PCB, incluso mayor que la mostrada por las cepas similares aisladas del medio ambiente."

Con el tiempo, Mandella espera realizar nuevas investigaciones sobre mutagénesis y estudios de suelo en laboratorio para probar la efectividad de esta nueva cepa. "La actividad del microorganismo es buena, pero hay que evaluar que realmente pueda trabajar en suelos contaminados", señaló Mandella. Este mismo optimismo mostró John Glaser, líder del equipo la EPA para la Biorremediación de Suelos del Laboratorio Nacional de Investigación y Manejo de Riesgo en Cincinnati, OH. Glaser resaltó que las enzimas algunas veces pueden no

expresarse después de insertar el material genético en otro organismo.

Junto con esta metodología de expresar material genético en diferentes organismos huésped, los científicos han usado otros métodos para ayudar a la degradación enzimática de desechos tóxicos. En el Departamento de Energía de Savannah, se monitoreó un proceso de remediación patentada para rescatar el Río Savannah tratando aguas contaminadas con tricloroetileno (TCE). Un equipo dirigido por Terry Hazen, microbiólogo ambiental, reconoció que la inyección de metano en las aguas subterráneas mejoraba las actividades oxidativas de las enzimas metano-monooxigenasas degradadoras de TCE.<sup>2</sup> Actualmente este equipo constituye una compañía de biorremediación.

Hazen ocupa un programa de computadora que interpreta en tres dimensiones la estructura cristalina de las enzimas, para explorar posibilidades de manipulación y otros factores involucrados en biorremediación con la finalidad de mejorar las actividades de interés. "Existen varios parámetros ambientales—pH, fuerza iónica y temperatura, por ejemplo— que pueden causar cambios significativos en la estructura de las enzimas", dijo Hazen. "Nuestros modelos de predicción por computadora muestran varios escenarios, y permiten observar cómo ocurren dichos cambios estructurales"; Hazen y su colega Ralph Wolf están tratando de descubrir los detalles del mecanismo de reacción oxidativa en los sitios activos de las enzimas. "Una vez que nosotros entendamos bien cómo funcionan las enzimas bajo diferentes variables de control, podremos adaptar mejor los procesos."

El trabajo de Hazen podrá algún día beneficiarse de las investigaciones que han llevado a la identificación de otras enzimas metano-monooxigenasas que oxidan TCE 50 veces más rápido que otras enzimas.<sup>3</sup> Thomas Wood, profesor asistente de Bioquímica e Ingeniería Ambiental de la Universidad de California, ha identificado una prometedora enzima metano-monooxigenasa que se expresa en bacterias de lento crecimiento. Además ha explorado la opción de insertar las expresiones enzimáticas en microorganismos de rápido crecimiento, Wood admite que el proceso es "probablemente comercializable en cinco años."

### Rediseño de enzimas

Mientras algunos científicos impulsan las metodologías de selección de organismos vivos, que expresan adecuadamente enzimas de interés, otros intentan rediseñar enzimas basándose en el uso directo de la relación estructura-función-dinámica. Rick Ornstein del Labora-



torio del Pacífico Noreste, está motivado por la idea de rediseñar una enzima y encontrar las respuestas a problemas ambientales que aparentemente no tienen solución. Si tiene éxito el trabajo de Ornstein podría brindar un método para degradar hidrocarburos recalcitrantes halogenados en suelos profundos o bajo condiciones ambientales difíciles para cualquier microorganismo dehalogenador conocido.

En un proyecto, Ornstein comenzó con un citocromo P450 de una bacteria común en suelos que hidroxila camfor. Sus colaboradores han mostrado recientemente que la enzima nativa y las mutantes pueden romper ciertos etanos pesados halogenados, bajo condiciones anaeróbicas, pero el 1, 1, 1, tricloroetano no se ve afectado. Una serie de simulaciones por computadora, que comenzaron con la estructura de rayos X de los cristales del citocromo P450, han mostrado recientes predicciones donde se espera que una mutante de citocromo P450 incremente al doble la dehalogenación del tricloroetano.<sup>6</sup> Si esta predicción es exitosa, el gene para el rediseño de la enzima dehalogenadora rediseñada podrá ser insertado en la microflora nativa que puede subsistir en condiciones extremas. "Presumiblemente, como las células regresan a su nicho familiar, podemos tener una razonable oportunidad de que sobrevivan e incrementen la biodegradación de compuestos modelo", dijo Ornstein.<sup>7</sup>

Para la biorremediación *in situ* de un sitio contaminado, una compañía ofreció sus servicios de fitorremediación; al final, la limpieza del lugar fue llevada a cabo por dos compañías estadounidenses que comercializaban sistemas a base de hongos para la limpieza ambiental. La capacidad de estos organismos para degradar compuestos tóxicos orgánicos se incrementará en el futuro, una vez que los mecanismos de bioconversión enzimática se entiendan mejor. Pero el debate fundamental continúa para investigaciones y aplicaciones futuras.

### Limitaciones de las enzimas

Los investigadores reconocen que la especificidad extrema que caracteriza a muchas enzimas es a la vez una debilidad y una fortaleza. La unión precisa del sustrato con la enzima la hace operar con rapidez y eficiencia. "El problema es que los compuestos tóxicos son desechados en corrientes de agua limpias", dijo Nielsen de *Novo Nordisk*, "pero donde exista un contaminante peligroso, las enzimas pueden atacarlo."

Muchos investigadores comparten este punto de vista. McCutcheon y su equipo han identificado algunas enzimas no específicas, especialmente relacionadas con

plantas viejas, que se piensa pueden atacar mezclas de compuestos químicos como el TNT en forma eficiente. "Una vez que se tengan plantas que contengan tres o más sistemas enzimáticos específicos que degraden los compuestos deseados, éstas podrán ser empleadas." Carreira estuvo de acuerdo, y encontró enzimas nitroreductasas, presentes en el 20% de las plantas que probó, y capaces de reducir cualquier grupo nitro unido a la mayoría de anillos aromáticos de compuestos aminados. "Un consorcio de enzimas puede trabajar en sitios con múltiples contaminantes", aseveró Carreira.

Otro cambio importante en este campo, es entender el análisis de las vías y estar seguro de que las enzimas completen su trabajo. "Si un sistema enzimático transforma un compuesto en productos que son más tóxicos que la sustancia original, estás más equivocado que al principio", dijo Glaser de la EPA.

Mientras los debates continúan, algunos científicos están ansiosos de poner en los aparadores de las tiendas, enzimas que degraden compuestos biológicos. "Bacterias vs plantas vs hongos no es lo mejor. Estos sistemas no tienen que venir exclusivamente de alguno de estos organismos", dijo Milton Gordon, profesor de Bioquímica de la Universidad de Washington. Gordon está trabajando con Petróleo Occidental como modelo para remediar una gran área contaminada con TCE utilizando álamos.

Otros investigadores, sin embargo, piensan que las fuentes pueden ser mejores si primero se entienden los principios básicos de la remediación con enzimas. "Con un costo para remediación empleando un superfondo de un trillón de dólares, nosotros simplemente no podemos proporcionar una elaborada investigación en ingeniería genética para cada problema que tengamos", insistió McCutcheon. ☺

### Referencias

1. Bollag, J.; Dec, J. (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 1132-1139.
2. Schnoor, J. et al. (1995), *Environ. Sci. Technol.*, 29 (7), 318A.
3. Barr, D.; Aust, S. (1994), *Environ. Sci. Technol.*, 28(2), 78A.
4. Hazen, T. (1995), *Environmental Protection*, 12.
5. Janhg, D.; Wood, T. (1994), *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (7), 2473.
6. Manchester, J. L., Ornstein, R. L. J., *Biol. Struct. Dyn.*
7. Ornstein, R., *Structural Biology: The State of the Art.*, Sarma R. H., Eds. Adenine Press: Albania, N.Y. Vol. 1, pp. 59-76.

# El uso del ácido dinitrosalicílico

para la determinación de azúcares reductores.

Gail Lorenz Miller\*

El reactivo ácido dinitrosalicílico, desarrollado por Sumner y colaboradores<sup>11,14</sup> para determinar azúcares reductores, está compuesto por ácido dinitrosalicílico, sales de Rochelle, fenol, bisulfito de sodio e hidróxido de sodio. De acuerdo con los autores de la prueba, la sal de Rochelle se agrega para proteger al reactivo del oxígeno disuelto;<sup>12</sup> el fenol, para incrementar la cantidad de color producido y para balancear el efecto del fenol encontrado en la orina,<sup>13</sup> y el bisulfito, para estabilizar el color obtenido en presencia del fenol.<sup>12</sup> Se requiere la presencia de álcali para ayudar en la acción reductora de la glucosa sobre el ácido dinitrosalicílico.

El mayor problema de la prueba es que se pierde una parte de los azúcares reductores que se analizan. Lo anterior lo señaló Sumner,<sup>12,14</sup> lo refirieron Brodersen y Rickets,<sup>2</sup> y se observó en repetidas ocasiones en este laboratorio.<sup>6,8,9</sup> La evidencia de la pérdida de azúcar también se ha dado en los datos presentados por Hostettler, Borel y Denel<sup>4</sup> y por Bell, Manners y Palmer.<sup>1</sup> Como este defecto al parecer no se ha podido remediar, se realizó el presente estudio para investigar todos los diferentes factores que podrían causar dicho problema. En el curso de la investigación también se determinó el efecto que tenía el variar las concentraciones de los diferentes componentes del reactivo. Los hallazgos que aquí resultaron han llevado al desarrollo de un reactivo modificado, al igual que la metodología.

\* Miller, G. L. 1959. "Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar", *Anal. Chem.*, Vol. 31, No. 3, 426-428.

Traducido por: Mtra. Aurora Martínez Trujillo, profesora investigadora en el Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE.

