



Reporte Final Proyecto Interno Convocatoria 2022

Fecha: 30/11/22

Título del Proyecto	No. De Proyecto
Análisis de la respuesta transcriptómica diferencial del fitopatógeno <i>Erwinia amylovora</i> expuesto a nanoestructuras de óxido de zinc usadas para su control	PI-22-17

Líder Técnico y Administrativo del Proyecto	
Nombre	Dr. Joan Sebastián Salas Leiva
Departamento de Adscripción/Sede	Medio Ambiente y Energía, sede CIMAV Chihuahua

Resumen Ejecutivo del proyecto
<p>En el presente documento, se describen las actividades y productos alcanzados para cada uno de los objetivos planteados en nuestro proyecto. De manera general, el desarrollo del proyecto no tuvo inconvenientes y se cumplió con aproximadamente el 95% del plan de trabajo propuesto (incluyendo los entregables). Nuestro objetivo principal, fue analizar la respuesta transcriptómica diferencial de <i>Erwinia amylovora</i> expuesta a nanoestructuras de óxido de zinc (neZnO). Para ello, se sintetizaron cuatro tipos de neZnO: plateletas i) sin Vo (Pt-SV) y ii) con Vo (Pt-CV), y quasiredondas iii) sin Vo (Qr-SV) y iv) con Vo (Qr-CV). Las técnicas de caracterización empleadas XRD, SEM, TEM, SAED, RAMAN, XPS, UV-vis, corroboraron la morfología y la generación de (VO) en las neZnO empleadas. Para los análisis de actividad antimicrobiana de las neZnO se usaron tres cepas bacterianas (<i>E. amylovora</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>). Los resultados indican que las neZnO tienen la capacidad de inhibir el crecimiento en 50% de dichas cepas en concentraciones que van desde 65 a 128 mg L⁻¹. En <i>E. amylovora</i> las plateletas tuvieron mayor actividad antimicrobiana (IC₅₀= 105 mg L⁻¹) que las quasiredondas (IC₅₀=128 mg L⁻¹), sin importar que éstas estén enriquecidas o no con VO (p<0.05).</p> <p>Los análisis genómicos indican que el genoma de <i>E. amylovora</i> es de ~3.8 Mb (3839213 bp) de tamaño y el genoma del plásmido es ~28.3 Kb (28370 bp) este último es 100% idéntico al plásmido pEa29 (CP050241.1 ncbi) que confiere resistencia a Estreptomicina. El análisis de expresión diferencial indicó que la exposición de <i>E. amylovora</i> al IC₅₀ Pt-SV generó una alta y baja expresión de 219 y 253 transcritos (genes) respectivamente (p<0.01). De la totalidad de transcritos diferencialmente expresados, el 10% pertenecen a 28 rutas metabólicas y el 90% restante corresponde</p>



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



a transcritos que se encuentran implicados en más de una ruta metabólica. Los procesos biológicos influenciados por la adición de **Pt-SV** incluyen: reparación de ADN, transporte de metabolitos, catabolismo de macromoléculas, movilidad, metabolismo de ATP, y los componentes celulares influenciados incluyen tanto la pared celular y membrana como el citoplasma.

La capacidad de las **Pt-SV** para inhibir el crecimiento de *E. amylovora* con resistencia a Estreptomycina, es alentador porque se presenta como una alternativa para el control de este fitopatógeno evitando el uso de antibióticos convencionales que generan resistencia antimicrobiana. Las funciones biológicas afectadas por **Pt-SV** en *E. amylovora* seguirán siendo motivo de estudio con el propósito de comprender mejor las rutas de toxicidad de estas. Este estudio abre paso para la continuidad de investigaciones *in situ* (en granjas productoras) y de manera paralela direccionar la búsqueda del desarrollo de productos a escala comercial con base en **Pt-SV** para controlar este fitopatógeno.

Actividades académicas y/o científicas de relevancia realizadas

Las actividades académicas y científicas están estrechamente ligadas a los objetivos establecidos en el “**Formato para Propuestas 2022 de Proyectos Internos del CIMAV**”

A los objetivos propuestos fueron:

Objetivo General

OG: Analizar la respuesta transcriptómica diferencial de *Erwinia amylovora* expuesta a nanoestructuras de óxido de zinc (neZnO)

Objetivo específicos

OE1: Sintetizar y caracterizar neZnO de morfologías quasiredondas y plateletas, con y sin vacancias de oxígeno (Vo).

OE2: Determinar la concentración inhibitoria de crecimiento 50% (IC₅₀) en aislados de *E. amylovora* con cada una de las neZnO sintetizadas.

OE3: Ensamblar *de novo* el genoma cromosomal y extra-cromosomal de *E. amylovora*.

OE4: Determinar la expresión génica diferencial de *E. amylovora* como respuesta a la exposición a neZnO.

OE5: Determinar las rutas metabólicas que se afectan por acción de neZnO

Nota: la metodología detallada de los objetivos relacionados con genoma, transcriptómica y expresión génica se puede descargar automáticamente del enlace: <https://perun.biochem.dal.ca/downloads/dsalas/Methods.zip>



Relación de Objetivos, y productos (entregables) comprometidos con el trabajo realizado en los siete meses de duración del proyecto.

OE1: Sintetizar y caracterizar neZnO de morfologías quasiredondas y plateletas, con y sin vacancias de oxígeno (Vo).

Durante el proyecto se logró sintetizar con los métodos hidrotérmico y coloidal dos tipos de neZnO: plateletas de ~200 nm de largo y quasiredondas ~30 nm de diámetro **ver Anexo1: Figura 1 a 2)** respectivamente. A cada una de estas neZnO se les pudo generar (o enriquecer) vacancias de oxígeno (Vo). De esa manera, se obtuvo un total de cuatro grupos de neZnO: plateletas i) sin Vo (**Pt-SV**) y ii) con Vo (**Pt-CV**), y quasiredondas iii) sin Vo (**Qr-SV**) y iv) con Vo (**Qr-CV**). La caracterización microestructural de forma, tamaño, composición elemental y determinación de la presencia de Vo en las neZnO se realizó mediante diferentes técnicas como SEM, TEM, XRD, Raman, UV-Vis, XPS. En la sección de anexos se presenta algunos resultados de algunas técnicas de caracterización (**Anexo1: Figura 1 a 4**). La caracterización completa del material y la discusión de los resultados obtenidos se encuentra descrita en el artículo "*Defects on the structure and chemical bond of nanosized zinc oxide particles and their antimicrobial activity*" sometido a evaluación para su publicación en la revista Environmental Science and Pollution Research (Q1) (**ANEXO_2: Artículo sometido**).

OE2: Determinar la concentración inhibitoria de crecimiento 50% (IC₅₀) en aislados de *E. amylovora* con cada una de las neZnO sintetizadas.

Para este propósito además de hacer pruebas de toxicidad de las neZnO con *E. amylovora* realizamos pruebas con otras bacterias modelo como: *E. coli* (gram-negativa) y *S. aureus* (gram-positiva). Después de realizar varias pruebas determinamos que las neZnO tiene la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano en un 50% en concentraciones desde 63 y 128 mg L⁻¹. Se observó que las bacterias gram-positivas presentan mayor sensibilidad con respecto a las gramnegativas debido a la diferencia de concentraciones para obtener la IC₅₀. Esto puede deberse a las diferencias existentes en la conformación de su membrana y la cantidad de peptidoglucanos. En *E. amylovora*, las **Pt-SV** tuvieron mayor actividad antimicrobiana (IC₅₀= 105 mg L⁻¹) que las quasiredondas (IC₅₀=128 mg L⁻¹), sin importar que éstas estén enriquecidas o no con VO (p<0.05) (**Anexo1: Figura 5**).



OE3: Ensamblar de novo el genoma cromosomal y extra-cromosomal de *E. amylovora*

El número de lecturas de ADN (reads) fue 39820527 y el de ARN varió entre 59905014 (control R1) hasta 91262967 (**Pt-SV** R1). El genoma ensamblado de *E. amylovora* es de aproximadamente 3.8 Mb de tamaño y está representado en 211 contigs. El genoma del plásmido es ~28.3 Kb, ensamblado en un contig único que es 100% idéntico al plásmido pEa29 (CP050241.1 ncbi). **Anexo1: Tabla1** Resumen de características de cada uno de los ensamblajes obtenidos.

El mapeo de reads de ADN sobre el genoma resalta variación mínima en el mapeo de lecturas genómicas, lo cual es ideal e indica que el genoma fue ensamblado con número homogéneo de reads sin evidencia de sesgo, excepto en unas pequeñas áreas altamente repetitivas. En el caso de ARN, se observa variación en el mapeo de lecturas de RNAseq en las réplicas tanto de los controles como del tratamiento con **Pt-SV (Anexo1: Fig. 6)**, esto es esperado y fue cuantificado en términos de expresión diferencial (ver siguiente objetivo).

OE4/OE5: Determinar la expresión génica diferencial y las rutas metabólicas de *E. amylovora* como respuesta a la exposición a neZnO.

Se detectó que las **Pt-SV** provocan una alta y baja expresión de 219 y 253 transcritos ($p < 0.01$), respectivamente. Los 10 transcritos con mayor o baja expresión corresponden a genes codificantes de proteínas transportadoras y relacionadas con la producción de energía (**Anexo1: Fig. 7**). De la totalidad de transcritos diferencialmente expresados, el 10% pertenecen a 28 rutas metabólicas y el 90% restante corresponde a transcritos que se encuentran implicados en más de una ruta (**Anexo1: Tabla 2**). Los procesos biológicos influenciados por la adición de **Pt-SV** incluyen: reparación de ADN, transporte de metabolitos, catabolismo de macromoléculas, movilidad, metabolismo de ATP (**Anexo1: Tabla 3**) y los componentes celulares incluyen tanto la pared celular y membrana como el citoplasma (**ver anexo1: Tabla 4**).

Actividades realizadas en beneficio de la sociedad/Descripción de la forma en que sería posible hacer una transferencia de los resultados del proyecto a la sociedad

El cultivo de manzana en México es muy importante, en el año 2020 se produjeron aproximadamente 714.203 toneladas de este fruto. Entre las afecciones de su producción, está la provocada por la bacteria *E. amylovora* causante de la enfermedad conocida como "mancha de fuego" que afecta al árbol y a los frutos causando grandes pérdidas económicas. El propósito en este proyecto fue hacer



investigación que combine ciencia básica y aplicada para buscar alternativas para el control de este fitopatógeno. Los resultados obtenidos son prometedores porque las **Pt-SV** parecen controlar el crecimiento microbiano y además se obtuvo información que aún estamos analizando para comprender en detalle como estas **Pt-SV** afectan el metabolismo microbiano y como se podrían usar efectivamente para su control. El beneficio para la sociedad es precisamente la generación de esta información. Sin embargo, para que haya un beneficio tangible a nivel social, es necesario obtener financiamiento para realizar ensayos prácticos para evaluar la efectividad y factibilidad de la aplicación de neZnO en granjas productoras de manzana.

Expectativas generadas en el ámbito Científico y tecnológico como resultado del proyecto

Los resultados obtenidos indican que las neZnO tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de *E. amylovora* (resistente a estreptomycin). Esta resistencia es posiblemente el resultado del mal uso o uso excesivo de dicho antibiótico en las granjas de Cuauhtémoc (Chihuahua). Por esta razón, las expectativas generadas por nuestros resultados son altas, ya que Pt-SV se presentan como una alternativa para el control de este fitopatógeno y así evitar el uso de antibióticos convencionales. Consideramos que nuestro estudio abre la oportunidad para realizar investigaciones que permitan a futuro el desarrollo de productos comerciales para tratar la mancha de fuego provocada por *E. amylovora* en los manzanos. Sin embargo, consideramos que existen varios retos; entre los que se encuentran el escalamiento de producción (masivo) de plateletas de ZnO, conocer estabilidad de plateletas en solución de dispersión, forma de aplicación en campo, sensibilidad colateral de estas partículas en el ambiente, entre otras.

