



Cuerpo Académico: Química, Salud y Desarrollo Regional (UABJO-CA-49),
Investigación en Salud (UABJO-CA-63), Cuerpo Académico:
Inmunología y Microbiología Clínica (UABJO-CA-65)
y Cuerpo Académico: Química y Salud Ambiental (UABJO-CA-71)

CIENCIAS QUÍMICO FARMACOBIOLOGICAS:

INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA EN EL CAMPO DE LA SALUD VOL 1.



Héctor Ulises Bernardino-Hernández
Honorio Torres-Aguilar
Coordinadores

CIENCIAS QUÍMICO
FARMACOBIOLOGICAS:
INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA EN EL CAMPO DE
LA SALUD

VOLUMEN 1

Héctor Ulises Bernardino-Hernández
Honorio Torres-Aguilar
Coordinadores

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca
Asociación Nacional de Docentes Universitarios A. C.

Copyright © 2023

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca
Asociación Nacional de Docentes Universitarios A. C.

Portada: Omar Cortés
Responsable de la edición: Dr. Jorge Everardo Aguilar Morales

International Edition

All rights reserved

Printed in North Charleston, South Carolina, United States of America

ISBN: 9798418821645

El contenido total de este libro fue sometido a evaluación para su dictaminación aprobatoria, en el sistema de doble ciego a través de expertos investigadores *ad hoc* en cada una de las áreas y externos a la Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca. En la presente edición se utilizaron los servicios editoriales de la Asociación Nacional de Docentes Universitarios A.C.

Todos los contenidos son responsabilidad exclusiva de los autores y no necesariamente reflejan la postura del editor o de las instituciones que participaron en el arbitraje y en el proceso editorial.

Se autoriza la reproducción parcial o total de este libro con fines educativos y de investigación, siempre que se cite la fuente y no se use con fines de lucro.

Para más información comuníquese a:
contacto@profesoresuniversitarios.org.mx
O visite la página web del libro:
www.profesoresuniversitarios.org.mx/publicaciones.html

La presente publicación ha sido posible gracias a los recursos provenientes del apoyo 2023/INTER-PUBLIC/A969 del Programa Editorial Institucional para el Fomento de Publicaciones Científicas de Profesores Universitarios Latinoamericanos de la Asociación Nacional de Docentes Universitarios A. C. Ambos programas tienen como objetivo incentivar la producción científica de profesores universitarios. La presente publicación ha superado un proceso de arbitraje realizado por investigadores independientes a los autores.

ÍNDICE

	Presentación	7
	<i>Héctor Ulises Bernardino Hernández y Honorio Torres Aguilar</i>	
I	Actividad antiproliferativa in vitro de nanopartículas de oro sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7	9
	<i>Cosme Aquino Jiménez, Roberto Martin Morales López, Adriana Moreno Rodríguez y Gabriel Sánchez Cruz</i>	
II	Análisis morfológico, composición y efecto de <i>Echeveria pallida</i> sobre la producción de trampas extracelulares de neutrófilos humanos	19
	<i>Ángeles Esmeralda Gómez Bustamante, Paola Ester López Díaz, Juan Pablo Merino Villalobos y Honorio Torres Aguilar</i>	
III	Alimentos oaxaqueños que fortalecen el sistema inmunitario	35
	<i>Teresa Amelia Cruz García, Yanetzi Ortiz Altamirano, Claudia Elizabeth Porras Antonio, Leobardo Reyes Velasco y Arturo Zapién Martínez</i>	
IV	Determinación de fenoles y flavonoides de la especie vegetal <i>Malpighia mexicana</i> (nanche rojo) de los Valles Centrales de Oaxaca	45
	<i>Gladys Luis Chincoya, Yadira Bonilla Pacheco, Araceli Pérez Vásquez, Gabriel Sánchez Cruz y Sol Cristians Niizawa</i>	
V	Polifenoles totales en <i>Leucaena esculenta</i> (DC.) Benth (huaje) de uso comestible de los Valles Centrales de Oaxaca.	53
	<i>Yadira Bonilla Pacheco, Gladys Luis Chincoya, Gabriel Sánchez Cruz, Araceli Pérez Vásquez y Sol Cristians Niizawa</i>	
VI	Método matemático para determinar el volumen de formas farmacéuticas sólidas con geometría cilíndrico-biconvexas	63
	<i>Yundalla Villalobos Dehesa, Alejandra Nicolás Cruz y Asela Garnica Sánchez</i>	
VII	Diseño y validación de microdispositivos con nanopartículas magnéticas conjugadas para inmunoensayos rápidos utilizando microfluídica	75
	<i>Kenia Chávez Ramos y María del Pilar Cañizares-Macías</i>	

VIII	Presencia de agentes patógenos en leche cruda de ganado bovino en el municipio de San Pablo Huixtepec, Oaxaca	89
	<i>Martha Elena Santos Peralta, Mario Alfredo Urbina Mata, Ericel Hernández García, José Ángel Cueva Villanueva y Héctor Ulises Bernardino Hernández</i>	
IX	Síntesis, caracterización y cálculos teóricos de descriptores globales de reactividad de una serie de derivados de tiazol	99
	<i>Fernando Mejía Zarate, Juan Luis Bautista Martínez y Francisco Emanuel Velásquez Hernández</i>	
X	Un método en flujo rápido para la determinación de la capacidad antioxidante en muestras de alimentos	113
	<i>Willmann Antonio Jiménez Morales y María del Pilar Cañizares Macías</i>	
XI	Caracterización de nanopartículas de plata utilizando como agente reductor <i>Aloe vera</i>	126
	<i>Yareth Aparicio Luna, Antonio Canseco Urbieto, Ivonne Arisbeth Díaz Santiago y Yosemite Arjuna León Nataret</i>	

PRESENTACIÓN

Héctor Ulises Bernardino Hernández¹ y Honorio Torres Aguilar²

La presente obra titulada **Ciencias Químico Farmacobiológicas: Investigación básica y aplicada en el campo de la salud Volumen 1**; es el resultado de los avances y trabajos de investigación de estudiantes de licenciatura y posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y otras Facultades invitadas de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca y de otras universidades, que fueron desarrollados como parte de las investigaciones realizadas en la Facultad de Ciencias Químicas entre los años 2020 y 2021. Mediante un procedimiento académico riguroso se realizó su selección y dictaminación por pares académicos para su incorporación en este libro. Dichos trabajos han sido dirigidos y asesorados por Profesores e Investigadores de las mismas Facultades, pertenecientes a diversos Cuerpos Académicos (CA), entre los que destacan el CA *Química, Salud y Desarrollo Regional* (UABJO-CA-49), *Investigación en Salud* (UABJO-CA-63), *Inmunología y Microbiología Clínica* (UABJO-CA-65) y *Química y Salud Ambiental* (UABJO-CA-71). Los diferentes trabajos abordan las áreas de la química, farmacia, biología y ambiente, cuya finalidad es contribuir a atender la problemática y mejorar la salud pública de la población oaxaqueña. Con esta obra, se busca difundir los avances y quehacer científico que se está logrando en la Facultad de Ciencias Químicas de la UABJO.

¹ Profesor Investigador de Tiempo Completo de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, líder del CA *Química y Salud Ambiental* (UABJO-CA-71). Investigador Nacional Nivel I del CONAHCYT.

² Profesor Investigador de Tiempo Completo de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, líder del CA *Inmunología y Microbiología Clínica* (UABJO-CA-65). Investigador Nacional Nivel II del CONAHCYT.

ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA IN VITRO DE NANOPARTÍCULAS DE ORO SOBRE LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA MCF-7

Cosme Aquino Jiménez¹, Roberto Martin Morales López¹, Adriana Moreno Rodríguez^{1,2} y Gabriel Sánchez Cruz^{1,3}

RESUMEN

Introducción: El cáncer engloba un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación incontrolada de células que puede aparecer en diversas partes del cuerpo, considerándose en la actualidad como la segunda causa de muerte en América Latina, siendo los principales el cáncer de mama, tiroides y cervicouterino, las de mayor incidencia en mujeres. Actualmente la biomedicina enfocada al área de nanotecnología, ofrece grandes avances para la búsqueda de nuevos tratamientos en diversas enfermedades, dentro de los cuales se encuentra el cáncer. **Objetivo:** Evaluar *in vitro* la actividad antiproliferativa de nanopartículas de oro (NPs-Au) sobre la línea celular MCF-7. **Materiales y métodos:** Se emplearon NPs-Au previamente sintetizadas y caracterizadas mediante UV-Vis y microscopio de fuerza atómica, las cuales fueron evaluadas a diversas concentraciones (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL) sobre el cultivo celular MCF-7 a 24 y 48 horas de exposición. La comparación de la viabilidad celular entre los tratamientos, se empleó un ANOVA y prueba *pos hoc* de Tukey. **Resultados:** Las NPs-Au presentes en solución fueron semiesféricas con un tamaño entre 10-100 nm. La concentración de 3.125 µg/mL presentó actividad antiproliferativa significativa en las células cancerígenas a 24 y 48 horas. **Conclusiones:** Los hallazgos obtenidos, pueden ser un referente para seguir evaluando a las NPs-Au en futuras investigaciones.

Palabras claves: Cáncer, células MCF-7, nanopartículas de oro.

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. **Autor de correspondencia:** gsanchez@uabjo.mx

² Miembro del CA Química, Salud y Desarrollo Regional (UABJO-CA-49)

³ Miembro del CA Química y Salud Ambiental (UABJO-CA-71)

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación incontrolada de células que puede aparecer en cualquier parte del cuerpo, actualmente es la segunda causa de muerte en América Latina. Para México, no se difiere la magnitud de los efectos de la enfermedad con respecto al panorama mundial, ya que de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015), el cáncer pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico y mamario, son los responsables del mayor número de fallecimientos en el mundo, de manera particular el cáncer de pulmón afecta a los hombres y el de mama es la principal causa de muerte entre las mujeres (Jemal, Bray, Ferlay, Ward & Forman, 2011; Feitelson, 2016).

A pesar de los múltiples avances que existen hasta el momento, la ciencia pretende experimentar nuevos senderos en el campo de biomedicina, dentro de los cuales se encuentra la nanotecnología, que describe un gran avance con múltiples aplicaciones, especialmente en la medicina mediante el desarrollo de nanotransportadores de fármacos, nanofármacos, así como el uso de nanopartículas (NPs) de diversos metales para algunas enfermedades con la finalidad de obtener tratamientos terapéuticos menos invasivos, económicos y con grandes beneficios. Se ha documentado que las nanopartículas de oro (NPs-Au) por diversos métodos de síntesis, presentan efectos terapéuticos de tipo citotóxico en diversas líneas celulares (Selim & Hendi, 2012). Sin embargo, no se ha descrito la identificación de las NPs-Au por microscopia de fuerza atómica (MFA) derivado de síntesis química, así como su actividad antiproliferativa contra la línea celular de cáncer de mama (MCF-7, Michigan Cancer Foundation 7) en un modelo *in vitro*. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de NPs-Au sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

METODOLOGÍA

Identificación de AuNPs

Se adquirieron 0.5 mL de una solución stock de NPs-Au a una concentración de 1.95 mg/mL. Para la caracterización se utilizaron 2 mL de una solución previamente diluida a la concentración de 3.125 µg/mL con agua desionizada, la cual fue medida por microscopia UV-Visible Thermo scientific genes 10s en un rango de barrido de 200-800 nm para determinar la presencia de las NPs. Para su identificación mediante microscopía de fuerza atómica (Bruker innova) a través de la técnica de contacto, se usó 1 µL de la solución diluida que fue colocada sobre una mica de grafito pirolítico altamente orientado (HOPG, *Highly oriented pyrolytic graphite*) y utilizando un tamaño de escaneo de 744.1 nm por triplicado a 320 Hz a un voltaje estándar de calibración de 2.0 V, la cual permite determinar el tamaño, la forma y la dispersión de las NPs-Au. Una vez teniendo la caracterización se procedió a la suspensión de las NPs en medio Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI) y se realizaron diluciones en serie (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL) a partir del stock, para su posterior evaluación biológica.

Líneas celulares y las condiciones de cultivo

Las líneas celulares cancerígenas fueron donadas por el Laboratorio 6 de la Facultad de Ciencias Químicas y el Laboratorio de Mecanismos Celulares en Hemostasia y Cáncer de la Facultad de Medicina y Cirugía, ambos de la UABJO. Dichas células fueron cultivadas en medio RPMI 1640, suplementado con L-Glutamina (Caisson Laboratories, Inc. USA) al 10% de suero fetal bovino (SFB) (Biowest) y 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina 100X (Caisson Laboratories, Inc. USA). Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora (MR Brinder, Alemania) con CO₂ al 5% utilizando el procedimiento estándar de cultivo.

Ensayo de viabilidad *in vitro* mediante MTT

De las células cancerígenas previamente obtenidas, se realizó un cultivo de 5 000 células/pozo en una microplaca de 96 pozos, usando como volumen final 100 μL de medio de cultivo RPMI. Posteriormente, se procedió a la incubación por 24 horas a 37°C humidificado con 5% CO_2 para su adherencia, inmediatamente fueron tratadas con 100 μL de NPs-Au a diferentes concentraciones (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), obteniendo un volumen final de 200 μL . Todo lo anterior, se realizó por triplicado para incubar a diferentes tiempos: 24 y 48 horas. En cada caso se incluyeron tres controles; el primero para mantener vivas a las células (sin adición de NPs-Au) y dos controles para garantizar la muerte celular: peróxido de hidrogeno al 40% y dimetilsulfóxido (DMSO) al 30%, respectivamente. Una vez transcurrido el tiempo de 24 y 48 horas de incubación, en cada placa se retiró el medio con micropipeta y se le agregaron 20 μL de MTT (5 mg/mL en PBS 1X de bromuro de 3-(4,5-dimetiltoazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium, SIGMA), posteriormente se incubaron por 4 horas a 37°C y 5% de CO_2 permitiendo la formación de cristales de formazán. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el reactivo de MTT por decantación y se procedió a la adición de 100 μL de isopropanol acidificado a temperatura ambiente para la solubilización de los cristales. La variable de respuesta fue el porcentaje de viabilidad celular a las 24 y 48 horas de incubación, la cual se calculó a través de la lectura de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 570 nm en un lector de placas (Multiskan FC, Termo scientific), utilizando la siguiente formula: $VC = (DONPs-Au/DOCC) \times 100$. Dónde: VC = Viabilidad celular (%); DONPs-Au = Densidad óptica de células tratadas con cada concentración de NPs-Au a 570 nm y, DOCC = Densidad óptica de células control (sin adición de NPs-Au) a 570 nm.

Para analizar la información del ensayo, se consideraron nueve tratamientos (por triplicado) bajo un diseño completamente aleatorizado, se utilizó la prueba de ANOVA y prueba *pos hoc* de Tukey

mediante el programa SPSS v15.0, para identificar las diferencias entre los tratamientos, previa comprobación de la normalidad de los datos.

RESULTADOS

La técnica de espectroscopía UV-Visible se realizó como prueba preliminar para la formación y presencia de NPs. En la figura 1, se representa gráficamente la resonancia de plasma de superficie (SPR) de las NPs-Au, las cuales generan un pico más alto a 575 nm indicando la presencia de las NPs-Au. En la caracterización mediante MFA, el tamaño osciló entre 78-100 nm (fig. 2), las cuales no se encuentran aglomeradas.

Figura 1. Espectro UV-Vis registrado por la presencia de nanopartículas de oro.

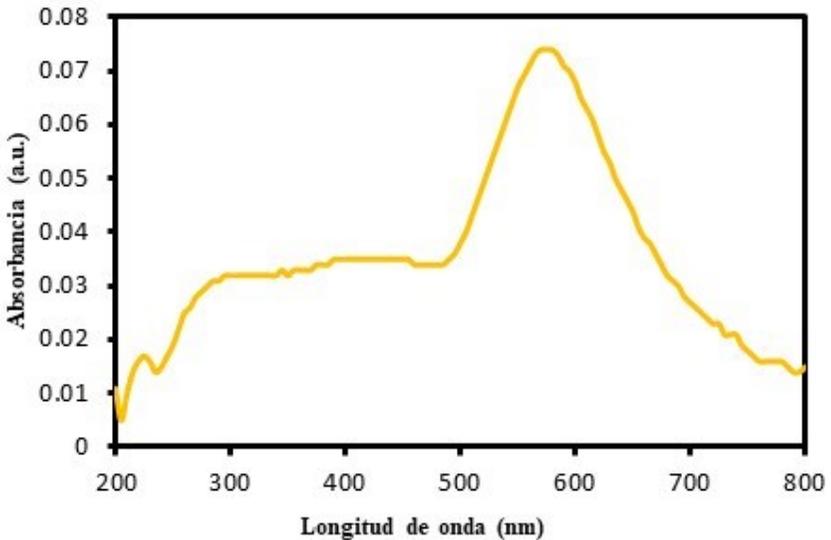
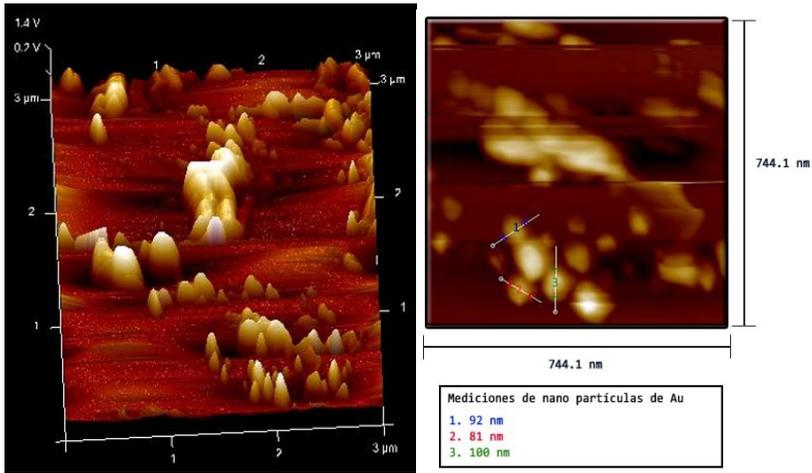


Figura 2. Caracterización de las nanopartículas de oro mediante microscopía de fuerza atómica (izquierda) y tamaño de dichas nanopartículas (<100 nm, derecha).



En el ensayo de viabilidad *in vitro* mediante MTT a las 24 horas, se observó que los tratamientos de 3.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, H_2O_2 y DMSO fueron estadísticamente iguales entre ellos y significativamente menores al resto de los tratamientos ($p=0.000$). A las 48 horas, la menor viabilidad celular se observó con las concentraciones de 3.125, 6.25 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que fueron estadísticamente iguales con los tratamientos de H_2O_2 y DMSO, seguido de la similitud entre los tratamientos de DMSO, 6.25 y 12.5 y 100 mg/mL y posteriormente de los tratamientos de 6.25, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ que fueron iguales entre ellos; el valor más alto de viabilidad celular y significativamente diferente a los demás tratamientos, se observó sin la presencia de NPs-Au ($p=0.000$) (Tabla 1).

Tabla 1. Viabilidad celular a las 24 y 48 horas.

Tratamiento	24 horas	48 horas	
Sin NPs-Au	0.6940±0.16956 b	0.2563±0.04980	d
100 µg/mL	0.9743±0.12889 b	0.1363±0.02413	bc
50 µg/mL	0.9460±0.21956 b	0.1487±0.01097	c
12.5 µg/mL	0.6350±0.16286 b	0.1380±0.02352	bc
25 µg/mL	0.9620±0.23707 b	0.1260±0.01600	a c
6.25 µg/mL	0.5907±0.14230 b	0.0910±0.00100	abc
3.125 µg/mL	0.0707±0.00603 a	0.0650±0.00436	a
DMSO (30%)	0.0860±0.01015 a	0.0753±0.00681	ab
H ₂ O ₂ (40%)	0.0817±0.03742 a	0.0700±0.00985	a

Letras diferentes, son estadísticamente diferentes.

DISCUSIÓN

De acuerdo con la prueba de identificación de las NPs realizada por espectrometría UV-Vis, se obtuvo una banda de 575 nm, ubicándose en la zona inferior del espectro visible. Estudios realizados por Akram Iqbal, Daniyal y Khan (2017), así como por Ahmad, Bhatnagar, Saxena, Iqbal, Ghosh & Dutta (2017), quienes sintetizaron y caracterizaron NPs-Au midiendo los rangos de longitud de onda entre 500 a 550 nm a través del espectro UV-Vis, obtuvieron un pico alto de 540 nm que corresponde a la resonancia de plasma de superficie de la formación de dichas NPs, la presencia de color rojo rubí y el pico a 520 nm verifican la producción de NPs-Au con un tamaño de aproximadamente 78 nm, lo que concuerda con la caracterización obtenida mediante MFA en el presente estudio (78-100 nm). De la misma manera, lo reportan Devi y Sathishkumar (2017), quienes usaron la técnica de espectrometría para la caracterización de las mismas NPs, donde ajustaron a un barrido de 200-800 nm e intervalos de 1 nm, dando la banda de absorción en el rango de 510–560 nm, obteniendo la producción de NPs-Au con un tamaño de 20-50 nm.

En el caso de la prueba de viabilidad, se decidió emplear una sola línea celular debido a las características que estas presentan desde el punto de vista molecular (Holliday & Speirs, 2011), ya que se han considerado diferentes en algunos aspectos, incluidos los perfiles moleculares, los tiempos de duplicación del cultivo *in vitro* y la tumorigenicidad *in vivo*. Es decir, las células MCF-7 se clasifican molecular y genéticamente como Luminal A (ER + / PR + / HER2-), mientras que MDA-MB-231 es una línea celular triple negativa (ER- / PR- / HER2-) y claudin-baja. Según se informa, las células MCF-7 son de tipo salvaje P53, mientras que MDA-MB-231 son mutantes P53. MCF-7 tienen firma molecular del fenotipo epitelial, mientras que MDA-MB-231 son molecularmente de tipo mesenquimatoso. Considerando dichas características para la línea celular estudiada, se observó la mejor actividad antiproliferativa a la concentración de 3.125 µg/mL de NPs-Au a las 24 y 48 horas. Es importante mencionar, que a las 48 horas dicho efecto se observó a concentraciones altas de dichas NPs, la explicación a dicho comportamiento puede deberse al efecto de las propias NPs; sin embargo, debe considerarse que también pudo deberse a las alteraciones morfológicas, bioquímicas y funcionales propias de las células que inducen a su muerte después de cierto tiempo. Lo anterior, indica la necesidad de realizar más evaluaciones para obtener datos más contundentes y determinar con más certeza el efecto de las NPs-Au sobre células cancerígenas.

A pesar de lo anterior, los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito por Uma Suganya et al. (2016) y Selim & Hendi (2012), quienes evaluaron el efecto citotóxico de NPs-Au con forma esféricas y tamaño aproximado de 12.5 nm, mediante la técnica de MTT en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231, observando una actividad antiproliferativa a una concentración de 4 y 6 µg/mL después de 48 horas de exposición, concluyendo que a menor tamaño de las NPs, es mayor el efecto citotóxico.

CONCLUSIONES

Las técnicas de UV-Visible y MFA, son confiables y sensibles para la identificación, caracterización y distribución de las NPs-Au. Dichas NPs, mostraron actividad antiproliferativa en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 a concentraciones más bajas en diferentes tiempos. Los resultados obtenidos sientan las bases para seguir documentando los efectos antiproliferativos en células cancerígenas por efecto de la exposición a NPs-Au.

REFERENCIAS

- Ahmad N., Bhatnagar S., Saxena R., Iqbal D., Ghosh A.K. & Dutta R. (2017). Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles: Kinetics, in vitro and in vivo study. *Materials Science and Engineering C Mater Biol Appl*, 78,553–564. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.282>
- Akram, M., Iqbal M., Daniyal M. and Khan A.U. (2017). Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*. 50,33. <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>
- Devi G.K. & Sathishkumar K. (2017). Synthesis of gold and silver nanoparticles using *Mukia maderaspatna* plant extract and its anticancer activity. *IET Nanobiotechnology*. 11(2),143-151. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0054>
- Feitelson D.G. (2016). Data on the distribution of cancer incidence and death across age and sex groups visualized using multilevel spie charts. *Journal of Clinical Epidemiology*, 72:90-97. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2015.11.001>
- Holliday D.L. and Speirs V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13:215. <https://doi.org/10.1186/bcr2889>
- Jemal, A., Bray F., Center M.M, Ferlay J., Ward E., Forman D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61: 69-90. <https://doi.org/10.3322/caac.20107>
- Organización mundial de la salud (OMS) (2015) *Cáncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Selim M.E. & Hendi A.A. (2012). Gold nanoparticles induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(4):1617-1620. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2012.13.4.1617>
- Uma Suganya K.S., Govindaraju K., Ganesh Kumar V., Prabhu D., Arulvasu C., Stalin Dhas T., Karthick V., Niranjan C. (2016). Anti-proliferative effect of biogenic gold nanoparticles against breast cancer cell lines (MDA-MB-231 and MCF-7), *Applied Surface Science*, 371, 415-424. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.03.004>

ANÁLISIS MORFOLÓGICO, COMPOSICIÓN Y EFECTO DE *Echeveria pallida* SOBRE LA PRODUCCIÓN DE TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Ángeles Esmeralda Gómez Bustamante¹, Paola Ester López-Díaz², Juan Pablo Merino Villalobos³ y Honorio Torres Aguilar^{3,4}

RESUMEN

Introducción: Las trampas extracelulares de neutrófilos (del inglés, NETs) son redes de cromatina descondensada cargadas con péptidos antimicrobianos y enzimas producidas en contra de microorganismos. Actualmente, la variabilidad en su composición está escasamente estudiada y no se han descrito productos naturales que inhiban sus efectos patológicos. **Objetivo:** Evaluar las divergencias estructurales en la composición de las NETs inducidas por estímulos bioquímicos y microbiológicos en presencia de plasma con lupus eritematoso sistémico y extracto de *Echeveria pallida*. **Materiales y métodos:** Por microscopía de fluorescencia se analizó la morfología de NETs inducidas por estímulos bioquímicos (acetato de miristato de forbol y ácido hipocloroso) y microbiológicos (*Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*), en presencia de plasma de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y extracto hidroalcohólico de *E. pallida*. **Resultados:** Las evidencias experimentales revelaron una composición diferencial de ADN y del péptido antimicrobiano catelicidina (LL37) ante los diferentes estímulos. La presencia de plasma de pacientes con LES aumentó la liberación de ADN y LL37. El extracto de *E. pallida* inhibió la producción de NETs. **Conclusiones:** Se obtuvieron evidencias sobre la especialización de las NETs como mecanismo microbicida de los neutrófilos, que sustentan los efectos de *E. pallida* en la inhibición de la producción de NETs.

Palabras clave: Autoinmunidad, *Echeveria pallida*, neutrófilos, trampas extracelulares.

¹Oaxaca's Site Management Organization S.C. (Red OSMO).

²Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR, Oaxaca.

³Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. **Autor de correspondencia:** gbhonorio@hotmail.com

⁴Miembro del CA Inmunología y Microbiología Clínica (UABJO-CA-65)

Los neutrófilos son leucocitos cruciales para la defensa en contra de las infecciones en la respuesta inmune innata. Estas células pueden realizar funciones especializadas como la fagocitosis, la degranulación y la producción de especies reactivas de oxígeno dependiendo del patógeno que identifiquen. La producción de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), es un mecanismo microbicida adicional que se describió recientemente como la emisión de redes de cromatina descondensada cargadas con histonas, enzimas y péptidos antimicrobianos para capturar, neutralizar y eliminar ciertos tipos de bacterias, hongos y algunos virus (Mayadas, Cullere & Lowell, 2014). Las NETs pueden producirse por dos procesos principales: a) Una NETosis lítica o "suicida", dependiente de NADPH oxidasa 2 (NOX2), en este proceso, la membrana nuclear se disgrega y la cromatina es descondensada para mezclarse con componentes de los gránulos, el contenido completo se libera al espacio extracelular implicando la muerte de los neutrófilos (Brinkmann et al., 2004); b) Una NETosis "vital" o no lítica, independiente de NOX2 en la que el ADN se empaqueta en vesículas que posteriormente se expulsan al espacio extracelular, los neutrófilos mantienen su viabilidad permaneciendo como citoplastos anucleados capaces de rodar y engullir bacterias (Yipp, 2012). En ambos procesos, la actividad del péptido antimicrobiano catelicidina (LL37) se han descrito como relevante para la función microbicida de las NETs (Papayannopoulos, Metzler, Hakkim & Zychlinsky, 2010; Papayannopoulos, 2018).

Sin embargo, a pesar del papel relevante de las NETs en la respuesta inmune innata, una sobreproducción puede ser perjudicial, como se ha descrito en el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) (Jeremic et al., 2019; Torres-Aguilar, Sosa-Luis & Aguilar-Ruíz, 2019) y en enfermedades oculares como la carnosidad (pterigiión) (Yipp, Zamora-Ortiz, Buentello-Volante, García-Mejía & Garfias, 2019). Respecto a este último, la planta medicinal mexicana *Echeveria pallida* (siempreviva), ha sido utilizada tradicionalmente para tratar esta enfermedad (González-Zorzano, 2011; Reyes, Brachet, González, Islas

& López, 2015; Méndez, Ferrer, Dorantes, Simá & Dzib, 2003; Godeau, Laugier, Orange, Godeau, Guittarda & Darmanin, 2017). De acuerdo con lo anterior y dada la escasa información en la heterogeneidad de la estructura de las NETs, se evaluó su morfología y composición ante diferentes estímulos microbianos, así como el efecto de factores solubles derivados de un proceso autoinmune (plasma LES). Por otra parte, se analizó el efecto del extracto hidroalcohólico de *E. pallida* sobre la emisión de NET's.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de neutrófilos y muestras de plasma

El proyecto fue aprobado por el comité de investigación del Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca (HRAEO/CIC/CEI 013/16). Se obtuvieron muestras de 10 mL de sangre con EDTA de pacientes con LES (lupus eritematoso sistémico) e individuos sanos pareados en edad y género. Los neutrófilos se purificaron mediante gradientes de Percoll (GE Healthcare). El número de células y su viabilidad se cuantificaron por exclusión con azul tripano (0.4% Sigma). La pureza se evaluó por citometría de flujo (MACSQuant 10) y software FlowJo (Tree Star, Inc), su morfología se observó mediante la tinción de Wright (Hycel).

Material vegetal y preparación del extracto

La planta *E. pallida* fue colectada en Soledad, Etna, Oaxaca y fue autenticada por la botánica y taxonomista M. en C. Manzanero-Medina (N° de registro: JBRCC-250-01). Para el extracto se trituraron 500 g de hojas frescas y se extrajeron con 500 mL de etanol durante 40 horas. El extracto etanólico resultante se filtró y se concentró al vacío, posteriormente se diluyó en buffer de fosfatos DPBS (del inglés Dulbecco's Phosphate Buffered Saline).

Inducción de trampas extracelulares de neutrófilos

La formación de NETs, se evaluó a partir de tres condiciones experimentales de análisis: 1) Inducción mediante estímulos bioquímicos (acetato de miristato de forbol -PMA- 200 nM [Sigma Aldrich] y ácido hipocloroso -HOCl- 4.5 mM [NaOCl Sigma Aldrich]), bacterianos (*Staphylococcus aureus* [grampositivo ATCC 25923] y *Pseudomona aeruginosa* [gramnegativo, ATCC 10145] a MOI 100) y fúngico (*Candida albicans* [pseudohifas, ATCC 10231] a MOI 1.0); 2) Inducción mediante los estímulos bioquímicos y microbiológicos por separado en presencia de plasma de tres orígenes diferentes: plasma autólogo (del donador de neutrófilos), plasma de pacientes con LES y plasma de individuos sanos alogénico (10%); 3) Inducción mediante los estímulos bioquímicos y microbiológicos por separado en presencia de extracto etanólico de *E. pallida* en concentraciones de 30, 50, 80, 100, 200 y 300 µg/mL. Así mismo, se incluyó como control, neutrófilos en ausencia de plasma en presencia de solución salina equilibrada de Hank (del inglés, HBSS).

Caracterización de las NETs por microscopía de fluorescencia

Para todas las condiciones experimentales de análisis, el ADN se tiñó con DAPI Fluoroshield (Sigma) (color azul) y con Alexa Fluor 594 anti-LL37 (color rojo) o bien, con control de isotipo (Santa Cruz) como control interno para descartar uniones inespecíficas. Para el monitoreo de los estímulos microbianos (*S. aureus*, *P. aeruginosa*) y fúngico (*C. albicans*), fueron marcados previamente con CFSE (5 µM, Sigma) (color verde), respectivamente. Las imágenes en MERGE, son la unión de las imágenes del ADN (azul) y LL37 (rojo), cuyo solapamiento se refleja con la aparición del color lila. Las imágenes fueron obtenidas por microscopía de fluorescencia (microscopio, Axio observer Z1, ZEISS) y analizadas con el software ImageJ. Las lecturas de fondo de fluorescencia se establecieron con células no teñidas para DAPI o el control de isotipo para LL37, con la finalidad de analizar

el valor medio de gris de la señal por área para cada color, cuyos valores fueron utilizados como variables para el análisis ANOVA.

Análisis estadístico

Las diferentes condiciones experimentales de análisis fueron realizadas en diez experimentos independientes realizados por triplicado en un diseño completamente aleatorizado. Para identificar diferencias entre los tratamientos para cada experimento, se realizó un ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey, previa comprobación de la normalidad de los datos, mediante el software Minitab con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

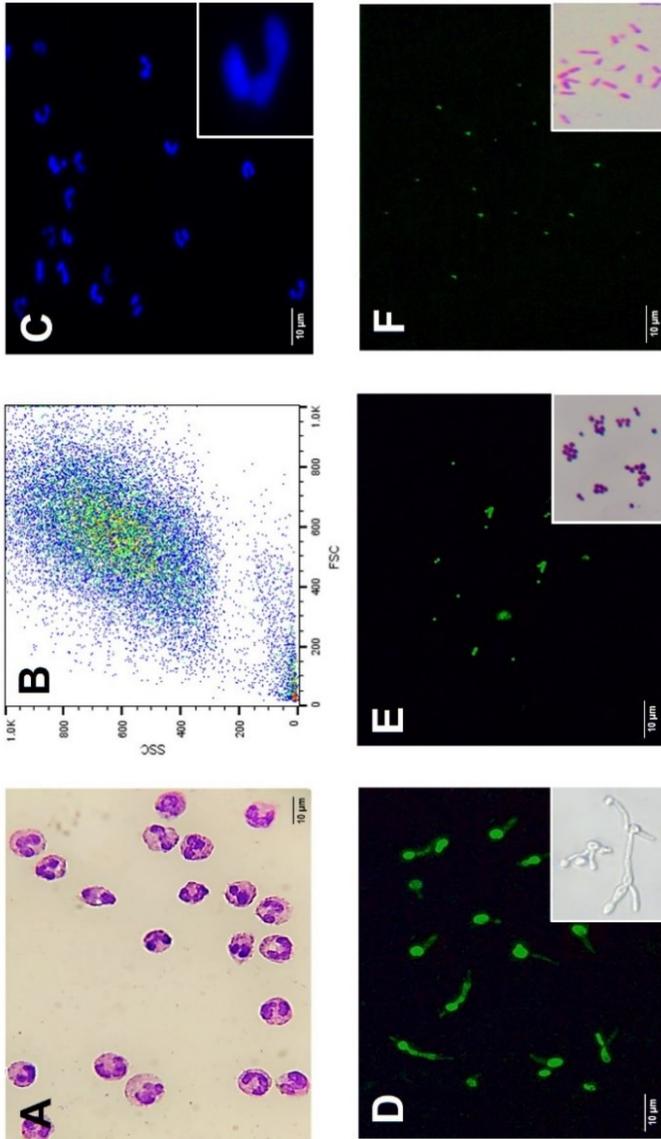
Parte de los resultados ya han sido publicados en revistas internacionales arbitradas e indexadas bajo las siguientes referencias: Sosa-Luis SA et al. *Immunologic Research*. 2021;69(3):264-274 y de Jesús Rios-Rios W, *Altern Ther Health Med*. 2021. Online ahead of print. La información fue retomada como parte del trabajo de los autores como medio de difusión de la ciencia, realizando las citas correspondientes.

Pureza y morfología de neutrófilos y microorganismos

Las características morfológicas observadas por tinción de Wright (Fig. 1A), el perfil FSC-SSC por citometría de flujo (Fig. 1B) y la cuantificación de la viabilidad por exclusión con azul de tripano, permitieron obtener una pureza celular del $98.9 \pm 0.06\%$ y una viabilidad celular del $95.5 \pm 4.2\%$ de neutrófilos purificados en diez experimentos realizados. Las características morfológicas y fluorescentes de la tinción de ADN-DAPI de neutrófilos recién purificados (Fig. 1C) y la tinción CFSE de *C. albicans* (Fig. 1D), *S. aureus* (Fig. 1E) y *P. aeruginosa* (Fig. 1F) fueron establecido inicialmente por microscopía de fluorescencia para caracterizar los cambios morfológicos debido a la inducción de NETs.

Análisis morfológico, composición y efecto de *Echeveria pallida* sobre la producción de trampas extracelulares de neutrófilos humanos

Figura 1. Pureza inicial y características morfológicas de los neutrófilos y los microorganismos. Las imágenes son representativas de uno de diez experimentos. Se observa la pureza de los neutrófilos por tinción de Wright 100X (A); citometría de flujo FSC (dispersión frontal) vs SSC (dispersión lateral) dot blot (B); características morfológicas y fluorescentes de neutrófilos recién purificados con tinción de ADN-DAPI-azul 40X (C) y tinción con CFSE-verde 40X de *C. albicans* (D); *S. aureus* (E) y *P. aeruginosa* (F). Los cuadrados en el extremo inferior derecho muestran una amplificación de 100X en el panel C, una amplificación óptica de 100X en el panel D y una amplificación de tinción de Gram de 100X en los paneles E y F.



Fuente: Sosa-Luis et al. (2021).

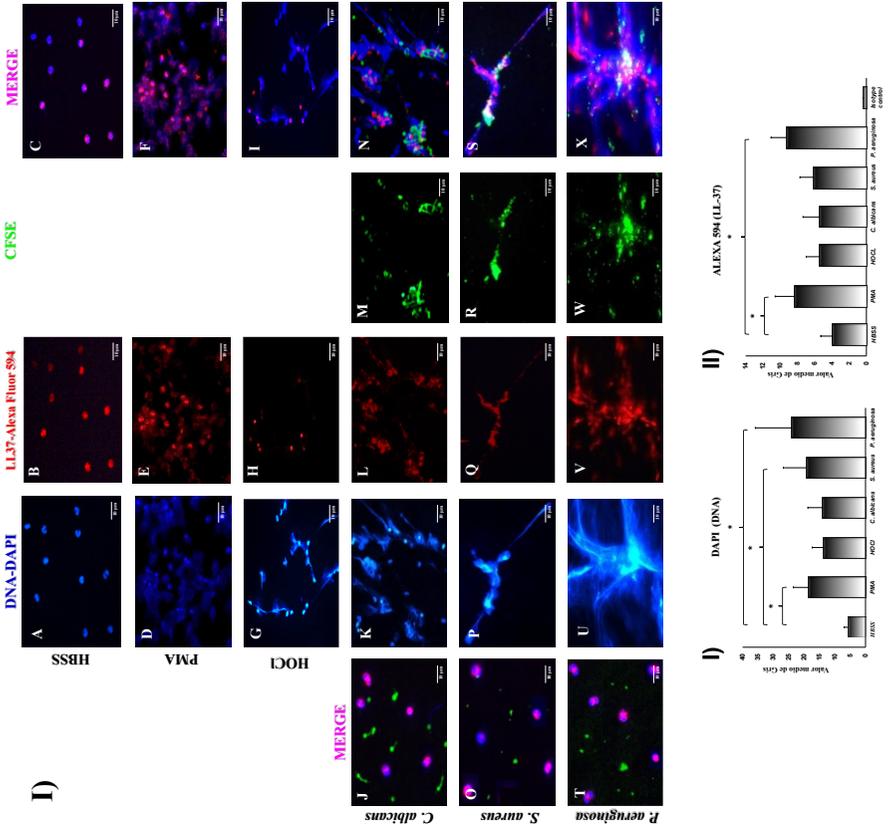
Diferencias morfológicas y estructurales en las NETs inducidas por estímulos bioquímicos y microbiológicos

Los neutrófilos no estimulados mostraron una cromatina condensada con una ubicación citoplásmica de LL37 (Fig. 2 A, B y C). PMA indujo estructuras de ADN de apariencia turbia como se describe para NETs líticas y LL37 se localizó en el espacio extracelular unido a toda la estructura de las NETs ((Fig. 2 D, E y F). HOCl indujo una morfología de filamentos de ADN tipo no líticas y LL37 no colocalizó con los filamentos de las NETs (Fig. 2 G, H y I). *C. albicans* indujo filamentos de ADN prominentes y estructuras anucleadas de tipo citoplastos tipo no lítico y LL37 mantuvo una ubicación citoplásmica (Fig. 2 K, L, M y N). *S. aureus* desencadenó características de NETs no líticas, las bacterias fueron capturadas por filamentos de ADN y LL37 (Fig. 2 O, P, Q, R y S). *P. aeruginosa* generó vastas estructuras de ADN turbias tipo lítico, las partículas bacterianas estaban cubiertas por ADN y LL37 (Fig. 2 T, U, V, W y X).

Es importante resaltar que, aunque las NETs inducidas por *C. albicans*, *S. aureus* y HOCL mostraron características no líticas; sólo *S. aureus* indujo una tinción de ADN superior estadísticamente significativa (Fig. 2, panel II), pero sin diferencias significativas en la participación de LL37 (Fig. 2, panel III) en comparación con los neutrófilos no estimulados. Así mismo, tanto PMA como *P. aeruginosa* como inductores de NETs líticas, mostraron niveles de ADN más altos estadísticamente significativos (Fig. 2, panel II) y LL37 (Fig. 2, panel III) en comparación con los neutrófilos en reposo.

Análisis morfológico, composición y efecto de *Echeveria pallida* sobre la producción de trampas extracelulares de neutrófilos humanos

Figura 2. Composición de ADN y LL37 de NETs inducidas por activadores bioquímicos y microbiológicos. Las imágenes muestran resultados representativos de microscopía de fluorescencia de diez repeticiones independientes realizados por triplicado para cada condición experimental. Los gráficos II y III muestran promedios \pm desviación estándar del valor medio de gris de la señal por área para DAPI-DNA y Alexa Tinción con flúor 594-LL37, respectivamente. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) de comparaciones entre grupos de condiciones experimentales con un nivel de confianza del 95%. HBSS (solución salina equilibrada de Hank); PMA (acetato de miristato de forbol); HOCl (ácido hipocloroso); CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester); MERGE (del inglés, unión o solapamiento de imágenes).



Fuente: Sosa-Luis et al. (2021).

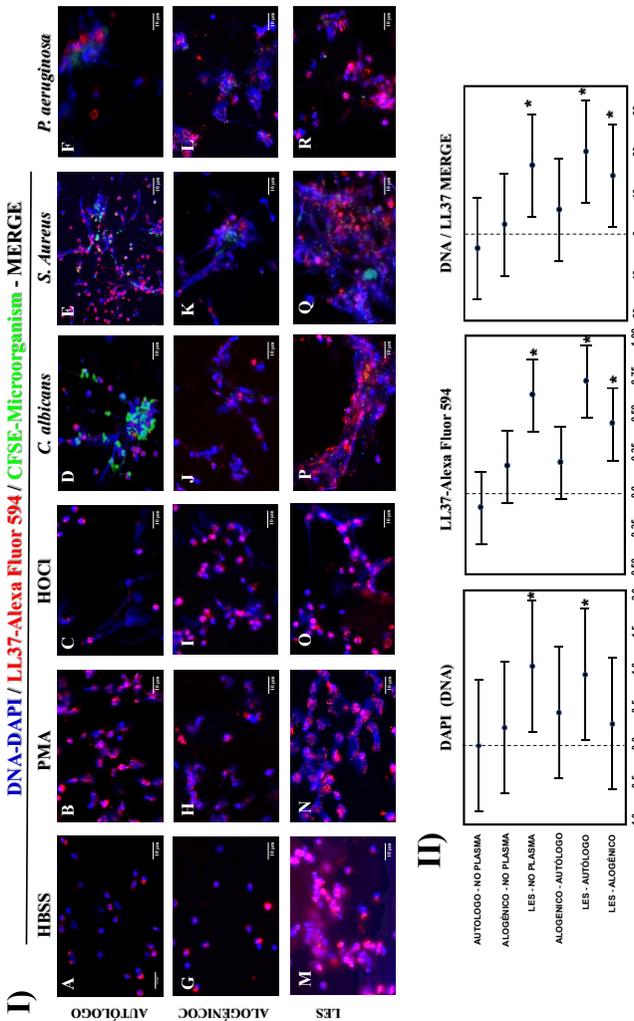
Efecto del plasma de LES

Los resultados mostraron que en comparación con los neutrófilos mantenidos en ausencia de plasma y estímulo (Fig. 2 C); la presencia de plasma autólogo (Fig. 3 A) y la presencia del plasma alogénico (Fig. 3 G), no produjeron cambios morfológicos ni variaciones en la localización del ADN/LL37. Sin embargo, los neutrófilos en presencia de plasma LES mostraron una agregación celular evidente y pequeñas fibras de ADN espontáneas similares a NETs y una tinción difusa de LL37 (Fig. 3 M). Por otro lado, la presencia de plasma autólogo y alogénico durante la inducción de NETs ya sea por estímulos bioquímicos o microbiológicos, no indujo cambios sustanciales en las estructuras y ubicaciones de ADN/LL37 en comparación con la ausencia de plasma utilizado como control en la Figura 2 C. De forma reproducible, la presencia de plasma de pacientes con LES durante todos los estímulos indujo una agregación de los neutrófilos (Fig. 3 N, O, P, Q y R).

Efecto del extracto hidroalcohólico de *E. pallida*

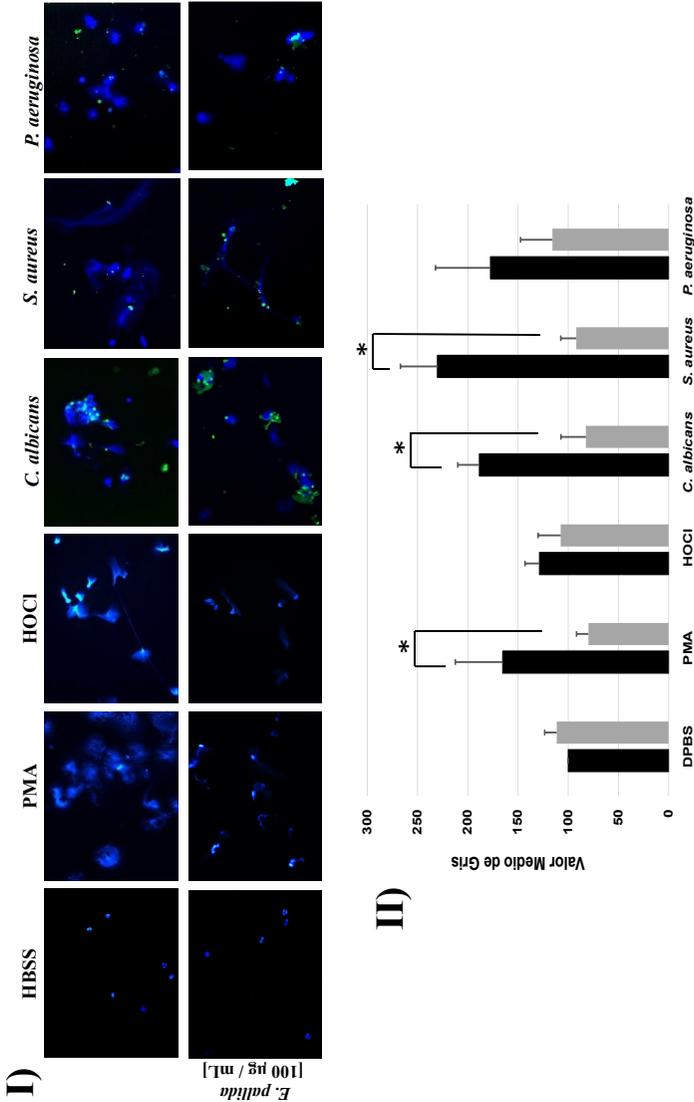
El extracto de *E. pallida* produjo cambios significativos sobre la morfología de las NETs a partir de 100 µg/mL (Figura 4, I), estos resultados persistieron en las concentraciones más altas. La presencia del extracto no afectó la morfología de los neutrófilos (HBSS vs *E. pallida* [100 µg/mL]), pero redujo las NETs emitidas frente a todos los estímulos en comparación con el control sin el extracto (Fig. 4, I, panel superior vs panel inferior). Este efecto fue estadísticamente significativo en la reducción de la producción de NETs en presencia del extracto ante PMA, *C. albicans* y *S. aureus* (Fig. 4, II).

Figura 3. Efecto del plasma autólogo, alógeno sano y alógeno de pacientes con LES sobre las diferencias estructurales inducidas por desencadenantes bioquímicos y microbiológicos. Las imágenes MERGE muestran colocalizaciones de los colores mencionados de resultados representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado. II) Los gráficos muestran el análisis estadístico del valor medio de gris de la señal para cada color (DAPI-DNA, Alexa Flúor 594-LL37 y tinción MERGE [colocalización de ambos colores]). Las comparaciones estadísticas se realizaron entre la ausencia de plasma (NO PLASMA) y la presencia de plasma autólogo, alógeno o LES con todos los estímulos, y entre la presencia de los diferentes plasmas como se describe en el eje Y. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) de comparaciones entre grupos de condiciones experimentales con un nivel de confianza del 95%. HBSS (solución salina equilibrada de Hank); PMA (acetato de miristato de forbol); HOCl (ácido hipocloroso).



Fuente: Sosa-Luis et al. (2021)

Figura 4. El extracto etanólico de *E. pallida* redujo la producción de NETs. I) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de NETs (DAPI-DNA azul) que habían sido inducidas por los estímulos que se describen en la parte superior de la imagen (microorganismos teñidos con CFSE-verde), tanto en ausencia (arriba) o presencia (abajo) del extracto. HBSS (solución salina equilibrada de Hank); PMA (acetato de miristato de forbol); HOCl (ácido hipocloroso). II) promedios \pm desviación estándar del valor medio de gris de la señal por área para DAPI-DNA. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en el análisis estadístico comparando la producción de NETs en presencia y ausencia del extracto.



Fuente: De Jesús et al. (2021).

DISCUSIÓN

Algunos autores afirman que una morfología turbia del ADN nuclear puede resultar de la muerte celular necrótica debido a la incubación prolongada de neutrófilos *in vitro* (Pieterse, Rother, Yanginlar, Hilbrands & van der Vlag, 2016) y que la apariencia de las NETs podría verse alterada de fibras similares a nubes a fibras extendidas debido a las corrientes en los medios (Boeltz et al., 2019). En la presente investigación, este probable efecto artefactual fue descartado porque la metodología incluyó controles internos que les permitieron mantener la morfología sin cambios en los neutrófilos en reposo tratados en las mismas condiciones. Asimismo, la morfología de las NETs obtenidas fueron similares a las reportadas por separado para cada estímulo por diferentes autores: lítica para PMA (Brinkmann et al., 2004) y *P. aeruginosa* (Young et al., 2011); reproduciblemente no lítica para HOCl (Palmer, Cooper, Ling, Wright, Huissoon & Chapple, 2012), *C. albicans* (Urban, Reichard, Brinkmann & Zychlinsky, 2006) y *S. aureus* (Pilszczek et al., 2010; Petretto et al., 2019). La presencia de plasma de pacientes con LES reveló una agregación celular en los neutrófilos en reposo con diminutas fibras de ADN espontáneas similares a NETs. Curiosamente, la inducción de NETs contra todos los estímulos en presencia de plasma de LES también presentó una agregación significativa de neutrófilos con un aumento sustancial de la colocalización de ADN/LL37 en comparación con la presencia de plasma autólogo, alogénico o sin plasma. La agregación celular, es un efecto esperado debido a la activación de los neutrófilos causada por niveles elevados de IFN- α e inmunocomplejos en pacientes con LES, lo cual podría estimular la formación de NETs (Båve et al., 2003; Skrzeczynska-Moncznik et al., 2013) y además de la depuración inadecuada de ADN descrita en esta enfermedad, se ha propuesto como un probable mecanismo de pérdida de tolerancia inmunológica y producción de autoanticuerpos anti-ADN y anti-LL37 en el LES y la psoriasis (Gestermann et al., 2018; Xhindoli, Pacor, Benincasa, Scocchi, Gennaro & Tossi, 2016).

En cuanto a los efectos del extracto de *E. pallida*, los resultados obtenidos describen por primera vez una actividad farmacológica de esta planta, al inhibir la producción de trampas extracelulares en neutrófilos humanos de individuos sanos. Sin embargo, a pesar de la amplia aplicación de las plantas de la familia *Crassulaceae* para el tratamiento de pterigión y otras enfermedades oftálmicas en la medicina tradicional mexicana y otros países del mundo (Godeaua, Laugier, Orange, Godeaua, Guittarda & Darmanin, 2017; Markova, Batovska, Kozuharova & Enchev, 2015), no hay estudios disponibles que exploren las bases científicas que respalden su uso etnofarmacológico. Asimismo, debido a la ausencia de otros estudios científicos que evalúen extractos de diferentes especies de *Echeverias* en la inmunopatología del pterigión, la realización de un análisis comparativo no es posible hasta el momento. Por lo anterior, es necesario continuar con estudios adicionales para determinar las moléculas bioactivas específicas de esta planta y los blancos celulares específicos donde podría darse su efecto terapéutico. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio revelan que las propiedades curativas de *E. pallida* en pterigión podrían ser parcialmente a través de la inhibición de la producción de NETs con un efecto reductor posterior en la producción de matriz extracelular y la inflamación crónica.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran nueva evidencia sobre la variabilidad y especialización de la composición de las NETs dependiendo del estímulo inductor y el medio local. Las propiedades curativas de *E. pallida* en enfermedades oftálmicas podrían ser en parte a través de la inhibición de la producción de NETs.