## Metodología

La prueba de color se llevó a cabo con alícuotas de glucosa de tres ml, agregando alícuotas de tres ml de reactivo, en tubos de 14 ml. Las mezclas se calentaron durante cinco minutos en un baño de agua hirviendo y después de ese tiempo se enfriaron bajo el chorro del agua hasta alcanzar la temperatura ambiente. Es necesario tener las muestras a temperatura ambiente por el efecto de la temperatura en la absorbancia de los productos coloridos de la reacción,<sup>2</sup> un efecto confirmado por el presente estudio. La intensidad de color en las muestras se midió en un espectrofotómetro marca Beckman modelo DU, a 575 nm con una apertura de 0.06 mm.

En las pruebas se utilizó el reactivo de Sumner y Sisler<sup>14</sup> y un reactivo modificado. El reactivo original contenía aproximadamente 0.63% de ácido dinitrosalicílico, 18.2% de sales de Rochelle, 0.05% de fenol, 0.5% de bisulfito de sodio, y 2.14% de hidróxido de sodio; el reactivo modificado contenía 1% de ácido dinitrosalicílico, 0.2% de fenol, 0.05% de sulfito de sodio y 1% de hidróxido de sodio. Para ciertas pruebas, el reactivo modificado incluía diversas concentraciones de la sal de Rochelle. La composición elegida para el reactivo modificado se basó en los resultados de pruebas preliminares que indicaron que tal reactivo era óptimo y serviría mejor como referencia para probar los efectos de la variación en la composición. En la ausencia de sales de Rochelle, el color obtenido con el reactivo modificado era inestable. Para estabilizar el color bajo estas condiciones, se adicionó un ml de una solución de la sal al 40% a la mezcla de reactivos, después de desarrollar el color y antes de enfriarlos.

El reactivo modificado se preparó colocando todos los componentes sólidos en un recipiente y disolviéndolos simultáneamente por medio de agitación con el



volumen requerido de hidróxido de sodio. Esto fue más sencillo que otros procedimientos.<sup>2,14</sup>

El reactivo modificado produjo el mismo color con la glucosa de un día a otro, con lo cual se probó que era más estable a este respecto que el desarrollado por Brodersen y Rickets.<sup>2</sup> El reactivo modificado al cual se le agregó la sal de Rochelle, tampoco cambió de un día a otro. Sin embargo, dependiendo de las condiciones de almacenaje, este reactivo tendió eventualmente a deteriorarse, debido a la oxidación atmosférica del sulfito presente en él. Este deterioro se solucionaba al adicionar sulfito fresco. Por lo tanto, el problema de la oxidación del sulfito podía evitarse preparando grandes cantidades del reactivo sin agregarle el sulfito, el cual era adicionando a alícuotas del reactivo justo antes de que fuera a utilizarse.

### Estudio de las variables

**Remoción del oxígeno disuelto con una corriente de nitrógeno.** Sumner y Sisler<sup>14</sup> indicaron que la pérdida de glucosa con el reactivo de ácido dinitrosalicílico se debía a la destrucción por oxidación, y basaron su teoría en resultados no reportados de experimentos en los cuales hacían pasar una corriente de nitrógeno por los reactivos. En un intento por confirmar esta observación, el presente trabajo indica que hacer pasar una corriente de nitrógeno a través de una mezcla del reactivo de Sumner y glucosa durante dos minutos antes del desarrollo del color, eliminará poderosamente la destrucción de la glucosa (figura 1a).

**Con sulfito.** Debido a que el sulfito se ha utilizado previamente con éxito para remover el oxígeno disuelto de soluciones acuosas,<sup>2</sup> era sorprendente que estando presente en el reactivo de Sumner y Sisler, fallara para este propósito. A fin de comprobar que esta falla del sulfito podía deberse a la interferencia provocada por otros componentes del reactivo, se adicionó sulfito al 0.1% a las muestras de glucosa antes de mezclarla con el reactivo. Este procedimiento redujo la destrucción de la glucosa en un 70%. Los resultados, mostrados en la figura 1b, proporcionaron una fuerte evidencia para sospechar de la interferencia de otros componentes del reactivo bajo las condiciones normales de la prueba.

**Interferencia de las sales de Rochelle.** A continuación, se llevaron a cabo algunas pruebas comparativas con el reactivo del ácido dinitrosalicílico modificado, en las cuales se adicionaron diferentes concentraciones de la sal de Rochelle. Los resultados, mostrados en la figura 1c, claramente indican que la sal de Rochelle fue el factor que mayor influencia tuvo en la

interferencia con la remoción de oxígeno por el sulfito, debido a que, en ausencia de la sal, el sulfito era capaz de remover el oxígeno disuelto y proteger así a la glucosa. Además de contribuir a la pérdida de una porción de la glucosa, la sal de Rochelle causó una intensificación del color, debido a la glucosa remanente.

**Concentración del sulfito.** El efecto de diferentes concentraciones de sulfito en el reactivo modificado (figura 1d), indicaron que se obtenía una máxima intensidad de color con una concentración de sulfito del 0.05%. En experimentos no mostrados, se obtuvieron esencialmente los mismos resultados a concentraciones de sulfito de 0.025 y 0.1%. Bajas concentraciones provocaron una pérdida de la linealidad, mientras que tanto altas como bajas concentraciones causaron una disminución de la intensidad del color y una pérdida de la glucosa.

**Concentración del hidróxido de sodio.** El efecto de diferentes concentraciones de hidróxido de sodio se muestra en la figura 1e. Altas concentraciones de hidróxido de sodio provocaron una intensificación del color, pero a la vez, contribuyeron a una pérdida de la glucosa. El nivel del 1% de hidróxido de sodio parece ser el más conveniente, ya que con éste se produjo la máxima intensidad de color sin la concomitante pérdida de glucosa.

**Concentraciones de fenol.** El máximo desarrollo del color se alcanzó con una concentración de aproximadamente 0.2% de fenol (figura 1f). En experimentos no mostrados en la figura, se obtuvieron los mismos resultados observados con 0.5% de fenol. Bajas concentraciones resultaron en una pérdida de la linealidad. La intensidad obtenida en presencia de 0.2% de fenol fue de alrededor de cinco veces la obtenida en ausencia del mismo. Sobre el rango probado, el fenol no tuvo efecto en la pérdida de glucosa.

**Concentración del ácido dinitrosalicílico.** Cuando se variaron las concentraciones del ácido dinitrosalicílico, la intensidad de color se aproximó al máximo, a una concentración de 1% (figura 1g). El ácido dinitrosalicílico, al igual que el fenol, no tuvo efecto en la pérdida de glucosa sobre el rango probado.

**Otras sustancias.** El resultado de pruebas preliminares sugiere la posibilidad de que otras sustancias podrían afectar la prueba del ácido dinitrosalicílico. Por ejemplo, era de interés el asegurar que, al usar la prueba en la medición de la actividad de celulasa,<sup>8,10</sup> la presencia de carboximetilcelulosa y el regulador de citratos a pH 5 podrían causar interferencia. Con can-

tidades de carboximetilcelulosa y regulador de citratos correspondientes a aquellas usadas en la medición de celulosa, se produjeron los efectos mostrados en la figura 1h. La carboximetilcelulosa provocó una intensificación del color, mientras que el citrato causó una depresión del mismo. Una mezcla de esas sustancias neutralizaron aproximadamente los dos efectos opuestos. Para determinar si el efecto del citrato pudiera ser a consecuencia de su acción reguladora, se hicieron pruebas con regulador de acetatos pH 5 en una concentración equivalente. Sin embargo, el acetato no afectó la prueba.

### Método final

Cuando están presentes soluciones puras de azúcares reductores, o cuando puede haber algunos contaminantes que se sabe no afectan al desarrollo del color o causan alguna pérdida de azúcares reductores, es posible utilizar el reactivo modificado en ausencia de las sales de Rochelle. Para estabilizar el color producido bajo tales condiciones, se adicionan las sales de Rochelle a la mezcla, inmediatamente después de desarrollar el color y antes de llevar a enfriamiento. El tiempo de calentamiento se incrementa hasta 15 minutos, debido a que el periodo de cinco minutos, adecuado para el procedimiento original, no produce un completo desarrollo del color en el procedimiento modificado. Para la linealidad de los datos producidos por este método, siempre es necesario proteger la glucosa y la estabilidad del color.

Si existen sustancias que interfieren en muestras desconocidas, deben correrse controles especiales. Tales controles consisten en soluciones estándar de azúcares reductores a los que se les han agregado cantidades apropiadas de las sustancias que causan esa interferencia. Cuando las sustancias que interfieren ocasionan una pérdida del azúcar, y particularmente cuando las cantidades de azúcares que se van a medir en muestras desconocidas son iguales o más pequeñas que la cantidad que se pierde, se adicionan cantidades conocidas de glucosa tanto a las muestras desconocidas como a los estándares.

El procedimiento de adicionar glucosa también se puede aplicar ventajosamente para compensar la pérdida de azúcares reductores ocurrida cuando se agregan las sales de Rochelle directamente en el reactivo del ácido dinitrosalicílico. Por ejemplo, es conveniente en la prueba de celulosa<sup>10</sup> introducir glucosa en la mezcla formada por la carboximetilcelulosa con el citrato y usar un reactivo modificado que contenga 20% de sales de Rochelle.<sup>8</sup> Bajo estas condiciones, la adición, por separa-

do de las sales de Rochelle a la mezcla de reacción después del desarrollo del color debe omitirse. Los controles para estas pruebas consisten en un blanco y soluciones estándar de glucosa, que contienen carboximetilcelulosa, citratos y la glucosa compensatoria.