También es importante mencionar que con la difusión realizada en este proyecto hemos podido atraer la atención de investigadores del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) y de productores de manzana de Cuauhtémoc con el propósito darle continuidad a este tipo de estudios. En la actualidad se tiene una idea base para generar un nuevo proyecto que permita generar conocimiento sobre efectos de la plateletas de ZnO en cultivo de manzanos.

Logros de Objetivos/Entregables

Objetivo/Entregable (De acuerdo a protocolo)	Resultado obtenido (De acuerdo a protocolo)	En su caso, motivo de no alcanzar el objetivo/entregable





<i>Entre paréntesis, los entregables comprometidos</i>		
Generación de un nuevo convenio (1)	Se generó el documento para la celebración del convenio académico general entre CIMAV y el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). (ANEXO_2: Convenio CIAD)	
Artículos JCR (2 enviados)	De los dos artículos que se aspiraba a someter, se sometió uno y el otro aún está en preparación. El artículo sometido se titula <i>"Defects on the structure and chemical bond of nanosized zinc oxide particles and their antimicrobial activity"</i> a la revista Environmental Science and Pollution Research (Q1) relacionado con la caracterización de las neZnO y su potencial antimicrobiano (ANEXO_2: Artículo sometido)	El segundo artículo, aún esta en proceso de análisis y escritura, debido que la información obtenida sobre rutas y procesos biológicos alterados por la adición de Pt-SV es enorme. En realidad, no esperábamos que la adición de las Pt-SV afectase dramáticamente múltiples rutas metabólicas y componentes celulares de manera simultánea. Por esta razón estamos realizando un sondeo detallado para ranquear cuales de esas alteraciones son las desencadenantes primordiales de las demás alteraciones detectadas y así entender el mecanismo de acción de las neZnO. El borrador del documento tiene como título tentativo <i>"Nanostructures of zinc oxide (neZnO): their effect on Erwinia amylovora and on apple tree soil rhizosphere"</i> . La revista a la que se lo desea



		someter es Hazardous Materials (Q1)
Artículo en extenso (1)		El artículo en extenso no se envió, porque no fue posible encontrar un congreso en el cual se incluyera de manera particular la temática que abordamos en nuestra investigación.
Trabajo en congreso (1 internacional)	Dentro del marco de la XLVII Semana de Química Internacional organizada por la UACH en el curso de Nanotoxicología la estudiante de DCTA de Aurora Roxana Araiza Campos presentó el trabajo "Nanotoxicidad en Microorganismos Aislados" donde se presentaron resultados parciales obtenidos en nuestro proyecto interno. (ANEXO_2: Congreso internacional)	
Actividad de divulgación (2)	1. <i>Nanoestructuras de óxido zinc para el control de Erwinia amylovora, patógeno que provoca la mancha de fuego en manzanos</i> , publicado en la revista electrónica PTIC con arbitraje (ISSN 2007-1310). 2. <i>Control de la mancha de fuego en manzanos</i> , el cual fue publicado en la sección de Ciencia y Tecnología del diario EL SUDCALIFORNIANO (tiraje 15000 ejemplares).	



	(ANEXO_2: Artículos de difusión)	
Generación de tesis (1 de doctorado)	Nuestro proyecto incluyó algunos aspectos relacionados a los objetivos de la tesis doctoral de la estudiante de DCTA Aurora Roxana Araiza Campos, que esta bajo mi asesoría académica. Parte de los resultados obtenidos en nuestro proyecto harán parte de los resultados de su investigación doctoral denominada "Efecto de nanoestructuras de ZnO sobre <i>E. amylovora</i> y el microbioma del suelo del manzano (<i>Malus domestica</i>)". (ANEXO_2: Tesis doctorado)	
Realización de Prácticas Profesionales (1)	Se incorporaron tres estudiantes de último semestre de la carrera de Ingeniería en biotecnología del Tecnológico de Monterrey. (ANEXO_2: Prácticas profesionales)	

Impactos del proyecto		
Impactos	Productos <i>(Publicaciones, patentes, tesis, convenios con sector salud, gobierno, industria, solución de problemas de la población, etc)</i>	Beneficiarios <i>(Directos o potenciales, sector salud, población rural, urbana, marginada, mejoramiento de vivienda, PYMES, etc.)</i>
Social	2 artículos de divulgación.	Sociedad en general
Científico/Tecnológico	2 artículo científicos (1 en escritura) en revistas indexadas Q1.	Comunidad científica



Productivo/Económico	NA	NA
Ambiental	NA	NA

Análisis FODA del equipo de trabajo y operación en la realización del proyecto

Debilidades:

Hasta el momento no hemos detectado debilidades, debido a que cada miembro del equipo de trabajo contribuyó activamente durante la ejecución del proyecto, tanto en ideas globales, así como dentro de sus áreas de experticia.

Fortalezas:

El equipo de trabajo lo constituyó un grupo de investigadores y estudiantes, con diferentes formaciones académicas y experiencias profesionales. Esta multidisciplinaria permitió un desarrollo fluido de las metodologías contempladas en el proyecto e interpretación de datos, lo cual fue determinante para la consecución de los objetivos planteados.

Amenazas:

La dificultad de obtener citas para caracterizar el material sintetizado en los equipos de microscopía, espectroscopía de CIMAV. Entendemos que esta concurrencia es algo común debido a la alta demanda de los equipos. Sin embargo, consideramos que debido al corto plazo de ejecución del proyecto (7 meses) esto se convirtió en un factor que generó presión durante la primera etapa del proyecto.

Oportunidades:

Durante el desarrollo del proyecto, el grupo de trabajo realizó sugerencias para realizar experimentos complementarios con el propósito de recopilar más información y ampliar conocimiento de este proyecto. También se discutió la búsqueda de financiamiento para dar continuidad al proyecto en granjas productoras de manzana.

Sugerencias para próximas convocatorias

Consideramos que el tiempo de ejecución de los proyectos es muy corto (7 meses) por lo que se podría estudiarse la posibilidad de extenderlo hasta un año o más. Nuestro proyecto demuestra que se pueden obtener resultados en tiempos cortos, pero que su análisis y el entendimiento demandan más tiempo dado que los resultados fueron de alta complejidad. Adicionalmente, este tipo de proyecto que realizamos requiere de más fondos financieros debido a las técnicas necesitadas tecnologías, por lo cual sugerimos incrementar el monto de financiamiento.





GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Joan Sebastian Salas Leiva

INFORMACIÓN ADICIONAL
Fotografías, diagramas, dibujos, etc



ANEXO 1. Figuras y Tablas

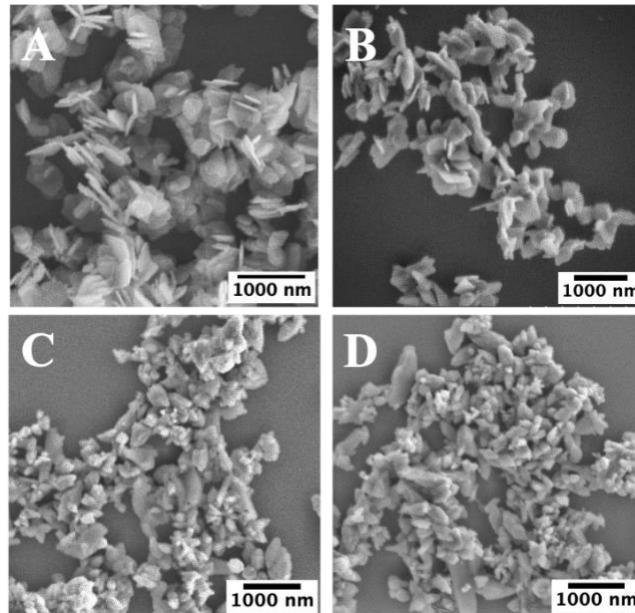


Figura 1. SEM de neZnO con forma de A) Pt-SV B) Pt-CV; C) Qr-SV y D) Qr-CV.

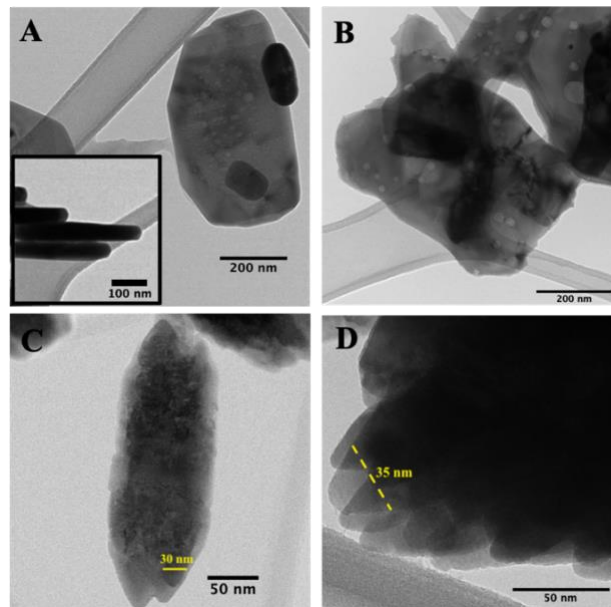


Figura 2. TEM modo campo claro de neZnO con forma de A) Pt-SV B) Pt-CV; C) Qr-SV y D) Qr-CV.

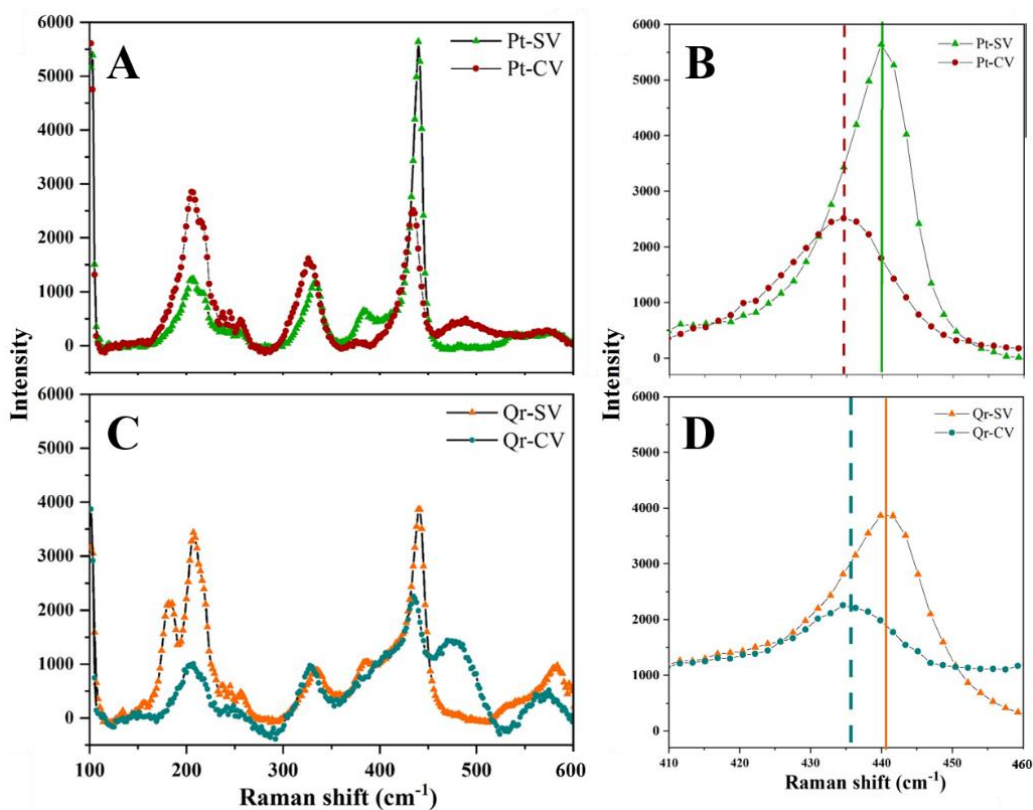


Figura 3. Comparación del análisis de banda Raman considerando el ajuste Lorentziano utilizando el software Fityk para plaquetas sin y con vacancias de oxígeno (SV-CV) en el panel A y tipo cuasi-redondeado (SV-CV) en el panel C. Los paneles B y D muestran la magnificación para el modo $E2^{\text{high}}$ asociado a la vibración del oxígeno y su influencia de los defectos estructurales en la intensidad y el cambio de la banda Raman.