REFERENCIAS

- Båve U, Magnusson M, Eloranta ML, Perers A, Alm GV, Rönnblom L. (2003). Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG. *J Immunol.* 171(6), 3296-3302. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.6.3296>
- Boeltz S, Amini P, Anders HJ, Andrade F, Bilyy R, Chatfield S, et al. (2019). To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 26(3),395-408. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0261-x>
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 303(5663):1532-1535. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>.
- de Jesús Rios-Rios W., Pérez-Vásquez A, Manzanero-Medina GI, Sosa-Luis SA, Torres-Aguilar H. (2021). *Echeveria pallida*: Inhibiting adhesion of fibroblasts from pterygium and neutrophil extracellular traps production. *Altern Ther Health Med.* 22,AT6789. Epub ahead of print. PMID: 34936988.
- Gestermann N, Di Domizio J, Lande R, Demaria O, Frasca L, Feldmeyer L, et al. (2018). Netting neutrophils activate autoreactive B cells in lupus. *J Immunol.* 200(10),3364-3371. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700778>
- Godeau G, Laugier JP, Orange F, Godeau RP, Guittarda F, Darmanin T. (2017). A travel in the *Echeveria* genus wettability's world. *Appl. Surf. Sci.* 411,291-302.
- González-Zorzano O. (2011). *Echeveria pallida* E. Walther. *Cact. Suc. Mex.* 56(3):96-96.
- Jeremic I, Djuric O, Nikolic M, Vlajnic M, Nikolic A, Radojkovic D, et al. (2019). Neutrophil extracellular traps-associated markers are elevated in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 39(11),1849-1857. <https://doi.org/10.1007/s00296-019-04426-1>
- Markova NV, Batovska DI, Kozuharova EK, Enchev VG. (2015). Anti-conjunctivitis effect of fresh juice of xGraptoveria (*Crassulaceae*): A phytochemical and ethnobotanical study. *J Intercult Ethnopharmacol.* 4(1),24-8.
- Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol.* 9,181-218. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164023>.
- Méndez ME, Ferrer CM, Dorantes EA, Simá PP, Dzib G. (2003). *Catálogo de plantas medicinales de uso común en Yaxcabá*. Centro de investigación Científica de Yucatán A.C. Yucatán.
- Palmer LJ, Cooper PR, Ling MR, Wright HJ, Huissoon A, Chapple IL. (2012). Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin Exp Immunol.* 167(2),261-268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04518.x>
- Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 191(3):677-691. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>.
- Papayannopoulos V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 18(2),134-147. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.10>
- Petretto A, Bruschi M, Pratesi F, Croia C, Candiano G, Ghiggeri G, et al. (2019). Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. *PLoS One.* 14(7):e0218946. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218946>.
- Pieterse E, Rother N, Yanginlar C, Hilbrands LB, van der Vlag J. (2016). Neutrophils discriminate between lipopolysaccharides of different bacterial sources and selectively release neutrophil extracellular traps. *Front Immunol.* 7,484. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00484>
- Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. (2010). A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 185(12),7413-7425. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000675>
- Reyes SJ, Brachet IC, González ZO, Islas LA, López CL. (2015). Four new taxa of the genus *Echeveria* from the state of Oaxaca, Mexico. *Haseltonia.* 21,80-91.

- Skrzeczynska-Moncznik J, Włodarczyk A, Banas M, Kwitniewski M, Zabieglo K, Kapinska-Mrowiecka M, et al. (2013). DNA structures decorated with cathepsin G/secretory leukocyte proteinase inhibitor stimulate IFN γ production by plasmacytoid dendritic cells. *Am J Clin Exp Immunol.* 2(2),186-194. PMID: 23885335 PMCID: PMC3714177
- Sosa-Luis SA, Ríos-Ríos WJ, Gómez-Bustamante ÁE, Romero-Tlalolini MLÁ, Aguilar-Ruiz SR, Baltierrez-Hoyos R, Torres-Aguilar H. (2021). Structural differences of neutrophil extracellular traps induced by biochemical and microbiologic stimuli under healthy and autoimmune milieus. *Immunol Res.* 69(3),264-274. doi: 10.1007/s12026-021-09199-z. PMID: 33966252.
- Torres-Aguilar H, Sosa-Luis SA, Aguilar-Ruiz SR. (2019). Infections as triggers of flares in systemic autoimmune diseases: novel innate immunity mechanisms. *Curr Opin Rheumatol.* 31(5),525-531. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000630>
- Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 8(4),668-676. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x>
- Xhindoli D, Pacor S, Benincasa M, Scocchi M, Gennaro R, Tossi A. (2016). The human cathelicidin LL-37--A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *Biochim Biophys Acta.* 1858(3),546-566. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2015.11.003>
- Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnik LD, et al. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med.* 18(9),1386-93. <https://doi.org/10.1038/nm.2847>
- Yipp BG, Zamora-Ortiz R, Buentello-Volante B, García-Mejía M, Garfias Y. (2019). Neutrophil extracellular traps: Current perspectives in the eye. *Cells.* 27;8(9),979.
- Young RL, Malcolm KC, Kret JE, Caceres SM, Poch KR, Nichols DP, et al. (2011). Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PLoS One.* 6(9):e23637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023637>

ALIMENTOS OAXAQUEÑOS QUE FORTALECEN EL SISTEMA INMUNITARIO

Teresa Amelia Cruz García¹, Yanetzi Ortiz Altamirano¹, Claudia Elizabeth Porras Antonio¹, Leobardo Reyes Velasco^{1,2} y Arturo Zapién Martínez^{1,2}

RESUMEN

Introducción: La alimentación es un factor muy importante para el buen funcionamiento del cuerpo y sus sistemas. Oaxaca es un estado que cuenta con una gran diversidad climática, biológica y cultural, lo que permite una riqueza culinaria con un enorme potencial de nutrimentos que pueden fortalecer el sistema inmunitario. **Objetivos:** Documentar los nutrientes que fortalecen el sistema inmunitario presentes en algunos alimentos oaxaqueños. **Materiales y métodos:** Estudio descriptivo a través de una revisión bibliográfica. **Resultados:** Se identificaron 17 alimentos con una diversidad de nutrientes (compuestos fitoquímicos, vitaminas y minerales) que ayudan a fortalecer el sistema inmunitario. **Conclusiones:** El estado de Oaxaca posee una diversidad de alimentos que aportan un alto valor nutrimental a la dieta, pero algunos son importantes debido a que contienen nutrimentos esenciales para el fortalecimiento y buen funcionamiento del sistema inmunitario, entre estos se encuentra el caldo de nopales, el pozole mixteco y el estofado.

Palabras clave: Alimentos oaxaqueños, nutrimentos, sistema inmunitario.

¹ Facultad de Ciencias Químicas, UABJO. **Autor de correspondencia:** cruzgarciatere@gmail.com

² Miembro del CA Química y Salud Ambiental (UABJO-CA-71)

La alimentación es un factor muy importante para el buen funcionamiento del cuerpo, tal es el caso del sistema inmunitario. Dicho sistema es un factor clave en la salud humana. En la actualidad, el efecto que tiene la nutrición sobre la función inmunológica está bien establecida ya que son varias las vitaminas (A, B6, B12, C, D, E y folato) al igual que algunos oligoelementos (zinc, hierro, selenio, magnesio, cobre, entre otros), que desempeñan funciones esenciales y complementarias para el mantenimiento y funcionamiento óptimo del sistema inmunitario (Childs, Calder & Miles, 2019). Oaxaca es un estado que cuenta con una gran diversidad climática, biológica y cultural, que ha permitido el desarrollo de una riqueza culinaria representativa que, a su vez, aportan una gran variedad de nutrientes a la dieta de los oaxaqueños (Matus y Galván, 2014). El objetivo del presente documento fue documentar los nutrimentos que fortalecen el sistema inmunitario presentes en algunos alimentos oaxaqueños.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio descriptivo a través de una revisión sistemática de libros, página web y artículos publicados en los últimos años en revistas indizadas y arbitradas, relacionadas con alimentos oaxaqueños y su contenido nutrimental. Las herramientas de exploración fueron los buscadores académicos de Redalyc, SciELO, Dialnet y Google Scholar, a través de las palabras clave “alimentos oaxaqueños” y “nutrimentos en alimentos”. La información se organizó en alimentos y su contenido nutrimental, así como la descripción de los nutrimentos y su efecto en el sistema inmunitario. Es probable que no se haya incluido toda la literatura relevante respecto al tema, pero brinda un panorama general que sirve de base para informar a los lectores sobre la relevancia nutrimental de algunos alimentos oaxaqueños, así como para profundizar en futuras revisiones o investigaciones al respecto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La alimentación oaxaqueña y su aprovechamiento nutrimental

Los alimentos representan formas culturales materializadas. A través de su elaboración y consumo, los individuos logran reconocerse e identificarse al interior de la sociedad donde habitan (Ruíz, 2009). En Oaxaca, para comer no sólo se emplea el sentido del gusto; saborear los diversos alimentos y platillos como el chileatole, nicuatole, moles, así como las diversas tortillas o bebidas (tejate, mezcal, pulque o tepache), implica involucrar todos los sentidos. Además de lo anterior, son ricos en nutrimentos que favorecen la salud de los individuos (Favela, 2015). Derivado de la revisión de literatura, se identificaron 17 alimentos oaxaqueños (Tabla 1), que contienen una diversidad de nutrimentos, entre ellos compuestos fitoquímicos, vitaminas y minerales que ayudan a fortalecer el sistema inmunitario. Los alimentos que presentan la mayor cantidad de nutrimentos fueron el pozole mixteco, el estofado y el caldo de nopales, mientras que aquellos alimentos con menor cantidad fueron el tejate, las quesadillas y los chiles rellenos.

Tabla 1. Algunos platillos oaxaqueños y sus nutrientes.

Alimento	Nutriente
Guaje	Taninos, mimosina, flavonoides y antocianinas.
Tejate	Fibra, fósforo, manganeso, ácido fólico, vitamina B1, A y E.
Frijol con hierba de conejo	Vitaminas del grupo B, hierro, calcio, potasio, fósforo y zinc.
Empanadas de flor de calabaza	Vitaminas (A, C, B1, B2, B3 y B9), hierro, calcio, fósforo, potasio y magnesio.
Memelitas	Calcio, hierro, sodio, potasio, magnesio, fósforo y zinc. Vitaminas de grupo A, B y D, en especial el ácido fólico.
Quesadillas	Hierro, calcio, magnesio, fosforo y vitamina C.
Tlayudas	Fibra, vitaminas (A, B2, C y E), calcio, potasio, yodo, hierro, zinc.
Chile de agua relleno de queso	Vitamina C, magnesio, fosforo y potasio.
Chile pasilla relleno de pollo	Vitamina A y C, sodio, potasio, hierro, calcio y magnesio.
Chípil	Hierro, magnesio vitamina B, C, tiamina, niacina y riboflavina, β -caroteno.
Chapulines	Vitamina B1 y B12, magnesio, potasio y cobre.
Molotes	Vitaminas (B1, B3, B6 y C), hierro, calcio, potasio, fosforo y zinc.
Sal de gusano	Hierro, potasio, sodio, fibra, vitamina A, B1, B2 y B6.
Guacamole	Vitaminas (A, C, B1 y E), magnesio, hierro y calcio.
Caldo de nopales	Vitaminas (A, C, E y algunas del complejo B), calcio, sodio, potasio, hierro, β -caroteno, magnesio y ácido fólico.
Pozole mixteco	Vitaminas (A, E y algunas del complejo B), magnesio, fósforo, ácido fólico, potasio, manganeso, zinc, hierro, cobre y sodio.
Estofado	Vitamina A, C y complejo B, riboflavina, niacina, β -caroteno, folato, yodo, hierro, fósforo y magnesio.

Fuente: Elaboración propia a partir de la revisión de literatura.

A continuación, se describen los efectos sobre el sistema inmunológico de los diversos nutrimentos identificados:

Vitamina E: Es un antioxidante liposoluble que puede proteger los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana de la oxidación, además de regular la producción de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, así como modular la transducción de señales (Young & Nim, 2018).

Vitamina C: Mejora la integridad de la barrera epitelial, promoviendo la síntesis de colágeno, mantiene el estado oxidativo de las células y protege contra las especies reactivas del oxígeno generadas durante el estallido respiratorio y la respuesta inflamatoria. Estimula las funciones de los leucocitos (neutrófilos, y desplazamiento de los monocitos). Además, regula la respuesta inmunitaria a través de sus propiedades antivirales y antioxidantes. También reduce la duración y severidad del resfriado común (San Mauro y Garicano, 2015).

Carotenos: Los carotenoides son un grupo de agentes antioxidantes. Uno de los más relevantes es el β -caroteno debido a que puede mejorar las respuestas inmunitarias mediadas por células, particularmente en los ancianos (Hughes, 2007).

Vitamina A: Así como los metabolitos de retinoides, juegan un papel fundamental en la regulación del sistema inmunitario. Es un nutriente esencial para la normal diferenciación del tejido epitelial y está involucrado en la expresión génica. Interviene en la proliferación de los linfocitos debido a la activación de los receptores de ácido retinoico, por lo tanto, juega un papel fundamental en el desarrollo y diferenciación de los linfocitos Th1 y Th2 (Seguroola, Cárdenas y Burgos, 2016).

Vitamina B6: Participa en la maduración y activación de linfocitos, así como en la respuesta innata y adaptativa (actividad de linfocitos T, células NK, linfocitos B, producción de anticuerpos). La deficiencia de

esta vitamina está relacionada con una reducción del tamaño del timo (López, 2018).

Ácido fólico (vitamina B9): Representa una función muy importante en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, por lo que una inadecuada cantidad de folato puede alterar de forma significativa la respuesta inmunitaria. Además de lo anterior, mejora la función inmunitaria al modificar la actividad de las células NK mejorando la respuesta Th1; proporcionando así, una mayor protección contra las infecciones (Sánchez, Ortega, Conteras y Alonso, 2008).

Vitamina B12: Es fundamental en la síntesis de ácidos nucleicos. Su carencia origina una disminución en la proliferación de los linfocitos en respuesta a mitógenos (Ortiz-Andrellucchi, 2007).

Vitamina D: Exceptuando las células B, casi todas las células del sistema inmunitario, expresan receptores para la vitamina D y sus metabolitos, incrementan la inmunidad innata y mejora la regulación de la inmunidad adquirida; lo que produce un incremento de la tolerancia inmunitaria a los propios tejidos. Además, participa en el metabolismo de la insulina; la regulación del metabolismo de minerales y en el mantenimiento de la homeostasis (crecimiento, diferenciación y apoptosis celular) (Oliveira, Muller, Dutra, Daniele y Zirbes, 2014).

Zinc: Influye sobre varios aspectos del sistema inmunitario, desde la barrera de la piel hasta la regulación génica en los linfocitos, contribuye en la función de las células que median la inmunidad no específica (neutrófilos y células NK), pero también en la modulación de la inmunidad específica actuando sobre la activación de los linfocitos T, la producción de citoquinas y la maduración de los linfocitos B. La insuficiencia de zinc se asocia con atrofia linfoide, una respuesta de hipersensibilidad retardada cutánea reducida, disminución de la respuesta proliferativa de linfocitos frente a mitógenos y, una menor actividad de la hormona tímica (Nova, Montero, Gómez y Marcos, 2015).

Hierro: La deficiencia en hierro produce una depresión de la inmunidad celular y humoral, ya que el hierro es necesario para la síntesis de los citocromos linfocitarios. Su insuficiencia, disminuye la función fagocítica de neutrófilos y macrófagos, debido a la participación del metal en enzimas hierro-dependientes, como la mieloperoxidasa y el citocromo de la NADPH-oxidasa, implicados en la destrucción bacteriana (Barrios, 2016).

Cobre: Es un micronutriente esencial para el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y funcionamiento normal del sistema inmunitario en la diferenciación, maduración y activación de los distintos tipos de células inmunocompetentes, así como para la secreción de citoquinas con propiedades autocrinas, paracrinas y endocrinas, ejerciendo así una correcta defensa del huésped (Varela, Gonzalez & Marcos, 2002).

Arginina: Mejora la función de las células T observada durante el estado crítico, dicho aminoácido tiene un efecto antitumoral a través del sistema inmunitario específico e inespecífico (Navas, 2014).

Glutamina: Este aminoácido fortalece la capa protectora del estómago e intestinos (Valderrábano, Guzmán, Huerta, Lagunas y Garza, 2014).

El organismo humano está expuesto continuamente a bacterias, hongos, virus y parásitos, los cuales son capaces de causar anomalías fisiológicas e incluso la muerte; por eso es necesario que el sistema inmunitario se encuentre en buenas condiciones para combatir a los diferentes agentes patógenos (Hall y Guyton, 2016). La adecuada nutrición a través de una dieta saludable, contribuye a que dicho sistema funcione correctamente, permitiendo que las diversas células involucradas, actúen de manera eficiente.

En la respuesta inmune, las células intervienen a través de a) la *explosión oxidativa*: donde se producen compuestos conocidos como especies reactivas de oxígeno, las cuales dañan a los agentes

invasores; los nutrimentos requeridos en este proceso son las vitaminas C y E, hierro, zinc, cobre y selenio; b) la *proliferación*: donde se genera una producción acelerada de células para responder ante el agente invasor, los micronutrimentos que influyen en este proceso son la vitaminas A, D, B12 y B6, así como el hierro, zinc y folato y; c) la *inflamación*: donde se distribuyen células, mensajeros químicos y anticuerpos en el área lesionada o infectada, en este proceso los nutrimentos que se requieren son el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico (Angelo, 2016).

CONCLUSIONES

El estado de Oaxaca posee una gran variedad de alimentos que aportan un alto valor nutrimental, pero algunos son importantes debido a que contienen nutrimentos esenciales para el fortalecimiento y buen funcionamiento del sistema inmunitario, entre estos alimentos se encuentra el caldo de nopales, el pozole mixteco y el estofado.

REFERENCIAS

- o Angelo G. (2016). *Nutrition and the immune system*. Infografía. Oregon State University <https://ipi.oregonstate.edu/mic/health-disease/immunity-in-brief>
- o Barrios M.F. (2016). Regulación del metabolismo del hierro: dos sistemas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunol y Hemoter*, 32(1):4-14. <http://scielo.sld.cu/pdf/hih/v32n1/hih021116.pdf>
- o Childs C. E., Calder, P. C. & Miles, E. A. (2019). Diet and immune function. *Nutrients*, 11(1933),3-4. doi:10.3390/nu11081933
- o Favela M. (2015). *Sabores de Oaxaca, Maestrías en Cocina de México*. <http://www.culinaryartschool.edu.mx/cocinasdemexico/wpcontent/uploads/2015/09/Sabores-de-Oaxaca.pdf>
- o Hall J. E. y Guyton, A. C. (2016). *Compendio de fisiología médica* (13 ed.). Elsevier.
- o Hughes D.A. (2007). *Effects of carotenoids on human immune function*. <https://www.cambridge.org/core/journals/proceedings-of-the-nutrition-society/article/effects-of-carotenoids-on-human-immune-function/8C0275BFE29D8C343A2CA18B62062483#article>
- o López E.L. (2018). *Influencia de la alimentación en el correcto funcionamiento del sistema inmune* (tesis de pregrado) Universidad de Sevilla. Sevilla.
- o Matus P. y Galván, M. (2014). *Una aproximación a la transición nutricional en el estado de Oaxaca*. Educación y salud. Boletín científico. Instituto de Ciencias de la Salud Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 3(5). <https://doi.org/10.29057/icsa.v3i5.774>
- o Navas R.M. (2014). *Papel inmunosupresor y citotóxico de la arginasa I y la disponibilidad de L-arginina en el sistema inmune y cáncer* (tesis doctoral). Universidad de Salamanca. doi:10.14201/gredos.124153

- Nova E., Montero A., Gómez, S. y Marcos, A. (2015). *La estrecha relación entre la nutrición*. Soporte nutricional en el paciente oncológico. Grupo de Inmunonutrición. Dpto. Metabolismo y Nutrición. Instituto del Frío. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Oliveira V., Muller, G.L., Dutra, E.L., Daniele, B.B. y Zirbes, G.S. (2014). Influencia de la vitamina D en la salud. *Bioquímica Clínica Latinoamérica*, 48(3), 329-337. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=535/53532405006>
- Ortiz-Andrellucchi A. (2007). Nutrición e inmunidad. *Revista de la Sociedad Médico-Quirúrgica del Hospital de Emergencia Pérez León*, 38(1), 14-15. http://www.geocities.ws/rsmqhpl/38_s1_12.pdf
- Ruíz M.M. (2009). El ingrediente étnico. Alimentos y restaurantes en Los Ángeles, California. *RURIS*, 3(1), 1-2. <https://www.ifch.unicamp.br/ojs/index.php/ruris/article/view/690/555>
- San Mauro I. y Garicano, E. (2015). Papel de la vitamina C y los β -glucanos sobre el sistema inmunitario. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 19(4). doi:<http://dx.doi.org/10.14306/renhyd.19.4.173>
- Seguro H.G., Cárdenas, G.L. y Burgos, R.P. (2016). Nutrientes e inmunidad. *Nutrición clínica en medicina*, 10(1), 1-19.
- Sánchez E. D., Ortega, J. P., Conteras, M.I. y Alonso., M.C. (2008). Micronutrientes antioxidantes y actividad física: evidencias de las necesidades de ingesta a partir de las nuevas tecnologías de evaluación y estudio del estrés oxidativo en el deporte. *Retos. Nuevas tendencias en Educación Física, Deporte y Recreación*, (13):11-14 www.retos.org
- Valderrábano O.L.E., Guzmán V.C.R., Huerta H.R.E., Lagunas G.J.G. y Garza E.R. (2014). Alimentos funcionales en pediatría. *Alergia, ASMA e Inmunología Pediátricas*, 23(3):47-64. <https://www.medigraphic.com/pdfs/alergia/al-2014/al143c.pdf>
- Varela S., Gonzalez, M. & Marcos, A. (2002). Functional foods and the immune system: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(3),29-33.doi:10.1038/sj.ejcn.1601481
- Young G.L. & Nim, S.H. (2018). The role of vitamin E in immunity. *Nutrients*, 10(11):1-2. doi:<https://doi.org/10.3390/nu10111614>

DETERMINACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES DE LA ESPECIE VEGETAL *MALPIGHIA MEXICANA* (NANCHE ROJO) DE LOS VALLES CENTRALES DE OAXACA

Gladys Luis Chincoya¹, Yadira Bonilla Pacheco¹, Araceli Pérez Vásquez^{2,4}, Gabriel Sánchez Cruz^{1,4} y Sol Cristians Niizawa³.

RESUMEN

Introducción: *Malpighia mexicana* A. Juss (Familia: Malpighiaceae), originaria de México y nativa del estado de Oaxaca, comúnmente conocida como nanche rojo, presenta un fruto que es utilizado como alimento y de acuerdo con otras especies de *Malpighia*, su valor nutrimental podría estar relacionado al contenido de micronutrientes como la vitamina C y de manera adicional a metabolitos bioactivos como los polifenoles. Cuenta con registros de uso medicinal, donde la raíz es utilizada como abortiva y la corteza para tratar el empacho en lactantes. Por esta razón, es importante generar conocimiento del contenido metabólico y en especial de los polifenoles que podrían actuar como antioxidantes. **Objetivo:** Cuantificar el contenido de fenoles totales (FT) y flavonoides en diferentes extractos de la especie vegetal *Malpighia mexicana*. **Metodología:** A partir de las hojas y epicarpios de la planta colectadas en San Dionisio Ocotepec, Tlacolula, Oaxaca, se prepararon extractos acuosos por infusión y decocción, así como orgánicos e hidroalcohólicos: acetona, metanol, acetato de etilo, etanol, etanol absoluto, metanol-agua (70:30). Se utilizó el método de Folin Ciocalteu para conocer el contenido de FT y el reactivo de tricloruro de aluminio (AlCl₃) para flavonoides. La ecuación de regresión lineal para FT fue $y=0.1142x-0.33$ ($R^2=0.9956$) y para flavonoides $y=0.0686x+0.0026$ ($R^2=0.9990$). **Resultados:** El contenido más alto de FT en las hojas, se obtuvieron con acetona (0.3692 mg/g) y para flavonoides con acetato de etilo (1.0035 mg/g). Para los epicarpios, los valores más altos tanto de FT como flavonoides fueron con acetato de etilo (0.1802 mg/g y 0.3229 mg/g, respectivamente). **Conclusiones:** Se cuantificó la presencia de FT y flavonoides en hojas y epicarpios de *M. mexicana*. El acetato de etilo y la acetona permitieron determinar el contenido más alto de FT. Los hallazgos establecen parcialmente la importancia de *M. mexicana* como una rica fuente de metabolitos bioactivos como son los polifenoles, dándole un valor agregado del tipo nutrimental a la planta.

Palabras clave: Antioxidantes, flavonoides, fenoles, *Malpighia mexicana*, nanche rojo.

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. **Autor de correspondencia:** gsanchez@uabjo.mx

² Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

³ Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

⁴ Miembro del CA Química y Salud Ambiental (UABJO-CA-71)

Los compuestos fenólicos representan un numeroso grupo de metabolitos ampliamente distribuido en la naturaleza, poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante, por lo cual pueden captar radicales libres y neutralizando especies reactivas de oxígeno que pueden representar un riesgo a la salud, así como iones metálicos quelantes. Debido a su reactividad se encuentran en la mayoría de los casos combinadas con un ácido orgánico, un azúcar o bien, con ellas mismas (Nava, 2009). La actividad antioxidante que presentan estos compuestos se debe a la facilidad con la que un átomo de hidrógeno del grupo fenólico puede ser donado a la especie radical, así como la habilidad de la estructura fenólica para soportar un electrón desapareado (Mezadri, Fernández, Villaño, García & Troncoso, 2006).

La mayoría de los compuestos fenólicos provienen del metabolismo del ácido shikímico o de la ruta mixta (ácido shikímico – policétidos) (Ricco, Agudelo & Wagner, 2015), reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente. El ácido fosfomolibdotúngstico (de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul, cuya intensidad es la que se mide para evaluar el contenido en polifenoles (García, Fernández y Fuentes, 2015). Para su determinación, se utiliza el método con $AlCl_3$, donde el catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides en metanol, generando un efecto batocrómico importante y detectable hacia longitudes de onda mayores, así como una intensificación de la absorción (Amaya y Portillo, 2013). Los productos de esta reacción son quelatos de aluminio-flavonoide donde la intensidad del color y la sensibilidad del método, dependen del número de grupos hidroxilo en el flavonoide y en las propiedades del ion de aluminio (Chel, 2018).

Malpighia mexicana A. Juss pertenece a la familia Malpighiaceae [sin.: *Malpighia mexicana* subsp. *guadalajarensis* (S. Watson) FK Mey. (The Plant List, 2020)], originaria de México y

ampliamente distribuida en el estado de Oaxaca, se conoce comúnmente como nanche rojo o colorado, el fruto es utilizado como alimento, aunque también se menciona que la raíz del árbol se usa como abortiva, mientras que su corteza junto con la corteza de guamúchil (*Pithecellobium dulce*) y de *Byrsonima* sp, son empleadas para tratar el empacho en lactantes a través del consumo de una infusión por la madre (Caballero, 1998). Se ha relacionado con otras especies de *Malpighia*, debido a su carácter de alimento, representado por su elevado contenido en vitamina C, flavonoides, antocianinas y carotenoides (Aguilera, Del Toro y Orduz, 2020). Se ha documentado en otras especies de *Malpighia*, que el epicarpio de los frutos contiene sustancias químicas con propiedades farmacológicas relevantes (Chel, 2018). Su papel como antioxidante ha tenido especial importancia en los últimos años, debido a que la mayoría de las enfermedades cardiovasculares tienen su origen en el stress oxidativo producido, además la vitamina C es considerada uno de los antioxidantes naturales más potentes y menos tóxico para el ser humano (Mezadri, Fernández, Villaño, García & Troncoso, 2006). Por otro lado, *M. mexicana* también puede ser considerada para consumo en fresco o para la industria (Maldonado, García, García, Corona, Cetina & Ramírez, 2016). De acuerdo con lo anterior, el objetivo del presente documento, fue cuantificar el contenido de fenoles totales (FT) y flavonoides en diferentes extractos obtenidos de la especie vegetal *Malpighia mexicana*.