### Discusión

La química de la prueba del ácido dinitrosalicílico para determinar azúcares reductores se ha aclarado previamente, al menos en una parte. El ácido 3,5-dinitrosalicílico se reduce a ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico, mientras que, en las pruebas más simples, los grupos aldehído parecen ser oxidados a grupos carboxilo.<sup>4</sup> Sin embargo, la equivalencia entre el ácido amino-nitrosalicílico producido y el azúcar no es exacta<sup>2</sup> y el hecho de que distintos azúcares pueden producir diferentes cantidades de color<sup>1,3,7</sup> sugiere que la química de la prueba puede ser apreciablemente más complicada.

Tales complicaciones pueden ser asociadas con las diversas reacciones de descomposición de los azúcares en soluciones alcalinas.<sup>3</sup> Si esta explicación es correcta, la reacción de los grupos aldehído de los azúcares agrupados con el ácido dinitrosalicílico puede verse como un competidor con reacciones colaterales que involucran la descomposición del azúcar. El efecto de diferentes concentraciones de los diversos constituyentes del reactivo y las sustancias extrañas como la carboximetilcelulosa o el regulador de citratos, sobre la cantidad de color producida y la destrucción de la glucosa, como se observa en el presente estudio, pudieran interpretarse de manera similar a como se hace con los efectos de la naturaleza y grado de las reacciones colaterales.

El reactivo del ácido dinitrosalicílico, en una forma que consiste sólo de ácido dinitrosalicílico disuelto en álcali, se ha utilizado con aparente éxito para medir el peso molecular de los productos resultantes de la hidrólisis del almidón.<sup>7</sup> Este método depende de la suposición de que todos los oligosacáridos superiores de las series homólogas, comenzando por la maltosa, pueden producir cantidades equivalentes de color con este reactivo. Estudios recientes sobre las reacciones de los miembros de series homólogas con el reactivo del ácido dinitrosalicílico, empezando por los disacáridos, no se han reportado, pero podrían ser de considerable interés.

La principal virtud de la prueba del ácido dinitrosalicílico para azúcares reductores radica en su gran conveniencia, comparada con otras pruebas de azúcares, particularmente cuando se requiere analizar grandes cantidades de muestras. Sin embargo, los factores antes discutidos deben

tomarse en cuenta con cierta consideración para evitar interpretaciones erróneas de los resultados.

- Paso de una corriente de nitrógeno a través de la mezcla; Reactivo de Sumner.
- Tratamiento del sulfito de sodio previo a la adición del Reactivo de Sumner.
- Concentración de las sales de Rochellé; reactivo modificado.
- Concentración del sulfito; reactivo modificado.
- Concentración del hidróxido de sodio; reactivo modificado.
- Concentración del fenol; reactivo modificado.
- Concentración del ácido dinitrosalicílico; reactivo modificado.
- Presencia de carboximetilcelulosa, citratos o la mezcla de ambos; reactivo modificado.

**Referencias**

- Bell, D. J.; Manners, D. J.; Palmer, A., *J. Chem. Soc.*, 3760, (1952).
- Brodersen, R.; Ricketts, H. T., *J. Lab. Clin. Med.*, 34, 1441, (1940).
- Gilman, H.; *Organic Chemistry, Advanced Treatise*, New York, Wiley, 2ª ed., Vol. 2, (1943), p. 1640.
- Hosttler, F.; Borel, E.; Deuel, H., *Helv. Chim. Acta* 34, 2132, (1951).
- Kolthoff, I. M.; Lingane, J. J., "Polarography", *Interscience*, New York, (1946).
- Mandels, G. R., *Quartermasteer Research and Engineering Center, Natick, Mass., private communication*.
- Meyer, K. H.; Van der Wyk, A. J. A.; Peng, C., *Helv. Chim. Acta* 37, 1619, (1954).
- Miller, G. L.; Blum, R.; Glennon, W. E., *Quartermaster Research and Engineering Center, Natick, Mass., unpublished data*.
- Reese, E. T., *Quartermasteer Research and Engineering Center, Natick, Mass., private communication*.
- Reese, E. T.; Siu, R. G. H.; Levinson, H. S., *J. Bacteriol.*, 59, 485, (1950).
- Sumner, J. B., *J. Biol. Chem.* 47, 5, (1921).
- Ibid.*, 62, 287, (1924-25).
- Ibid.*, 65, 393, (1925).
- Sumner, J. B.; Sisler, E. B., *Arch. Biochem.* 4, 333, (1944).

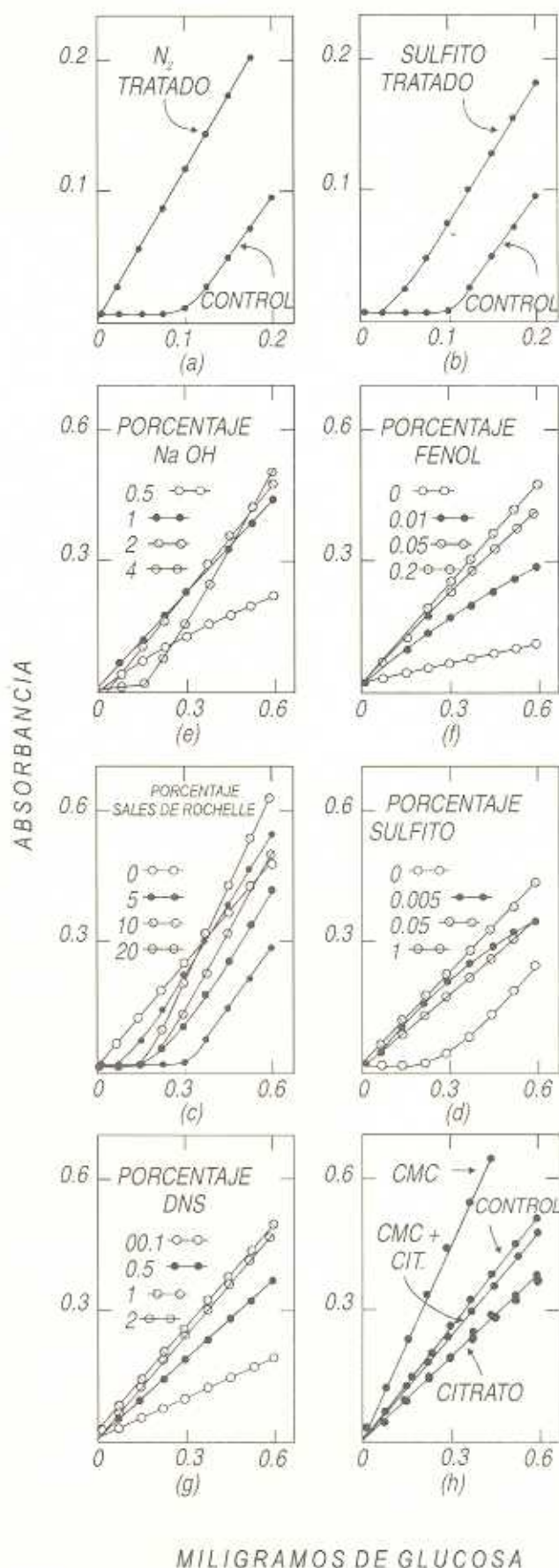


Figura 1

# El cometabolismo y la biorremediación de suelos

contaminados con sustancias xenobióticas

Dra. Ma. del Rosario Peralta Pérez\*

El constante crecimiento de las poblaciones humanas, junto con el desarrollo tecnológico a todos niveles, ha dado como resultado un incremento alarmante de la contaminación en el mundo. Esto ha propiciado que se busquen nuevas soluciones a ese problema; una de ellas es la biorremediación, que se define como el uso de microorganismos o partes de éstos para eliminar sustancias tóxicas en un sitio determinado.

Un fenómeno biológico que está estrechamente involucrado con la biorremediación es el "cometabolismo". El término fue propuesto inicialmente por Jackson W. Foster, en 1962, y lo describió como la transformación biológica de un compuesto, denominado cosustrato, en presencia obligada de un sustrato de crecimiento o suministrador de energía; esto quiere decir que los microorganismos transforman el cosustrato y el resultado (la molécula modificada), se acumula en forma estequiométrica mientras usa un sustrato para llevar a cabo la replicación celular y el mantenimiento. Debido a que generalmente se involucran reacciones de oxidación, se ha usado también el término cooxidación, aunque cometabolismo es un término más extenso que puede incluir reacciones de reducción, deshalogenación, etcétera.

Otros autores, como Dalton y Stirling (1982), han sugerido que cometabolismo se refiere a un metabolismo fortuito y no a un novedoso evento metabólico.

La razón por la que ocurre el cometabolismo no es clara, la principal explicación se da con base en la inespecificidad de las enzimas. Esto es, a veces se tiene la enzima capaz de metabolizar un paso, pero el produc-

to ya no puede seguir siendo transformado; o bien, se tiene una enzima que es inespecífica y actúa sobre un cosustrato estructuralmente similar al sustrato original, así que el producto ya no es reconocido y no puede seguir siendo transformado. Entonces, como regla podemos decir que muchas enzimas no son absolutamente específicas para un sustrato, actúan sobre moléculas con estructuras muy parecidas.

Como ejemplo de esto tenemos a:

- a) La metano monooxigenasa de bacterias metilotróficas.
- b) Tolueno dioxigenasa de bacterias aerobias.
- c) Tolueno monooxigenasa de bacterias aerobias.
- d) Dehalogenasas.