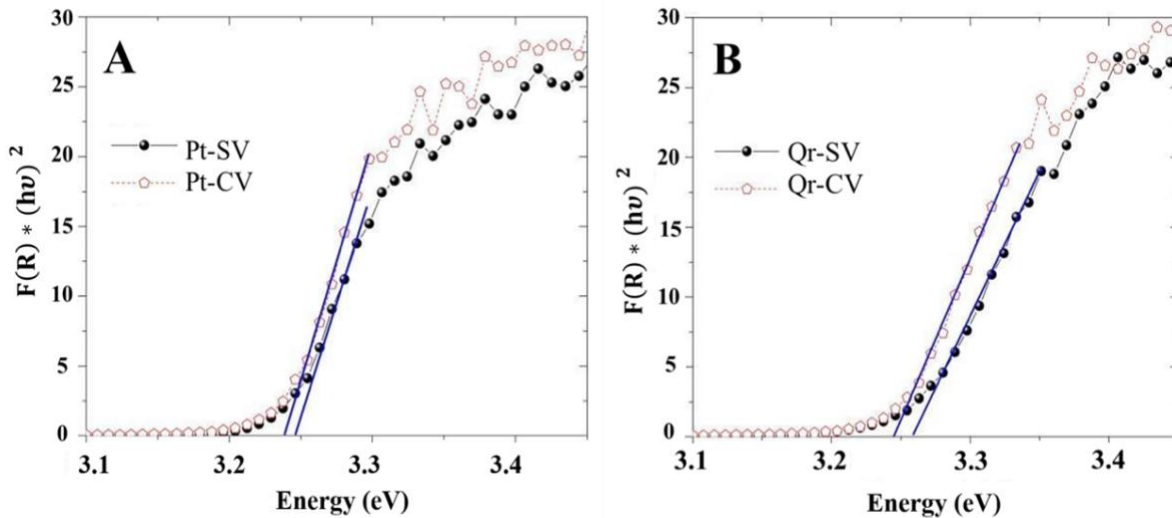


Figura 4. UV-Vis en unidades Kubelka-Munk y la determinación del valor energético de la banda prohibida mediante el método Tauc para neZnO con menor presencia de VO y NPs de ZnO enriquecidas con VO.

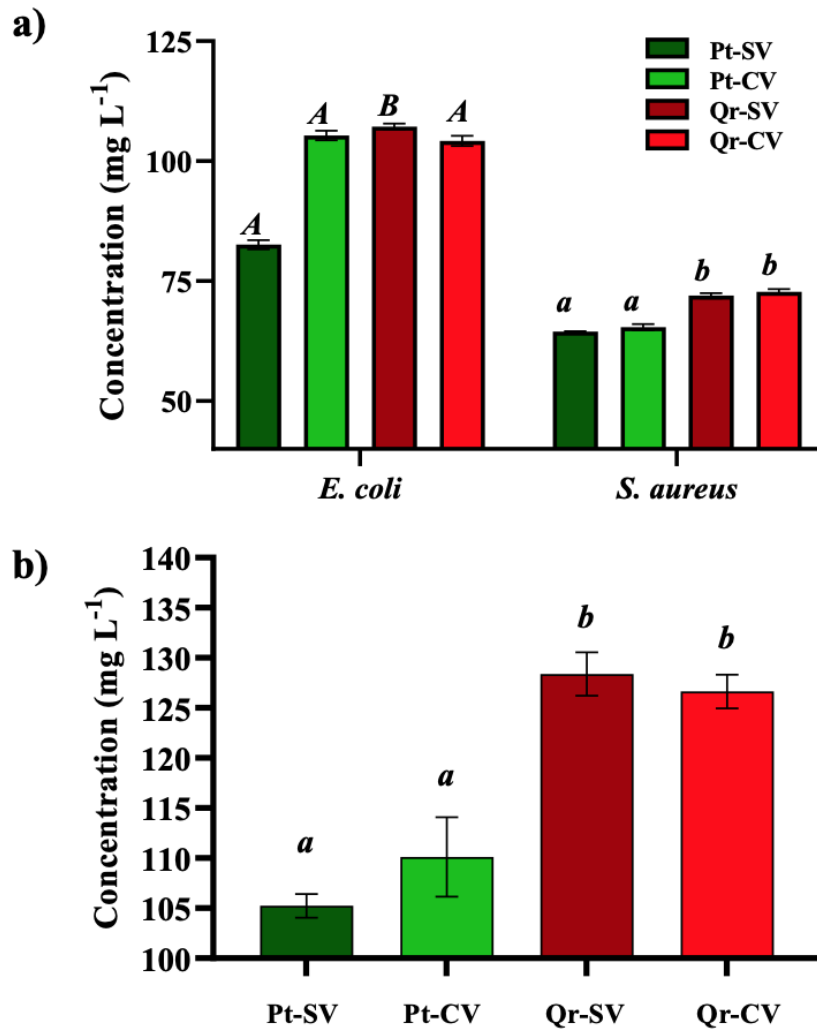


Figura 5. Determinación de la concentración inhibitoria 50% en A) *Escherichia coli* (gram-negativa), *Staphylococcus aureus* (gram-positiva). B) *Erwinia amylovora* (gram-negativa). Plateletas sin vacancias de oxígeno (Pt-SV), Plateletas con vacancias de oxígeno (Pt-CV), Quasiredondas sin vacancias de oxígeno (Qr-SV), Quasiredondas con (Qr-CV). Los valores se representas como medias \pm SE. Letras en la parte superior de las barras indican $p < 0.05$.

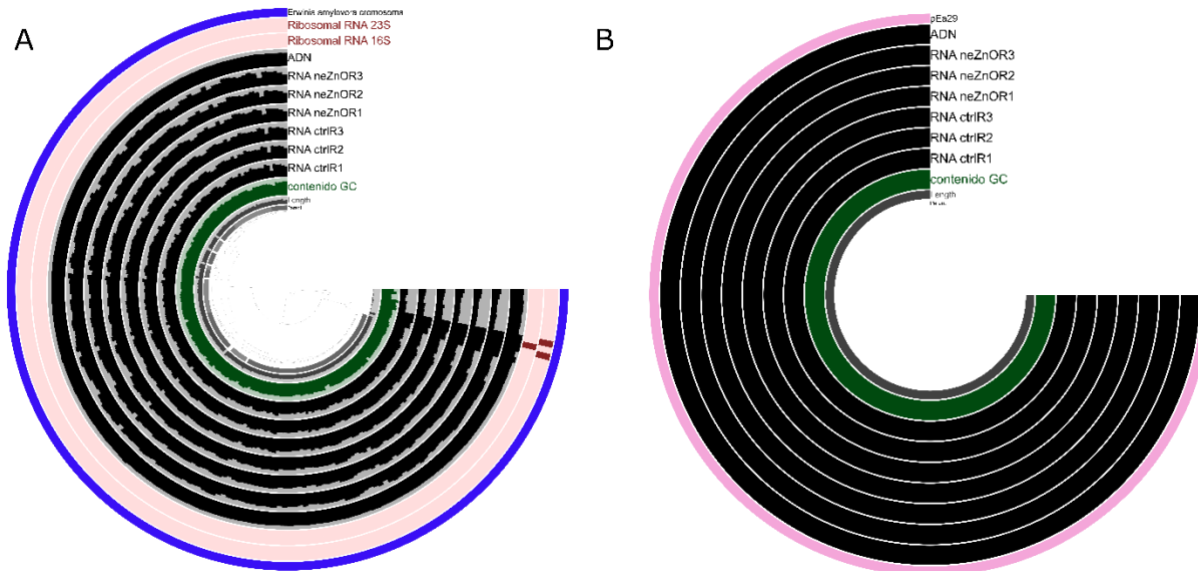
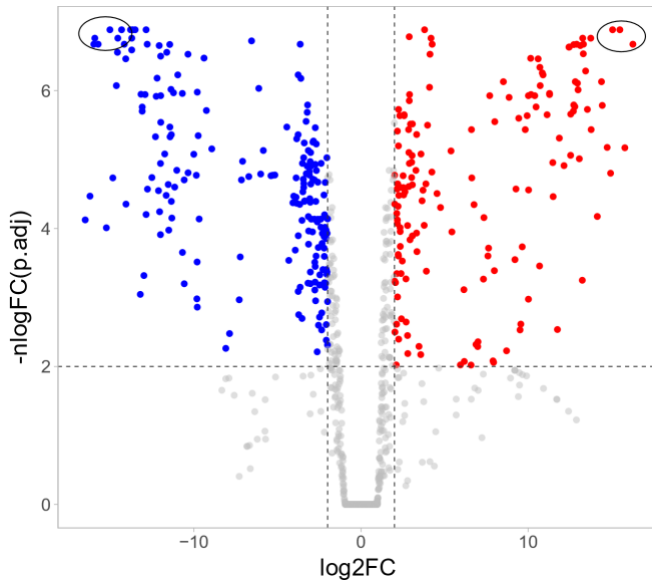


Figura 6. Mapeo de lecturas cortas de ADN y de RNA sobre los genomas **A)** cromosomal de *E. amylovora* y **B)** plásmido pEa29. Los mapeos de RNA se presentan por cada una de las réplicas del control y tratamiento con neZnO. En el caso de A: Contigs de tamaño mayor a 20kb están divididos en fragmentos equitativos y agrupados en un clúster denominado 'parental' que forman parte del árbol de agrupamiento (UPGMA); dos carriles en rosado indican la detección de rARN ribosomal. **Nota:** debido a la escala empleada en el gráfico **B** no se observa variación en lecturas de RNA, pero ésta fue detectada en los análisis estadísticos de expresión diferencial.



Transcrito	Anotación	log2FC	Fuente
EagDN481_c0_g1_i1	O-ACETILTRANSFERASA WECH	-15.9	E. amylovora
EagDN1439_c0_g1_i1	GLICOGENO FOSFORILASA	-16.0	E. amylovora
EagDN237_c0_g1_i1	NO-RIBOSOMAL PEPTIDO SINTETASA	-15.7	E. amylovora
EagDN376_c0_g1_i1	TRANSPORTADOR PROLINA/BETAINA	-15.0	E. amylovora
EagDN1453_c0_g1_i1	GLUTAMATO-CISTEINA LIGASA	-14.5	E. amylovora
EapDN0_c0_g1_i1	SUCCINATO SEMIALDEHIDO DESHIDROGENASA [NAD(P)+] SAG	-14.3	pEa29
EagDN11_c0_g4_i1	ARGININA DECARBOXILASA BIOSINTETICA	-14.6	E. amylovora
EagDN4687_c0_g1_i1	ATPASE TRANSPORTADORA DE CADMIUM/ZINC	16.3	E. amylovora
EagDN490_c0_g1_i1	PROTEINA DE TRANSFERENCIA MULTIFOSFORIL	15.5	E. amylovora
EagDN658_c0_g1_i1	CITOCROMO B2 SUBUNIDAD II	15.1	E. amylovora

Legenda

- Sincambio
- Sobrexpresion
- Subexpresion

Figura 7. Gráfica volcán resaltando en azul y rojo los transcritos con cambio significativo de expresión génica sobre o sub expresados, respectivamente, en el tratamiento Pt-SV. Los óvalos corresponden a las 10 proteínas con el mayor cambio en el conjunto de datos, las cuales se resaltan en la tabla presentada a la derecha del gráfico.



Tabla 1. Número y tamaño de contigs, porcentaje guanina-citosina y predicción proteica para los genomas y transcriptomas ensamblados.