METODOLOGÍA

Se realizó un estudio descriptivo, para ello se colectó la planta en la comunidad de San Dionisio Ocotepéc, Tlacolula Oaxaca, perteneciente a los Valles Centrales. La identificación taxonómica se realizó en el Instituto de Biología de la UNAM. De acuerdo al uso etnobotánico documentado, se seleccionó la parte que corresponde a las hojas y frutos para la cuantificación del contenido de fenoles y flavonoides. Las hojas fueron secadas a la sombra, a temperatura ambiente y posteriormente se trituraron en un mortero. Respecto a

los frutos, se les quitó el epicarpio (cáscara) para secarlos a sombra y posteriormente, realizar la extracción.

Reactivos

Se prepararon soluciones de tricloruro de aluminio al 2%, carbonato de sodio anhidro al 10.75%, acetato de sodio 1 M. También se empleó el reactivo de Folin-Ciocalteu (2 N), metanol, etanol 96º, etanol absoluto, acetona, acetato de etilo, los cuales fueron adquiridos comercialmente.

Preparación de extractos

Dos gramos de cada una de las drogas crudas, previamente secas y molidas, se pusieron en contacto con 20 mL de cada uno de los disolventes (acetona, metanol, acetato de etilo, etanol 96º, etanol absoluto, metanol-agua), se dejaron macerar en la oscuridad por tres días. Transcurrido el tiempo, los extractos se colocaron sobre papel filtro para eliminar todo el material vegetal y se secaron al vacío. En el caso de los extractos acuosos por infusión, se ocuparon 250 mL de agua en ebullición y 2 g de la droga por 30 minutos. Para la decocción fueron 5 minutos de ebullición con el material vegetal (2 g y 250 mL de agua), posteriormente se filtraron con papel filtro y se secaron al vacío.

Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

La determinación de fenoles totales se realizó mediante la metodología descrita por Blainski, Lopes & Palazzo de Mello (2013) con algunas modificaciones. Se prepararon soluciones de 10 mL a una concentración de 300 µg/mL de cada extracto obtenido, en un tubo de reacción se colocaron 0.4 mL de cada una de las alícuotas seleccionadas, 1.4 mL de una solución de carbonato de sodio al 10.75%, y 0.2 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N, se aforó a un volumen final de 4 mL con agua desionizada. Después de 40 minutos

de incubación en la oscuridad a temperatura ambiente, se tomaron las lecturas de absorbancia a 763 nm, utilizando el equipo Thermo Scientific Genesys 10s. Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado ($n = 4$). El contenido de fenoles totales se expresó en porcentaje calculado con relación al contenido de ácido gálico (equivalentes de ácido gálico).

Determinación de flavonoides

La determinación de flavonoides se realizó utilizando la metodología descrita por Pękal y Pyrzynska (2014) con algunas modificaciones. Se utilizó una solución de tricloruro de aluminio al 2% (w/v) preparada con etanol-agua al 20%, acetato de sodio 1 M y agua desionizada, las alícuotas de extracto en un tubo de ensaye de 5 mL se colocó 1 mL de solución de $AlCl_3$, 2 mL de cada una de las alícuotas de los extractos y 1 mL de solución de acetato de sodio. Se dejó reaccionar por 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se tomó la lectura de absorbancia a 430 nm, utilizando el equipo antes mencionado. Se repitió este procedimiento para tener cuatro lecturas de absorbancia ($n=4$). Todos los extractos se prepararon a una concentración de 600 $\mu\text{g/mL}$ y se sometieron a las mismas condiciones. El contenido de flavonoides se expresó en porcentaje calculado con relación al contenido de quercetina (equivalentes de quercetina).

Análisis estadístico

Para las determinaciones analíticas del contenido de fenoles totales y flavonoides, se realizó una recta de mejor ajuste (curva de calibrado), por medio del análisis de regresión de los mínimos cuadrados. La relación del conjunto de valores seleccionados de concentración ($\mu\text{g/mL}$) con la respuesta (absorbancia), se evaluó a partir de la obtención del coeficiente de determinación R^2 . La linealidad del método se evaluó aplicando las pruebas de ANOVA y t de Student para un nivel de confianza de 95%. En el caso de la t de Student, se encontró una relación directamente proporcional entre la

concentración y la respuesta analítica en los rangos de concentración analizados: de 5.68 a 12.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para F-C y de 3.0 a 15.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para flavonoides. Por otra parte, la precisión de los datos obtenidos de absorbancia de cada una de las muestras analizadas, fue evaluada con un coeficiente de variación (DER) $< 2.0\%$ con $n=4$.

RESULTADOS

La planta seleccionada se consideró principalmente por su uso comestible, la selección de los disolventes se hizo considerando la polaridad de los mismos, por lo cual se consideraron disolventes de mediana y alta polaridad como acetona, acetato de etilo, metanol, etanol 96° y absoluto, metanol-agua (70:30), así como acuosos: infusión y decocción. Para el caso de *M. mexicana* no hay reportes de su composición química. El contenido de los compuestos fenólicos en los epicarpios (cáscara) y hojas del nanche, se muestran en la tabla 1, los extractos con mejor rendimiento fueron los acuosos. Para las determinaciones analíticas, se realizó mediante la ecuación de la recta para el contenido de fenoles totales $y= 0.1142x-0.33$ ($R^2= 0.9956$) y flavonoides $y= 0.0686x+0.0026$ ($R^2= 0.9990$).

DISCUSIÓN

La información es escasa en cuanto a *M. mexicana*; mientras tanto, para otras especies de *Malpighia* existe información que respalda su valor nutrimental de los frutos (Vendramini & Trugo, 2004; Medrazzi, Fernández, Villaño, García & Troncoso, 2006). Respecto al contenido de polifenoles en las hojas, los valores más altos de FT se obtuvieron con acetona (0.3692 mg/g) y para flavonoides con acetato de etilo (1.0035 mg/g) coincidiendo con lo reportado por Pérez (2019). Para los epicarpios (cáscara), los valores más altos tanto de FT como flavonoides, fueron con el disolvente acetato de etilo (0.1802 mg/g y 0.3229 mg/g respectivamente); como se observa en los resultados obtenidos en el presente estudio, las hojas presentan un mayor contenido de flavonoides y fenoles totales.

Los ensayos de Folin-Ciocalteu y de flavonoides con $AlCl_3$ (Blainski et al 2013; Pekal y Pyrzynska, 2004), pueden ser de utilidad en la determinación de polifenoles presentes en materias primas de origen vegetal y contribuir en la generación de extractos cuantificados. Sin embargo, es necesario profundizar con más investigaciones para determinar la capacidad antioxidante mediante otros métodos (Kuskoskis, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, J& Fett, 2005).

Tabla 1. Valores de extracción y contenido de flavonoides y fenoles totales.

		Droga cruda (g)	Extracto seco (g)	Fenoles Totales (mg/g extracto)	Flavonoides (mg/g extracto)
Hojas	Infusión	2.0003	0.4797	0.0230	0.0148
	Decocción	2.0001	0.4976	0.0268	0.0202
	Metanol-H ₂ O	2.0001	0.1829	0.0432	0.0216
	Metanol	2.0002	0.2077	0.0411	0.0239
	Acetona	2.0004	0.0164	0.3692	0.8133
	Acetato de etilo	2.0003	0.0116	0.2320	1.0035
	Etanol 96°	2.0003	0.1005	0.0981	0.0564
	Etanol absoluto	2.0001	0.0744	0.1375	0.1588
Epicarpios	Decocción	2.0005	1.3172	0.0035	0.0016
	Metanol	2.0002	0.5562	0.0040	0.0025
	Acetona	2.0001	0.0483	0.0553	0.0851
	Acetato de etilo	2.0002	0.0189	0.1802	0.3229

CONCLUSIONES

Se logró determinar y cuantificar la presencia de fenoles totales y flavonoides, tanto en hojas como en epicarpios (cáscaras) de *M. mexicana*, obteniéndose los valores más altos para FT con acetona y para flavonoides con acetato de etilo. Los resultados obtenidos, permiten establecer parcialmente, la composición química de *M.*

mexicana como una rica fuente de polifenoles y darle un valor agregado desde un punto de vista nutrimental.

REFERENCIAS

- Amaya R. L. M. y Portillo M. C. E. (2013). *Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio Chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible (Tesis de licenciatura)*. Universidad del Salvador. R <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/5311>.
- Aguilera A.G.A., Del Toro A.J.M. y Orduz, R.J.O. (2020). Acerola (*Malpighia emarginata* DC): Fruta promisoriosa con posibilidades de cultivo en Colombia. Una revisión. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 24(2):7.
- Blainski A., Lopes, CG. & Palazzo de Mello, JC. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*; 18(6), 6852-6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>.
- Caballero FJ. (1998). *Dendrología natural y botaneología americana, o tratado de los árboles y hierbas de la América*. <http://www.cervantesvirtual.com/nd/ark:/59851/bmc0875472>.
- Chel G.L.D. (2018). *Evaluación del potencial farmacológico de los extractos metanólicos de cáscaras de frutas tropicales: Annona squamosa L. (Saramuyo), Annona reticulata L. (Anona), Chrysophyllum cainito L. (Caimito) y Melicoccus bijugatus Jacq. (Huaya)*. (Tesis de doctorado). Instituto Tecnológico de Mérida.
- García E.M., Fernández, I. y Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Tecnología de alimentos. <http://hdl.handle.net/10251/52056>.
- Kuskoski E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. & Fett, R.. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4),726-732. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>.
- Maldonado P. M. A., García S. G., García N. J. R., Corona T. T., Cetina A. V. M. & Ramírez H. C. (2016). Calidad morfológica de frutos y endocarpios del nanche rojo (*Malpighia mexicana*, *Malpighiaceae*). *Acta Botánica Mexicana*, 117:37-46. <https://doi.org/10.21829/abm117.2016.1166>.
- Mezadri T., Fernández P., M. S, Villaño, D., García P., M. C. & Troncoso, A. M. (2006). El fruto de la acerola: composición, características productivas e importancia económica. *Arch. latinoam. nutr*; 56(2), 101-109.
- Nava G. M. A. (2009) Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. *Rev Acad*, 1, 1-4.
- Pękal A. y Pyrzynska K. (2014). Evaluación de la reacción de complejación de aluminio para el ensayo de contenido de flavonoides. *Food Analytical Methods* 7,1776–1782.
- Pérez H. J. G. (2019). *Determinación de fenoles totales y flavonoides en plantas medicinales selectas la comunidad de Capulálpam de Méndez, Oaxaca*. [Tesis de licenciatura]. Facultad de Ciencias Químicas, UABJO.
- Ricco R.A., Agudelo I.J. & Wagner M.L. (2015). Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa*, 52(2),161-174.
- The Plant List. (2020). Recuperado de <http://www.theplantlist.org/1.1/about/>.
- Vendramini, A. L. A. & Trugo, L.C. (2004). Phenolic compounds in acerola fruit (*Malpighia punicifolia*, L.). *J. Braz. Chem. Soc.*, 15(5), 664-668.

POLIFENOLES TOTALES EN *LEUCAENA ESCULENTA* (DC.) BENTH (HUAJE) DE USO COMESTIBLE DE LOS VALLES CENTRALES DE OAXACA

Yadira Bonilla Pacheco¹, Gladys Luis Chincoya¹, Gabriel Sánchez Cruz^{1,4}, Araceli Pérez Vásquez^{2,4} y Sol Cristians Niizawa³

RESUMEN

Introducción: Las vainas de *Leucaena esculenta* conocidas como huaje rojo, tienen valor tanto alimenticio como medicinal en el estado de Oaxaca. Las semillas contenidas en las vainas, así como las hojas, se utilizan tradicionalmente como remedio antiparasitario. **Objetivo:** Determinar fenoles totales y flavonoides en extractos orgánicos de hojas secas de *Leucaena esculenta*. **Materiales y métodos:** Se trituraron las hojas secas y posteriormente se prepararon los extractos con los siguientes disolventes: metanol, metanol-agua (70-30), acetona, acetato de etilo, etanol 96° y etanol absoluto. Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu para fenoles totales y AlCl₃ para flavonoides. Se realizaron cuatro repeticiones en cada ensayo y se obtuvieron las absorbancias a longitudes de onda de 763 para fenoles totales y 430 nm para flavonoides. La ecuación de regresión lineal para fenoles totales fue $y = 0.1142x - 0.33$ ($R^2 = 0.9956$) y para flavonoides $y = 0.0686x + 0.0026$ ($R^2 = 0.9990$). **Resultados:** Los valores más altos de rendimiento de la extracción, se obtuvieron con la mezcla metanol-agua (70:30) y metanol al 100%. El contenido de fenoles totales más alto se detectó en el extracto de acetona (0.1585 mg/g) y para flavonoides fue en el extracto de acetato de etilo (0.3533 mg/g). **Conclusiones:** Los métodos utilizados se consideran procedimientos simples, precisos, adecuados y capaces de detectar y cuantificar polifenoles y flavonoides. Los extractos con metanol fueron los de mejor rendimiento, pero los de acetona y acetato de etilo fueron los más eficientes para la extracción de metabolitos. Los hallazgos contribuyen al conocimiento de la composición química de esta planta con valor medicinal y alimenticio.

Palabras clave: huaje, fenoles, flavonoides, *Leucaena esculenta*, Oaxaca.

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.

² Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. **Autor de correspondencia:** perezva@unam.mx.

³ Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

⁴ Miembro del CA Química y Salud Ambiental (UABJO-CA-71)

Leucaena esculenta (DC.) Benth perteneciente a la familia Fabaceae, es conocida como “huaje rojo”, presenta diversos usos, destacando el de alimento y forraje, aunque presenta propiedades medicinales y su madera es apreciada (Sotelo et al., 2017). Se distribuye en distintas partes de México (Zárate, 1994). Campos (2017), documenta que además del consumo de semillas en la elaboración de salsas y “guaximole” posee varios usos en medicina tradicional, donde las semillas inmaduras y las hojas se preparan en una mezcla que es utilizada como antiparasitario. Román (2014) comparó el valor nutricional y nutracéutico de *L. esculenta* y *L. leucocephala*, demostrando que el huaje rojo tiene un mayor contenido de fibra cruda (10.75%), proteína (33.12%) y minerales como magnesio (Mg), manganeso (Mn), fósforo (P) y zinc (Zn).

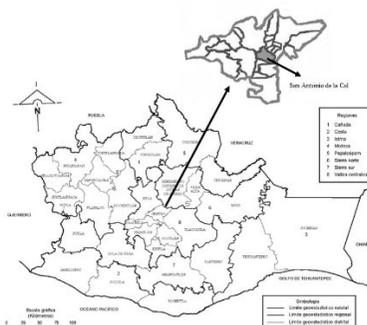
Por otra parte, los polifenoles constituyen uno de los grupos de metabolitos más numerosos y diversos en la naturaleza. Son considerados antioxidantes naturales (Peña-Cerda et al., 2017) y junto con los micronutrientes, forman parte integral de la dieta humana (Sarkar & Shetty, 2018) Estos compuestos poseen un anillo aromático que lleva uno o más grupos hidroxilo, sus estructuras pueden variar, desde una molécula fenólica simple hasta la de un polímero de masa molecular compleja (Chen et al., 2015). Las reacciones colorimétricas a partir de métodos espectrofotométricos UV/VIS, son ampliamente utilizadas para determinar fenoles en vegetales en general, ya que son fáciles de aplicar y rápidas, además de su bajo costo. Los polifenoles de los extractos vegetales reaccionan con reactivos redox específicos; por ejemplo, el reactivo de Folin-Ciocalteu con el cual pueden formar un complejo azul que puede cuantificarse mediante espectrofotometría (Blainski et al., 2013). La reacción generalmente proporciona datos precisos y específicos para varios grupos de compuestos fenólicos, ya que muchos compuestos cambian de color de manera diferente, debido a las diferencias en la concentración y la cinética de reacción. Los flavonoides igualmente se pueden medir utilizando la espectrofotometría y reactivos quelantes como tricloruro de aluminio ($AlCl_3$). Este método se basa en la reacción de iones de

aluminio con moléculas de flavonoides bajo condiciones básicas. Los productos de esta reacción son quelatos rojos de aluminio-flavonoide donde la intensidad del color y la sensibilidad del método dependen del número de grupos hidroxilo en la molécula flavonoide y en las propiedades del ion de aluminio (Matić et al., 2019). Tomando en cuenta que el metanol es indicado como el disolvente más eficiente para extraer una enorme proporción de compuestos bioactivos de polaridad intermedia a alta, y que, en diversos estudios, los extractos metanólicos han exhibido una alta bioactividad que los extractos con otros disolventes, posiblemente derivado de la extensa diversidad de compuestos hidroalcohólicos que tienen la posibilidad de extraerse (Chel, 2018). De acuerdo con lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar el contenido de fenoles totales y flavonoides en los extractos orgánicos a partir de metanol, metanol-agua (70-30), acetona, acetato de etilo, etanol 96° y etanol absoluto de las hojas secas de *Leucaena esculenta*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue cuantitativo de tipo descriptivo, de acuerdo con el criterio de preselección etnomédica. Las muestras de la planta para los ensayos, fueron colectadas en el municipio de San Antonio de la Cal, Oaxaca, durante octubre de 2019 (Fig. 1). La identificación de la especie vegetal, fue a través del Dr. Sol Cristians Niizawa, un ejemplar de dicha planta previamente herborizado, fue depositado en el Herbario Nacional MEXU. Cabe señalar que dicha especie, no cuenta con ninguna situación de riesgo de acuerdo con la norma NOM-059-SEMARNAT-2010 "Protección ambiental especies nativas de México flora y fauna silvestres categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio de lista de especies en riesgo".

Figura 1. Aspecto de *Leucaena esculenta* (DC) Benth, colectada en San Antonio de la Cal, en la región de Valles Centrales del estado de Oaxaca.



Las soluciones utilizadas fueron tricloruro de aluminio al 2% (p/v en H₂O-MeOH), carbonato de sodio al 10.75%, acetato de sodio 1 M, stock de ácido gálico a 284 µg/mL y stock de quercetina a 30 µg/mL.

Material vegetal

La droga cruda de interés para los ensayos fueron las hojas, las cuales se recolectaron seleccionando aquellas que no presentaran rastros de algún daño ocasionado por plagas o enfermedades, así como hayan alcanzado su punto máximo de crecimiento, posteriormente fueron secadas a temperatura ambiente (secado pasivo) y a la sombra. Finalmente, se trituraron en un mortero para generar una muestra homogénea en la que se mezclaron tanto hojas como sus pequeñas ramas.

Obtención de extractos

Se realizó por maceración del material vegetal utilizando como disolventes metanol, acetona, acetato de etilo, etanol 96°, etanol absoluto y metanol-agua (MeOH-H₂O, 70-30), todos de grado analítico. Se midieron 2 g de material vegetal triturado para colocarlo en 20 mL de cada disolvente, se dejaron macerar por tres días. Los

extractos fueron recuperados por filtración con gravedad sobre papel filtro y secados al vacío en campana de extracción (Lab Tech LFH-120SCI) para eliminar el disolvente en exceso.

Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Se siguió el procedimiento descrito por Blainski et al., (2013) con algunas modificaciones. De cada extracto seco se prepararon soluciones de 10 mL a una concentración de 600 µg/mL. En seguida se realizó por cuadruplicado el siguiente procedimiento: a 0.4 mL de la solución muestra se le adicionaron 1.4 mL de una solución al 10.75% de carbonato de sodio, agua destilada y reactivo de Folin-Ciocalteu (marca Sigma-Aldrich); posteriormente se dejó reposar durante 40 minutos en un ambiente cerrado y a la oscuridad, una vez transcurrido el tiempo se midieron los valores de absorbancia en espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 20) a 763 nm. Para la construcción de la curva de calibración se realizaron siete puntos con el mismo procedimiento antes mencionado, sustituyendo los mL de muestra con alícuotas preparadas a partir de la solución stock de ácido gálico.

Determinación de flavonoides con $AlCl_3$

Se utilizó el ensayo descrito para flavonas y flavonoles con ausencia de $NaNO_2$ descrita por Pękal y Pyrzyńska (2014) con algunas modificaciones. Se prepararon las soluciones de los extractos, siguiendo la misma técnica de fenoles. Para la preparación de los ensayos (por cuadruplicado), se mezclaron 2 mL de la muestra con 1 mL de acetato de sodio 1 M y $AlCl_3$ al 2% (p/v en H_2O -MeOH). Posteriormente, se dejaron reposar en un lugar cerrado y a la oscuridad durante 10 minutos, al término se midieron las absorbancias en un espectrofotómetro de la marca Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS a 430 nm. Para la curva de calibración, se obtuvieron ocho puntos sustituyendo los mL de muestra por alícuotas preparadas a partir de la solución stock de quercetina.

Análisis estadístico

Para las determinaciones analíticas del contenido de fenoles totales y flavonoides, se obtuvo el promedio de las cuatro absorbancias en cada ensayo con un índice de coeficiente de variación menor al 2% y se evaluó a partir de la recta de calibración mediante análisis de regresión de mínimos cuadrados. La relación del conjunto de valores seleccionados de concentración y respuesta, se evaluaron a partir de la obtención del coeficiente de determinación R^2 . El contenido total se expresó en porcentaje, calculado para fenoles totales como equivalentes de ácido gálico con las unidades de mg de dicho ácido por cada 100 g de muestra, mientras que para flavonoides relacionando los mg de quercetina por cada 100 g de muestra. Para identificar las diferencias entre disolventes respecto al contenido de fenoles totales y flavonoides, se utilizó un ANOVA y prueba pos hoc de Tukey, previa comprobación de la normalidad.

RESULTADOS

Los rendimientos obtenidos de los extractos por cada disolvente, se muestran en la Fig. 2, los rendimientos más altos se obtuvieron con metanol-agua y metanol, mientras que los más bajos fueron con acetona y acetato de etilo. En la tabla 1, se muestra la relación de cada extracto con sus absorbancias, se observa que los disolventes metanol-agua y metanol, presentaron los C.V. más elevados para fenoles totales y flavonoides, respectivamente; mientras que los valores más bajos se presentaron con acetato de etilo y etanol 96° para fenoles totales y acetona y acetato de etilo para flavonoides. El comportamiento de las curvas de calibración en función de las concentraciones utilizadas para cada caso se muestra en la fig. 3, para fenoles se usó ácido gálico como referencia y quercetina para flavonoides.

La ecuación de la recta para fenoles totales fue $y = 0.1142x - 0.33$ con $R^2 = 0.9956$ y para flavonoides fue $y = 0.0686x + 0.0026$ con $R^2 = 0.9990$, de estas se despejó el término x para calcular las

concentraciones parciales y relacionándolas con el peso total de cada extracto se obtuvieron las concentraciones finales, las más altas se obtuvieron con acetona y acetato de etilo (fig. 4).

Figura 2. Rendimiento de extractos orgánicos de hojas secas de *L. esculenta* (DC) Benth (huaje rojo) en los diferentes disolventes.

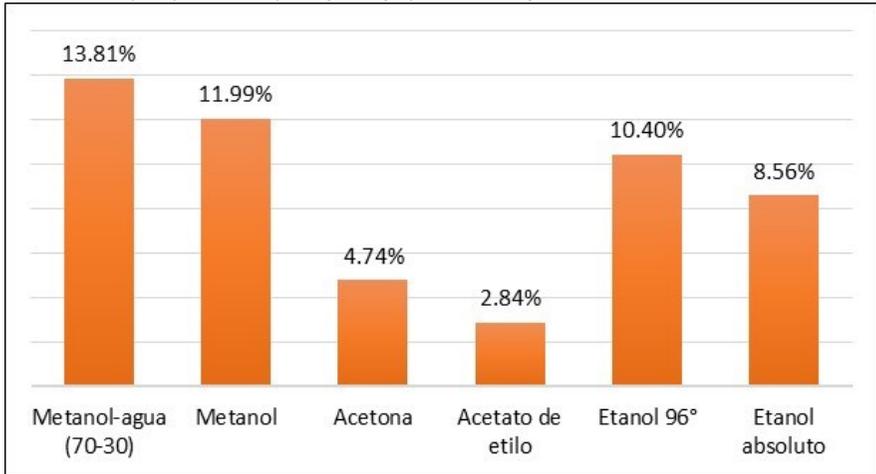


Tabla 1. Coeficiente de variación de absorbancias para fenoles totales y flavonoides, según el disolvente utilizado.

Disolvente	Fenoles totales		Flavonoides	
	Media±DE	C.V. (%)	Media±DE	C.V. (%)
Metanol-Agua	1.3125±0.0210 c	1.60	1.0845±0.0040 a	0.37
Metanol	1.2033±0.0177 b	1.47	1.3765±0.0071 b	0.52
Acetona	1.3840±0.0141 d	1.02	2.0235±0.0026 d	0.13
Acetato de etilo	0.2268±0.0021 a	0.91	1.3815±0.0024 b	0.17
Etanol 96°	1.4303±0.0107 e	0.75	1.8268±0.0041 c	0.23
Etanol absoluto	1.6480±0.0216 f	1.31	1.8315±0.0017 c	0.09

Figura 3. Curva de calibración para fenoles totales y flavonoides.