En la vida diaria, cuando un compuesto *recalcitrante* (difícil de degradar) se encuentra en el ambiente, como resultado de nuestras actividades industriales o domésticas, se acumula debido a que los microorganismos presentes son incapaces de *mineralizarlo* (oxidarlo hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ). Generalmente, esta incapacidad se debe a que dichos compuestos tienen estructuras no reconocidas por los microorganismos ya que son fabricados por el hombre; estos compuestos se denominan *xenobióticos* y un claro ejemplo de ellos son los plásticos. Hay veces que la mineralización puede favorecerse modificando las condiciones ambientales, o enriqueciendo los sistemas con nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio; o cambiando el pH y aireando. Sin embargo, como la cantidad de variables es muy grande o simplemente esta estrategia no funciona, es posible modificar una gran variedad de compuestos xenobióticos recalcitrantes por cometabolismo. En la tabla 1 se muestra una gran cantidad de ejemplos en donde podemos observar también

\*Profesora investigadora en el Laboratorio de Catálisis Enzimática del TESE.

Tabla 1. Compuestos xenobióticos recalcitrantes biotransformados por cometabolismo.

Microorganismo	Compuesto	Fuente
<i>Hydrogenomonas</i> sp.	DDT	Foehy Alexander, 1971.
<i>Arthrobacter</i> sp.	Bifenilospoliolorinados.	Kolery col., 1988.
<i>Lactococcus</i> y <i>Lactomostoc</i>	Carbohidratos y citrato	Cogan, 1987 Bandelly col., 1998.
<i>Pseudomonas</i>	Benzotiofenos metil sustituidos	Saffey col. 1992.
Bacterias Bacterias	Sucralosa PAHs: naftaleno, fenantreno, antraceno, fluoreno, pireno y fluoranteno.	Labrey Alexander, 1994 Bouchez col., 1995
Flora nativa de agua subterránea y sólidos de acuíferos	Cloroforno y 1,1,1 tricloroetano	Kimy col., 1997.
<i>Ciraphium</i> sp.	Metilter-butileter	Hauhsory col., 1997
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	1,1-dicloro-2,2-bis(4-clorofenil)etileno	Hay y Foehi, 1998.

la diversidad de microorganismos que pueden llevar a cabo estas reacciones.

El cometabolismo puede jugar un importante papel en la modificación e incluso mineralización de este tipo de moléculas; un compuesto recalcitrante como los hidrocarburos poliaromáticos que aquí se representan, que no pueden ser usados por una sola especie de microorganismos, puede ser degradado por una serie de microorganismos que actúan sobre sustratos específicos. Se ha postulado que este sistema de ayuda para la total mineralización de xenobioticos recalcitrantes ocurre en la naturaleza, aunque probarlo ha sido muy difícil.

Las observaciones acerca de la existencia del cometabolismo, así como de la interacción de diversas poblaciones, fueron realizadas inicialmente en el laboratorio, se han hecho esfuerzos por extrapolar los resultados al campo y aplicarlos en la biorremediación de suelos.

Las primeras evidencias del cometabolismo en la naturaleza fueron realizadas por Jacobson y colaboradores en 1980. Se ideó un sistema modelo, que simulara la naturaleza, usando para ello microorganismos de sitios y comunidades microbianas heterogéneas con el fin de observar el cometabolismo de varios herbicidas marcados radiactivamente: flucloralin, profluralin, trifluralin y nitrofen (todos ellos son químicamente similares). Se usaron lodos de una planta de tratamiento de aguas y se les adicionó los herbicidas en una concentración de

100 µg/ml, 250 ml; los lodos se colocaron en matraces Erlenmeyer y se agitaron a 40 rpm.

Se tomaron muestras en diferentes días y se enriqueció el matraz con la periódica adición de lodos, que proporcionaron fuente de carbono y energía así como nuevos microorganismos. Se tuvieron dos tipos de muestras: unas que fueron aireadas continuamente y otras que sólo se airearon en forma esporádica, provocando una anaerobiosis discontinua. Los principales resultados obtenidos se muestran en la tabla 2, el tipo de aireación, el compuesto y el carbono 14 recuperado en los productos durante los diferentes días. Se puede observar que en todos los casos existe transformación de los herbicidas, y dicha transformación aumenta con el tiempo de incubación con ambos tipos de aireación.

En ninguno de los dos casos se encontró radioactividad asociada a la fracción de ácidos nucleicos del lodo, demostrándose que estos sustratos no se emplean en la formación de biomasa. Dicho estudio fue un primer esfuerzo por demostrar cometabolismo en un sistema similar a la naturaleza.

Otro estudio clásico fue realizado por Wilson y Wilson en 1985, este trabajo es de cometabolismo de tricloroetileno (TCE) en suelo. Se sabe la monooxigenasa de metanótrofos oxida y declorina metanos halogenados; se ha reportado también que las bacterias que oxidan propano pueden epoxidar etilenos. Estas observaciones sugieren que las enzimas

Forma de alineación	Compuesto	<sup>14</sup> C recuperado en productos (%)			
		18	34	55	88
Aeróbico	Flucloralin	12.0	22.0	92	91
	Profluralin	3.5	27.0	66	87
	Trifluralin	3.0	7.0	N.D.	49
	Nitrofen	<0.1	1.2	30	40
Anaerobiosis discontinua	Flucloralin	N.D.	32	90	95
	Profluralin	0.5	2.8	17	23
	Trifluralin	3.4	5.7	82	91
	Nitrofen	N.D.	1.3	1.8	11

Tabla 2. Degradación de herbicidas en condiciones aerobias y anaerobias.

que epoxidan etileno pueden transformar al TCE. A fin de investigar esta posibilidad, se enriqueció un suelo haciendo pasar una corriente de gas natural (rica en metano) a fin de favorecer a los microorganismos que oxidan pequeños alcanos del gas natural para luego examinar la capacidad del suelo para remover el TCE. El TCE fue alimentado en una concentración de 150 µg/l, se observó que las columnas alimentadas con TCE que no fueron previamente sometidas a la corriente de gas natural no presentaron degradación significativa de TCE.

Comparando con otros resultados, se observa que mientras existe mineralización en este proceso aerobio, enriquecido con gas natural, bajo condiciones anaerobias la transformación es mínima y atribuible al cometabolismo.

Los resultados hasta ahora analizados son en sistemas líquidos; estos modelos no se parecen a lo que ocurre en ambientes naturales; por lo que no es posible aplicar directamente estos conocimientos a la realidad en forma directa. Una propuesta es usar los principios de la Fermentación en Medio Sólido (FMS) para la bioremediación de suelos. En trabajos realizados en la Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, usando un reactor de un kg de capacidad con suelo contaminado con hidrocarburos, enriquecido con un inóculo adaptado para la degradación de estos compuestos y bagazo de caña como agente de volumen, se logró una degradación de aproximación 18% de los HTP.

Otra idea para entender los complejos sistemas naturales, ha sido proponer un nuevo soporte para hacer crecer microorganismos sobre él. La propuesta ha sido emplear un sistema denominado "sol-gel", en donde alcóxidos metálicos reaccionan con agua, dando como resultado un polímero poroso capaz de retener agua y atrapar en su red polimérica una molécula modelo (fenantreno), que se sabe es cometabolizado en presencia de otra fuente de carbono, glucosa en este caso. El xerogel se prepara en

un medio ácido y se adiciona una solución de fenantreno disuelto en dimetilformamida, se calienta a 60° C, se lava y seca nuevamente, a fin de eliminar el etanol tóxico producido durante la reacción (Peralta-Pérez y Col, 2001).

Este soporte ha servido para hacer crecer sobre él, a dos hongos filamentosos *Aspergillus niger* ATCC9642 y *Phanerochaete chrysosporium* A594; se ha reportado que ambos hongos sólo biotransforman el FE a alcoholes, obteniéndose metabolitos que se acumulan en el MC lo cual podría atribuirse al fenómeno del cometabolismo.

Este tipo de sistemas simplificados y empleando FMS nos permite tener modelos de la naturaleza limpios y más fáciles de estudiar, la intención es que con el tiempo se obtengan resultados que se puedan extrapolar a la naturaleza. ☺

## Bibliografía

- Dalton H. y Stirling, D. I. (1982), *Cometabolism*, Phil. Trans. R., Soc. Lond., B297, 481-496.
- Jacobson S. N.; O'mara, N. L. y Alexander M. (1980). *Evidence for cometabolism in sewage*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 40: 917-921
- Peralta-Pérez M. R., Gutiérrez-Rojas M., Saucedo-Castañeda G. y Campero A. *SiO<sub>2</sub> Xerogel: A Suitable inert support for microbial growth*, *J. Sol-Gel Sci. and Tech.*, (2001), 20: 105-110.
- Wilson J. T. y Wilson B. H. (1985), *Biotransformation of trichloroethylene in soil*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 242-243.





# Incremento de la transferencia de masa

de hidrocarburos del suelo a la fase líquida en un cultivo de suelo en suspensión\*

Dra. Mayola García Rivero\*\*

En México existen varias áreas contaminadas con hidrocarburos del petróleo como consecuencia de las actividades de extracción, refinamiento y transporte. Otra fuente de contaminación importante, en el caso de combustibles, son los derrames en ductos que son perforados para tomas clandestinas, y los derrames o fugas en sitios donde se distribuye el combustible. Los derrames de hidrocarburos, debido a la complejidad de las mezclas involucradas, pueden poner en peligro la integridad de los ecosistemas, así como la preservación de los recursos naturales.

La remediación de suelos contaminados con estas sustancias, representa una gran área de oportunidad para el cuidado del medio ambiente. En general los suelos contaminados por hidrocarburos derivados del petróleo son tratados por biorremediación, solidificación/estabilización, tratamiento térmico o físicoquímico. En particular la biorremediación es una buena opción, pero presenta una desventaja en cuanto al tiempo del proceso. En este sentido, es necesario enfocar la investigación a tratar de implementar estrategias que acorten el tiempo de proceso. El tratamiento de suelos contaminados, a través de la aplicación de métodos biológicos, puede efectuarse en fase sólida o en cultivo de suelo en suspensión. En ese último proceso, el suelo contaminado se trata en un biorreactor, en donde se realizan la extracción y la biodegradación de los contaminantes. El mezclado con-

tinuo en el biorreactor mantiene el suelo en suspensión, a la vez que permite el rompimiento de los agregados de suelo, favoreciendo la disolución de contaminantes y, en consecuencia, se reduce la resistencia a la transferencia de masa de los contaminantes de la fase sólida a la fase líquida.