Ensamblaje	Item	Cromosomal (~3.8 Mb)	Extracromosomal (pEa29) (~28.3 Kb)
Genoma	No. total contigs	211	1
	Contig más largo (bp)	1465119	28370
	N50 (bp)	418999	28370
	%GC	53.5	50.2
	No. Proteínas estimadas*	3390	30
Transcriptoma	No. total transcritos (incluyendo isoformas)	1760	10
	Transcritos únicos	1576	9
	Transcritos de rARN	2**	0
	No. Proteínas estimadas*	1574	9
	%GC	53.6	50.3

* predicción proteica

** representados por 13 isoformas



Tabla 2. Rutas metabólicas de *E. amylovora* y plásmido pEa29 significativamente ($p < 0.01$) afectadas por la adición de Pt-SV. Sobreexpresión (+), Subexpresión (-)

Rutas metabólicas PANTHER	No. Transcritos	Expresión	fdr
Sin clasificar*	380	-	1.00E+00
Utilización de acetato (P02722)	2	-	1.00E+00
De novo biosíntesis de purinas (P02738)	2	-	9.93E-01
Sistema circadiano (P00015)	2	-	6.83E-01
De novo biosíntesis de ribonucleótidos de pirimidinas (P02740)	2	-	1.00E+00
Degradación de aminobutirato (P02726)	1	-	5.79E-01
Síntesis de ATP (P02721)	1	-	1.00E+00
Síntesis de ácido Gamma-aminobutírico (P04384)	1	-	1.00E+00
De novo biosíntesis de desoxirribonucleótidos de pirimidinas (P02739)	1	-	6.34E-01
Biosíntesis de fenilalanina (P02765)	1	-	1.00E+00
Biosíntesis de biotina (P02731)	1	-	1.00E+00
Metabolismo de pirimidinas (P02771)	1	-	5.22E-01
Ciclo de Krebs (TCA) (P00051)	1	-	9.46E-01
Biosíntesis de valina (P02785)	1	+	1.00E+00
Biosíntesis lisina (P02751)	1	+	7.03E-01
Biosíntesis de treonina (P02781)	1	+	6.32E-01
Biosíntesis de corismato (P02734)	1	+	1.00E+00
Biosíntesis de peptidoglicanos (P02763)	1	+	1.00E+00
Biosíntesis de isoleucina (P02748)	1	+	9.62E-01
Biosíntesis de serina-glicina (P02776)	1	+	7.87E-01
Metabolismo del piruvato (P02772)	1	+	1.00E+00
Glicólisis (P00024)	1	+	9.85E-01
Biosíntesis de arginina (P02728)	1	+	1.00E+00
Biosíntesis de triptofano (P02783)	2	+	7.54E-01
Degradación de fenilpropionato (P02767)	2	+	5.16E-01
Replicación/replicación de ADN (P00017)	2	+	9.80E-01
Biosíntesis de Heme (P02746)	2	+	1.00E+00
Biosíntesis de leucina (P02749)	3	+	6.38E-01
Biosíntesis de histidina (P02747)	5	+	7.89E-01

* transcritos participantes en varios procesos biológicos y/o rutas metabólicas, pero no asignados a una ruta metabólica particular



Tabla 3. Función biológica afectada por Pt-SV identificada con 3 o más transcritos significativamente sobre (+) o sub expresados (-).

Función biológica	No Transcritos	Expresión	fdr
Sin clasificar	254	-	8.55E-01
Transporte de péptidos (GO:0015833)	5	-	4.68E-01
Catabolismo de carbohidratos (GO:0044275)	3	-	5.12E-01
Catabolismo de macromoléculas (GO:0009057)	3	-	4.87E-01
Síntesis de ácidos grasos (GO:0006633)	3	-	5.49E-01
Transporte transmembranal de hierro (GO:0034755)	3	-	5.75E-01
Movilidad flagelo-dependiente (GO:0001539)	3	-	6.84E-01
Síntesis de peptidoglicanos (GO:0009252)	3	-	8.42E-01
Transporte transmembranal de aniones (GO:0098656)	3	-	9.14E-01
Elongación translacional (GO:0006414)	9	+	4.18E-01
Transporte de derivados de carbohidratos (GO:1901264)	7	+	9.75E-01
Proceso metabólico de aminoácidos aromáticos (GO:0009072)	5	+	6.95E-01
Modificación de tRNA (GO:0006400)	5	+	7.16E-01
Biosíntesis de leucina (GO:0009098)	3	+	5.00E-01
Metabolismo de aminas (GO:0006576)	3	+	5.67E-01
Transporte de carbohidratos (GO:0008643)	3	+	5.61E-01
Reparación recombinacional (GO:0000725)	3	+	6.12E-01
Catabolismo de carbohidratos (GO:1901136)	3	+	9.49E-01
Síntesis de ATP acoplada con transporte de protones (GO:0015986)	3	+	9.57E-01
Síntesis de metabolitos secundarios (GO:0044550)	3	+	9.43E-01

* transcritos participantes en varios procesos moleculares, pero no asignados a una función biológica particular





Tabla 4. Componentes celulares PANTHER GO-Slim con más de 15 transcritos significativamente sobre (+) o sub (-) expresados en el tratamiento con Pt-SV.

Componente celular	No. Transcritos	Expresión	fdr
Sin clasificar*	271	-	9.11E-01
Componente celular** (GO:0005575)	145	+	9.94E-01
Entidad anatómica celular*** (GO:0110165)	141	+	1.00E+00
Membrana (GO:0016020)	83	+	9.20E-01
Membrana plasmática (GO:0005886)	64	+	1.00E+00
Estructura intracelular (GO:0005622)	64	+	9.06E-01
Periferia celular (GO:0071944)	64	+	9.97E-01
Citoplasma (GO:0005737)	62	+	8.86E-01
Citosol (GO:0005829)	34	+	8.52E-01
Componente de membrana (GO:0031224)	21	-	1.00E+00
Envoltura (GO:0031975)	19	-	9.06E-01
Envoltura celular (GO:0030313)	18	-	7.45E-01
Componente integral de membrana (GO:0016021)	18	-	1.00E+00
Complejos proteicos (GO:0032991)	18	-	8.85E-01

* transcritos de los cuales solo se conoce su clasificación proteica (e.j. deshidrogenasas, hidrolasas, transferasas, etc)

** ,*** son categorías generale que contienen proteínas asociadas con múltiple componentes celulares

ANEXO 2: CONVENIO CIAD



CONVENIO GENERAL DE COLABORACIÓN ACADÉMICA, CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA QUE CELEBRAN, POR UNA PARTE, EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C., A QUIEN EN LO SUCESIVO Y PARA LOS EFECTOS DEL PRESENTE CONVENIO SE LE DENOMINARÁ "CIAD", REPRESENTADO EN ESTE ACTO, POR, EL DR. PABLO WONG GONZÁLEZ, EN SU CARÁCTER DE DIRECTOR GENERAL Y REPRESENTANTE LEGAL, Y POR LA OTRA PARTE, EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN MATERIALES AVANZADOS, S.C., EN LO SUBSECUENTE DENOMINADO "CIMAV" REPRESENTADA EN ESTE ACTO POR LA DRA. LETICIA MYRIAM TORRES GUERRA, EN SU CARÁCTER DE DIRECTORA GENERAL Y REPRESENTANTE LEGAL, Y DE MANERA CONJUNTA SERÁN DENOMINADAS "LAS PARTES", AL TENOR DE LAS SIGUIENTES DECLARACIONES Y CLÁUSULAS:

DECLARACIONES

1. DECLARA "CIAD" POR CONDUCTO DE SU REPRESENTANTE:

- 1.1 Que es un Centro Público de Investigación constituido como Asociación Civil conforme a las leyes mexicanas, según consta en la escritura pública número 5,601, de fecha 16 de marzo de 1982, otorgada ante la fe del Notario Público No. 68, con ejercicio en la ciudad de Hermosillo, estado de Sonora, Lic. Juan Antonio Ruibal Corella, e inscrita en el Registro Público de la Propiedad y del Comercio de la ciudad de Hermosillo, Estado de Sonora, bajo el número 570, de la sección Sociedad Civil, volumen No. 8, el 15 de abril de 1982.
- 1.2 Que la Secretaría de Educación Pública emitió el Acuerdo por el que se reconocen diversas entidades paraestatales del sistema SEP-CONACYT como Centros Públicos de Investigación, entre las cuales se encuentra el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), publicado en el Diario Oficial de la Federación con fecha 16 de agosto de 2000.
- 1.3 Que su objeto social, según consta en la modificación del Instrumento Jurídico de Creación del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., aprobado en el Acta de la Primera Sesión Extraordinaria de la Asamblea General de Asociados en fecha 19 de octubre de 2011, celebrada en la ciudad de Mazatlán, Sinaloa, y protocolizada mediante la escritura pública número 865 (ochocientos sesenta y cinco) del 20 de abril de 2012 de la notaría pública No 77 a cargo de la Lic. Carolina Montiel Reyes; consiste en: Realizar actividades de investigación básica y aplicada en el área de la alimentación, la salud, el desarrollo regional, los recursos naturales y disciplinas afines. En su caso, elaborar los estudios socioeconómicos que las fundamentan, orientadas hacia la solución de problemas nacionales, regionales y locales; formular, ejecutar e impartir programas para estudios de licenciatura, especialidad, maestría, doctorado y estancias postdoctorales, así como cursos de actualización y especialización de personal en actividades relacionadas con el objeto de la Asociación; orientar la investigación científica y el desarrollo e innovación tecnológica a la modernización del sector productivo y promover y gestionar ante las organizaciones públicas, sociales y privadas, la transferencia del conocimiento, en términos de que para el efecto se establezca en el marco normativo aplicable; colaborar con las autoridades competentes en actividades de promoción de la metrología, el establecimiento de normas de calidad y la certificación en apego a la ley de la materia; difundir y publicar información técnica y científica sobre los avances que registre en su especialidad, así como de los resultados de las investigaciones y trabajos que realice; y contribuir con el Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología a que se refiere la Ley de Ciencia y Tecnología para asociar el trabajo científico y la formación de recursos humanos de alto nivel al desarrollo del conocimiento y a la atención de las necesidades de la sociedad mexicana.



- 1.4 Que el Dr. Pablo Wong González acredita la personalidad que ostenta como Director General y Representante Legal de la referida persona moral, con el testimonio de la Escritura Pública número 8,899 (ocho mil ochocientos noventa y nueve) Volumen 124 (ciento veinticuatro) de fecha 22 de enero de 2018, otorgada ante la fe de la Lic. Yeri Márquez Félix, titular de la Notaría Pública número 17, con ejercicio y residencia en la ciudad de Hermosillo, Sonora, en el que consta su nombramiento y facultades de acuerdo a la ley y a sus estatutos, entre los que se encuentran la de otorgar toda clase de actos y documentos respecto de su objeto, así como la de administrar y representar legalmente a dicho Centro, con facultades de dominio, administración, pleitos y cobranzas, aún aquellas que requieran cláusula especial conforme a la ley.
- 1.5 Que cuenta con el Registro Federal de Contribuyentes No. CIA820316TI4 otorgado por la Secretaría de Hacienda y Crédito Público (SHCP), y que su domicilio legal para efectos del presente instrumento, se ubica en Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46, Col. La Victoria, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora.