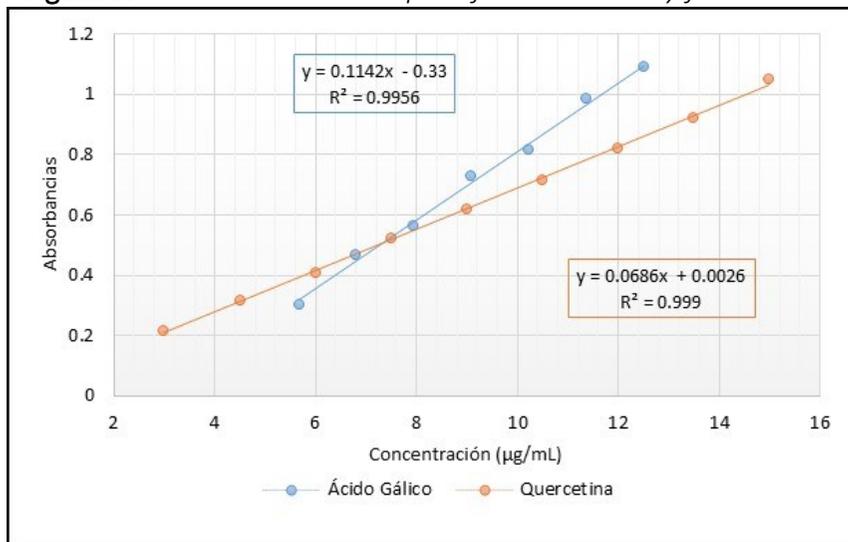
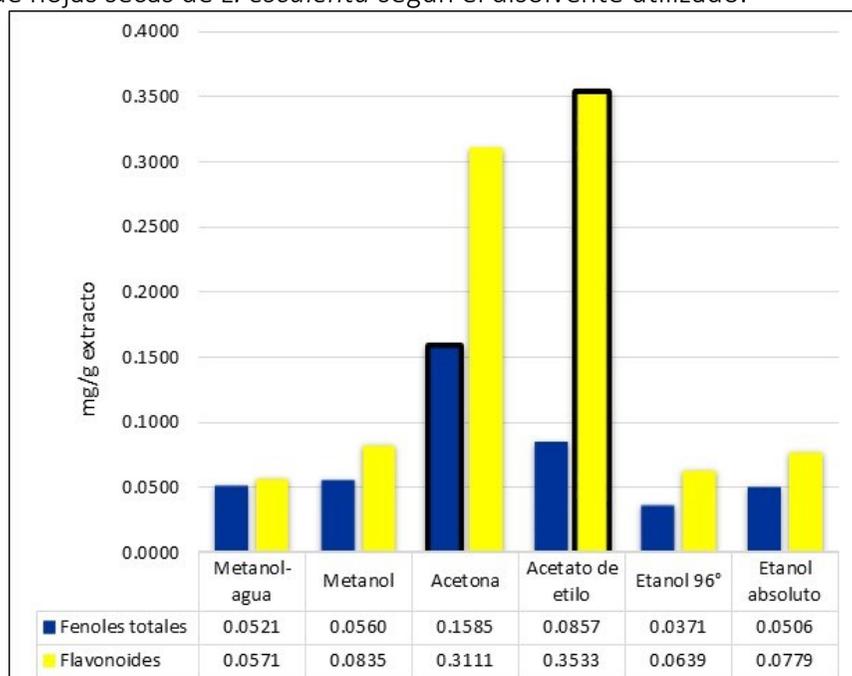


Figura 4. Concentración en mg/g_{extracto} de fenoles totales y flavonoides de hojas secas de *L. esculenta* según el disolvente utilizado.



DISCUSIÓN

Leucaena esculenta fue elegida de acuerdo al criterio etnobotánico, debido a su amplio uso como alimento y propiedades medicinales, reportada por la población oaxaqueña y documentada respecto a su valor nutrimental (Campos et al., 2017). Los rendimientos más elevados se obtuvieron con metanol-agua (70:30) y metanol, lo cual coincide con lo reportado por Chel (2018). Respecto al contenido de fenoles totales, el más alto se encontró con acetona y para flavonoides fue con acetato de etilo, la explicación a lo anterior, es que dichos disolventes al ser de mediana polaridad pueden extraer flavonoides libres o monoglicosilados y derivados de ácido cafeico (Pérez, 2019); sin embargo, los extractos con estos disolventes fueron los más bajos en rendimiento, por lo que no serían viables como primera elección para la extracción de metabolitos. Por otro lado, Román (2014), reporta altas concentraciones para fenoles totales, a través de semillas frescas en extracto metanólico, lo cual puede ser considerado como referencia para continuar con futuras investigaciones al respecto.

CONCLUSIONES

Los métodos utilizados se consideran procedimientos simples, precisos, adecuados y capaces de detectar y cuantificar polifenoles y flavonoides. Los extractos con metanol fueron los de mejor rendimiento, pero los de acetona y acetato de etilo los más eficientes para la extracción de metabolitos. Los hallazgos obtenidos en el presente estudio, contribuyen al conocimiento de la composición química de esta planta, con importancia medicinal y nutrimental en el estado de Oaxaca.

REFERENCIAS

- Blainski A., Lopes, G. C. & De Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18,6852-6865. <https://doi.org/10.3390/molecules18066852>
- Campos A. G. (2017). Uso antropocéntrico del guaje *Leucaena esculenta* (Moc. & Sessé Ex. Dc.) Benth, en dos comunidades de la mixteca baja oaxaqueña. *Polibotanica*, 43(349–364). <https://doi.org/10.18387/polibotanica.43.15>
- Chel G.L.D. (2018) *Evaluación del potencial farmacológico de los extractos metanólicos de cáscaras de frutas tropicales: Annona squamosa L. (Saramuyo), Annona reticulata L. (Anona), Chrysophyllum cainito L. (Caimito) y Melicoccus bijugatus Jacq. (Huaya) [Tesis de doctorado]*. Instituto Tecnológico de Mérida. Yucatán, México. https://www.researchgate.net/profile/Lilian-Chel-Guerrero/publication/331233197_Evaluacion_del_Potencial_Farmacologico_de_los_Extractos_Metanolicos_de_Cascaras_de_Frutas_Tropicales_Anonna_squamosa_L_saramuyo_Anonna_reticulata_L_anona_Chrysophyllum_cainito_L_caimito_y_Melicoccus_bijugatus_Jacq_huaya/links/5c6d8acb4585156b570d2d18/Evaluacion-del-Potencial-Farmacologico-de-los-Extractos-Metanolicos-de-Cascaras-de-Frutas-Tropicales-Annona-squamosa-L-saramuyo-Annona-reticulata-L-anona-Chrysophyllum-cainito-L-caimito-y-Melicoccus.pdf
- Chen L. Y., Cheng, C. W. & Liang, J. Y. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food chemistry*, 170,10-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.038>
- Matić P., Sabljic M. & Jakobek L. (2019). Validation of spectrophotometric methods for the determination of total polyphenol and total flavonoid content. *Journal of AOAC International*, 100,1795-1803. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0066>
- *Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental especies nativas de México flora y fauna silvestres categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio de lista de especies en riesgo* (2010)
- Pełal A. & Pyrzynska K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7(9),1776-1782. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>
- Peña-Cerda, M., Arancibia-Radich, J., Valenzuela-Bustamante, P., Pérez-Arancibia, R., Barriga, A., Seguel, I., García, L. & Delporte, C. (2017). Phenolic composition and antioxidant capacity of *Ugni molinae* Turcz. leaves of different genotypes. *Food chemistry*, 215, 219-227. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.07.159
- Pérez H. J. G. (2019). *Determinación de fenoles totales y flavonoides en plantas medicinales selectas la comunidad de Capulálpam de Méndez, Oaxaca [Tesis de licenciatura]*. Facultad de Ciencias Químicas, UABJO.
- Román, C. N., García, M. M., Castillo, G. M., Sahagún, C.J. & Jiménez, A.A. (2014). Componentes nutricionales y antioxidantes de dos especies de guaje (*Leucaena* spp.): Un recurso ancestral subutilizado. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 20(2), 157-170. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2013.07.023>
- Sarkar, D. & Shetty, K. (2018). Metabolic and microbiome innovations for improving phenolic bioactives for health. Chapter 14, In *Advances in Plant Phenolics: From Chemistry to Human Health*. *American Chemical Society series*, 1286,261-281. DOI: 10.1021/bk-2018-1286.ch014
- Sotelo, B. M., García, M, E., Romero, M, A., Monroy, R. & Luna, C. M. (2017). Arboreal structure and cultural importance of traditional fruit homegardens of Coatetelco, Morelos, Mexico. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 23(1),137-153. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2016.01.002>
- Zárate, P. (1994). Revisión del género *Leucaena* en México. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica*, (65) :83-162 <https://www.redalyc.org/pdf/400/40065202.pdf>

MÉTODO MATEMÁTICO PARA DETERMINAR EL VOLUMEN DE FORMAS FARMACÉUTICAS SÓLIDAS CON GEOMETRÍA CILÍNDRICO-BICONVEXAS

Yundalla Villalobos Dehesa¹, Alejandra Nicolás Cruz² y Asela Garnica Sánchez¹

RESUMEN

Introducción: Diversos estudios fisicoquímicos de las formas farmacéuticas sólidas, como los comprimidos, requieren parámetros físicos como la densidad. Calcular esa propiedad precisa de equipos sofisticados y costosos. Una alternativa en el cálculo de la densidad es determinar primero el volumen. Pero, en el caso de los comprimidos con forma cilíndrico-biconvexas resulta complejo por las líneas curvas que delimitan el contorno. **Objetivo:** Desarrollar un modelo teórico-matemático que permita calcular de forma exacta el volumen de una forma farmacéutica sólida con geometría cilíndrico-biconvexa. **Metodología:** Con la aplicación del método de “volumen de revolución de discos” se formuló una ecuación que permite determinar el volumen de un comprimido ($V_{\text{comprimido}}$) donde los parámetros involucrados son la altura de la corona, el diámetro y altura del comprimido. Los valores de salida de la ecuación se validaron de la siguiente manera: a) con el cálculo del porcentaje de error al comparar los volúmenes de comprimidos biconvexos reportados en la literatura y los obtenidos con el método aquí propuesto al usar los respectivos parámetros bibliográficos y, b) mediante análisis estadístico t-student al comparar los volúmenes calculados con los parámetros tomados manualmente y los volúmenes resultado de la relación masa-densidad de los comprimidos control. **Resultados:** La ecuación obtenida fue: $V_{\text{comprimido}} = \pi(D/2)^2\delta - 2 \left[\frac{\pi\alpha^2}{5(D/2)^4} \left(\frac{D}{2}\right)^5 \right]$. La validación teórica arrojó resultados con margen de error menores al 5%, mientras que la validación experimental presentó un coeficiente de correlación de 0.9962 con una diferencia de error estándar de 0.24% y un coeficiente de variación de 2.20%. **Conclusiones.** La ecuación que se propone, es precisa y confiable para ser implementada en el cálculo de volúmenes de comprimidos biconvexos. Esta herramienta puede ser de gran utilidad tanto en el control de calidad de la industria como en el proceso de enseñanza-aprendizaje del área de tecnología farmacéutica.

Palabras clave: biconvexo, modelo matemático, volumen.

¹ Facultad de Ciencias Químicas, UABJO. **Autor de correspondencia:** gasa_73_qfb@hotmail.com

² Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN, Unidad Monterrey.

Las formas farmacéuticas sólidas son la principal forma en la que se elaboran los medicamentos de administración por vía oral; ejemplo de ello, son los comprimidos con geometría cilíndrico-biconvexa (Bhusnure, Gholve, Nitin, Giram, Gaikwad & Rajmane, 2015). Antes de que cualquier medicamento salga al mercado farmacéutico debe pasar por análisis fisicoquímicos que garanticen su liberación y absorción después de ser administrados, para ello, se requiere obtener parámetros físicos y químicos propios de la forma farmacéutica; en el caso de los comprimidos se necesita calcular la densidad, masa en gramos (g), dureza, solubilidad, entre otros (Diarra, Mazel, Busignies, & Tchoreloff, 2015; Jassim & Rajab, 2018; Desbois, Tchoreloff & Mazel, 2020). La densidad es un parámetro básico y fácil de calcular para las industrias y/o laboratorios bien equipados ya que la forma precisa para obtener la densidad de un comprimido o cualquier otra forma sólida es con un picnómetro de gas (Kadiri & Michrafy, 2013; Nguyen, Horn, Bleakney, Siderius & Espinal, 2019), estos equipos resultan ser costosos y, por ende, de difícil acceso para pequeños laboratorios farmacéuticos o para las instituciones en educación en farmacia.

Una alternativa para calcular la densidad es usar los elementos que conforman su definición física como la relación entre la masa y el volumen de una sustancia. Experimentalmente, calcular la masa de un comprimido con bordes convexos es sencillo siempre que se tenga una balanza analítica; pero el volumen resulta más complicado por la forma no recta que presenta cada una de sus caras debido a que se tienen fusionados dos cuerpos geométricos (dos porciones de esfera separadas por una porción cilíndrica) (May et al., 2013; Mazel, Diarra, Malvestio & Tchoreloff, 2018). En la literatura existen decenas de métodos matemáticos o aproximaciones de cálculo teórico del volumen de formas farmacéuticas sólidas donde se consideran relaciones trigonométricas (Tanabe *et al.*, 2018) o el radio de curvatura (Song, Turton & Kayihan, 2006; Bawuah, Ervasti, Tan, Zeitler, Ketolainen & Peiponen, 2016). Sin embargo, escasos son los

métodos que aterrizan en una ecuación global que a la salida arroje el resultado que se necesita. Por todo lo anterior, en el presente trabajo se propone como objetivo, desarrollar un modelo teórico-matemático que permita calcular el volumen de una forma farmacéutica sólida (comprimido) con geometría cilíndrico-biconvexa basado en el teorema de “volumen de un sólido por revolución de discos (VSRD)”. Este teorema plantea que cualquier curva que gira alrededor del eje x , y o z , trazará un cuerpo sólido cuyo volumen puede determinarse si se consideran pequeños discos de altura infinitesimal que cambian el valor de su radio a lo largo de una curva (Martín & Oller, 2014).

METODOLOGÍA

Método VSRD

El teorema o método VSRD (fig. 1) consiste en descomponer un sólido en “rodajas” o “discos” que son perpendiculares al eje de revolución. Matemáticamente se hace la suposición de que $y = f(x)$ es una función continua (no negativa) en el intervalo $[a, b]$ y que al rotar la región bajo $f(x)$ entre $x = a$, $y = b$ alrededor del eje x , se puede determinar el volumen, de esta manera se obtiene un sólido de revolución.

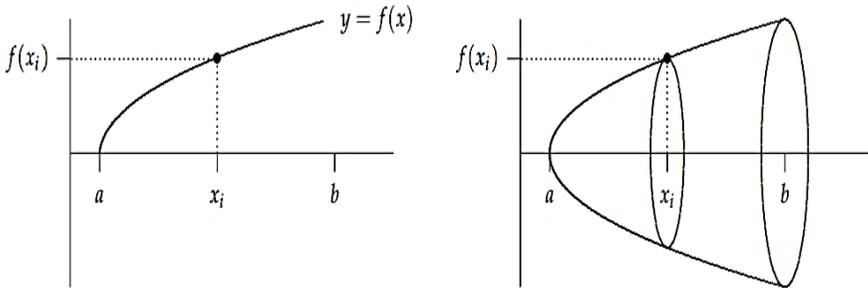
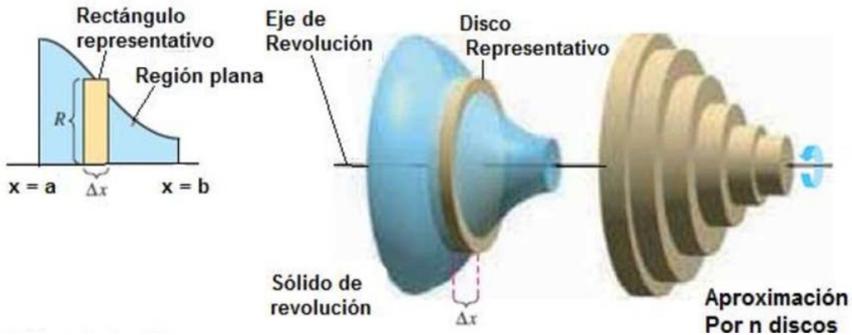
Primero se determina el área cross-seccional del sólido con la siguiente expresión: $A(x_i) = \pi R^2 = \pi [f(x_i)]^2$ (donde R es el radio de la forma cross-sección circular) en el punto $(x_i, f(x_i))$. Una vez obtenido $A(x_i)$ se puede emplear el teorema VSRD para determinar el volumen ya que la altura de cada disco está determinada por un segmento infinitesimal en el eje x el cual se representa como dx y al ser integrado en el intervalo $[a, b]$ se obtiene que $VSRD = \pi \int_a^b [f(x)]^2 dx$.

Descomposición geométrica de un comprimido cilíndrico-biconvexo

Las formas farmacéuticas sólidas con caras convexas separadas por una franja cilíndrica (fig. 2) se pueden analizar a través

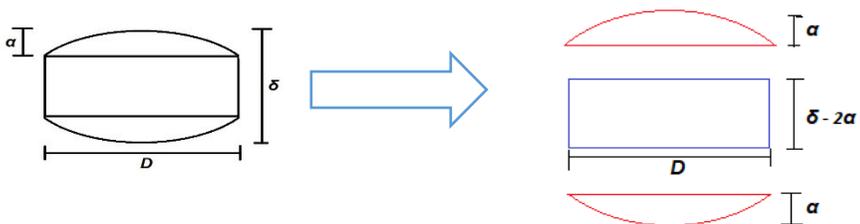
de sus componentes geométricos además de medir los parámetros longitudinales más sencillos como son: el diámetro del comprimido (D), la altura de la corona (α) y la altura total del comprimido (δ).

Figura 1. Diagrama general de un sólido de revolución y su aproximación por una serie de n discos.



Fuente: Larson & Edwards (2018).

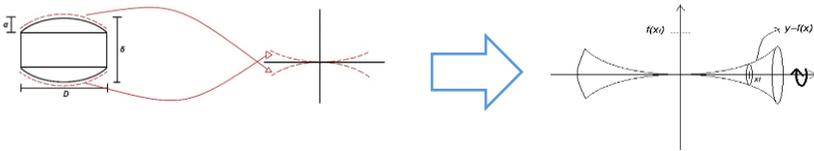
Figura 2. Representación bidimensional de un comprimido cilíndrico-biconvexo y su fragmentación en elementos geométricos.



Construcción algebraica del modelo

Primero se consideró al comprimido como un cilindro perfecto y se calculó el volumen total (V_1) mediante la ecuación: $V_1 = \pi r^2 h$, donde r es el radio de la base y h la altura del cilindro. Para este caso el radio se representó como $D/2$ y la altura como δ , de esta manera la ecuación se reescribió como: $V_1 = \pi(D/2)^2 \delta$. Sin embargo, la expresión obtenida no representa realmente el volumen del comprimido, sino que abarca un volumen mayor. Para resolver ese inconveniente, las curvas que delimitan ambas caras convexas del comprimido, se trasladaron a un plano con coordenadas cartesianas (fig. 3), de tal forma que los vértices se ubicaron en el origen en forma de “espejo”.

Figura 3. Diagrama geométrico de las curvas bidimensionales convexas del comprimido en un sistema cartesiano y VSRD.



Ambas curvas se describieron geoméricamente como parábolas y se construyó la ecuación de segundo grado $f(x) = \frac{\alpha}{(D/2)^2} x^2$ que se requiere en el modelo VSRD y así, obtener un segundo volumen que en un comprimido representa el espacio sobrante, V_2 , contenido en V_1 . Para obtener V_2 se resolvió la ecuación diferencial del modelo VSRD en el intervalo $[-D/2, D/2]$ según la siguiente integral:

$$\int dV_2 = \pi \int_{-D/2}^{D/2} \left(\frac{\alpha}{(D/2)^2} x^2 \right)^2 dx$$

Finalmente, el volumen real del comprimido se obtuvo restando $V_1 - V_2$.

Validación del modelo matemático

Para validar los valores de salida de la ecuación se realizó una revisión bibliográfica de artículos en la base de datos del *National Center of Biotechnology Information (NCBI por sus siglas en inglés)* y ELSEVIER, que contaran con información acerca del volumen de comprimidos cilíndrico-biconvexos, así como la altura, el diámetro y la altura de la corona de dicha forma farmacéutica. Se compararon los volúmenes reportados en los artículos seleccionados con los volúmenes resultantes al evaluar el modelo matemático propuesto con los mismos datos y se calculó el porcentaje de error que permitió evaluar esa comparación mediante la siguiente ecuación:

$$\%error = \frac{|\gamma - \omega|}{\omega} \cdot 100$$

Donde γ =valor experimental o aproximado y ω =valor teórico o real.

Por otro lado, el modelo matemático también se validó experimentalmente, con un lote de 10 tabletas con AVICEL PH301 + 1% de estearato de magnesio de las que se obtuvieron manualmente los parámetros (D , α , δ) requeridos por la ecuación, además de medir la masa y densidad para la aproximación del volumen empírico. En esta segunda validación, se utilizó la prueba t-student (Sánchez, 2015) para comparar el volumen empírico y el volumen teórico del modelo matemático. La solución de la ecuación para cada caso se realizó de forma automática con un programa creado en Python 3.8 y el análisis estadístico de los datos se hizo con el software GraphPad Prism 5.0.

RESULTADOS

Después de resolver la ecuación diferencial, se obtuvo que $V_2 = 2 \left[\frac{\pi \alpha^2}{5(D/2)^4} \left(\frac{D}{2}\right)^5 \right]$, con ello la expresión matemática global para calcular el volumen real de un comprimido basado en el método VSRD quedó representada por:

$$V_{\text{comprimido}} = \pi(D/2)^2\delta - 2 \left[\frac{\pi\alpha^2}{5(D/2)^4} \left(\frac{D}{2}\right)^5 \right]$$

La validación teórica (Tabla 1) se realizó al comparar el volumen reportado en la literatura consultada con los resultados obtenidos después de evaluar los parámetros teóricos de la bibliografía en la ecuación obtenida. El análisis arrojó un porcentaje de error promedio de 1.617%.

Tabla 1. Validación teórica del modelo matemático propuesto.

Referencia	Volumen reportado (mm ³)	Volumen calculado en el modelo matemático (mm ³)	Diferencia (mm ³)	Error (%)
(Song, Turton & Kayihan, 2006)	441.000	437.387	3.613	0.826
(Kodam Curtis, Hancock & Wassgren, 2012)	531.200	537.870	6.670	1.240
	254.380	256.820	2.440	0.950
(Shuichi <i>et al.</i> , 2018)	251.870	256.820	4.950	1.927
	510.870	513.356	2.480	0.484
	508.230	487.380	20.850	4.278

Por otra parte, en la validación experimental (Tabla 2) el volumen empírico se calculó de forma indirecta con los datos de densidad y masa. Al analizar los valores de los volúmenes calculados empíricamente y aquellos obtenidos por el modelo matemático, el análisis estadístico mostró que existe diferencia significativa entre ambos volúmenes (212±3.86 mm³ y 211.4±4.65 mm³, respectivamente; t=2.295; p=0.0474) pero se identificó una correlación positiva (r=0.9962, p<0.0001) entre los mismos.

Tabla 2. Validación experimental del modelo propuesto.

Núm.	Masa (g)	Densidad (g/mL)	Diámetro (mm)	Altura (mm)	Altura corona (mm)	Volumen empírico (mm ³)	Volumen modelo matemático (mm ³)
1	0.2886	1.340	8.11	4.16	0.08	215.37	214.86
2	0.2898	1.362	8.11	4.12	0.06	212.78	212.81
3	0.2846	1.357	8.11	4.06	0.03	209.73	209.72
4	0.2792	1.321	8.11	4.09	0.45	211.36	210.25
5	0.2806	1.306	8.11	4.16	0.08	214.85	214.86
6	0.2884	1.399	8.14	3.96	0.48	206.15	204.90
7	0.2839	1.321	8.11	4.16	0.08	214.91	214.86
8	0.2817	1.374	8.12	3.96	0.48	205.02	203.39
9	0.2902	1.350	8.11	4.16	0.08	214.96	214.86
10	0.2823	1.314	8.11	4.16	0.08	214.84	214.86

Código Python

La solución a la ecuación global para obtener el volumen de un comprimido se automatizó en lenguaje de programación Python versión 3.8 y las líneas de código del programa son las siguientes:

```

from math import pi
def Volumen_comprimido(Diametro, altura_comprimido, altura_corona):
    D=Diametro
    h=altura_comprimido
    tcap=altura_corona
    V_cilindro=pi*((D/2)**2)*h
    mu=(pi*(tcap**2))/(5*((D/2)**4))
    phi=(D/2)**5
    V_sobrante=2*mu*phi
    return print("El volumen del comprimido es: %.5f mm^3" % (V_cilindro - V_sobrante))
    
```

DISCUSIÓN

Históricamente se han creado algoritmos que permiten estudiar las propiedades reológicas de los comprimidos, por ejemplo, simulaciones del contacto entre comprimidos biconvexos o predicciones de la porosidad ante diferentes condiciones de compactación, se realizan con frecuencia. En cualquiera de los casos, el cálculo del volumen es indispensable para llevar a cabo estos estudios y el total de parámetros empleados para dicho objetivo, depende de la facilidad de obtenerlos, sin embargo, una constante que se observa es el uso del radio de curvatura, parámetro que se ha mantenido hasta el presente (Bawuah, Ervasti, Tan, Zeitler, Ketolainen & Peiponen, 2016).

Aquí se simplifica el concepto de radio de curvatura, al considerar a la parábola como representación geométrica de las caras convexas de la forma farmacéutica, de esta manera se elimina el error de considerar las caras convexas como porciones de una esfera perfecta y se utiliza el cálculo del volumen de un sólido por revolución de discos como modelo más sencillo. Esta última idea acerca de un modelo basado en una parábola, no se ha considerado en el pasado, pero es entendible debido al escaso uso de los modelos matemáticos para abordar esta parte de la farmacéutica, afortunadamente en los últimos años se ha manifestado un incremento de la atención sobre el entendimiento científico de los procesos de manufactura lo que permitirá avances importantes en la calidad de la elaboración de medicamentos (Sajjia, Shirazian, Egan, Iqbal, Albadarin, Southern & Walker, 2017).

En este trabajo se logró desarrollar un modelo matemático, que permitió formular una ecuación que considera únicamente tres parámetros para el cálculo de volúmenes de comprimidos biconvexos. La confiabilidad de los resultados, se sustenta tanto en la validación teórica como en la validación experimental, en esta última se demostró que los valores obtenidos indirectamente usando la densidad y masa (volumen empírico) comparados con los valores

arrojados por el modelo matemático, coinciden en un 99.62%. La importancia de la validación recae en el hecho de que los modelos matemáticos describen numéricamente un objeto o fenómeno, con la condición de que el modelo represente lo mejor posible la realidad, además de ser capaz de amortiguar los factores que alteran el entorno y, aun así, seguir aproximándose a lo real (Ravishankar, Singh, Wang & Subramaniyan, 2012).

Es importante mencionar que, las métricas longitudinales realizadas para la validación experimental, se realizaron usando un vernier y, sin ser un equipo sofisticado, resultó adecuado para la finalidad de este trabajo. Esto es relevante porque la intención principal del modelo aquí propuesto, es facilitar las mediciones y cálculo de volúmenes, sobre todo cuando una de las aplicaciones del modelo es con fines educativos. Es evidente que la ciencia actual, y en general la sociedad, apoyan su progreso en las nuevas tecnologías, sin embargo, el uso de herramientas sencillas para lograr un entendimiento integral de la realidad siempre será necesario (Paez, 2008).

Respecto al uso de Python como herramienta de automatización, se hizo con la intención de no dejar a un lado las facilidades que brindan las herramientas computacionales, además de que se le ahorra tiempo al usuario y es un lenguaje de programación sencillo, basado en intérprete por scripts y de acceso libre (Salvatier, Wiecki & Fonnesbeck, 2016), estas características se siguen conservando desde la creación de este lenguaje a finales de los 80's por van Rossum (Virtanen *et al.*, (2020).

CONCLUSIONES

La ecuación global del modelo matemático obtenido para el cálculo del volumen de comprimidos cilíndricos-biconvexos, es confiable y preciso para su aplicación en la enseñanza académica y principalmente en laboratorios pequeños, que no cuenten con equipo

sofisticado y deseen realizar control de calidad de dichas formas farmacéuticas. Es necesario implementar la programación para automatizar la solución de ecuaciones matemáticas complejas y extensas, facilitan el cálculo de los valores resultantes en comparación con los cálculos manuales o semiautomáticos con calculadoras digitales. Finalmente, el uso del presente modelo matemático en las prácticas de tecnología farmacéutica permitirá a los estudiantes realizar cálculos precisos y abrir un nuevo enfoque en el aprendizaje numérico, así como las ventajas de las matemáticas y las ciencias computacionales.