Cuando un compuesto ha permanecido por largo tiempo en el suelo (intemperización) tiende a migrar hacia los poros y microporos del suelo, sitios a los cuales no tienen acceso los microorganismos (Alexander, 2000). A fin de que tales compuestos estén disponibles para los microorganismos, deben desorberse para llegar a la fase líquida. Con el propósito de incrementar la tasa de desorción de los compuestos, se ha propuesto el uso de surfactantes y solventes. La utilización de los surfactantes ha mostrado efectos contradictorios (Liu y col., 1995) y además su empleo en biorreactores agitados puede favorecer la producción de un exceso de espuma. En este trabajo se optó por el uso de solventes para mejorar el proceso global de la biodegradación, debido a que se conoce poco sobre el efecto de los solventes para incrementar la biodegradación de hidrocarburos en un sistema de suelo en suspensión.

El objetivo fundamental fue mejorar la transferencia de masa de hidrocarburos intemperizados de un suelo contaminado a la fase líquida, incrementando la desorción de los hidrocarburos mediante la adición de un solvente.

La muestra de suelo con la que se desarrolló el estudio fue tomada de un sitio próximo a una refinería localizada en el estado de Veracruz. Del mismo lugar se tomó una planta nativa (*Cyperus Laxus* Loam) que crecía en

\*\*Profesora Investigadora Titular "A" del TESE.  
\*Trabajo para obtener el grado de doctora en Biotecnología por la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.



Figura 1. *Cyperus Laxus Loam*, que crecía en el sitio contaminado.

el suelo contaminado, para a partir de su rizósfera, aislar un consorcio microbiano adaptado a concentraciones elevadas de hidrocarburos, mismo que se utilizó para estudiar el proceso de biodegradación.

El trabajo se dividió en tres partes: en la primera, se estudió el efecto sobre la solubilización y desorción de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP), de los solventes no polares: hexano, benceno y tolueno, y de los solventes polares: butanol, acetona y metanol. La mayor desorción de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) se obtuvo con tolueno, cuyo extracto contiene una alta proporción de compuestos aromáticos y asfaltenos, según lo indicó el análisis por cromatografía en columna.

Tabla 1. Resultados de solubilidad /desorción y consumo de hidrocarburos en presencia de los diferentes solventes.

Posteriormente, se estudió el efecto de los mismos solventes en la desorción/biodegradación simultánea, en frascos serológicos de 165 ml, con 30 ml de suspensión de suelo y 10% de inóculo (v/v), incubados a 30 °C y 150 rpm. Se encontró que la adición de tolueno (ver tabla 1) incrementó de manera significativa, con respecto al control sin solvente, el consumo de HTP y particularmente el consumo de compuestos poliaromáticos. Se ha sugerido (Álvarez y Vogel, 1998) que la presencia de compuestos poliaromáticos de bajo peso molecular induce la biodegradación de poliaromáticos, tal como se observó en el presente estudio. Los resultados de la desorción/biodegradación simultánea con los demás solventes probados, no fueron significativamente diferentes al control sin solvente, excepto con benceno, tratamiento en el cual se obtuvo el menor consumo debido a su alta toxicidad (Huertas y col., 1998). En el caso del metanol, el bajo consumo podría explicarse por la alta concentración usada para permitir la desorción de los hidrocarburos.

Basándose en los resultados obtenidos, se seleccionó al tolueno para la siguiente serie de estudios. En la segunda parte, se analizó el efecto de la concentración de tolueno en la desorción y después en el proceso global desorción/biodegradación en cultivo de suelo en suspensión. Los ensayos se realizaron en frascos serológicos de 165 ml con 30 ml de suspensión de suelo, 10% de inóculo (v/v) y se incubaron a 30 °C y 150 rpm. En las pruebas de desorción, se adicionó azida de sodio, para inhibir el crecimiento microbiano. La tasa de desorción mostró un comportamiento exponencial con respecto a la concentración de tolueno. En el intervalo de concentraciones de tolueno probadas, la mejor degradación ocurrió cuando se adicionaron 14,000 mg/kg de suelo base seca; en 30 días de

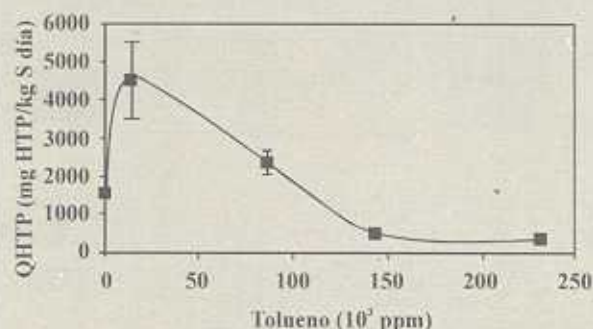
	Solubilidad (g/g solvente)	Desorción (mg/kg suelo)	Hidrocarburos consumidos (mg/kg de suelo)
Hexano	0.379	158 ± 14	25 100 ± 12
Benceno	2.733	317 ± 15	11 000 ± 4
Tolueno	4.615	391 ± 9	44 400 ± 1
Butanol	0.913	201 ± 16	30 400 ± 1
Acetona	0.418	140 ± 4	36 500 ± 2
Metanol	0.112	66 ± 6	3 700 ± 1
Control	----	----	28 600 ± 2

tratamiento, los HTP iniciales, 292,000 mg de HTP/kg de suelo base seca, disminuyeron un 47%. Sin embargo, el consumo de HTP fue inhibido cuando se adicionaron más de 14,000 mg de tolueno/kg de suelo. Estos resultados se explican debido a que la toxicidad de un compuesto está en función de la concentración en la membrana celular, más que de la estructura química del compuesto (Isken y col., 1999).

La tasa de consumo de hidrocarburos ( $q_{TPH}$ ), se estimó con base en los datos de hidrocarburos residuales. El cambio de  $q_{TPH}$  en función de la concentración de tolueno (ver figura 3) sugirió un posible efecto inhibitorio de la concentración de HTP-Tolueno. Para los fines de este trabajo se supuso que el consumo de hidrocarburos sólo ocurre en la fase líquida (Goshal y col., 1996) y este consumo fue explicado por un modelo de inhibición por sustrato (Alexander y Show, 1989) acoplado a un mecanismo sencillo de desorción en estado transitorio. El modelo permitió apoyar la hipótesis de que el consumo de HTP se lleva a cabo en la fase líquida. Se estimaron las constantes de afinidad ( $k_m$ ) y de inhibición ( $k_i$ ) y el grupo adimensional de Damköhler (Ghoshal y col., 1996) que proporciona información sobre la relación entre la biodegradación de hidrocarburos y la transferencia de masa de hidrocarburos entre la superficie del suelo y la fase líquida.

El modelo generó una  $k_m$  y una  $k_i$  de 57 y 490 mg HTP/l de suspensión, respectivamente. Este modelo también permitió estimar el grupo adimensional de Damköhler ( $Da$ ), el cual indicó que la transferencia de masa de los hidrocarburos es el paso que limita el proceso de biodegradación en concentraciones de tolueno menores a 86,000 mg/kg de suelo (Zhao y Voice, 2000). Con concentraciones de tolueno superiores, la reacción biológica se convierte en el paso limitante, según lo indica el  $Da$ . Los resultados se explican por el efecto inhibitorio de los compuestos solubles en la fase líquida (HTP-Tolueno) que pueden disminuir la actividad de la población microbiana, provocando la acumulación de HTP-Tolueno.

Los resultados obtenidos confirmaron que es factible el uso de solventes, específicamente tolueno, para acelerar la desorción de HTP y mejorar la biodegradación de los hidrocarburos. La biodegradación de los HTP en la fase líquida fue exitosamente explicada por el modelo propuesto, que incluye tanto a la transferencia de masa como al componente de reacción biológica. La tasa de desorción de HTP por efecto del tolueno podría incrementarse tantas veces como se quisiera, sin embargo, la toxicidad de los compuestos HTP-Tolueno marcan el límite máximo tolerable. ☺



## REFERENCIAS

- Alexander M, Aging, "Bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants", *Environ. Sci. Technol*, 2000, 34:4259-4264.
- Alexander, M. y Scow, K. "Kinetics of biodegradation in soil", Reactions and movement of organic chemicals in soils, Shawhney and Brown Eds.; *Soil Science Society of America Inc.*, Wisconsin, USA, 1989, pp. 243-269.
- Olivarez, P. y Vogel, T. "Substrate interactions of benzene, toluene and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries", *Appl. Environ. Microbiol*, 1991, 37:2981-2985.
- Ghoshal, S.; Ramaswami, A. y Luthy, R. "Biodegradation of naphthalene from coal tar and heptamethylnonane in mixed batch systems", *Environ. Sci. Technol*, 1996, 30: 1282-1291.
- Huertas M.; Duque E.; Marqués, S. Ramos J. "Survival in Soil of different toluene-degrading *Pseudomonas* strains alter solvent shock", *Environ. Sci. Technol*, 1998, 64:38-42.
- Isken, S.; Derks, A.; Wolffs, P. Y Bont, J. "Effect of organic solvents on the yield of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12", *Appl. Environ. Microbiol*, 1999, 65:2631-2635.
- Liu, Z.; Jacobson, A. y Luthy, R. "Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant system", *Appl. Environ. Microbiol*, 1995, 61:145-151.
- Zhao, X. y Voice, T. "Assessment of bioavailability using a multicolumn system", *Environ. Sci. Technol*, 2000, 34:1506-1512.