2. DECLARA "CIMAV" POR CONDUCTO DE SU REPRESENTANTE:

- 2.1 Que es Sociedad Civil constituida conforme a las leyes mexicanas. Establecida según Escritura Pública Número 42, otorgada ante la Fe del Lic. Juan José Royo Provencio, en funciones de Notario por separación del Titular de la Notaría Pública Número 12, Lic. Armando Herrera Acosta, en fecha 25 de octubre de 1994, y registrada bajo el número 233, folios 143, del Libro 36 de la Sección Cuarta, del Registro Público de la Propiedad de este Distrito Judicial Morelos, Estado de Chihuahua, con fecha 23 de marzo de 1995.
- 2.2 Que su objeto social de acuerdo a su Instrumento Jurídico de Creación es:
- I. Realizar actividades de investigación básica y aplicada en las áreas de Ciencia de Materiales y Ciencia y Tecnología Ambiental y disciplinas afines, orientadas hacia la solución de problemas nacionales, regionales y locales del país;
 - II. Formular, ejecutar e impartir programas para estudios de licenciatura, especialidad, maestría, doctorado y estancias posdoctorales, así como cursos de actualización y especialización de personal en actividades relacionadas con el objeto de la Sociedad;
 - III. Orientar la investigación científica y el desarrollo e innovación tecnológica a la modernización del sector productivo y promover y gestionar ante las organizaciones públicas, sociales y privadas, la transferencia del conocimiento, en términos de lo que para el efecto se establezca en la normatividad aplicable;
 - IV. Difundir y publicar información técnica y científica sobre los avances que registre en su especialidad, así como de los resultados de las investigaciones y trabajos que realice;
 - V. Contribuir con el Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología a que se refiere la Ley de Ciencia y Tecnología en congruencia con el programa sectorial y la red nacional de grupos y centros de investigación, para asociar el trabajo científico y la formación de recursos humanos de alto nivel al desarrollo del conocimiento y a la atención de las necesidades de la sociedad mexicana;
 - VI. Realizar labores de vinculación con los sectores público, social y privado; y
 - VII. Colaborar con las autoridades competentes en actividades de promoción de la metrología, el establecimiento de normas de calidad y la certificación en apego a la Ley de la materia



- 2.3 Que la Dra. Leticia Myriam Torres Guerra tiene la capacidad jurídica necesaria para suscribir lo que se consigna en el presente documento, misma que acredita con el testimonio de la escritura pública número 23,287 de fecha 10 de enero del 2020, pasada ante la fe del Lic. Hiram Quezada Anchondo, notario auxiliar de la notaría pública número tres en el Distrito Judicial Morelos, Estado de Chihuahua, en funciones de notario por separación de su titular Lic. Sergio Granados Pineda, misma que contiene poder para celebrar y otorgar toda clase de actos y documentos respecto del objeto de la Sociedad, manifestando que a la fecha de firma del presente instrumento jurídico, sus facultades no le han sido revocadas ni modificadas en forma alguna.
- 2.4 Que cuenta con el Registro Federal de Contribuyentes No. CIM-941025-MJ1, otorgado por la SHCP, y manifiesta encontrarse al corriente de sus obligaciones fiscales.
- 2.5 Que, para los efectos legales de este convenio, señala como domicilio legal el ubicado en Miguel de Cervantes No. 120, Complejo Industrial Chihuahua, C.P. 31136, Chihuahua, Chih., México.

En virtud de las Declaraciones que anteceden, "LAS PARTES" otorgan y se someten a las siguientes:

CLÁUSULAS

PRIMERA. Objeto. "LAS PARTES" convienen que, para facilitar su mejor desarrollo en el campo de la investigación científica y tecnológica, así como en el campo académico, en este acto unen sus esfuerzos a través de este Convenio General de Colaboración a fin de optimizar la utilización de sus propios recursos a través de la ayuda mutua, el trabajo coordinado y el intercambio de experiencias.

SEGUNDA. Actividades Conjuntas. Para la consecución del objeto del presente instrumento, "LAS PARTES" a través de Convenios Específicos, alentarán la actividad relativa a la formación y actualización de recursos humanos, a la investigación científica y a la superación académica en las áreas que consideren de su interés, a través de:

- a. Realizar conjuntamente proyectos de investigación científica y desarrollo de tecnología.
- b. Desarrollo de propuestas de investigación básica y aplicada para ser sometidas a fuentes de financiamientos.
- c. Intercambio de información, libros de texto, publicaciones y bibliografías especializadas, material didáctico y material multimedia.
- d. Estancias sabáticas para estudios de posgrado del personal científico de ambas instituciones.
- e. Elaboración conjunta de, artículos, publicaciones, monografías y/o libros de texto.
- f. Realización de cursos, conferencias, seminarios, encuentros, talleres, congresos, etc., de interés común para ambas instituciones.
- g. Facilidades para participar en los programas contenidos en convenios celebrados con otras instituciones que puedan ser de interés mutuo.
- h. Desarrollo de programas académicos con acreditación conjunta.
- i. Facilidades para inscripción dentro de los programas académicos que ofrecen ambas instituciones para docentes.
- j. Facilitar la estancia de estudiantes con el fin de realizar servicio social, prácticas profesionales, residencias profesionales, estancias académicas, tesis y estudios de posgrado.
- k. Favorecer el intercambio de personal académico, ya sea con fines docentes, de investigación, o de asesoramiento en los campos de interés para ambas instituciones.

TERCERA. Representantes. Para los efectos de coordinación y enlace en todo lo relacionado con el



presente Convenio, "**LAS PARTES**" designan como sus representantes, por parte del "CIAD" al Coordinador de Vinculación, Dr. Aarón Fernando González Córdova, y por parte del "CIMAV", al Director Académico, Dr. Alfredo Aguilar Elguezabal.

CUARTA. Convenios Específicos. "**LAS PARTES**" para instrumentar las acciones de colaboración derivadas de este Convenio General, suscribirán Programas Específicos de Trabajo a través de Convenios Específicos de Colaboración, por medio de un Grupo Permanente de Coordinación, cuyos integrantes son las personas señaladas en la Cláusula Tercera.

Dichos Convenios Específicos deberán constar por escrito y describirán con precisión sus objetivos, las actividades a realizar, calendario de trabajo, los costos o financiamientos, la vigencia, lugares de trabajo, personal involucrado, propiedad intelectual, las relaciones laborales, enlaces y coordinadores o responsables, recursos técnicos y materiales, publicación de resultados, metas alcanzadas y actividades de difusión, controles de evaluación y seguimiento; las aportaciones económicas o en especie de cada una de "**LAS PARTES**", así como todos los datos y documentos que resulten necesarios para determinar las causas, fines y alcances de cada uno de ellos, los cuales deberán estar siempre en equilibrio en cuanto a derechos y obligaciones de "**LAS PARTES**".

QUINTA. Del Grupo Permanente de Coordinación. Serán facultades y atribuciones del Grupo Permanente de Coordinación las siguientes:

1. Definir el procedimiento de comunicación entre los integrantes del grupo, de acuerdo con las estructuras administrativas de "**LAS PARTES**".
2. Coordinar la elaboración de los Programas Específicos de Trabajo, apoyándose en todos aquellos grupos o especialistas que consideren necesarios, programas que deberán contener la autorización de las instituciones que tengan intervención en los mismos.
3. Coordinar el desarrollo de los Programas Específicos de Trabajo.
4. Según el caso de que se trate, presentar un informe escrito al final o por etapas, respecto de cada Programa Específico de Trabajo, en el que se señalen los resultados obtenidos, así como la conveniencia de extender o finalizar cada programa.

SEXTA. Relación Laboral. Ambas partes acuerdan que en todos los Convenios Específicos de Colaboración se estipulará que el personal o los miembros de cada parte que sean designados para la realización conjunta de cualquier acción, continuará en forma absoluta bajo la dirección y dependencia de la parte con la que tenga establecida su relación laboral, independientemente de estar prestando sus servicios en las instalaciones de la parte a la que fue asignado.

Cada una de "**LAS PARTES**" cubrirá en forma total los gastos y viáticos de sus representantes, en el grupo permanente de trabajo, cuando sea necesario que efectúen desplazamientos fuera de su institución, salvo disposición contraria establecida en los Convenios Específicos. Asimismo, cada una de "**LAS PARTES**" respetará y atenderá los lineamientos particulares de cada institución, por lo que convienen que no existirá substitución patronal entre ellas, ni frente a terceros.

SÉPTIMA. Propiedad Intelectual. "**LAS PARTES**" acuerdan que la propiedad intelectual que se derive de los trabajos realizados con motivo de este Convenio estará sujeta a las disposiciones legales aplicables y a los instrumentos específicos que sobre el particular suscriban "**LAS PARTES**", otorgando el reconocimiento correspondiente a quienes hayan intervenido en la ejecución de dichos trabajos.

"**LAS PARTES**" convienen que este Convenio no otorga a las mismas, licencia alguna o algún tipo de derecho respecto de la propiedad intelectual de la otra parte. Para efectos de este instrumento,



Propiedad Intelectual incluye, sin limitar, todas las marcas registradas y/o usadas en México o en el extranjero por "LAS PARTES", así como todo derecho sobre invenciones (patentadas o no), diseños industriales, modelos de utilidad, información confidencial, know-how, procesos de fabricación y/o distribución, nombres comerciales, avisos comerciales, reservas de derechos, nombres de dominio, así como todo tipo de derechos patrimoniales sobre obras y creaciones protegidas por derechos de autor y demás formas de propiedad industrial o intelectual reconocida o que lleguen a reconocer las leyes correspondientes. "LAS PARTES" se obligan a no usar, comercializar, revelar a terceros, distribuir, regalar, o de cualquier otro modo disponer de cualquier información desarrollada por la otra parte, ni de cualquier material o producto que sea resultado de la propiedad intelectual de la otra, sin tener permiso previo y por escrito de la parte titular.

"LAS PARTES" se obligan a no usar, comercializar, revelar a terceros, distribuir, regalar, o de cualquier otro modo disponer de cualquier proyecto realizado por "LAS PARTES", ni de cualquier material o material excedente que sea resultado de la propiedad intelectual de "LAS PARTES" sin el consentimiento previo y dado por escrito de la otra parte. Queda estrictamente prohibido para "LAS PARTES" y para su personal en su caso, reproducir sin permiso de la otra parte, cualquier tipo de material que se le hubiese proporcionado o que se hubiere desarrollado al amparo del presente Convenio, bajo pena de incurrir en alguna sanción establecida por las leyes en materia de derechos de autor y propiedad industrial; lo que constituirá además una causa de la rescisión al presente Convenio.

Ninguna de "LAS PARTES" podrá utilizar la marca, logotipo o emblema de la otra parte en publicaciones ni programas si antes no está autorizado o expresamente convenido por escrito por los representantes legales de cada una de "LAS PARTES".

Queda expresamente entendido que "LAS PARTES" podrán utilizar los resultados obtenidos de las actividades amparadas por el presente instrumento en sus respectivas actividades.

OCTAVA. Responsabilidad Civil. Queda expresamente pactado que "LAS PARTES" no tendrán responsabilidad civil por daños y perjuicios que pudieran causarse, como consecuencia del caso fortuito o fuerza mayor, particularmente por paro de labores académicas o administrativas, en la inteligencia de que, una vez superados estos eventos, se reanudarán las actividades en la forma y términos que determinen "LAS PARTES". En estos supuestos, la parte afectada deberá notificarlo a la otra parte tan pronto como le sea posible, así como tomar las provisiones que se requieran para el remedio de la situación de que se trate.

NOVENA. Avisos y Notificaciones. Todas las notificaciones que deban realizarse serán por escrito con acuse de recibo a los domicilios señalados en las declaraciones. En caso de que cualquiera de "LAS PARTES" cambie de domicilio deberá de notificarlo a la otra parte de forma fehaciente, con al menos diez (10) días hábiles de anticipación a la fecha efectiva en que ocurra dicho cambio de domicilio, de no ser así, cualquier notificación realizada en los domicilios señalados por "LAS PARTES" en el apartado de declaraciones será considerada como efectivamente realizada.

DÉCIMA. Modificaciones. En caso de que resulte necesario realizar alguna modificación al presente Convenio, "LAS PARTES" de común acuerdo podrán efectuarla, siempre y cuando el Convenio Modificatorio respectivo se efectúe por escrito y por conducto de sus respectivos representantes legales, el cual, a partir de su firma, pasará a formar parte integral de este Convenio.

DÉCIMA PRIMERA. Confidencialidad. "LAS PARTES" convienen expresamente que toda información resultado de la celebración y cumplimiento del presente Convenio General, así como de los Convenios Específicos, tendrán el carácter de confidencial y exclusivamente podrá ser conocida por "LAS PARTES", salvo en los casos que expresamente lo exceptúen, o se trate de información del dominio público en los



términos de la legislación aplicable. En consecuencia, cada una de "LAS PARTES" se compromete a no proporcionar a terceros, inclusive después de la terminación formal de este instrumento, dicha información; siendo extensivo el compromiso a su personal, agentes o factores, por lo que "LAS PARTES" serán solidariamente responsables de los daños y perjuicios que se pudieran ocasionar por incumplimiento a esta cláusula o a la ley aplicable.