REFERENCIAS

- Bawuah P., Ervasti, T., Tan, N., Zeitler, J. A., Ketolainen, J. & Peiponen, K.E. (2016) Noninvasive porosity measurement of biconvex tablets using terahertz pulses. *International Journal of Pharmaceutics*, 509(1-2), 439-443. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.023>
- Bhusnure O., Gholve S., Nitin K., Giram P., Gaikwad V. & Rajmane T. (2015). Advanced approaches in solid-state analysis of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research*, 5(1), 1-29. https://www.researchgate.net/publication/289530620_Advanced_Approaches_in_Solid-State_Analysis_of_Pharmaceuticals
- Desbois L., Tchoreloff, P. & Mazel, V. (2020). Characterization and modeling of the viscoelasticity of pharmaceutical tablets. *International journal of pharmaceutics*, 587, 119695. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119695>
- Diarra H., Mazel, V., Busignies, V. & Tchoreloff, P. (2015). Investigating the effect of tablet thickness and punch curvature on density distribution using finite elements method. *International Journal of Pharmaceutics*, 493(1-2), 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.030>
- Jassim Z.E. & Rajab N.A. (2018). Review on preparation, characterization and pharmaceutical application of nanosuspension as an approach of solubility and dissolution enhancement. *Journal of Pharmacy Research*, 12(5), 771-774. https://www.researchgate.net/publication/327829085_Review_on_preparation_characterization_and_pharmaceutical_application_of_nanosuspension_as_an_approach_of_solubility_and_dissolution_enhancement
- Kadiri M.S. & Michrafy, A., (2013). The effect of punch's shape on die compaction of pharmaceutical powders. *Powder Technol.* 239, 467-477. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.02.022>
- Kodam M., Curtis, J., Hancock, B. & Wassgren, C. (2012) Discrete element method modeling of biconvex pharmaceutical tablets: contact detection algorithms and validation. *Chemical Engineering Science*, 69(1), 587-601. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2011.11.011>
- Larson R. & Edwards, B.H. (2018) *Multivariable calculus* (11th Ed.). United States of America: Cengage Learning.
- Martín M. J. & Oller, M.A. (2014) Computing volumes of solids of revolution with double integrals. *The College Mathematics Journal*, 45(3), 219-221. <https://doi.org/10.4169/college.math.j.45.3.219>
- May R.K., Su, K., Han, L., Zhong, S., Elliott, J.A., Gladden, L.F., Evans, M., Shen, Y. & Zeitler, J.A. (2013). Hardness and density distributions of pharmaceutical tablets measured by terahertz pulsed imaging. *J. Pharm. Sci.* 102(7), 2179-2186. <https://doi.org/10.1002/jps.23560>

- Mazel V., Diarra, H., Malvestio, J. & Tchoreloff, P. (2018) Lamination of biconvex tablets: Numerical and experimental study. *International Journal of Pharmaceutics*, 542(1-2), 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.012>
- Nguyen H., Horn, J.C., Bleakney, M., Siderius, D.W. & Espinal, L. (2019). Understanding material characteristics through signature traits from helium pycnometry. *Langmuir: the ACS Journal of surfaces and colloids*, 35(6),2115–2122. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03731>
- Paez T. (2008) *Introduction to model validation*. Albuquerque Sandia National Laboratories. <https://www.osti.gov/servlets/purl/1142730>
- Ravishankar B., Singh, G., Wang, L. & Subramaniyan, A.K. (2012). Probabilistic Validation Metrics for *Industrial Engineering Analysis Models*. 53rd AIAA/ASME/ASCE/AHS/ASC Structures, Structural Dynamics and Materials Conference 23 April 2012 - 26 April 2012.. <https://doi.org/10.2514/6.2012-1443>
- Sajjia M., Shirazian S., Egan D., Iqbal J., Albadarin A.B., Southern M., Walker G. (2017). Mechanistic modelling of industrial-scale roller compactor 'Freund TF-MINI model'. *Computers & Chemical Engineering*, 104,141–150. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2017.04.018>
- Salvatier J., Wiecki, T.W. & Fonnesbeck, C. (2016) Probabilistic programming in Python using PyMC3. *PeerJ PrePrints*, 4:e1686v1 <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1686v1>
- Sánchez T.R.A. (2015). t-Student. Usos y abusos. *Revista Mexicana de Cardiología*, 26(1), 59-61. Disponible en <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmc/v26n1/v26n1a9.pdf>
- Song Y., Turton, R. & Kayihan, F. (2006). Contact detection algorithms for DEM simulations of tablet-shaped particles. *Powder Technology*, 161(1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2005.07.004>
- Tanabe S., Nakagawa, H., Watanabe, T., Minami, H., Shuichi, A., Urbanetz, N.A. & Scherlier, R. (2018) Selection of a round convex tablet shape that mitigates the risk of chipping and capping based on systematic evaluation by utilizing multivariate analysis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 120:212-221. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.05.008>
- Virtanen P., Gommers, R., Oliphant, T.E. *et al.* (2020) SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nat Methods*, 17, 261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>

DISEÑO Y VALIDACIÓN DE MICRODISPOSITIVOS CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CONJUGADAS PARA INMUNOENSAYOS RÁPIDOS UTILIZANDO MICROFLUÍDICA

Kenia Chávez Ramos¹ y María del Pilar Cañizares Macías²

RESUMEN

Introducción: El creciente interés en el diagnóstico de enfermedades crónicas y agudas mediante la aplicación de métodos económicos y sencillos destinados a la identificación de biomarcadores específicos ha conducido a la implementación de dispositivos basados en microfluídica como una alternativa prometedora para lograr un diagnóstico ágil y eficaz. **Objetivo:** Evaluar microdispositivos de polidimetilsiloxano para la detección espectrofotométrica y cuantificación de anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP) empleando nanopartículas magnéticas conjugadas a un antígeno. **Materiales y métodos:** Se construyó un microdispositivo de polidimetilsiloxano por fotolitografía y litografía suave para realizar un inmunoensayo indirecto empleando nanopartículas magnéticas conjugadas con un péptido citrulinado cíclico (MNPs-CCP) como soporte sólido para la cuantificación de anti-CCP en un control positivo y negativo de plasma humano. La detección se llevó a cabo en un microdispositivo independiente empleado como celda de flujo acoplado con fibras ópticas, midiendo la absorbancia a $\lambda=650$ nm. **Resultados:** Inmovilizando MNPs-CCP con imanes se realizó un inmunoensayo indirecto. Se realizaron curvas de calibración (intervalo de detección 0.70-2000 U/mL, límite de detección 0.70 U/mL) a temperaturas y tiempos de reacción enzimática diferentes, encontrando que una temperatura de 37°C y un tiempo de 10 min es suficiente para tener señales diferenciables y poder realizar la cuantificación. Los anti-CCP cuantificados en el control positivo y negativo se compararon con un kit ELISA obteniendo resultados estadísticamente iguales. **Conclusiones:** El inmunoensayo en microdispositivo empleó sólo 6 μ L de muestra/reactivos y fue casi nueve veces más rápido y 16 veces más sensible que el kit comercial ELISA anti-CCP con el que fue comparado.

Palabras clave: anti-CCP, ELISA, inmunoensayo, microdispositivo, nanopartículas.

¹ Dra. en Ciencias Químicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. **Autor de correspondencia:** keniacr@ciencias.unam.mx

² Profesor Investigador de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

El creciente interés en el diagnóstico de enfermedades crónicas y agudas, ha llevado a la búsqueda e implementación de métodos sencillos y de bajo costo para la detección de biomarcadores específicos. Entre ellos, los dispositivos de microfluídica han demostrado ser una posible solución para un diagnóstico simple y rápido (Sanjay et al., 2015; Temiz et al., 2015). Uno de los métodos más utilizados para la detección de biomarcadores es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el cual es considerado como una valiosa técnica analítica basada en el reconocimiento molecular entre un anticuerpo y un antígeno, que permite la cuantificación de moléculas objetivo con alta sensibilidad y especificidad. Hasta la fecha, ya ha sido reportado el uso de microdispositivos para la realización de inmunoensayos empleando diferentes soportes sólidos para mejorar la captura específica del antígeno o anticuerpo (Chen et al., 2018; Han et al., 2013; Nishiyama et al., 2020 y 2021; Shirai et al., 2019). Entre ellos se encuentra una estructura de hidrogel cilíndrica llamada inmunopillar (Ikami et al., 2010; Kasama et al., 2015), una estructura 3D de fotopolímero fabricada dentro de un microcanal llamada inmunopared (Chávez-Ramos et al., 2019; Nishiyama et al., 2019; Yamamichi et al., 2016) o nanopartículas magnéticas conjugadas (Talha et al., 2016; Urusov et al., 2017). En comparación con el método convencional de placa de microtitulación, estas alternativas han demostrado proporcionar una detección más rápida, fácil y sensible.

El presente trabajo es parte de un estudio publicado en la revista *TALANTA* (Chávez-Ramos & Cañizares-Macías, 2021), en el que se desarrolló un inmunoensayo en microdispositivo empleando como soporte sólido nanopartículas magnéticas conjugadas al antígeno con detección espectrofotométrica; como anticuerpos de prueba, se detectaron y cuantificaron biomarcadores específicos para el diagnóstico de artritis reumatoide (AR) conocidos como anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCP). El desempeño de la metodología se evaluó empleando muestras de plasma diluidas, como

control negativo y positivo, contrastando los resultados con un kit ELISA anti-CCP comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

El kit LinkAmine MAGNETIC 200 nm se adquirió de Nanoimmunotech. El péptido citrulinado cíclico (CCP), con secuencia HQCHQEST—Citrulina—GRSRGRCGRSGS (pureza 95.21%), fue sintetizado por Peptido 2.0 Inc. Los estándares de anticuerpos monoclonales de péptido citrulinado cíclico anti-IgG (anti-CCP) de 1-2000 U/mL, el anticuerpo policlonal de oveja anti-humano-IgG conjugado a la enzima peroxidasa de rábano picante (anti-h-IgG-HRP), la solución cromogénica 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB/H₂O₂ 0.26 g/L) y el kit anti-CCP ELISA GWB-521226, fueron proporcionados por GenWay Biotech Inc. La solución amortiguadora de fosfato (SAF; 0.01 mol/L; pH 7.4), albúmina de suero bovino (BSA), Tween 80 y 2-propanol se adquirieron de Sigma-Aldrich. La resina fotosensible SU-8 3035 se adquirió de Microchem Inc. El kit de polidimetilsiloxano (PDMS) Sylgard 184 se adquirió de Dow Corning Corporation.

Diseño, fabricación y caracterización de los microdispositivos

El diseño se realizó en el programa *Adobe Illustrator CS6* dentro de una circunferencia de 70 mm y se imprimió en negativo (máscara óptica) para la construcción del molde mediante fotolitografía (MICROCHEM, n.d.) y las réplicas del microdispositivo en PDMS mediante litografía suave (Zaouk et al., 2006). La metodología se describe a continuación: se colocó una oblea de silicio, diámetro 75 mm y profundidad 381 ± 25 μm (Silicon Valley Microelectronics), sobre el spin-coater (WS-650MZ-23NPPB, Laurell Technologies Corp.) y se agregaron aproximadamente 3 mL de foto-resina SU-8 3035. Se aplicó un programa de 500 rpm durante 10 s (aceleración 100 rpm/s) seguido por 1000 rpm durante 30 s (aceleración 300 rpm/s). Enseguida, la oblea de silicio se calentó a 105°C durante 30 minutos

en una parrilla de calentamiento (Thermo Scientific Cimarec); la adición y calentamiento de la foto-resina se realizó una vez más para obtener una capa final de alrededor de 200 μm . Posteriormente, se colocó la máscara óptica sobre la oblea de silicio y se transfirió el patrón deseado exponiéndolo a luz ultravioleta (B-100AP, UVP Blak Ray) durante 45 s. A continuación, se retiró la máscara y la oblea de silicio se calentó a 75 °C durante 1 minuto y luego a 105°C durante 5 minutos. Como paso final, se sumergió en un recipiente que contenía acetato de propilenglicol monometil éter para eliminar la foto-resina no polimerizada, se lavó con 2-propanol y se colocó dentro de una caja de Petri. Se vertió una mezcla de PDMS y agente curante (relación 10:0.9), y después de la desgasificación al vacío, se polimerizó a 65°C (incubadora de calentamiento DHP-9032, Prolab) durante dos horas. Se cortaron las réplicas de los microdispositivos de PDMS, las entradas y salidas se realizaron con un perforador de 1.5 mm de diámetro interno. Finalmente, los microcanales se sellaron sobre una capa delgada de PDMS empleando tratamiento corona (BD-20AC, Electro-Technic Products). Los microdispositivos se caracterizaron utilizando una retícula para microscopio de 5 mm (0.05 x 100 mm, The Microscope Depot) como referencia. Se realizaron diversos cortes al microcanal y se tomaron imágenes de la sección transversal al microscopio (DM750, Leica Microsystems) con un objetivo 4x. El ancho y la profundidad del microcanal se midió en el programa *Leica LAS EZ*.

Toma de muestras de sangre

Empleando un vacutainer con anticoagulante EDTA K2, se tomaron dos muestras de sangre: de un paciente diagnosticado con AR desde hace más de seis años (control positivo) y de una persona sana (control negativo). Se separó el plasma del resto de la sangre mediante centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos (EBA 20, Hettich) y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Conjugación de las nanopartículas magnéticas (MNPs)

El antígeno péptido citrulinado cíclico (CCP) se inmovilizó covalentemente a los grupos carboxilo en la superficie de las MNPs siguiendo el procedimiento descrito en el kit LinkAmine MAGNETIC (Nanoimmunotech, n.d.). Las MNPs-CCP resultantes se lavaron y almacenaron a una temperatura de 4°C hasta su uso.

Procedimiento del inmunoensayo

La fig. 1, muestra la representación esquemática del inmunoensayo. Primero, los microdispositivos se colocaron sobre una torre de imanes y se adicionó 1 μL de MNPs-CCP (concentración 10 mg/mL; $70.9 \pm 5.4 \mu\text{g}$ CCP/mg MNPs) con ayuda de una micropipeta (Finnpipette F1, Thermo Scientific), reteniendo las nanopartículas magnéticas conjugadas dentro del microcanal. Los siguientes pasos requirieron un volumen de 6 μL de cada solución. Se adicionó al microcanal una solución amortiguadora de fosfatos (SAF) la cual fungió como blanco, estándar anti-CCP (1-2000 U/mL) o muestra de plasma diluida 1:100 en SAF con un tiempo de incubación de 1.5 min. Posteriormente, el anticuerpo policlonal anti-h-IgG-HRP se ingresó al microcanal y se incubó durante el tiempo de 30 s. Después de cada incubación a temperatura ambiente, las MNPs conjugadas se lavaron 5 veces con solución de lavado (SAF que contenía Tween 80 al 0.5% y BSA al 0.5%). Finalmente, se adicionó el sustrato cromogénico (TMB/ H_2O_2) y la reacción enzimática se llevó a cabo en oscuridad a 22°C durante 15 y 30 min, así como a 37°C durante 10 y 15 min. El producto de reacción enzimática se recolectó inmediatamente en puntas de micropipeta para su posterior detección espectrofotométrica.

Sistema de detección

La absorbancia se midió a $\lambda=650$ nm usando un segundo microdispositivo de PDMS como celda de flujo con un diseño en Z. El esquema del sistema de detección se muestra en la fig. 2. Éste consiste en un microcanal con un paso óptico de 1 cm, $362 \pm 7 \mu\text{m}$ de

ancho y $96 \pm 6 \mu\text{m}$ de profundidad (volumen total $0.35 \mu\text{L}$), acoplado con fibras ópticas de $200 \mu\text{m}$ (FIBER 200-UV, Ocean Optics), una fuente de luz multi-LED (BluLoop, Ocean Optics) y un detector UV-Vis (USB4000, Ocean Optics). El producto de reacción recolectado se ingresó al paso óptico con una micropipeta y la señal midió a través del programa *SpectraSuite*.

Figura 1. Procedimiento del inmunoensayo en microdispositivo. (a) Inmovilización de MNPs-CCP; (b) unión selectiva de los anticuerpos anti-CCP; (c) adición del anticuerpo anti-h-IgG-HRP; y (d) reacción enzimática al adicionar la solución cromogénica TMB/H₂O₂.

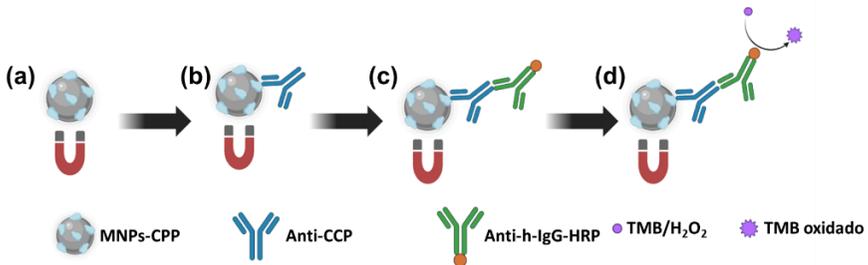
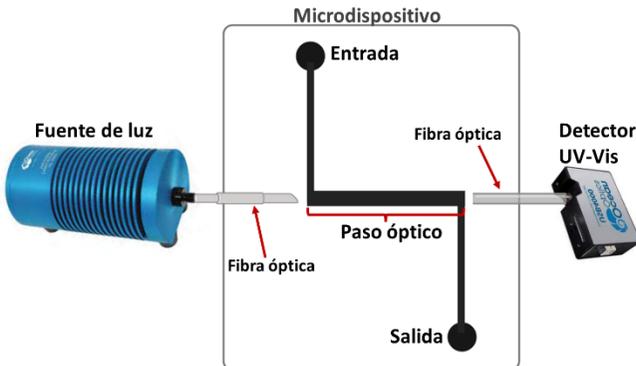


Figura 2. Ilustración del sistema de detección empleado un microdispositivo de PDMS acoplado con fibras ópticas.



Construcción de curvas de calibración y análisis de muestras

Se construyeron cuatro curvas de calibración con un intervalo de concentración de anti-CCP entre 1 y 2000 U/mL. Dos de ellas a 22°C con tiempos de reacción enzimática de 15 y 30 min y dos más a 37°C con tiempo de reacción enzimática de 15 y 10 min. Las muestras de plasma (control positivo y negativo) se diluyeron en una relación 1:100 en SAF antes de su análisis en el microdispositivo. Para comparar la cuantificación de anti-CCP en el método desarrollado, se empleó un método convencional en microplaca (anti-CCP ELISA kit) (GenWay, 2000).

Evaluación de la precisión: repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio

Se empleó un estándar anti-CCP (20 U/mL) para realizar el inmunoensayo en el microdispositivo diariamente durante siete días por duplicado. El tiempo de reacción enzimática fue de 10 minutos a 37°C. La señal analítica resultante se registró y se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar la precisión de la metodología.

Estudio del tiempo de vida de los microdispositivos

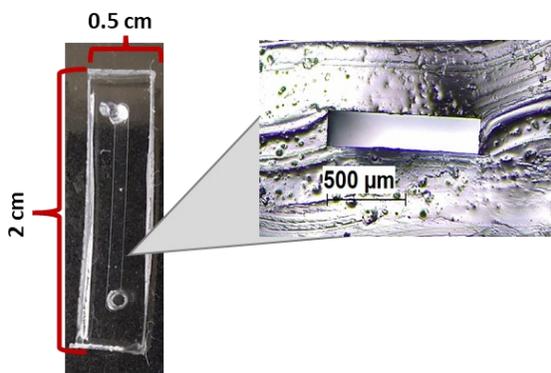
Empleando tres microdispositivos diferentes se midió la señal proporcionada por el blanco. Posteriormente, se lavaron los tres microdispositivos ingresando agua destilada a los canales y sonicándolos dentro de un vaso lleno con agua durante 15 min, por último, se secaron con aire a presión. Empleando los mismos tres microdispositivos, se realizaron inmunoensayos con el control positivo sin diluir repitiendo el paso de lavado después del inmunoensayo. El procedimiento descrito se repitió cinco veces durante un día (n=5) y se compararon (medición del blanco y control positivo) mediante una prueba de t de Student.

RESULTADOS

Caracterización de los microdispositivos

El diseño del microdispositivo consistió en un microcanal lineal con las siguientes dimensiones: longitud 1.5 cm, profundidad $225 \pm 25 \mu\text{m}$ y ancho $967 \pm 15 \mu\text{m}$. El volumen total fue de $3.2 \pm 0.4 \mu\text{L}$. En la fig. 3, se muestra una fotografía del microdispositivo, así como una vista de la sección transversal del mismo.

Figura 3. Fotografía del microdispositivo empleado y vista de la sección transversal del microcanal (objeivo 4X).

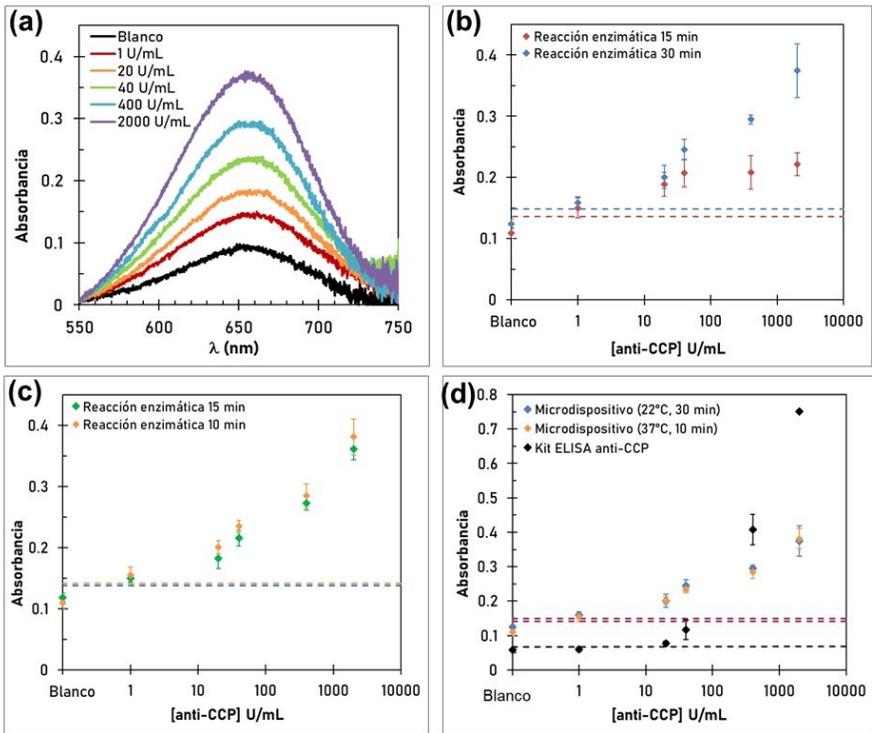


Construcción de las curvas de calibración

Las señales de medición espectrofotométrica típicas obtenidas se muestran en la fig. 4(a). Las curvas de calibración de anti-CCP (1-2000 U/mL) construidas a 22°C se presentan en la fig. 4(b), mientras que las curvas de calibración a 37°C se muestran en la fig. 4(c). Los límites de detección (LOD) a 22°C fueron 0.70 U/mL (15 min) y 0.71 U/mL (30 min), mientras que a 37°C fueron 0.70 U/mL (10 min) y 0.62 U/mL (15 min); éstos se determinaron considerando el promedio de la señal del blanco ($n=10$) más tres desviaciones estándar ($3S$). Para comparar el rendimiento del inmunoensayo, se construyó una curva de calibración de anti-CCP [fig. 4(d)] en el mismo

intervalo de concentraciones (1-2000 U/mL) siguiendo las instrucciones del kit anti-CCP ELISA (GenWay, 2000), obteniendo un valor de LOD de 11.50 U/mL.

Figura 4. Detección y cuantificación de anti-CCP. (a) Espectros de absorción. (b) Curvas de calibración a 22 °C (n=3). (c) Curvas de calibración a 37°C (n=3). (d) Comparación entre las curvas de calibración del inmunoensayo en microdispositivo (n=3) y microplaca (n=2). Las líneas discontinuas en (b), (c) y (d) representan la señal del blanco + 3S. Mediciones de absorbancia a $\lambda = 650 \text{ nm}$ (microdispositivo) y a $\lambda = 450 \text{ nm}$ (microplaca).



Asimismo, se realizó la cuantificación de los controles positivo y negativo. Mediante la prueba t de Student, se demostró que los promedios de la concentración de anti-CCP en el control positivo fueron estadísticamente iguales por los dos métodos (microdispositivo y microplaca), en ambos casos, no se pudo cuantificar el control negativo por estar por debajo del LOD. La tabla 1, resume los resultados para el inmunoensayo de microdispositivo y el método convencional de microplaca.

Tabla 1. Comparación de los resultados del inmunoensayo empleando el microdispositivo y el kit ELISA convencional para la cuantificación de biomarcadores anti-CCP.

Característica	Inmunoensayo en microdispositivo	Inmunoensayo en microplaca
Volumen	6 μ L	100 μ L
LOD	0.70 U/mL	11.50 U/mL
Tiempo de análisis	12 min	105 min
[anti-CCP] Control positivo	1505.19 \pm 317.13 U/mL	1594.50 \pm 173.24 U/mL
[anti-CCP] Control negativo	NC	NC
Repetibilidad	3.8%	5.5%
Reproducibilidad	6.1%	6.8%

NC: No cuantificable, valor de Absorbancia < LOD

DISCUSIÓN

Análisis de las curvas de calibración

Con un tiempo de reacción enzimática de 15 min a 22°C, la absorbancia medida permaneció constante después de la concentración de 40 U/mL, por lo que, bajo estas condiciones experimentales, sólo es posible tener una detección cualitativa de los anticuerpos. Sin embargo, si el tiempo de reacción enzimática aumenta hasta 30 min, es factible tener señales diferenciales para cada concentración de estándar de anti-CCP y cuantificar los anticuerpos. Al incrementar la temperatura a 37°C se obtuvieron señales analíticas equivalentes a las obtenidas con 22°C y 30 min de reacción, pero con un tiempo de reacción enzimática más corto. Con el propósito de reducir el tiempo total del inmunoensayo en el microdispositivo, se eligió el tiempo de reacción enzimática de 10 minutos a 37°C para probar el método desarrollado con muestras de plasma reales.