# Las dificultades en el aprendizaje del idioma inglés

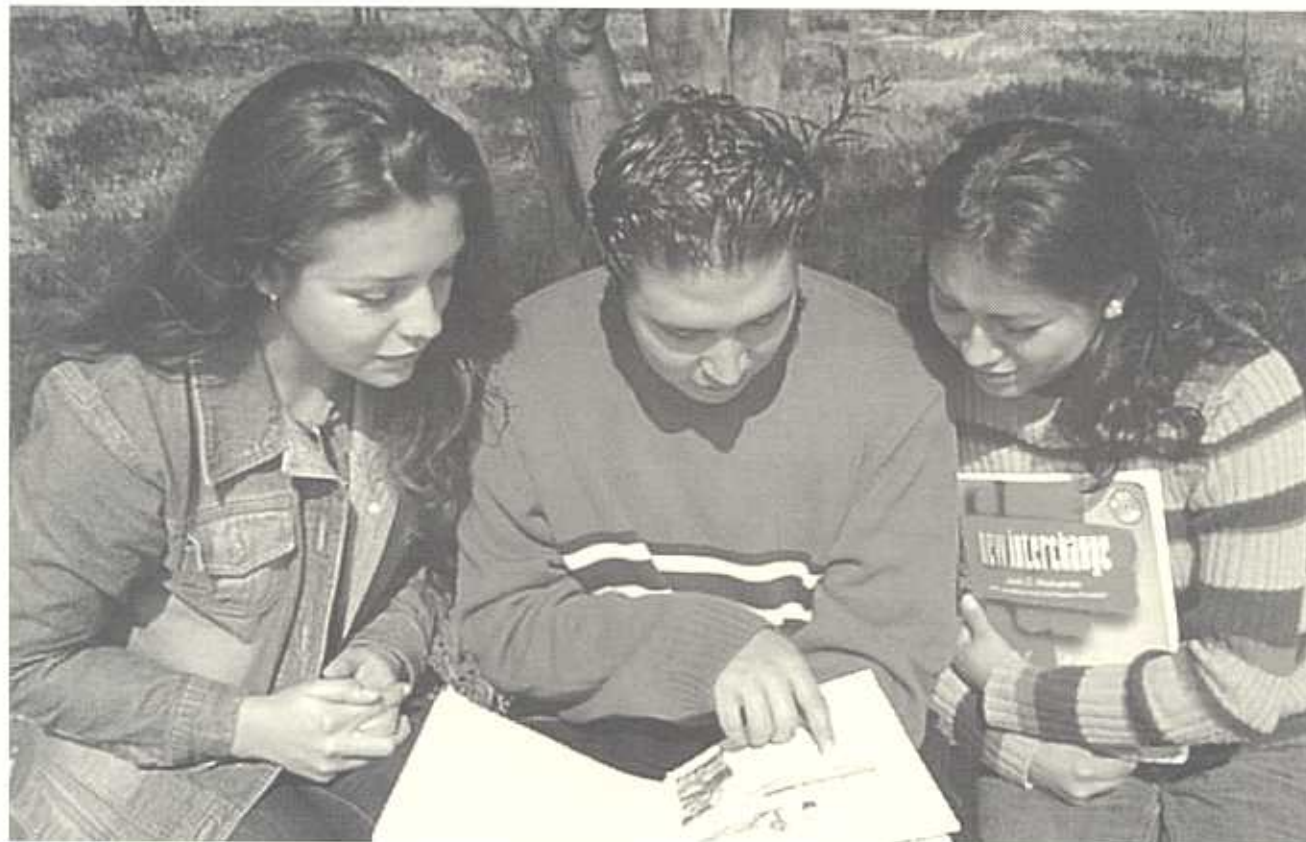
Prof. Miguel Ávalos Camino\*

Prof. Juan Carlos Sapien Medina\*

La primera forma de comunicación que una persona utiliza es a través del llanto, misma que inicia al momento de nacer; a través de este sonido el recién nacido comunica diferentes necesidades (malestar, hambre, dolor, entre otras).

Los primeros sonidos que un ser humano emite, ya sea risa o llanto, se efectúan por medio de la modulación de las cuerdas vocales, que funcionan al expulsar aire con diferente intensidad, posición de la lengua y movimiento de los labios, así como diferentes músculos del rostro.

\*Profesores del Centro de Idiomas del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.



Con este mecanismo y sonidos iniciales, el nuevo ser prepara los músculos que intervienen en la combinación de sonidos fonéticos, los cuales estarán determinados por el ambiente en el que se desenvuelve.

En este proceso continuo, el individuo aprende en forma cotidiana a imitar sonidos –lo que llamamos balbuceo– y a relacionarlos con objetos que le prepararán para emitir sonidos combinados y formar las palabras que en el futuro utilizará.

De esta manera, al llegar a la niñez, la persona ha obtenido la práctica suficiente para articular su lenguaje. Ha aprendido que al entorpecer el paso del aire con los dientes, la lengua, la boca y otros órganos y músculos, puede generar consonantes. El proceso es lento y a veces imperceptible, y debemos tomar en cuenta que como el pequeño se encuentra ejercitando la manera como debe, lingüísticamente, nombrar los objetos, el infante por lo regular no pronuncia correctamente las palabras, empero, ya lo intenta.

En un principio, con las palabras que dice, el niño no identifica los objetos y la mayoría de las ocasiones tampoco a las personas, pero ya puede expresar vocablos sencillos como mamá y papá; de manera emocional identifica quién es la madre; sin embargo, no siempre relaciona a dicha persona con la palabra, pero sí asocia características generales, diciéndole mamá a quien representa el sexo femenino, y papá a quien ejemplifica el masculino.

Al avanzar en su lenguaje, comienza a identificar los vocablos fonéticos con los objetos, y cómo y cuándo usarlos; este es el momento cuando el niño empieza realmente a aprender a hablar, y parece no haber nada que lo detenga. En promedio un niño aprende entre 5 y 10 palabras por día (incluyendo frases ya elaboradas).

### La función muscular en el proceso de aprendizaje de un idioma

Para poder hablar, son necesarias no sólo las cuerdas vocales, también la boca, la lengua, el diafragma, la na-

riz (en idiomas como el francés), el tórax (en idiomas como el alemán), entre otros; todo ello para adquirir una pronunciación correcta y dar sentido a las palabras. Cada idioma tiene sus peculiaridades: habilidades particulares o ejercicios bucales que se necesitan practicar, los cuales corresponderán, en principio, a la lengua vernácula (de su país o región), y de alguna manera predeterminan la capacidad de aprender un idioma diferente al materno.

Los movimientos musculares son uno de los principales obstáculos cuando intentamos hablar una lengua extranjera, porque nuestros hábitos consisten en hacer ciertos sonidos con determinados músculos y/o partes del cuerpo; siendo el español un idioma que demanda una gran cantidad de movimientos bucales, se tiende a desarrollar las habilidades correspondientes y a ejercitar los músculos que intervienen en este proceso (la boca); el francés es nasal, por ello los hablantes de este idioma tienden a desarrollar más la nariz, y en el caso del inglés, se requieren habilidades y partes diferentes (como la lengua) y es necesario desarrollarlas para aprender a hablar adecuadamente.

Como consecuencia de ello, para una persona que naturalmente habla español le será más fácil aprender italiano o francés (lenguas romances con influencia del latín), que aprender inglés; pero para una persona que habla naturalmente alemán, le será más sencillo el inglés que el español o italiano.

### Y ¿qué hay de los estudiantes mexicanos?

En México la mayoría de los estudiantes (provenientes de escuelas públicas) tienen su primer contacto con el idioma inglés en la secundaria; quienes continúan estudiando, pueden tener la materia de inglés en el nivel medio superior, y afortunadamente la mayoría de ellos son impulsados a estudiar una lengua extranjera en la universidad. Sin embargo, la mayor parte de los alumnos en la secundaria y en la preparatoria han sido sometidos, para el aprendizaje del idioma inglés, a un método llamado traducción gramatical (*grammar*



translation), el cual es muy buena herramienta para la lectura y comprensión de textos, pero muchos estudiantes que han estudiado inglés por este método, se frustran y adquieren como real la idea de que **el inglés es difícil**. Otro aspecto importante es la inexperiencia de los profesores para enseñar una lengua extranjera; triste, pero cierto.

La experiencia pone de manifiesto que en algunas instituciones dedicadas a la enseñanza del idioma inglés, cuentan con alumnos que cursan niveles de introducción, pero que son "maestros de base" en escuelas secundarias y de nivel medio superior en la materia de inglés; por tanto, resulta obvio que ellos no tienen ni la capacidad ni los conocimientos para instruir a un grupo en esta lengua.

No obstante, dicho problema se puede encarar conveniéndolo a los académicos (sepan o no el idioma inglés) a preparar sus clases considerando nuevos sistemas de enseñanza que contengan técnicas y didácticas de grupo adecuadas para el proceso de enseñanza-aprendizaje; con ello se conseguirá que profesores se encuentren a la altura de la calidad que se pretende alcanzar en la educación.

Otro obstáculo al que se enfrentan los alumnos interesados en aprender inglés, es que ellos presentan dificultades para expresarse correctamente en español, lo cual significa que los hispanoparlantes no conocen completamente su idioma, y la manera más natural de aprender inglés es traduciendo; por ello, al enfrentarse a una forma gramatical distinta del inglés y pretender traducirla al español, se hace incorrectamente, lo que complica aún más el aprendizaje.

La principal razón es porque cuando una persona está aprendiendo a hablar el idioma vernáculo, desde que el individuo es un bebé, crea mapas mentales para comunicar sus ideas; luego entonces, la gente puede entender lo que intenta decir. Si los mapas mentales están formados incorrectamente en el lenguaje nativo (español), la traducción estará incorrecta también; es por ello que comúnmente se escucha que una persona bilingüe por lo regular aprende también su mismo idioma.