DÉCIMA SEGUNDA. Vigencia. El presente Convenio tendrá una duración de diez (10) años contados a partir de la fecha de su firma; sin embargo, podrá darse por terminado en cualquier tiempo por acuerdo de "LAS PARTES", previo aviso por escrito con sesenta (60) días de anticipación, no obstante, los Programas Específicos de Trabajo que se encuentren en ejecución se evaluarán y se determinarán por escrito en el acuerdo de terminación las actividades a continuar hasta su terminación total.

DÉCIMA TERCERA. Terminación Anticipada. "LAS PARTES" convienen desde ahora en que, para el caso de convenir la terminación anticipada del presente Convenio, se comprometen a cumplir todas y cada una de las obligaciones que en el mismo se contienen y que a la fecha de la terminación se encontrasen pendientes de realizar.

DÉCIMA CUARTA. Definitividad. Este Convenio constituye la voluntad de "LAS PARTES" y sustituye en su totalidad cualquier otro acuerdo verbal o escrito celebrado con anterioridad respecto al objeto del presente Convenio, por lo que "LAS PARTES" lo consideran como definitivo.

DÉCIMA QUINTA. Jurisdicción. Ambas partes manifiestan que el presente Convenio es producto de la buena fe, por lo que realizarán todas las acciones que están a su alcance para su debida interpretación y cumplimiento. Los casos de discrepancia, serán solucionados a través de acuerdos conjuntos. En caso de no resolverse, esta será resuelta por sus representantes legales en forma administrativa de común acuerdo.

Leído el presente Convenio por "LAS PARTES", quedando debidamente enteradas del alcance, contenido y forma, de datos y cada una de las cláusulas, se firma por duplicado en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México, a los 9 días del mes de noviembre del año dos mil veintidós.

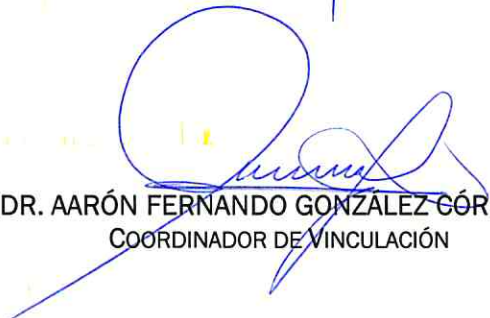
POR "CIAD"

POR "CIMAV"


DR. PABLO WONG GONZÁLEZ
DIRECTOR GENERAL Y REPRESENTANTE LEGAL

DRA. LETICIA MYRIAM TORRES GUERRA
DIRECTORA GENERAL Y REPRESENTANTE LEGAL

TESTIGOS


DR. AARÓN FERNANDO GONZÁLEZ GÓRDOVA
COORDINADOR DE VINCULACIÓN

DR. ALFREDO AGUILAR ELGUEZABAL
DIRECTOR ACADÉMICO

ANEXO 2: ARTÍCULO SOMETIDO

Environmental Science and Pollution Research

Defects on the structure and chemical bond of nanosized zinc oxide particles and their antimicrobial activity --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Defects on the structure and chemical bond of nanosized zinc oxide particles and their antimicrobial activity
Article Type:	Research Article
Keywords:	Material characterization; Zinc oxide; Nanostructures; Oxygen vacancies; Antimicrobial activity
Corresponding Author:	Joan Salas Leiva, PhD CIMAV: Centro de Investigacion en Materiales Avanzados SC Chihuahua, Chihuahua MEXICO
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	CIMAV: Centro de Investigacion en Materiales Avanzados SC
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Aurora Araiza-Campos
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Aurora Araiza-Campos Guillermo Herrera-Pérez, PhD Joan Salas Leiva, PhD Margarita Chávez-Beltrán del Río, Biotech bachelor Alejandro Aguirre-Hernández, Biotech bachelor Antonia Luna-Velasco, PhD Dayana E Salas-Leiva, PhD Dariel Tovar-Ramírez, PhD Alejandro Romo-Chacon Erasmus Orrantia-Borunda, PhD Francisco Paraguay-Delgado, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	CIMAV INTERNAL PROJECT (PI-22-17) Dr. Joan Salas Leiva
Abstract:	The current work exhibits the changes caused by the generation of structural defects such as oxygen vacancies (VO) in the crystal structure, microstructure and chemical composition in two types of zinc oxide nanostructures (neZnO) and their possible application as an antibacterial. Two morphologies of neZnO were obtained using colloidal and hydrothermal methods denoted as quasi-rounded and platelets, respectively. After synthesis, a controlled induction of VO was performed on the surface. neZnO were characterized by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), selected area electron diffraction (SAED), optical absorption UV-Vis (UV-Vis), Raman spectroscopy and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis. The possible antibacterial effect was determined using two bacterial strains, Escherichia coli and Staphylococcus aureus in room-light conditions. NeZnO with platelet-type shape was found to cause 50% inhibition (IC50) at concentrations of 0.064 to 0.072 mg/ml for S. aureus and 0.083 to

	0.104 mg/ml to E. coli, indicating greater sensitivity of S. aureus than E. coli. Then, our results suggest that platelet morphology is more effective than quasi-round, type shape regardless of the presence or absence of VO.
Suggested Reviewers:	<p>Leila Aparecida Chiavacci, PhD Professor, UNESP: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho leila@fcfar.unesp.br</p> <p>Esther Alarcón Lladó, PhD Professor, FOM-Institute AMOLF: AMOLF e.alarconllado@amolf.nl</p> <p>Jang Eue-Soon, PhD Professor, Kumoh National University of Technology: Kumoh National Institute of Technology euesoon@kumoh.ac.kr</p>
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
§Are you submitting to a Special Issue?	No

ANEXO 2: PRESENTACIÓN EN CONGRESO



OTORGA LA SIGUIENTE CONSTANCIA

A: M.C. AURORA ROXANA ARAIZA CAMPOS

POR FORMAR PARTE DEL COMITÉ DE APOYO EN LA:

**XLVII Semana de Química Internacional en el marco
de la 2da Semana Interinstitucional de Ciencias
Químicas y Materiales**

Llevada a cabo del 17 al 21 de octubre del 2022




M.C. Emiliano Zapata Chávez
Director
FCQ - UACH


Dra. Leticia Myriam Torres Guerra
Directora General
CIMAV



ANEXO 2: ARTÍCULOS DE DIFUSIÓN

Año 13, PCTI 204-2022-04-04

Nanoestructuras de óxido zinc para el control de *Erwinia amylovora*, patógeno que provoca la mancha de fuego en manzanos

Aurora Araiza-Campos¹, Antonia Luna-Velasco¹, Francisco Paraguay-Delgado¹, Joan S. Salas-Leiva^{1,2}

¹Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV), ²Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).
joan.salas@cimav.edu.mx

Biotecnología y Ciencias Agropecuarias.

Abstract

Fire blight is a disease of apple trees caused by the bacterium *Erwinia amylovora*. In this research, the antibacterial effect on *E. amylovora* of two zinc oxide nanostructures (nZnO) was determined: platelets (planar structures) and quasi-rounded (rounded structures), each with oxygen vacancies (empty spaces in the molecular structure) (cVo) and without oxygen vacancies (sVo). The nZnO were dispersed in water, and the microbial growth inhibition capacity was evaluated by the agar diffusion method. Two times of aging of the nZnO in the aqueous suspension were considered (1 and 15 days). The results indicate that all nZnO can inhibit the growth of *E. amylovora*. On day one, the greatest growth inhibition occurred with nZnO quasi-rounded (cVo), and on day 15, the platelets (cVo and sVo) were the most effective. The antibacterial effect due to the action of nZnO could be attributed to mechanical damage to cellular structures and the generation of oxidative stress due to the release of Zn²⁺ ions, which can increase with the time of suspension in water. **Keywords:** Zinc oxide, nanostructures, antimicrobial, phytopathogen.

Resumen

La mancha de fuego es una enfermedad del manzano causada por la bacteria *Erwinia amylovora*. En esta investigación se determinó el efecto antibacteriano sobre *E. amylovora* de dos nanoestructuras de óxido de zinc (nZnO): plaquetas (estructuras planas) y cuasi-redondas (estructuras redondeadas), cada una con vacancias de oxígeno (espacios vacíos en la estructura molecular) (cVo) y sin vacancias de oxígeno (sVo). Las nZnO se dispersaron en agua y se evaluó la capacidad de inhibición de crecimiento microbiano mediante el método de difusión en agar. Se consideraron dos tiempos de envejecimiento de las nZnO en la suspensión acuosa (1 y 15 días). Los resultados indican que todas las nZnO pueden inhibir el crecimiento de *E. amylovora*. Al día 1 la mayor inhibición de crecimiento ocurrió con nZnO cuasi-redondas (cVo) y al día 15 las plaquetas (cVo y sVo) fueron las más efectivas. El efecto antibacteriano por acción de nZnO podría atribuirse a daños mecánicos a estructuras celulares y generación de estrés oxidativo por liberación de iones de Zn²⁺ el cual puede aumentar con el tiempo de suspensión en el agua. **Palabras clave:** Óxido de zinc, nanoestructuras, antimicrobiano, fitopatógeno

Problemática

El uso intensivo de antibióticos sintéticos para combatir la mancha de fuego en el manzano ha generado cepas de *E. amylovora* resistentes a estas sustancias. Por lo que se requiere del desarrollo de tratamientos alternativos innovadores que permitan su control.

Usuarios

Esta investigación incide en el sector agrícola de la producción de manzana y pera del estado de Chihuahua y otras regiones productoras de estos frutos en México. La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER).

Introducción

Los manzanos y peras se encuentran dentro de la familia de las rosáceas, siendo la manzana, la de mayor consumo a nivel mundial. En México, en el año 2020 se produjeron aproximadamente 714.203 toneladas de manzanas, las cuales aumentaron en un 14% en el siguiente año (SADER, 2021). El estado de

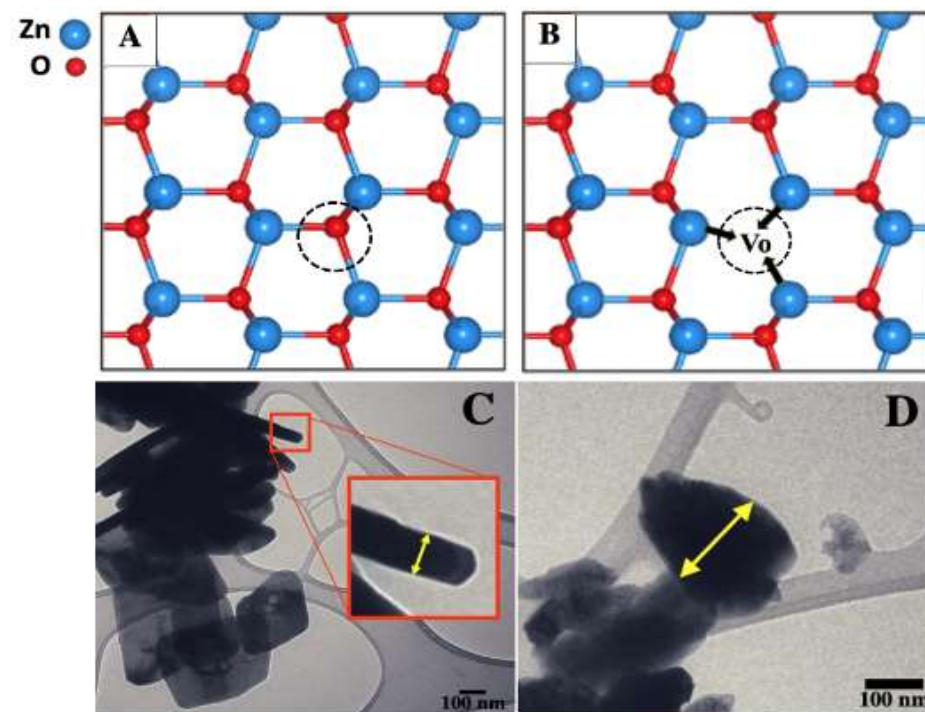


Figura 1. Representación gráfica de red cristalina de nZnO: A) sin vacancias de oxígeno (sVo) (círculo negro marca el lugar del oxígeno que se extrae), B) Ajuste de átomos con vacancia de oxígeno (cVo) modificada de Bhat et al. (2015). Micrografía MET en modo campo claro de las formas C) plaquetas y D) cuasi-redondas. Las líneas amarillas indican el grosor de las plaquetas (C) y cuasi-redondas (D).