Comparación con el método convencional

Se compararon las curvas de calibración entre los métodos de inmunoensayo en microdispositivo y microplaca, se observó que existe una mayor sensibilidad a bajas concentraciones cuando se trabaja con el microdispositivo [fig. 4(d)]. Este resultado podría atribuirse a la alta relación superficie/volumen de las MNPs-CCP (Wittstock et al., 2009) retenidas dentro del microcanal, lo que ayudó a tener un área de contacto más grande entre el antígeno y el anticuerpo. Por lo tanto, el método de microdispositivo ofrece la posibilidad de detectar y cuantificar concentraciones más bajas de anti-CCP. Sin embargo, a concentraciones más altas de anti-CCP, la absorbancia medida con el microdispositivo es notoriamente menor que la obtenida con el kit; la reducción en la sensibilidad podría atribuirse a la saturación en la superficie de las MNPs-CCP. Por lo tanto, es probable que se requiera una cantidad mayor de nanopartículas para obtener valores de absorbancia más altos. Como el propósito del inmunoensayo en el microdispositivo es reducir el volumen de reactivos y tiempo de análisis, la sensibilidad del método desarrollado se considera adecuada para la cuantificación. Así, el inmunoensayo en microdispositivo presentó las ventajas de requerir un volumen de muestra menor (6 μL) y un tiempo de ensayo más corto (12 min). Asimismo, la concentración de anti-CCP en el control positivo fue muy similar entre los dos métodos, en ambos casos, el control negativo no pudo ser cuantificado. Se realizó una prueba *t* de Student para comparar las medias de ambos métodos mostrando que no hay diferencia estadísticamente significativa, por lo que los resultados son equivalentes. En cuanto a la precisión, la repetibilidad obtenida fue de 3.8%, mientras que la reproducibilidad fue de 6.1%. El porcentaje de reproducibilidad es muy similar al reportado en el manual del kit ELISA (6.8 %), mientras que la repetibilidad obtenida fue un poco menor al reportado por el fabricante del kit (5.5 %). Estos resultados muestran que, a pesar de tan solo usar solo 6 μL de reactivos y muestras, existe una excelente precisión para el método desarrollado.

Estudio del tiempo de vida de los microdispositivos

Se utilizó un control positivo sin diluir con el fin de exponer la mayor cantidad de anti-CCP a las MNPs-CCP retenidas dentro del microcanal. Los resultados experimentales mostraron que, a pesar de la gran cantidad de anticuerpos, no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las cinco mediciones de absorbancia para el blanco (0.116 ± 0.005) y para el control positivo sin diluir (0.457 ± 0.013). Por lo tanto, los microdispositivos son reutilizables y se pueden emplear en repetidas ocasiones sin variación en la señal analítica. Tener microdispositivos, reutilizables es una gran ventaja que ofrece el usar MNPs-CCP como soporte sólido, ya que no existió magnetización remanente cuando se retira el campo magnético y la limpieza de los microcanales se pudo realizar fácilmente.

CONCLUSIONES

El microdispositivo desarrollado permite la determinación de anti-CCP con un tiempo de análisis más corto que los empleados actualmente en métodos convencionales de microplaca (12 min contra 105 min) con una precisión y resultados equivalentes a los del kit ELISA, pero con un LOD 16 veces menor (LOD 0.70 U/mL contra 11.50 U/mL). Los valores mínimos de detección reportados para los métodos actuales son variados, pero ninguno se ha desarrollado actualmente con un valor de LOD tan bajo como el presentado en esta investigación. Además, el microdispositivo desarrollado tiene la ventaja de requerir sólo 6 μ L de muestras y reactivos (en comparación con 100 μ L requeridos por el método convencional), además de poseer la gran ventaja de ser un microdispositivo reutilizable. Estas dos características ayudan a disminuir el costo del inmunoensayo. Así, utilizando 1 mL de cada reactivo se pueden realizar casi 167 pruebas, mientras que con el kit ELISA sólo se realizan 10. Los resultados obtenidos utilizando un control de anti-CCP negativo y positivo, mostraron que el inmunoensayo en microdispositivo puede ser un

excelente prototipo para la cuantificación de anti-CCP, siendo un método más rápido, económico, sensible y simple que los métodos actuales. También abre una ventana de oportunidad para la detección de otro tipo de biomarcadores con la posibilidad de disminuir los LOD actuales.

REFERENCIAS

- Chávez-Ramos, K., Nishiyama, K., Maeki, M., Ishida, A., Tani, H., Kasama, T., Baba, Y. & Tokeshi, M. (2019). Rapid, sensitive, and selective detection of H5 hemagglutinin from avian influenza virus using an immunowall device. *ACS Omega*, 4, 16683–16688. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02788>
- Chávez-Ramos, K. & Cañizares-Macías, M. del P. (2021). Microdevice immunoassay with conjugated magnetic nanoparticles for rapid anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) detection. *Talanta*, 224, 121801. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121801>
- Chen, Y., Meng, X., Zhu, Y., Shen, M., Lu, Y., Cheng, J., & Xu, Y. (2018). Rapid detection of four mycotoxins in corn using a microfluidics and microarray-based immunoassay system. *Talanta*, 186, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.064>
- GenWay (2000). *Anti CCP ELISA*. GenWay. <https://www.genwaybio.com/media/pdf/products/GWB-521226.pdf>
- Han, K. N., Li, C. A. & Seong, G. H. (2013). Microfluidic chips for immunoassays. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 6, 119–141. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062012-092616>
- Ikami, M., Kawakami, A., Kakuta, M., Okamoto, Y., Kaji, N., Tokeshi, M. & Baba, Y. (2010). Immuno-pillar chip: A new platform for rapid and easy-to-use immunoassay. *Lab on a Chip*, 10(24), 3335–3340. <https://doi.org/10.1039/c0lc00241k>
- Kasama, T., Ikami, M., Jin, W., Yamada, K., Kaji, N., Atsumi, Y., Mizutani, M., Murai, A., Okamoto, A., Namikawa, T., Ohta, M., Tokeshi, M. & Baba, Y. (2015). Rapid, highly sensitive, and simultaneous detection of staphylococcal enterotoxins in milk by using immuno-pillar devices. *Anal. Methods*, 7, 5092–5095. <https://doi.org/10.1039/c5ay00698h>
- MICROCHEM. (n.d.). *SU-8 3000 Permanent Epoxy Negative Photoresist*. Product Datasheet. Retrieved September 5, 2021, from <https://kayakuam.com/wp-content/uploads/2019/09/SU-8-3000-Data-Sheet.pdf>
- Nanoimmunotech. (n.d.). *LinkAmine kit MAGNETIC 200 nm - 5 mL*. <https://www.nanoimmunotech.eu/en/Shop/Bioconjugation-Kits-/Linkamine-kit-magnetic>
- Nishiyama, K., Takeda, Y., Maeki, M., Ishida, A., Tani, H., Shigemura, K., Hibara, A., Yonezawa, Y., Imai, K., Ogawa, H., & Tokeshi, M. (2020). Rapid detection of anti-H5 avian influenza virus antibody by fluorescence polarization immunoassay using a portable fluorescence polarization analyzer. In *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 316. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128160>
- Nishiyama, K., Takeda, Y., Takahashi, K., Fukuyama, M., Maeki, M., Ishida, A., Tani, H., Shigemura, K., Hibara, A., Ogawa, H., & Tokeshi, M. (2021). Non-competitive fluorescence polarization immunoassay for detection of H5 avian influenza virus using a portable analyzer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(18), 4619–4623. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03193-y>
- Nishiyama, K., Toshihiro, K., Nakamata, S., Ishikawa, K., Onoshima, D., Yukawa, H., Maeki, M., Ishida, A., Tani, H., Baba, Y. & Tokeshi, M. (2019). Ultrasensitive detection of disease biomarkers using an immuno-wall device with enzymatic amplification. *Analyst*, 144, 4589–4595. <https://doi.org/10.1039/C9AN00480G>
- Sanjay, S. T., Fu, G., Dou, M., Xu, F., Liu, R., Qi, H., & Li, X. (2015). Biomarker detection for disease diagnosis using cost-effective microfluidic platforms. *Analyst*, 140(21), 7062–7081. <https://doi.org/10.1039/c5an00780a>

- Shirai, A., Sueyoshi, K., Endo, T. & Hisamoto, H. (2019). Graphene/polyethylene glycol hybrids for single-step immunoassay microdevice. *FlatChem*, 13, 34–39.
- Talha, J., Ernandes Taveira, T. N., Mohamed, M. E., Nadia, Z., Marcos, H. K., Abdelhamid Errachid, E.-S. & Abdelhamid, E. (2016). Magnetic particles: From preparation to lab-on-a-chip, biosensors, microsystems and microfluidics applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 79, 344–362.
- Temiz, Y., Lovchik, R. D., Kaigala, G. V. & Delamarche, E. (2015). Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? *Microelectronic Engineering*, 132, 156–175. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2014.10.013>
- Urusov, A. E., Petrakova, A. V, Zherdev, A. V & Dzantiev, B. B. (2017). Application of magnetic nanoparticles in immunoassay. *Nanotechnologies in Russia*, 12, 471–479. <https://doi.org/10.1134/S1995078017050135>
- Wittstock, A., Baumann, T. F., Hamza, A. V, Synthesis, N., Livermore, L. & Physik, T. (2009). Surface chemistry in nanoscale materials. *Materials*, 2, 2404–2428. <https://doi.org/10.3390/ma2042404>
- Yamamichi, A., Kasama, T., Ohka, F., Suzuki, H., Kato, A. & Motomura, K. (2016). An immuno-wall microdevice exhibits rapid and sensitive detection of IDH1-R132H mutation specific to grade II and III gliomas. *Science and Technology of Advance Materials*, 17, 618–625.
- Zaouk, R., Park, B. Y. & Madou, M. J. (2006). Fabrication of polydimethylsiloxane microfluidics using SU-8 molds. *Methods in Molecular Biology*, 321, 17–21. <https://doi.org/10.1385/1-59259-997-4:17>

PRESENCIA DE AGENTES PATÓGENOS EN LECHE CRUDA DE GANADO BOVINO EN EL MUNICIPIO DE SAN PABLO HUIXTEPEC, OAXACA

Martha Elena Santos Peralta¹, Mario Alfredo Urbina Mata¹, Ericel Hernández García^{1,2}, José Ángel Cueva Villanueva^{1,2} y Héctor Ulises Bernardino Hernández^{1,2}

RESUMEN

Introducción: La contaminación por agentes patógenos es un problema que afecta la ganadería lechera y es un riesgo para la salud pública en países poco desarrollados a nivel mundial. **Objetivo:** Documentar el manejo del ganado bovino y la presencia de *Brucella* spp, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp en la leche, en el municipio de San Pablo Huixtepec, Oaxaca. **Materiales y métodos:** El estudio fue descriptivo y transversal. Entre octubre de 2018 a mayo de 2019, se aplicaron encuestas a 16 productores correspondientes a la misma cantidad de establos, para recabar información sobre el manejo de ganado bovino y el proceso de ordeño, además se colectaron muestras de leche para la determinación de *Brucella* spp, *E. coli* y *Salmonella* spp. La información se analizó mediante estadística descriptiva y χ^2 de Fisher para identificar las variables asociadas a la contaminación de leche por *Brucella* spp. **Resultados:** Existen malas condiciones de infraestructura en los establos, mal manejo del ganado y escasa higiene en el proceso de ordeño y recolección, lo que está provocando la contaminación de la leche por agentes patógenos, particularmente en los establos mas grandes. El 29.9% de las muestras fueron positivas a *Brucella* spp, representando una contaminación del 79.9% de establos. El 100% de los establos fueron positivos a la contaminación por *E. coli* y *Salmonella* spp. **Conclusiones:** Las malas condiciones de los establos, mal manejo del ganado y escasa higiene en el proceso de ordeño y recolección, influyen en la contaminación de la leche por los agentes patógenos estudiados. Es necesario implementar programas de capacitación en el buen manejo del ganado y obtención de leche, además de impulsar la vigilancia epidemiológica de la brucelosis y otros agentes patógenos, para disminuir el riesgo a la salud pública.

Palabras clave: brucelosis bovina, *Escherichia coli*, leche, *Salmonella* spp.

¹ Facultad de Ciencias Químicas, UABJO. **Autor de correspondencia:** hbernardino@yahoo.com

² Miembro del CA Química y Salud Ambiental (UABJO-CA-71)

La contaminación por agentes patógenos, entre ellos la brucelosis bovina es un problema que afecta la ganadería lechera de países poco desarrollados a nivel mundial, como consecuencia implica un riesgo a la salud de las personas que trabajan o consumen productos no pasteurizados provenientes de animales infectados (Schneider, Diniz, Lunardi, Benetti, Camargo, Freitas, Lopes y Sampaio, 2013).

Méndez, Rodríguez y Sánchez (2015) indican que la presencia de este tipo de enfermedades en los rumiantes domésticos influye en la presencia de la misma enfermedad en humanos, lo cual se ha asociado con las condiciones socio-económicas desfavorables de la población (García, Ramírez, Hernández, Hernández, Díaz y Orozco, 2014). Ocegüera, Bruce, Frankena, Udo, van der Zijpp y Rushton (2015), reportan que en las zonas rurales se presentan condiciones de alto riesgo para la propagación de agentes patógenos en humanos. El consumo de productos lácteos no pasteurizados es un factor de riesgo para la manifestación de diversas enfermedades, entre ellas la brucelosis (Rosales, Puentes, Arias y Romero, 2020).

De acuerdo con lo anterior, en la comunidad rural de San Pablo Huixtepec, Oaxaca; una parte de la población se dedica a la ganadería bovina principalmente para la obtención de leche y su transformación a sus derivados como el queso, quesillo y crema. Al respecto, algunos productores han manifestado que sus hijos después de haber ingerido leche cruda han manifestado síntomas de enfermedades gastrointestinales. Se sospecha que la leche pueda estar contaminada con agentes patógenos, por lo que es necesario indagar la presencia de *Brucella* spp, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en dicho producto, así como documentar el manejo del ganado. El objetivo del presente estudio fue documentar el manejo de ganado bovino y la presencia de *Brucella* spp, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en la leche, en el municipio de San Pablo Huixtepec, Oaxaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue descriptivo y transversal. Se realizó en el municipio de San Pablo Huixtepec, Oaxaca (fig. 1), durante el periodo de octubre de 2018 a mayo de 2019. En la comunidad de estudio, existen 16 ganaderos que al mismo tiempo son productores de leche. Dichos individuos formaron parte de la muestra de estudio. A cada individuo se le aplicó un cuestionario para captar la edad del productor, tiempo de dedicarse a la actividad, características del ganado (edad, especie, lugar de procedencia y número de gestaciones), manejo del ganado (vacunación, alimentación, procedencia, condiciones de encierro, características del establo), manipulación del ordeño (medidas de higiene del animal, del lugar, del personal y del producto), así como el proceso de transformación de la leche a sus derivados (medidas de higiene del personal, del establecimiento y de los utensilios, condiciones de transporte de la leche, tiempo de duración en la elaboración a los derivados y condiciones de almacenamiento de los derivados).

Figura 1. *Ubicación de la localidad de estudio.*



Fuente: Elaboración propia

Posteriormente previa autorización del productor, se colectaron en frascos estériles muestras de 100 mL de leche a las vacas que se encontraban en producción, a las cuales se les determinó anticuerpos antibrucelosis por la técnica Ring Test (Moreira, 2017). Para la identificación de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp, se utilizaron las técnicas de siembra en medios de cultivos selectivos de acuerdo con la NOM-113-SSA1-1994 y la NOM-114-SSA1-1994, respectivamente. La información colectada se analizó mediante estadística descriptiva (análisis de frecuencias, medidas de tendencia central y dispersión) y χ^2 de Fisher para identificar las variables asociadas a la contaminación de leche por *Brucella* spp.

RESULTADOS

La población de estudio se formó con 16 productores correspondiente a la misma cantidad de establos. La edad promedio de los entrevistados fue de 45.2 ± 9.6 años. El tiempo de dedicarse a la actividad ganadera fue de 21.8 ± 9.4 años. La edad del ganado fue de 4.1 ± 1.7 años. La raza predominante fue la Americana (53.3%) seguida de la Holstein (43.7%). La procedencia del ganado fue principalmente de San Pablo Huixtepec (74.8%), seguido de Querétaro y diferentes municipios de Oaxaca como Zaachila, San Nicolás y Zimatlán (6.3% para cada uno, respectivamente). Cada establo cuenta con 7.9 ± 7.0 machos, 7.4 ± 5.0 hembras y 2.8 ± 1.6 gestaciones.

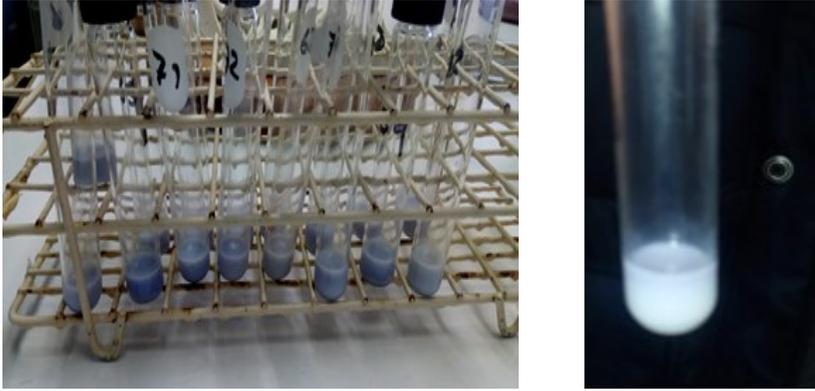
El 62.5% de los establos no cuentan con un esquema de vacunación, aunque el 100% sí realiza la desparasitación del ganado (56.3% lo realiza una vez y el 43.7% dos veces por año). Respecto a la alimentación del ganado, el 100% es obtenido en la comunidad, el 18.8% corresponde a la mezcla de alfalfa y forraje, 6.3% alfalfa con concentrado y 75.1% alfalfa con grano de maíz. Para las condiciones de encierro, el 87.5% es de lámina y está dentro del domicilio (entendiéndose como el lugar donde habita el productor y su familia), el resto solamente presenta techo de lámina y se encuentran fuera del domicilio (12.5%). Para el tipo de piso, el 81.3% es de cemento y el 18.8% de tierra. El tamaño del establo fue de 180.2 ± 280.3 m² con

15.6±12.9 animales. Todos los establos poseen comederos, bebederos y techo de lámina. El 18.8% comparten el lugar con otros animales, además de contar con fauna doméstica en el establecimiento (gallinas y perros).

Respecto al ordeño, el 31.3% lo realiza de manera mecánica a través de las máquinas ordeñadoras y el 68.8% de manera manual. El 100% de los entrevistados lavan las ubres y utilizan botas, el 93.7% lavan sus manos con jabón y el resto únicamente con agua (6.3%). El 18.8% limpia el lugar una vez al día, 43.8% dos veces, 31.3% tres veces y el 6.3% lo realiza seis veces al día. El 25% colecta la leche en los tambos de la maquina ordeñadora, el resto lo colecta en tambos de 20 L (75%). De acuerdo con las condiciones de transporte y/o almacenamiento de la leche, los productores utilizan tambos exclusivos para dicha actividad, el 56.3% utiliza tambos con tapa para el almacenamiento dentro del domicilio, el 12.5% utiliza tambos con tapa para su transporte en un vehículo y el resto utiliza tambos sin tapa para su almacenamiento dentro del domicilio (31.2%). Con respecto al tiempo de elaboración de los derivados, el 87.5% de los productores no elabora derivados lácteos, el resto los elaboran de dos a tres horas después del ordeño (12.5%), almacenando los productos en refrigeración para su posterior venta.

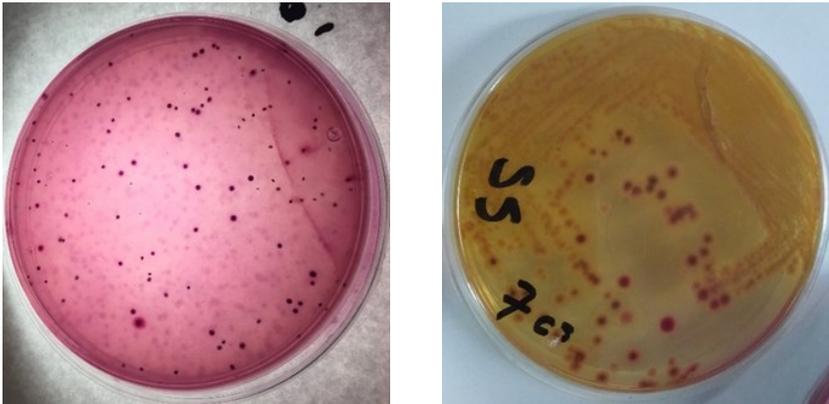
Se analizaron 117 muestras de leche correspondiente a igual número de vacas de los 16 establos. De este total, el 29.9% fueron positivas a *Brucella* spp, con un promedio de infección de 31.2±29.3% de establos, que corresponde al 79.9% de los hatos contaminados (fig. 2). Con respecto a *Escherichia coli* y *Salmonella* spp, se obtuvieron un total de 16 muestras (una por cada establo), de donde el 100% fueron positivas a ambos microorganismos (fig. 3). La variable que resultó significativa fue el tamaño del establo >101 m² para la contaminación con *Brucella* spp (tabla 1).

Figura 2. Muestras para *Brucella spp* positivas (izquierda) y negativa (derecha).



Fuente: Trabajo de laboratorio (2018).

Figura 3. Aspecto de las colonias para *Escherichia coli* (izquierda) y *Salmonella spp* (derecha).



Fuente: Trabajo de laboratorio (2018).

Tabla 1. Variables asociadas a la contaminación de leche por *Brucella* spp.

	Contaminado n(%)	No contaminad o n(%)	Total n=16 (%)	X ² de Fisher*
Tiempo dedicado a la ganadería				
>8 años	9(81.8)	2(18.2)	11(68.8)	0.547
<17 años	3(60.0)	2(40.0)	5(31.2)	
Vacunación del ganado				0.234
No	6(60.0)	4(40.0)	10(62.5)	
Si	6(100.0)	0(0.0)	6(37.5)	
Tamaño del establo				0.019**
>101 m ²	9(100.0)	0(0.0)	9(56.2)	
<100 m ²	3(42.9)	4(57.1)	7(43.8)	
Ordeña				0.245
Mecánica	5(100.0)	0(0.0)	5(31.2)	
Manual	7(63.6)	4(36.4)	11(68.8)	
Higiene del establo por día				0.585
< 2 veces	6(66.7)	3(33.3)	9(56.2)	
>3 veces	6(85.7)	1(14.3)	7(43.8)	
Presencia de fauna doméstica en el establo				0.516
Si	8(66.7)	4(33.3)	12(75.0)	
No	3(75.0)	1(25.0)	4(25.0)	
Alimento para el ganado				0.604
Alfalfa y zacate	4(66.7)	2(33.7)	6(37.5)	
Silo y alfalfa	8(80.0)	2(20.0)	10(62.5)	

* Significancia exacta bilateral

** Estadísticamente significativo

DISCUSIÓN

La prevalencia de contaminación por *Brucella* spp en la leche de ganado bovino, fue alta y es similar a algunos valores reportados a nivel nacional e internacional, oscilando entre el 5 hasta el 60% (Carrisoza, Medina, Palomares y Díaz, 2014; Méndez, Rodríguez y Sánchez, 2015; Pratim, Magnusson, Grace & Lindahl, 2018). Se identificó una variable que podría explicar la alta prevalencia encontrada en este estudio: el tamaño de los establos > 101 m² que, debido al tamaño y mayor número de ganado, están más expuestos al mal manejo o control de los animales, así como a temperaturas bajas, ausencia de luz directa y humedad elevada, lo cual provocan que el patógeno se mantenga en estado latente, tal como sucede en Tlaxcala, México (García, Ramírez, Hernández, Hernández, Díaz y Orozco, 2014). Las demás variables estudiadas no se asociaron a la

contaminación por dicho patógeno, probablemente debido al tamaño de la muestra y variables que no fueron incluidas en el presente estudio, como es el origen del agua utilizada como riego para el cultivo de las especies vegetales que se utilizan como alimento para el ganado lechero (por ejemplo, la alfalfa). Al respecto, se identificó que los campesinos utilizan las aguas residuales provenientes de la planta tratadora ubicada en la localidad (que realmente no trata las aguas contaminadas que recibe proveniente de las comunidades vecinas, solamente las almacena) para el riego de diversos cultivos, entre ellos la alfalfa. Por lo tanto, es altamente factible que se encuentren contaminadas con cargas bacterianas del tipo coliformes fecales incluyendo a la *Brucella*. Dicha situación, sugiere que sea la fuente y el origen de la contaminación. Además de lo anterior, no se realizó el análisis bacteriológico del agua de los pozos cercanos a esta planta, ya que también podría estar contaminada debido a infiltraciones provenientes de la planta tratadora de aguas residuales, lo cual podría representar la fuente de contaminación al ser utilizado para el riego de la alfalfa.

Dado que el ganado convive con otras especies de animales, es necesario profundizar en la determinación de dicho patógeno en los animales domésticos en investigaciones futuras, ya que pueden ser portadores y vectores que diseminen la infección. Es importante destacar que se observó la presencia de *Brucella* spp en diversos establos sin importar la vacunación de los animales, similar a lo reportado por Martínez, Cipolini, Storani, Russo y Martínez (2018). Sin embargo, es importante mantener este tipo de prevención, ya que ha sido un factor muy importante para promover la erradicación de dicha enfermedad en otros estados de la república mexicana (Franyuti, 2020).

La presencia del 100% de *Salmonella* spp y *E. coli* observada en el presente estudio, se debe probablemente a la mala calidad de higiene en la manipulación de la ordeña manual o mecánica. Esto es relevante, ya que no se habían realizado investigaciones similares en la comunidad de San Pablo Huixtepec, Zimatlán, Oaxaca, los resultados obtenidos son preocupantes ya que representan un riesgo

a la salud de los productores y consumidores (Aguilera, Urbano y Jaimes, 2014; Soto, Pérez y Estrada, 2016; Cogollo, Rodríguez y Calderón, 2016).

De acuerdo con lo anterior, es altamente pertinente profundizar en estudios epidemiológicos relacionados con los agentes patógenos estudiados, tanto en animales como en humanos, para dimensionar la situación real de esta infección a nivel local y regional para el estado de Oaxaca. Se recomienda realizar actividades de promoción y prevención en los diferentes grupos de personas relacionadas con el proceso productivo, enfatizando en la educación sobre aspectos técnicos sanitarios y control de factores de riesgo; así como el cumplimiento de la normatividad técnico-sanitaria en la materia (Fuentes, Ruíz, Sánchez, Ávila y Escutia, 2013).

CONCLUSIONES

La prevalencia de *Brucella spp* fue de 29.9% y de 100% por *Escherichia coli* y *Salmonella spp*. Los establos presentan malas condiciones, mal manejo del ganado y escasa higiene en el proceso de ordeño y recolección, lo que sugiere la contaminación de la leche por agentes patógenos, particularmente en los establos mas grandes. Es necesario implementar programas de capacitación en el buen manejo del ganado y obtención de leche, así como en el control de calidad de la leche y sus derivados, además de impulsar la vigilancia epidemiológica de la brucelosis y otros agentes patógenos, para disminuir el riesgo a la salud pública.