Jerome Brown argumenta que el análisis de los errores en el aprendizaje de los idiomas, revela que el desarrollo del interlenguaje se confronta con el lenguaje nativo. De acuerdo con Brown, la autocorrección de errores es importante para el alumno, porque le ayuda a entender la gramática de otro idioma, con lo cual explica que al entender las construcciones, éstas se

adquieren formando un mapa mental diferente, y conforme el individuo va aceptando como propia la nueva forma de comunicarse, también corrige errores comunes en el lenguaje materno.

Krashen (1981) distingue dos formas: adquisición y aprendizaje. La primera se refiere al entendimiento y la comunicación, mientras que la segunda concierne al uso y automonitoreo de la forma de transmisión del mismo, la cual usualmente llamamos *metacognición*. Argumenta que el proceso de adquisición es más crítico que el proceso de aprendizaje y se debe considerar a través de las actividades que envuelven la comunicación, así como a los ejercicios gramaticales y el vocabulario empleado en el proceso comunicativo.

Lo que pretendemos dejar claro al citar a Brow y Krashen, es la importancia de la práctica en el salón de clase, utilizando la comparación de los puntos gramaticales en ambos idiomas (inglés y español), de tal manera que los estudiantes, cuando estén aprendiendo el inglés, construyan correctamente sus mapas mentales.

Por ello mencionamos a los profesores que nada de lo que se ha dicho y hecho servirá, si no lo usamos y aplicamos correctamente, cualquier cosa que se tenga a la mano es buen material, porque cuando aprendimos a hablar nuestra lengua vernácula, lo hicimos relacionando los objetos que nos rodean con los sonidos que emitimos; siendo así nuestro principal propósito, contar con mejores herramientas para enseñar, que no necesariamente son las más caras, sino aquellas que implican el utilizar lo que está a nuestro alcance. ☺

## Bibliografía

- Brooks, Nelson (1960), *Language Learning: theory and practice*, Edit. Harcourt brace, New York.
- Ignasi, Vila e Inés de Gispert (Departamento de Psicología General de la Universidad de Barcelona), *Pensamiento y lenguaje*.  
[www.freewebhostingbyfortunecity.com](http://www.freewebhostingbyfortunecity.com) 03/12/02
- Kearsley, Greg (2002) *Adult Learning*.  
[www.gkearsley@sprynet.com](mailto:gkearsley@sprynet.com) y <http://home.sprynet.com/~gkearsley>. 01/12/02
- Piaget, Jean (1995) *Seis estudios de psicología*, Ed. Labor, Colombia.
- Piaget, Jean (2000) *Psicología del niño*, Ed. Morata.

# Paradigmas de la Organización del siglo XXI\*

Lic. René Francisco Palma Avendaño\*\*

**E**n este nuevo siglo, los cuatro paradigmas que deben caracterizar a las organizaciones del mundo son: la Competitividad, la Calidad, el Conocimiento y el Liderazgo.

## Paradigma de la Competitividad

A fin de comprender este concepto, es necesario primero dejar en claro el término globalización: "Es la manifestación de las transformaciones económicas, políticas, sociales y culturales que expresan, entre otras cosas:

- Los cambios que se dan al nivel de la participación del Estado en la economía.
- La mayor presencia de la sociedad civil en la toma de decisiones.
- La aparición de nuevos valores derivados de un cambio en la cultura".

La competitividad representa la capacidad de una empresa para producir bienes y servicios que le permitan diferenciarse de su competencia y mantenerse en el largo plazo en el mercado. Para ello, se requiere tomar como base los siguientes factores determinantes:

- 1 Diversificación de las preferencias del consumidor, según estratos de ingreso.
- 2 Ajuste de los volúmenes de producción a la demanda.

- 3 Mayor importancia en la calidad.
- 4 Oportunidad en la entrega y asistencia para el uso del producto o servicio.

Para mantenerse a un nivel competitivo, las empresas en las últimas décadas han tenido que hacer significativos cambios en sus conceptos, estructuras organizacionales y de funcionamiento; por ejemplo, mientras antiguamente la operación de un negocio se concebía como una estructura vertical, con separación por áreas independientes y con labores especializadas, hoy se busca la interacción y cooperación de las líneas que la conforman y que están definidas por productos finales.

Así también, mientras que antaño se buscaba generar grandes inventarios de mercancías para absorber las variaciones de la demanda, en la actualidad se procura adaptar el ritmo de producción al de las necesidades del mercado. (ver cuadro 1)

## Paradigma de la Calidad

En este rubro, igualmente se han dado trascendentales cambios en la concepción empresarial que se tenía acerca de la calidad, la cual ya no sólo se restringe al producto en sí, sino abarca los procesos, procedimientos, capacitación, administración, controles, instalaciones, documentación, etcétera. (Ver cuadro 2)

Para cualquier organización moderna, es imperioso contar con un Manual de Calidad, el cual expresa por escrito el compromiso de la Dirección en establecer y mejorar continuamente sus procesos. Este documento orienta los mismos hacia las necesidades del cliente o usuario, de acuerdo con los criterios que tenga la norma a utilizar, los cuales brindan certeza al comprador de la calidad que ofrece un proveedor sin tener que auditarlo.

\* Reseña de la conferencia presentada en el marco de la Segunda Jornada del Contador en el TESE, el 10 de diciembre, en el Auditorio de Contaduría.

\*\* Es egresado de la Licenciatura en Administración de la Universidad Nacional Autónoma de México; actualmente se desempeña como Secretario Particular del Director General del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec.

**Cuadro 1**

BASES DE LOS NEGOCIOS	ANTES	AHORA
Mando y Control	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mando centralizado.</li> <li>Controles externos (supervisores, procedimientos).</li> <li>"La gerencia es la que sabe".</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Metas de coordinación centrales.</li> <li>Controles internos (sistemas autorregulables).</li> <li>Proceso decisorio participativo.</li> </ul>
Estructura de Operación	<ul style="list-style-type: none"> <li>Niveles bien definidos en sentido vertical.</li> <li>Departamentos separados, especializados por funciones.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lineas de interacción y cooperación entre funciones a lo largo de líneas integradas, definidas por productos finales.</li> </ul>
Personal y Entrenamiento	<ul style="list-style-type: none"> <li>El personal es una pieza de recambio desechable.</li> <li>Procedimientos y rutinas estandarizadas.</li> <li>Definición de áreas para cada individuo.</li> <li>Especialización en una sola función.</li> <li>Flujo de decisiones de arriba hacia abajo, de informaciones de abajo hacia arriba.</li> <li>"Existe una manera óptima".</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>El personal como recurso a desarrollar.</li> <li>Sistemas flexibles.</li> <li>Definición de tareas para cada grupo.</li> <li>Personal polivalente.</li> <li>Amplia delegación de toma de decisiones.</li> <li>Flujo múltiple horizontal y vertical.</li> <li>"Siempre puede haber una mejor manera".</li> </ul>
Equipos y maquinaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Equipos dedicados. Tamaño óptimo de planta para cada producto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Equipo adaptable, programable y flexible.</li> <li>Crecimiento orgánico según la demanda real.</li> </ul>
Medición de la Productividad	<ul style="list-style-type: none"> <li>Medición distinta según el área (compras, producción, mercadotecnia, entre otros).</li> <li>Porcentaje de tolerancia en calidad y rechazos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Productividad total, medida a lo largo del proceso de producción de cada producto.</li> <li>La meta es cero defectos y cero rechazos.</li> </ul>
Proveedores, clientes y competidores	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aislamiento del mundo exterior; que los proveedores cumplan en precios, lograr productos estandarizados para clientes masivos.</li> <li>Competencia en función al precio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fuerte interacción con el mundo exterior.</li> <li>Lazos de colaboración con proveedores, con clientes y en algunos casos, con competidores (por ejemplo, en Investigación y Desarrollo).</li> </ul>

El establecimiento de un sistema de calidad estaría dado en cuatro niveles principales:

- Nivel 1 Política de calidad, manual de calidad.
- Nivel 2 Procedimientos generales y específicos.
- Nivel 3 Instructivos de trabajo.
- Nivel 4 Registros, libros y documentos.

Uno de los recursos para la regulación sistematizada de la calidad en una empresa u organización, es la norma ISO 9000:2000, la cual establece una serie de que deberán cumplirse para obtener una certificación. Un sistema de calidad comprende las siguientes etapas:

### 1 Documentación:

- Manual de calidad
- Procedimientos
- Registros

**Cuadro 2**

VISIÓN TRADICIONAL DE CALIDAD		VISIÓN ACTUAL DE CALIDAD
Productividad y calidad son objetivos que se contraponen.	→	La productividad se logra a través del mejoramiento.
Calidad medida por el grado de cumplimiento de estándares o especificaciones.	→	Calidad medida en términos de satisfacción plena del cliente, mejoramiento de procesos del producto o servicio de la empresa.
La calidad se obtiene por medio de la inspección del producto.	→	La calidad se obtiene por el diseño del producto o servicio.
La calidad es una función separada y orientada a la evaluación del producto y servicio.	→	La calidad es parte inherente a todos los procesos y sistemas de todas las áreas de la empresa.
Los trabajadores y empleados siempre tienen la culpa de la falta de calidad.	→	La calidad es responsabilidad primordial del grupo ejecutivo dirigente, y en especial, del Director General o Gerente General.
Las relaciones con los proveedores son a corto plazo y basadas en el costo.	→	Las relaciones con los proveedores son a largo plazo y basadas en la calidad.

### 2 Implantación:

- Difusión
- Capacitación
- Aplicación documentos

### 3 Seguimiento:

- Auditorías Internas
- Revisiones periódicas de la Dirección

## Paradigma del Conocimiento

El mundo está incesantemente cambiando en cuatro factores determinantes: *competidores, mercado, tecnología, y fuerza de trabajo* (la cual se basa en el conocimiento).