Chihuahua genera el 83% de la producción total nacional, seguido por Puebla, Durango y Coahuila (SADER, 2021). Entre las afecciones en la producción del manzano, está la provocada por la bacteria *E. amylovora* causante de la enfermedad conocida como "mancha de fuego" que afecta al manzano y a la fruta. El tratamiento más común para esta enfermedad es mediante la aplicación de antibióticos sintéticos, pero su uso intensivo, ha dado origen a cepas de bacterias resistentes a estos (de León Door et al., 2013). Una de las alternativas innovadoras para resolver esta problemática, es la aplicación de materiales a nanoescala (1-1000 nm), con propiedades antimicrobianas. El óxido de zinc en estructuras nanométricas (nanoestructuras) (nZnO) presenta propiedades antibacterianas según su forma, tamaño y defectos superficiales específicos. Cuando las nanoestructuras entran en contacto con las bacterias pueden generar daños mecánicos (ruptura de paredes celulares) y/o cambios fisicoquímicos (p.e., formación de especies reactivas de oxígeno-EROs) que conllevan a la muerte de las bacterias (Sirelkhatim et al., 2015). El ZnO cuenta con una estructura cristalina ordenada y empaquetada de átomos de Zn y O con patrones estables (Fig. 1 A), pero si se somete a tratamientos físicos (p.e., térmicos), se le pueden extraer átomos de O, generando un ajuste en la posición de los átomos restantes (Fig. 1 B), esto deja espacios en la red que se conocen como vacancias de oxígeno (Vo).

Objetivos

Evaluar el efecto de nanoestructuras de óxido zinc (nZnO) con vacancias (cVo) y sin vacancias (sVo) de oxígeno sobre el crecimiento de *E. amylovora* en un medio de cultivo sólido.

Materiales y Métodos

Se sintetizaron dos nZnO, plaquetas (Fig. 1C) y cuasi-redondas (Fig. 1D), por los métodos hidrotérmico y coloidal, respectivamente (Pariona et al., 2020). Las Vo se generaron en un horno tubular, a 600 °C por una h, con flujo continuo de 1L/min del gas 25% de Hidrógeno en balance Nitrógeno. De esa manera, se obtuvo un total de cuatro grupos nZnO: plaquetas i) sin Vo y ii) con Vo, y cuasi-redondas iii) sin Vo y iv) con Vo. La caracterización microestructural (forma y tamaño), composición elemental y presencia de Vo en las nZnO se realizó mediante las técnicas de difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión (MET) (Morales-Mendoza et al., 2019; Pariona et al., 2020). Por su parte, *E. amylovora* se obtuvo del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) (Cuauhtémoc, Chih.). *E. amylovora* se creció en caldo de cultivo Luria Bertani (LB) por 24 h a 28 °C (de León Door et al., 2013) antes de realizar las pruebas. La actividad antimicrobiana de las nZnO se evaluó en medio sólido mediante el método de disco de difusión en agar, en las que se midió el diámetro de inhibición de crecimiento alrededor del disco (método Kirby Bauer). Este

método consistió en embeber los discos de papel filtro (10 mm de diámetro) en una suspensión acuosa que contenía las nZnO en una concentración de 5000 ppm. Los discos embebidos se colocaron en la superficie de placas de agar previamente inoculadas con *E. amylovora* (100 µL de 1.65x10⁸ UFC/mL). Los ensayos se realizaron con todas nZnO en suspensión acuosa a los días 1 y 15 (envejecimiento). Como control negativo se usó agua destilada y como control positivo se utilizó cloruro de zinc (ZnCl₂) que es conocido por su actividad antimicrobiana. Para notar la inhibición de crecimiento, las placas de agar con los discos se incubaron por 48 horas a 28 °C (Balouiri et al., 2016). Posteriormente, se midieron los halos de inhibición de crecimiento con programa ImageJ. Todos los experimentos se hicieron por triplicado. Los datos de inhibición se expresaron en milímetros (mm). Para determinar las diferencias estadísticas se realizó una ANOVA de una vía y una prueba a posteriori de Tukey HDS (p < 0.05).

Resultados y Discusión

Las plaquetas sintetizadas midieron aproximadamente 50 nm de ancho y 450 nm de largo y las cuasi-redondas 100 nm (Fig. 1 C y D). En general, los

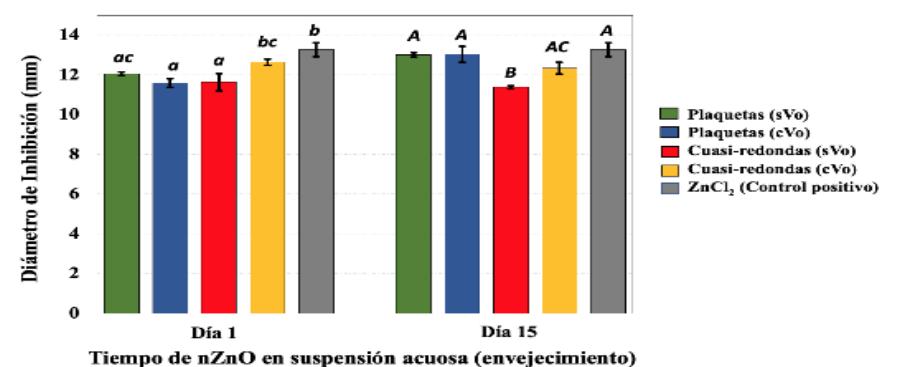


Figura 3. Diámetros de inhibición de crecimiento (en milímetros) de *E. amylovora* por efecto de nZnO y tiempo de envejecimiento de éstas en suspensión acuosa. El control negativo (agua destilada) no presentó inhibición de crecimiento. Letras minúsculas y mayúsculas diferentes sobre las barras indican p<0,05 para el día 1 y 15 respectivamente. sVo: sin vacancias de oxígeno; cVo: con vacancias de oxígeno.

resultados indican que todas las nZnO provocan una inhibición de crecimiento de *E. amylovora*. En la Figura 2A y 2B se observa los halos de inhibición por las nZnO. Al día 1, el mayor halo de inhibición se generó con nZnO cuasi-redondas (cVo) (12.63 ± 0.15 mm) y al día 15 con plaquetas (cVo y sVo) (13.01 ± 0.1 y 13.01 ± 0.39 mm respectivamente). El tiempo de envejecimiento de las nZnO, en la suspensión acuosa, generó un incremento en los halos de inhibición de plaquetas; mientras que en las cuasi-redondas el comportamiento fue similar (Fig. 3). El control positivo (ZnCl₂) en los dos tiempos presentó un halo de inhibición promedio de 13.27 ± 0.34 mm, cabe destacar que la concentración de este control fue 6.8 veces mayor (~34000 ppm) a las aplicadas con nZnO.

El control negativo no inhibió el crecimiento (0 mm de inhibición). Estos resultados son un indicativo del alto potencial antimicrobiano de las nZnO en un medio sólido. En investigaciones previas se ha indicado la actividad antimicrobiana de las nZnO depende de, tamaño, forma, concentración y defectos, atribuyéndoles cambios en las propiedades de la materia al incrementar la relación superficie/volumen en un material nanoparticulado (Prasanna and Vijayaraghavan, 2017). De acuerdo con los resultados, consideramos que la actividad de la forma cuasi-redondas (cVo) (día 1), puede deberse a la interacción física y generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) que se incrementa por acción de las Vo. Mientras que en las suspensiones envejecidas (15 días) podría estar relacionado principalmente con la ionización de ZnO en el agua, es decir, la liberación Zn²⁺ que en la célula genera estrés oxidativo y finalmente la muerte celular (Deylam et al., 2021; Mendes et al., 2022).

Conclusiones

Los resultados indican que la forma y el tiempo de envejecimiento de las nZnO pueden influir en la actividad antimicrobiana, esto es importante para conocer la estabilidad de las soluciones con nanoestructuras para futuras formulaciones antimicrobianas. Es necesario destacar que se requieren estudios complementarios para identificar el (los) mecanismo(s) exacto(s) por los cuales las nZnO evaluadas provocan la inhibición de crecimiento en *E. amylovora*.

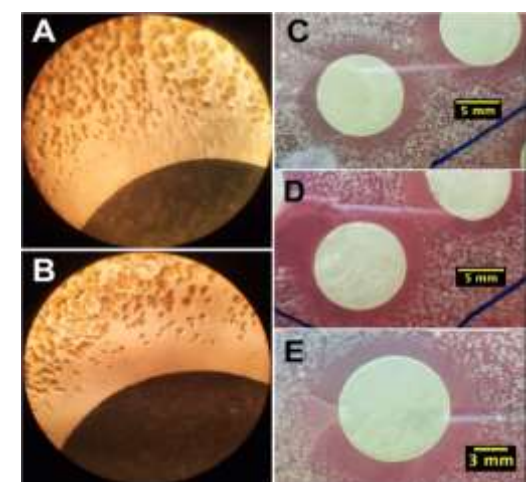


Figura 2. Micrografías de halos de inhibición generados por las nZnO en los días de envejecimiento en suspensión. Discos de papel filtro embebidos con nZnO A) cuasi-redondas cVo (1 día de suspensión), B) plaquetas cVo (15 días de suspensión), C) cuasi-redondas cVo (1 día de suspensión), y D) plaquetas cVo (15 días de suspensión), E) Control positivo con ZnCl₂.

Impacto Socioeconómico

El estudio de agentes alternativos para el tratamiento de patógenos en cultivos de manzano impactaría en un futuro en la reducción de pérdidas económicas y de costos, mediante el desarrollo de tratamientos novedosos, eficientes (alternativos, al uso de antibióticos convencionales de uso intensivo y con resistencia de los patógenos) en este sector agrícola.



Contacto PCTI:
hnolesco2008@hotmail.com

Ciencia y tecnología

hnoasco2008@hotmail.com

AURORA ARAIZA-CAMPOS¹,
ANTONIA LUNA-VELASCO¹,
FRANCISCO PARAGUAY-DELGADO¹,
JOAN S. SALAS-LEIVA^{1,2}

Control de la mancha de fuego en manzanos

Nanoestructuras de óxido zinc para el control de *Erwinia amylovora*, patógeno que provoca la mancha de fuego en manzanos

INTRODUCCIÓN: Las manzanas y peras se encuentran dentro de la familia de las rosáceas, siendo la manzana, la de mayor consumo a nivel mundial. En México, en el año 2020 se produjeron aproximadamente 714.203 toneladas de manzanas, las cuales aumentaron en un 14% en el siguiente año (SADER, 2021). El estado de Chihuahua genera el 83% de la producción total nacional, seguido por Puebla, Durango y Coahuila (SADER, 2021). Entre las afecciones en la producción del manzano, está la provocada por la bacteria *E. amylovora* causante de la enfermedad conocida como "mancha de fuego" que afecta al manzano y a la fruta. El tratamiento más común para esta enfermedad es mediante la aplicación de antibióticos sintéticos, pero su uso intensivo, ha dado origen a cepas de bacterias resistentes a estos (de León Door et al., 2013). Una de las alternativas innovadoras para resolver esta problemática, es la aplicación de materiales a nanoescala (1-1000 nm), con propiedades antimicrobianas. El óxido de zinc en estructuras nanométricas (nanoestructuras) (nZnO) presenta propiedades antibacterianas según su forma, tamaño y defectos superficiales específicos. Cuando las nanoestructuras entran en contacto con las bacterias pueden generar daños mecánicos (ruptura de paredes celulares) y/o cambios fisicoquímicos (p.e., formación de especies reactivas de oxígeno-EROs) que conllevan a la muerte de las bacterias (Sirelkhathim et al., 2015). El ZnO cuenta con una estructura cristalina ordenada y empaquetada de átomos de Zn y O con patrones estables (Fig. 1A), pero si se somete a tratamientos físicos (p.e., térmicos), se le pueden extraer átomos de O, generando un ajuste en la posición de los átomos restantes (Fig. 1B), esto deja espacios en la red que se conocen como vacancias de oxígeno (Vo).

OBJETIVOS: Evaluar el efecto de nanoestructuras de óxido zinc (nZnO) con vacancias (cVo) y sin vacancias (sVo) de oxígeno sobre el crecimiento de *E. amylovora* en un medio de cultivo sólido.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se sintetizaron dos nZnO, plaquetas (Fig. 1C) y cuasi-redondas (Fig. 1D), por los métodos hidrotérmico y coloidal, respectivamente (Pariona et al., 2020). Las Vo se generaron en

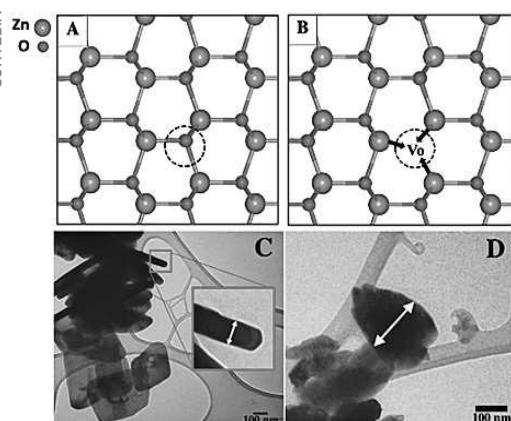


Fig 1. Red cristalina de nZnO: A) sin vacancias de O₂, con vacancia de O₂ (Bhat et al. (2015). Micrografía de C) plaquetas y D) cuasi-redondas.

un horno tubular, a 600 °C por una h, con flujo continuo de 1L/min del gas 25% de Hidrógeno en balance Nitrógeno. De esa manera, se obtuvo un total de cuatro grupos nZnO: plaquetas i) sin Vo y ii) con Vo, y cuasi-redondas iii) sin Vo y iv) con Vo. La caracterización microestructural (forma y tamaño), composición elemental y presencia de Vo en las nZnO se realizó mediante las técnicas de difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión (MET) (Morales-Mendoza et al., 2019; Pariona et al., 2020). Por su parte, *E. amylovora* se obtuvo del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) (Cauhtémoc, Chih.). *E. amylovora* se creció en caldo de cultivo Luria Bertani (LB) por 24 h a 28 °C (de León Door et al., 2013) antes de realizar las pruebas. La actividad antimicrobiana de las nZnO se evaluó en medio sólido mediante el método de disco de difusión en agar, en las que se midió el diámetro de inhibición de crecimiento alrededor del disco (método Kirby Bauer). Este método consistió en embeber los discos de papel filtro (10 mm de diámetro) en una suspensión acuosa que contenía las nZnO en una concentración de

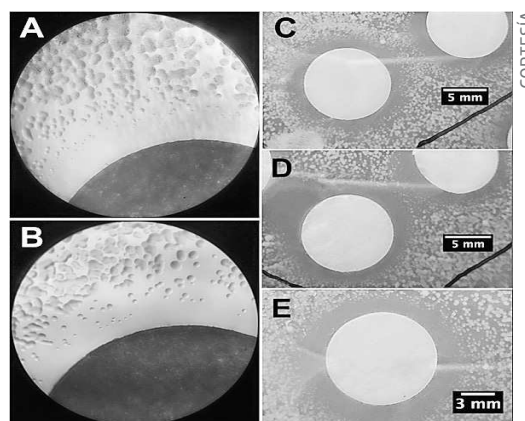


Fig 2. Halos de inhibición por las nZnO. A y C) cuasi-redondas, B y D) plaquetas, E) Control positivo con ZnCl₂.

5000 ppm. Los discos embebidos se colocaron en la superficie de placas de agar previamente inoculadas con *E. amylovora* (100 µL de 1.65x10⁸ UFC/mL). Los ensayos se realizaron con todas nZnO en suspensión acuosa a los días 1 y 15 (envejecimiento). Como control negativo se usó agua destilada y como control positivo se utilizó cloruro de zinc (ZnCl₂) que es conocido por su actividad antimicrobiana. Para notar la inhibición de crecimiento, las placas de agar con los discos se incubaron por 48 horas a 28 °C (Balouiri et al., 2016). Posteriormente, se midieron los halos de inhibición de crecimiento con programa ImageJ. Todos los experimentos se hicieron por triplicado. Los datos de inhibición se expresaron en milímetros (mm). Para determinar las diferencias estadísticas se realizó una ANOVA de una vía y una prueba a posteriori de Tukey HDS (p < 0.05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN: Las plaquetas sintetizadas midieron aproximadamente 50 nm de ancho y 450 nm de largo y las cuasi-redondas 100 nm (Fig. 1C y D). En general, los resultados indican que todas las nZnO provocan una inhibición de crecimiento de *E. amylovora*. En la Figura 2A y 2B se observa los halos de inhibición por las nZnO. Al día 1, el mayor halo de inhibición se generó con nZnO cuasi-redondas (cVo) (12.63 ± 0.15 mm) y al día 15 con plaquetas (cVo y sVo) (13.01 ± 0.1 y 13.01 ± 0.39 mm respectivamente). El tiempo de envejecimiento de las nZnO, en la suspensión acuosa, generó un incremento en los halos de inhibición de plaquetas; mientras que en las cuasi-redondas el comportamiento fue similar (Fig. 3). El control positivo (ZnCl₂) en los dos tiempos presentó un halo de inhibición promedio de 13.27 ± 0.34 mm, cabe destacar que la concentración de este control fue 6.8 veces mayor (~34000

PCTI
EXTRACTO DE PCTI: <http://pcti.mx>. Órgano oficial de divulgación de la AMECTIAC, Revista de divulgación CyT. ISSN 2007-1310. Director General y Editor en Jefe, Dr. Héctor Nolasco Soria.

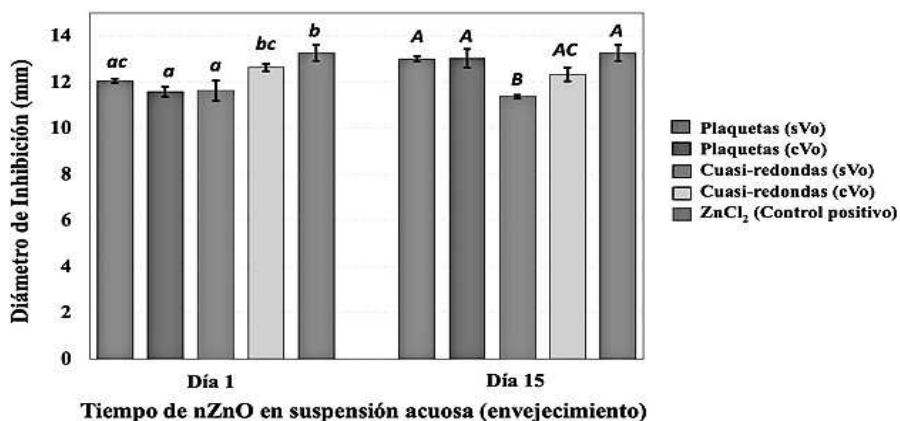


Fig 3. Inhibición de crecimiento de *E.amylovora* por efecto de nZnO /CORTESÍA

¹ Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV)
² Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)
joan.salas@cimav.edu.mx

ANEXO 2: TESIS DOCTORADO



GOBIERNO DE
MÉXICO



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Coordinación de estudios de Posgrado
Oficio PO - 226/2021
Chihuahua, Chih., a 26 de febrero de 2021

A quien corresponda
P r e s e n t e .

El suscrito **Lic. Emilio Pascual Domínguez Lechuga**, Coordinador de Estudios de Posgrado del Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C., hace constar que **Aurora Roxana Araiza Campos** de matrícula **DCTA2002002** está inscrita como alumna regular en nuestro programa Doctorado en Ciencia y Tecnología Ambiental, bajo la supervisión académica de **Joan Sebastian Salas Leiva**.

Se extiende la presente constancia a petición del interesado para los fines legales a que haya lugar.

A t e n t a m e n t e

Lic. Emilio Pascual Domínguez Lechuga
Coordinador de Estudios de Posgrado



ANEXO 2: PRÁCTICAS PROFESIONALES



**GOBIERNO DE
MÉXICO**



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



**Coordinación de estudios de Posgrado
Oficio PO - 2319/2022**

Chihuahua, Chih, a 14 de noviembre de 2022.

A quien corresponda
P r e s e n t e .

Por medio de la presente hago constar que el alumno **Alejandro Aguirre Hernández**, de la carrera de **Ingeniería en biotecnología** perteneciente a **Tecnológico de Monterrey Campus Chihuahua** y con número de control **A01566464** realizó **Prácticas Profesionales**, dentro del periodo comprendido del **16 de mayo de 2022 al 30 de septiembre de 2022** cubriendo un total de **525** horas en este Centro de Investigación, desarrollando las siguientes actividades:

Relacionadas con el PI-22-17, microbiología, nanotoxicología, nanoestructuras ZnO

Que nos reporta con resultados muy satisfactorios el asesor **Joan Sebastian Salas Leiva**, una puntuación de , por lo que no tenemos reserva alguna en felicitarlo por su excelente formación.

Se extiende la presente constancia en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua el día 14 del mes de noviembre de 2022, para los fines legales a que haya lugar.

Atentamente

Dra. Luz Leal Quezada
**Departamento de Medio Ambiente y
Energía**

Vo. Bo

Joan Sebastian Salas Leiva
Asesor Responsable



**GOBIERNO DE
MÉXICO**



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



**Coordinación de estudios de Posgrado
Oficio PO - 2318/2022**

Chihuahua, Chih, a 14 de noviembre de 2022.

A quien corresponda
P r e s e n t e .

Por medio de la presente hago constar que el alumno **Margarita Chavez**, de la carrera de **Ingeniería en biotecnología** perteneciente a **Tecnológico de Monterrey Campus Chihuahua** y con número de control **A01566378** realizó **Prácticas Profesionales**, dentro del periodo comprendido del **16 de mayo de 2022 al 30 de septiembre de 2022** cubriendo un total de **525** horas en este Centro de Investigación, desarrollando las siguientes actividades:

Estancia de investigación. Las actividades que desempeñará Margarita, están asociadas a manejo y técnicas microbiológicas y nanotoxicología. Estas actividades se enmarcan dentro de la del proyecto interno de CIMAV PI-22-17

Que nos reporta con resultados muy satisfactorios el asesor **Joan Sebastian Salas Leiva**, una puntuación de , por lo que no tenemos reserva alguna en felicitarlo por su excelente formación.

Se extiende la presente constancia en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua el día 14 del mes de noviembre de 2022, para los fines legales a que haya lugar.

A t e n t a m e n t e

Dra. Luz Leal Quezada
Departamento de Medio Ambiente y
Energía

Vo. Bo

Joan Sebastian Salas Leiva
Asesor Responsable



**GOBIERNO DE
MÉXICO**



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



**Coordinación de estudios de Posgrado
Oficio PO - 2320/2022**

Chihuahua, Chih, a 15 de noviembre de 2022.

A quien corresponda
P r e s e n t e .

Por medio de la presente hago constar que el alumno **Marlen García Bustillos**, de la carrera de **Ingeniería en Biotecnología** perteneciente a **Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores Monterrey** y con número de control **A01561783** realizó **Prácticas Profesionales**, dentro del periodo comprendido del **16 de mayo de 2022 al 30 de septiembre de 2022** cubriendo un total de **525** horas en este Centro de Investigación, desarrollando las siguientes actividades:

Actividades relacionadas con microbiología y nanotoxicología.

Que nos reporta con resultados muy satisfactorios el asesor **Joan Sebastian Salas Leiva**, una puntuación de , por lo que no tenemos reserva alguna en felicitarlo por su excelente formación.

Se extiende la presente constancia en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua el día 15 del mes de noviembre de 2022, para los fines legales a que haya lugar.

Atentamente

Dra. Luz Leal Quezada
**Departamento de Medio Ambiente y
Energía**

Vd. Bº

Joan Sebastian Salas Leiva
Asesor Responsable