El conocimiento se define como la capacidad de los individuos y sociedades para comprender y transformar su realidad. Sin embargo, entender no es equivalente a comprender, pues esto último sólo ocurre cuando se aplica a algo. Asimismo, el incremento del capital social de conocimiento está

dado por la competencia de la fuerza de trabajo, la capacidad de innovación tecnológica y la capacidad de integración cultural.

Las empresas tienen que convencerse rápidamente de que hay que tratar a los empleados como un patrimonio por desarrollar y no como un costo por reducir. Por lo tanto, una de las líneas de transición más concretas hacia una economía de conocimiento, es la progresiva transformación de la capacitación, de ser una función de apoyo administrativo, a una estratégica de negocio.

El conocimiento está ligado de manera intrínseca al aprendizaje, cuyo ciclo es el siguiente:

Preguntas → Ideas → Pruebas → Reflexión

La organización que aprende, es una visión particular de una empresa que busca la capacidad de incrementar continuamente sus habilidades para lograr dar forma a su futuro.

Dentro del proceso de aprendizaje, se pueden mencionar tres supuestos:

- a) Es parte del trabajo y este implica aprendizaje.
- b) Su objetivo fundamental es crear significado a partir de las experiencias que un individuo y los demás tienen en el mundo.
- c) El aprendizaje organizacional resulta de un esfuerzo planeado e intencional por aprender.



Finalmente, el conocimiento también incluye ideales, valores y emociones, así como imágenes y símbolos.

### Paradigma del Liderazgo

Para explicar este último paradigma es necesario primero delinear el perfil del entorno en que vivimos:

#### El Modelo Económico Neoliberal

- Al centrarse en el mercado y fomentar la competencia entre personas, sobreviven los más fuertes (“darwinismo social”).
- Se produce no lo que se necesita, sino lo que se vende.
- Crea una sociedad de consumo donde todo está disponible, pero sólo a quien lo puede pagar.
- Lo privado, lo propio, lo particular, es más importante que lo colectivo, lo de todos (esto es algo que puede llevar al fracaso a una sociedad, porque ésta se basa en la interacción de los individuos que la integran).

#### La Ciencia y la Tecnología

- Mayor productividad en la actividad humana.
- Mejor calidad de vida (más alimentos, más confort).
- Menos enfermedades.

#### Cultura Post-moderna


- Se producen seres humanos “light”.
- La juventud se caracteriza por el hedonismo, el consumismo a ultranza (la fórmula es: “yo soy igual a lo que tengo, más lo que consumo”, lo cual convierte en superficiales a los individuos). La promiscuidad (“todo se vale”); el relativismo (falta de compromiso y entrega), y la falta de solidaridad.
- Cambio en la escala de valores.
- Desintegración familiar y cultural.

Ante los desafíos que imponen los factores mencionados, la figura del líder cobra especial relevancia, dadas sus características:

- El líder encamina hacia un fin; provoca que las diversas fuerzas de la comunidad estén correctamente alineadas hacia una finalidad común.
- Utiliza el consenso, pero no espera a que otros decidan por él.
- Es un estadista; a partir de los hechos, puede imprimir una dirección más clara.

Sin embargo, el liderazgo está sujeto a elementos condicionantes como:

- Las habilidades y actitudes del líder.
- Las habilidades y actitudes de los seguidores.
- Las circunstancias.

En palabras de Gandhi, “el líder debe tener congruencia entre el sentir, el pensar y el actuar”. 

## PROMOTORES DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA



### Doctor Manuel V. Ortega Ortega

Asesor para la Creación  
de la Fundación del CINVESTAV

Recibió el título de Químico Biólogo Parasitólogo en la Escuela Nacional de Ciencias del Instituto Politécnico Nacional (IPN), en 1953. Obtuvo el grado de Doctor en Bioquímica en el Instituto Tecnológico de Massachusetts en 1960.

En 1961 se integra al grupo fundador del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. De 1962 a 1978 se desempeñó en esta institución como Secretario de la Dirección General, Jefe del Departamento de Biología Celular y Coordinador de los Departamentos de Genética y Biología Celular y de Bioquímica.

De 1975 a 1977 fue Director Adjunto de Apoyo al Sector Científico en el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), y fungió como Director General del CINVESTAV-IPN de 1978 a 1982.

Fue Subsecretario de Educación e Investigación Tecnológicas de la Secretaría de Educación Pública durante dos periodos (1982-1988 y 1988-2001), así como Director General del CONACYT de 1988 a 1991. Miembro de la Junta Universitaria de la Universidad de Sonora desde 1991 a la fecha; cuenta con una amplia trayectoria como catedrático y ponente en diversas universidades mexicanas e Instituciones de Educación Superior.

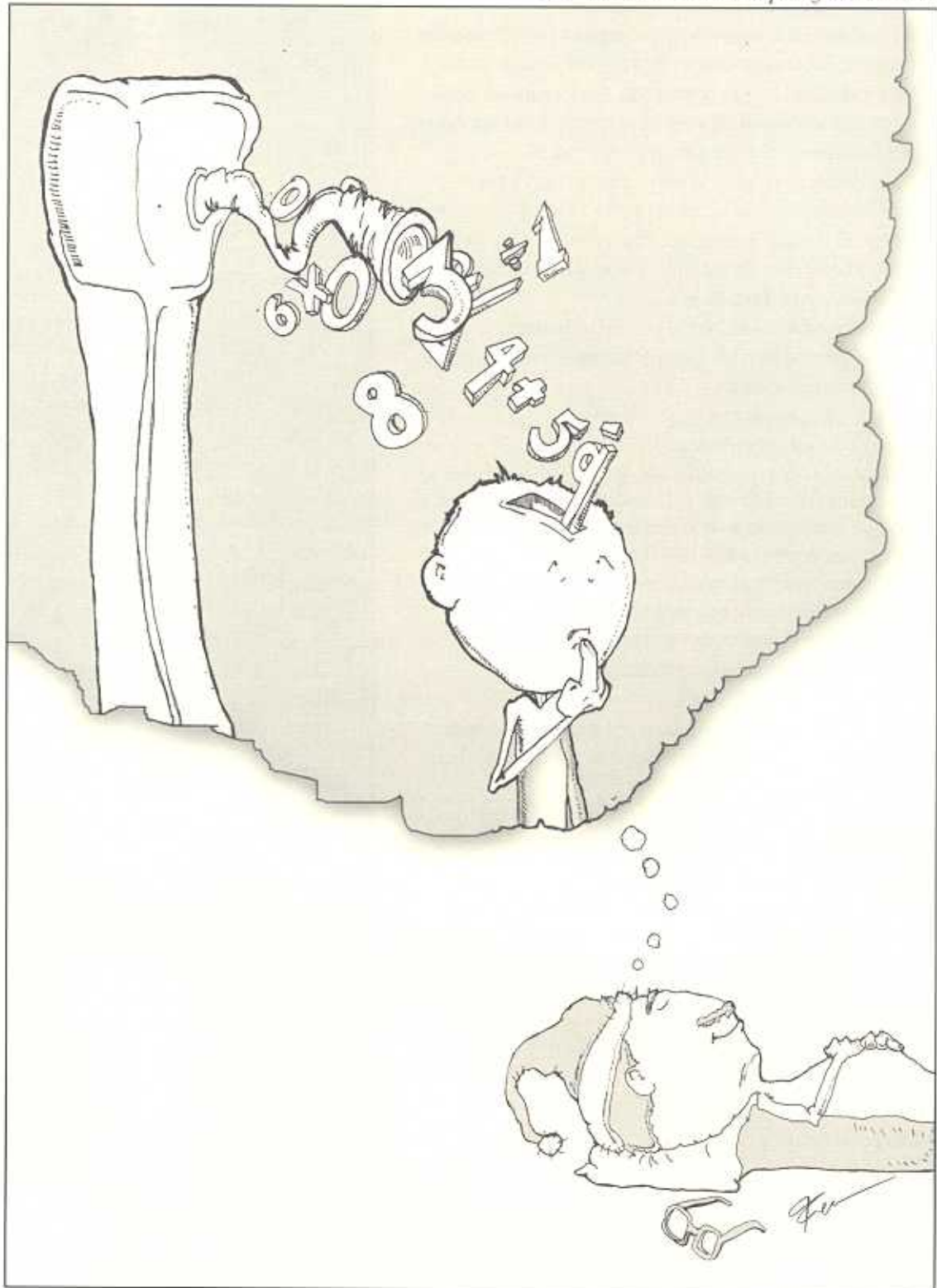
El Dr. Manuel Ortega fue nombrado Asesor para la Creación de la Fundación del CINVESTAV en marzo del 2003, cargo que desempeña con destacado profesionalismo y notable experiencia.



# Tecnohumor

por ferruco

*El sueño de los profesores...*



# TECNO AED



<http://www.ciberhabitat.gob.mx>

Página que reúne artículos, reportajes, investigaciones, tutoriales y tópicos referentes a la informática en diversos aspectos y aplicaciones.

<http://www.anfei.org.mx>

Asociación Nacional de Facultades y Escuelas de Ingeniería agrupa a Instituciones de Educación Superior del país para promover acciones encaminadas a mejorar la formación del Ingeniero.



<http://www.ou-lohe.qc.ca>

La organización Universitaria Interamericana promueve la mejora en la calidad de la educación superior. Cuenta con 380 instituciones miembros y constituye una red única de aliados al servicio de la cooperación universitaria interamericana en la cual el Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec ingresó desde noviembre de 2003.





*Museo de Sor Juana Inés de la Cruz  
Amecameca, Estado de México*



Estado de México



**AVANZA**