REFERENCIAS

- Aguilera B. A. M., Urbano, C. E. X. y Jaimes, B. C. P. (2014) Bacterias patógenas en leche cruda: problema de salud pública e inocuidad alimentaria. *Ciencia y Agricultura*, 11(2), 83-93. <https://doi.org/10.19053/01228420.3860>
- Carrisoza U. I., Medina, C. M., Palomares, R. E. G. y Díaz, A. E. (2014) Transmisión de *Brucella abortus* en becerras menores de tres meses diagnosticadas por medio de las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial en dos hatos lecheros del estado de Querétaro. *Número especial Veterinaria México*, 45, 11-18. <http://www.scielo.org.mx/pdf/vetmex/v45nspe/v45nspea2.pdf>

- Cogollo C. Y., Rodríguez, R. V. y Calderón, R. A. (2016) Determinación de patógenos asociados a leches crudas en empresas ganaderas doble propósito en Córdoba, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 34 (1Supl.), S1434-S1436. Doi: 10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58558
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa (1994).
- Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la determinación de salmonella en alimentos (1994).
- Franyuti K. G. A. (2020) Enfoque actual de la brucelosis en México y el mundo. *Queijos*, 6, 1-11. <https://doi.org/10.32388/CUJW20>
- Fuentes C. G., Ruíz, R. R. A., Sánchez, G. J. I., Ávila, R. D. N. y Escutia, S. J. (2013) Análisis microbiológico de leche de origen orgánico: atributos deseables para su transformación. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 10(4), 419-432. <http://www.scielo.org.mx/pdf/asd/v10n4/v10n4a3.pdf>
- García J. G., Ramírez, B. E., Hernández, V. M., Hernández, C. L. M., Díaz, A. E. y Orozco, B. H. (2014) Análisis de riesgos de la brucelosis en el estado de Tlaxcala. *Salud Pública de México*, 56(4), 355-362. Disponible en <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v56n4/v56n4a9.pdf>
- Martínez D. E., Cipolini, M. F., Storani, C. A., Russo, A. M. y Martínez, E. I. (2018) Brucelosis: prevalencia y factores de riesgo asociados en bovinos, bubalinos, caprinos y ovinos de Formosa, Argentina. *Revista Veterinaria*, 29(1), 40-44. DOI: <http://dx.doi.org/10.30972/vet.2912789>
- Méndez L. M., Rodríguez, R. E. J. y Sánchez, Z. L. M. (2015) Brucelosis, una zoonosis presente en la población: estudio de series de tiempo en México. *Salud Pública de México*, 57(6), 519-527. Disponible en <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v57n6/v57n6a10.pdf>
- Moreira Z. R. D. (2017) Concordancia entre la prueba del anillo en leche y ELISA indirecto en el diagnóstico de brucelosis bovina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 33, 93-101. <https://doi.org/10.19052/mv.4057>.
- Ocegüera M. D, Bruce, M., Frankena, K., Udo, H., van der Zijpp, A. & Rushton, J. (2015) Financial analysis of brucellosis control for small-scale goat farming in the Bajío region, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 118(4), 247-259. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2014.11.014
- Pratim D. R., Magnusson, U., Grace, D. & Lindahl J. (2018) Bovine brucellosis: prevalence, risk factors, economic cost and control options with particular reference to India- a review. *Infection Ecology & Epidemiology*, 9, 1-7. <https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1556548>
- Rosales G. C., Puentes, M. C., Arias, R. O. y Romero, Z. J. J. (2020) Aspectos epidemiológicos de la brucelosis en humanos en las Áreas Rectoras Aguas Zarcas y Los Chiles, Costa Rica, 2015-2017. *Revista Ciencias Veterinarias*, 38(1), 1-16. <http://dx.doi.org/10.15359/rcv.38-1.1>
- Schneider R. C., Diniz, S. M., Lunardi, M., Benetti, A. H., Camargo, L. M, Freitas, S. H., Lopes, N. R. & Sampaio, C. D. (2013). Prevalence of brucellosis and risk factors associated with its transmission to slaughterhouse employees in the Cuiaba metropolitan area in the state of Mato Grosso. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(5), 2367-2374. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n5p2367
- Soto V. Z., Pérez, L. L. y Estrada, A. D. (2016) Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105-122. <https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8598>.

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y CÁLCULOS TEÓRICOS DE DESCRIPTORES GLOBALES DE REACTIVIDAD DE UNA SERIE DE DERIVADOS DE TIAZOL

Fernando Mejía Zarate^{1,2}, Juan Luis Bautista Martínez^{1,3} y Francisco Emanuel Velásquez Hernández^{1,2}

RESUMEN

Introducción: La síntesis de nuevas moléculas con fines medicinales es un área muy relevante de la química orgánica. Relacionada a ella, se encuentra la química teórica y computacional, que permite mediante cálculos teóricos comprender la estructura electrónica, racionalizar tendencias de reactividad, predecir sitios de reacciones nucleofílicas o electrofílicas y determinar los posibles centros de interacción con dianas farmacológicas. Dentro de los compuestos orgánicos de interés medicinal, los derivados de tiazol son un grupo importante debido a su amplia variedad de usos farmacológicos. **Objetivo:** Realizar la síntesis, caracterización y cálculo de descriptores de reactividad de una serie de derivados de tiazol. **Materiales y métodos:** Mediante la reacción de Hantzsch, se hizo reaccionar la 2-(3,5-difluorobenciliden)hidrazina-1-carbotioamida con cuatro diferentes 2-bromoacetofenonas sustituidas, los compuestos sólidos obtenidos fueron caracterizados mediante técnicas espectrales de IR, ¹H RMN, ¹⁹F RMN y EM. Los cálculos teóricos fueron realizados a nivel semiempírico mediante el método AM1. **Resultados:** Se obtuvieron cuatro compuestos con buen rendimiento (3d, 3e, 3f y 3g). **Conclusiones:** El compuesto 3d sustituido por un grupo nitro en posición 4, se espera que sea un compuesto con alta reactividad con base en los cálculos de parámetros químicos como electronegatividad, dureza, blandura y potencial químico.

Palabras clave: electronegatividad, potencial químico, tiazol.

¹ Facultad de Ciencias Químicas, UABJO. Autor de correspondencia: fmejia.cat@uabjo.mx

² Miembro del CA Investigación Traslacional y Acompañamiento Social.

³ Miembro del CA Química, Salud y Desarrollo Regional (UABJO-CA-49)

La síntesis de nuevas moléculas con fines medicinales es un área muy importante de la química orgánica. En estrecha relación con ella, se encuentra la química teórica y computacional, que permite mediante cálculos teóricos, comprender la estructura electrónica molecular, racionalizar tendencias de reactividad, predecir sitios de reacciones nucleofílicas o electrofílicas y determinar los posibles centros de interacción con dianas farmacológicas (Krishnamurty & Pal, 2000). Dentro de los compuestos orgánicos de interés farmacológico, los derivados de tiazol son un grupo importante debido a su amplio abanico de actividad biológica (Kashyap, Garg, Sharma, Kumar, Dudhe & Gupta, 2012).

Los descriptores globales de reactividad como la electronegatividad (χ), la dureza (η), blandura (S) y el potencial químico (μ) son conceptos que predicen la respuesta de los sistemas moleculares (Ghanty & Ghosh, 1996), principalmente de la densidad electrónica cuando existe un cambio en el potencial externo y en el número de electrones (Chandra & Nguyen, 2002). Se han empleado en química, para obtener información de las propiedades electrónicas moleculares y poder predecir la reactividad química (López, Ensuncho y Robles, 2013). La electronegatividad (χ) es la capacidad de un átomo, ion o una molécula de atraer electrones hacia sí en un enlace, se puede expresar con la entidad $\chi = -\mu$ (Mulliken, 1934; Ouattara & Ziao, 2017). La dureza (η) se define como la resistencia que opone un sistema al cambio en su distribución electrónica, este parámetro mide la tendencia de reactividad de un sistema; una molécula con un valor alto de dureza presentara mayor estabilidad y menor reactividad ($\eta = \frac{I-A}{2}$) (Calvo y Pumachagua, 2015). La blandura (S) es el inverso de la dureza, las moléculas blandas sufren cambios en su densidad electrónica de forma más fácil y por lo tanto son más inestables y reactivas ($S = \frac{1}{2\eta}$) (Chabi Doco Kpota Houngue, Kpotin, Kuevi, Atohoun & Mensah, 2017). El potencial químico (μ) es el valor negativo de la electronegatividad (χ), describe la tendencia de un sistema a transferir sus electrones desde un estado de equilibrio. Los electrones fluyen

del potencial más alto al más bajo ($\mu = \frac{I+A}{2}$) (López, Ensuncho y Robles, 2013).

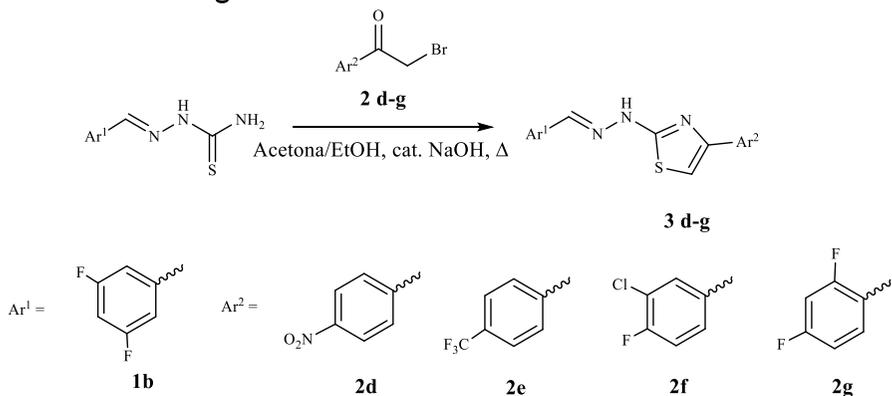
Por otra parte, las propiedades electrónicas de un sistema, se deben principalmente a los orbitales frontera; por lo tanto, se pueden aproximar los valores de los descriptores con base en la energía de estos de acuerdo al teorema de Koopmans (Koopmans, 1934), donde se establece que la energía de ionización I corresponde a la energía del *HOMO* (Highest Occupied Molecular Orbital) y la afinidad electrónica A , a la energía del *LUMO* (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) (Moncada y Salgado, 2008; Prades, Casals y Hernández, 2017), $-E_{HOMO} = I$ y $-E_{LUMO} = A$. Con los cuales se pueden utilizar las siguientes expresiones para dureza $\eta = \frac{E_{LUMO} - E_{HOMO}}{2}$, blandura $S = \frac{1}{2\eta}$, para electronegatividad y potencial químico $\mu = -\chi = \frac{E_{LUMO} + E_{HOMO}}{2}$. De acuerdo con lo anterior, el objetivo del presente estudio fue sintetizar, caracterizar mediante técnicas espectroscópicas y realizar cálculos teóricos de descriptores globales de reactividad química de una serie de derivados de tiazol.

MATERIALES Y MÉTODOS

A través de la reacción de Hantzsch (Ayati, Emami, Asadipour, Shafiee & Foroumadi, 2015), se hizo reaccionar la 2-(3,5-difluorobenciliden)hidrazina-1-carbotioamida (**1b**) (0.5 mmol) con cada una de las correspondientes 2-bromoacetofenonas sustituidas: la 2-bromo-4'-nitroacetofenona (**2d**) (0.5mmol), 2-bromo-1-(4-(trifluorometil)fenil)etan-1-ona (**2e**) (0.5 mmol), 2-bromo-3'-cloro-4'-fluoroacetofenona (**2f**) (mmol) y 2-bromo-2',4'-difluoroacetofenona (**2g**) (0.5 mmol) respectivamente, como se observa en el esquema de síntesis (fig. 1), adicionando una cantidad catalítica de NaOH y utilización de una mezcla etanol/acetona (1:1) como disolvente, a reflujo y agitación constante hasta el consumo de alguna de las materias primas. La reacción se monitoreo mediante cromatografía en capa fina (CCF). Una vez completada la reacción, se llevó a temperatura ambiente y posteriormente se evaporó el disolvente, obteniendo compuestos sólidos los cuales fueron caracterizados

mediante técnicas espectrales de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear para ^1H y ^{19}F (^1H RMN y ^{19}F RMN) y espectro de masas (EM).

Figura 1. Síntesis de derivados de tiazol.



Los cálculos teóricos de la energía de *HOMO* y *LUMO* fueron realizados a nivel semiempírico mediante el método AM1. El trabajo computacional se realizó utilizando el programa Spartan Wavefunction Inc. Versión 06, en una computadora personal Marca Toshiba con procesador Intel i5 con 8 Gb de RAM. Para realizar este proceso, las moléculas obtenidas se dividieron en dos fragmentos a partir del protón hidracinil, esto para correlacionar la influencia de los sustituyentes en el desplazamiento químico de éste y en el valor de los descriptores calculados. Para lo cual, se calculó el coeficiente de correlación, empleando el paquete de Excel 2010.

RESULTADOS

a) Síntesis y caracterización: Se obtuvieron cuatro compuestos con buen rendimiento, sus características físicas se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Características generales de los compuestos obtenidos.

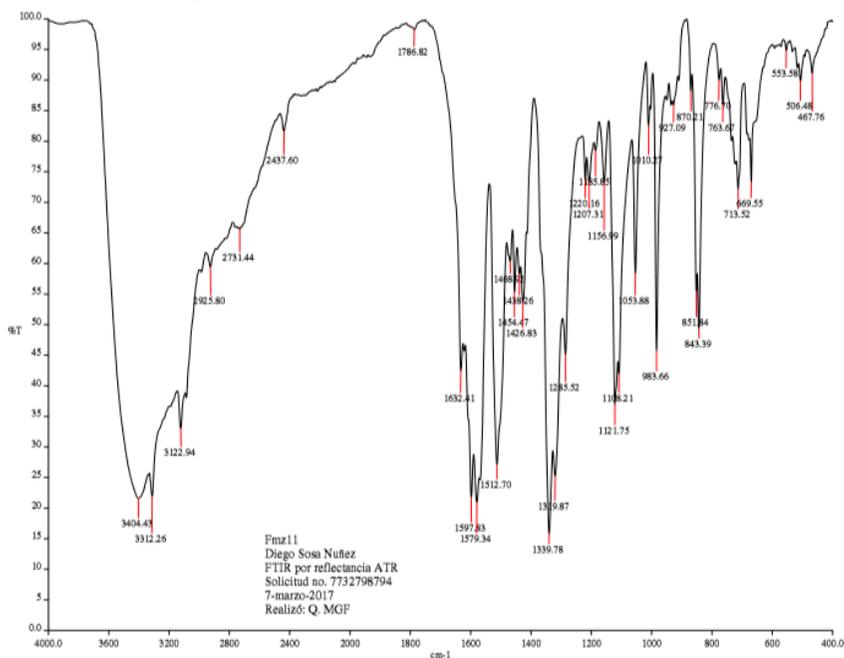
Compuesto	Forma física	Color	Punto de fusión (°C)	Formula molecular	Rendimiento (%)
3d	Polvo	Naranja	212-214	C ₁₆ H ₁₀ F ₂ N ₄ O ₂ S	73
3e	Polvo	Naranja	150-152	C ₁₇ H ₁₀ F ₅ N ₃ S	90
3f	Polvo	Blanco	158-160	C ₁₆ H ₉ ClF ₃ N ₃ S	93
3g	Polvo	Blanco	164-166	C ₁₆ H ₉ F ₄ N ₃ S	82

Para ejemplificar la caracterización completa, se describirá al compuesto **3d**. Este se obtuvo como un polvo anaranjado que fundió a 212-214°C, con rendimiento de 73%. El espectro de IR (fig. 2) mostró las siguientes bandas: 3404.43 cm⁻¹ vibración de estiramiento del enlace N-H, en 3122.94 cm⁻¹ se observó el alargamiento asignado al enlace =C-H, así también en 1597.83 cm⁻¹ presentó la vibración de estiramiento del enlace C=N, además una banda en 1512.70 cm⁻¹ generada por el estiramiento del enlace C=C, en 1339.78 cm⁻¹ se observaron los estiramientos para el enlace C-NO₂ y en 1121.75 cm⁻¹ la vibración del enlace C-F.

En el espectro de ¹H RMN (fig. 3), se observó una señal a 7.24 ppm como un triple de triples (*tt*) que integra para un hidrógeno y corresponde al protón **a** localizado en posición 4 en el anillo 3,5-difluorado. La siguiente señal corresponde a un doble de dobles (*dd*) con un desplazamiento de 7.35 ppm la cual integra para dos hidrógenos equivalentes y que es asignada a los protones **b** que se encuentran en posiciones 2,6 del anillo 3,5-difluorado. La siguiente señal se aprecia como un singlete (*s*) en 7.76 ppm y que integra para un hidrógeno, ésta es asignada al protón **c** del anillo de tiazol. La señal correspondiente al hidrógeno imínico **d** se muestra en 8.02 ppm como un singlete con un valor de integral de uno. En 8.10 ppm se presenta una señal doble que integra para dos hidrógenos equivalentes la cual es asignada a los protones **e** en las posiciones 2 y 6 del anillo nitrado. En 8.26 ppm se observa un doblete que integra para dos hidrógenos equivalentes que corresponde a los protones **f** de las posiciones 3 y 5

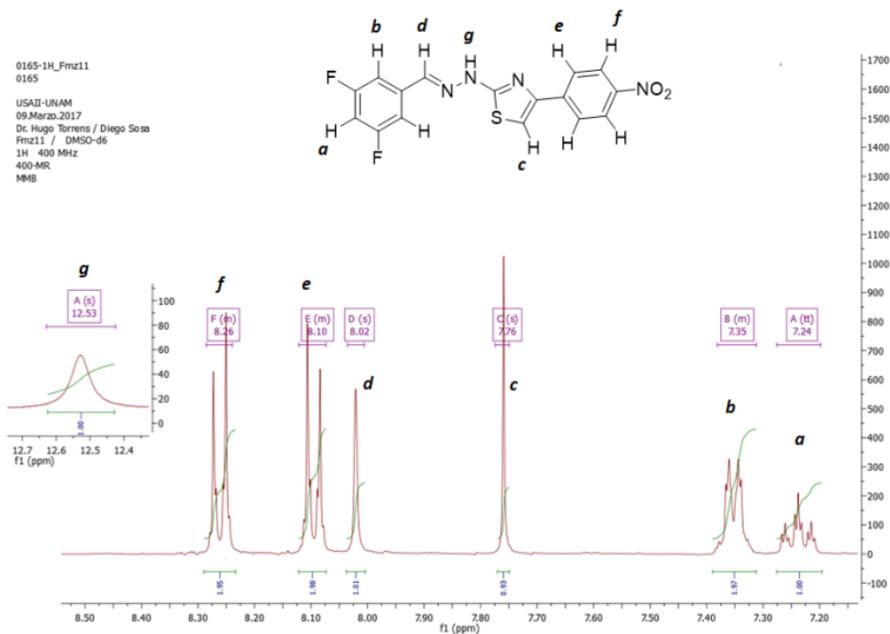
del anillo nitrado. Fuera de campo en 12.53 ppm, se localiza un singlete ancho que integra para un hidrógeno y que es asignado al protón **g** del grupo hidracinil.

Figura 2. Espectro de IR del compuesto 3d.



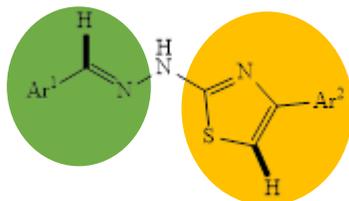
En lo que respecta a espectro de ¹⁹F RMN se observó solo una señal, lo que corrobora la estructura del compuesto ya que solo contiene un tipo de flúor. El espectro de masas proporcionó el peso molecular exacto del compuesto obtenido, mismo que confirmó el calculado previamente.

Figura 3. Espectro de ^1H RMN de 3d.



b) Cálculos teóricos computacionales: Los cálculos que se realizaron en este trabajo, tienen como objetivo conocer mediante el cálculo de descriptores de reactividad, las características y el posible comportamiento de los compuestos obtenidos, así como caracterizar la correlación de la electronegatividad (χ) con los datos experimentales de desplazamiento químico en la ^1H RMN, tomando como base la correlación observada en el protón hidracinil (fig. 4). Para este análisis, las moléculas fueron separadas en dos fragmentos tomando como referencia el protón antes mencionado. Una vez calculada la electronegatividad (χ), se procedió a realizar los cálculos de otros descriptores como la dureza (η), la blandura (S) y el potencial químico (μ).

Figura 4. Estructura general de los derivados obtenidos, se muestra en azul el protón hidracinil, el fragmento 1 en verde y fragmentos 2, 3, 4 y 5 en anaranjado.



En la Tabla 2, se observan los desplazamientos químicos de tres protones presentes en todos los derivados, el protón hidracinil, imínico y tiazólico. Como se puede apreciar, existe una tendencia descendente del desplazamiento químico con respecto al tipo de sustituyente que presentan los derivados, en primero lugar el compuesto **3d** con el grupo nitro (-NO₂), luego **3e** con el grupo trifluorometilo (-CF₃).

Tabla 2. Desplazamientos químicos experimentales (δ) de tres tipos de protones comunes en todos los derivados.

Compuesto	δ (ppm) de ¹ H RMN -		
	NN-H (hidracinil)	H-C=N (imina)	H-C=C (tiazol)
3d	12.53	8.02	7.76
3e	12.48	8.01	7.61
3f	12.44	8.02	7.50
3g	12.44	8.01	7.24

Los fragmentos que se generaron para el cálculo de la electronegatividad y el resto de los descriptores son los que se presentan en las tablas 3 y 4, también se muestran los valores de energía de *HOMO* y *LUMO*. En la tabla 3, los fragmentos se ordenaron de forma decreciente con respecto a la electronegatividad.

Tabla 3. Valores de E_{HOMO} y E_{LUMO} , electronegatividad (χ), dureza (η), blandura (S) y potencial químico (μ) de fragmento 1.

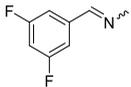
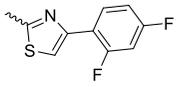
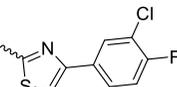
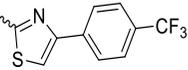
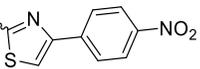
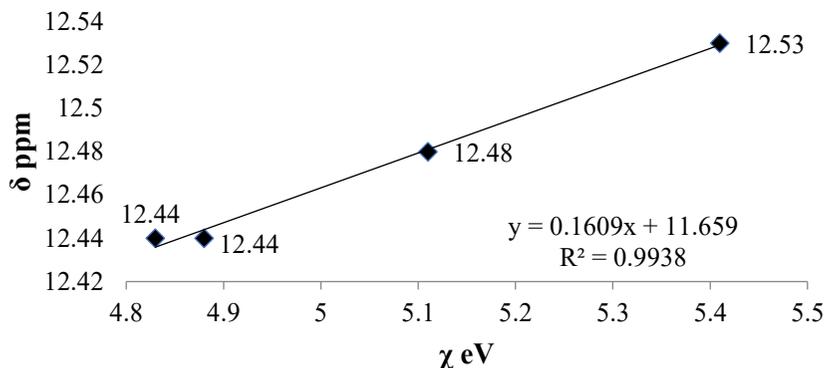
#	Fragmento	E_{HOMO}	E_{LUMO}	χ (eV)	η (eV)	S (eV ⁻¹)	μ (eV)
1		-9.99741	-0.79966	5.39	4.59	0.11	5.39

Tabla 4. Valores de E_{HOMO} y E_{LUMO} , electronegatividad (χ), dureza (η), blandura (S) y potencial químico (μ) de los fragmentos 2, 3, 4 y 5.

#	Fragmento	E_{HOMO}	E_{LUMO}	χ (eV)	η (eV)	S (eV ⁻¹)	μ (eV)	δ (ppm)
2		-8.91877	-0.74762	4.83	4.08	0.12	-4.83	12.44
3		-8.96790	-0.79527	4.88	4.09	0.12	-4.88	12.44
4		-9.33980	-0.88231	5.11	4.23	0.12	-5.11	12.48
5		-9.47371	-1.36625	5.41	4.05	0.12	-5.41	12.53

Los valores de electronegatividad fueron graficados contra el desplazamiento químico experimental, para observar la tendencia de estos dos parámetros (fig. 5), como se puede apreciar el desplazamiento químico aumenta conforme incrementa la electronegatividad, este comportamiento muestra una buena linealidad con un coeficiente de correlación de $R^2=0.9938$. El sustituyente que presenta la influencia principal, es el grupo nitro en el compuesto **3d** con un δ de 12.53 ppm y χ de 5.41 eV, seguido de **3e** sustituido con trifluorometilo. En cuanto a los valores de dureza y blandura, se puede mencionar que el fragmento **5** presente en la molécula **3d**, se espera sea el menos estable y más reactivo.

Figura 5. Electronegatividad (χ) vs desplazamiento químico (δ).



DISCUSIÓN

En el presente trabajo se sintetizaron cuatro compuestos derivados de tiazol, los cuales se encuentran sustituidos con diferentes radicales, esto con la finalidad de establecer correlaciones entre el comportamiento magnético y sus propiedades electrónicas. Referente a la síntesis, se obtuvieron compuestos con buena pureza y un adecuado rendimiento empleando la reacción de Hantzsch, tal como lo reportan Grozav *et al.* (2014), quienes prepararon derivados de tiazol con características muy similares a los obtenidos en el presente estudio. Se observaron las vibraciones esperadas en el IR para los diferentes grupos funcionales presentes en las moléculas, así también la ^1H RMN presentó las señales correspondientes; por ejemplo, la presencia de tres protones comunes en todos los derivados como el hidrógeno tiazólico que mostró un desplazamiento químico entre 7.24 y 7.76 ppm, el hidrógeno hidracinil entre 12.44 a 12.53 ppm y finalmente el hidrógeno imínico con desplazamientos entre 8.0 y 8.03 ppm en los diferentes compuestos, concuerda con lo reportado con Biernasiuk *et al.* (2019) con δ de 11.24 a 11.74 ppm y Laczowski, Sałat, Misiura, Podkowa and Malikowska (2016), que reportaron δ de 11.17 a 12.0 ppm para el protón hidrazinil, como una señal ancha en todos los casos. Con respecto a los cálculos de descriptores de reactividad, se encontró que el fragmento 5 que está

presente en el compuesto **3d** y presenta un grupo electroatractor, tiene la electronegatividad más alta y el efecto desprotector más importante, con lo que se puede apreciar que la electronegatividad tiene una relación directa con el desplazamiento químico. Así también, se predice de acuerdo con los valores de dureza y blandura, la menor estabilidad y por lo tanto, se espera que este compuesto sea el más reactivo, estos valores van en el mismo sentido con lo encontrado por Miar, Shiroudi, Pourshamsian, Oliaey & Hatamjafari (2021), en un estudio teórico de reactividad sobre algunos derivados de tiazol empleando otro nivel de cálculo como es DFT; sin embargo, aún con la diferencia de métodos de cálculo, ambos resultados convergen en que el compuesto sustituido con grupo nitro, presentará la mayor reactividad. En general, es interesante la correlación que se encuentra, sin embargo, es necesario realizar más estudios al respecto.

CONCLUSIONES

La reacción de Hantzsch es una técnica eficiente para la obtención de compuestos derivados de tiazol con buen rendimiento y pureza. Los compuestos obtenidos presentan las características espectrales correctas, por lo que la identidad corresponde a los compuestos propuestos. El método AM1 es importante por su facilidad y rapidez de proceso, principalmente para moléculas orgánicas sencillas. Se establece una correlación entre el desplazamiento químico en la ^1H RMN utilizando al protón hidracinil como referente y la electronegatividad con base al tipo de sustituyente, siendo el fragmento **5** que contiene al grupo nitro, el que presenta el desplazamiento químico a campo más bajo y la electronegatividad más alta. En cuanto a los cálculos de dureza y blandura, se establece que el compuesto **3d** presentara la reactividad más alta, ya que un valor bajo de dureza indica una molécula con tendencia a reaccionar frente a algún cambio en la densidad electrónica a su alrededor. Se espera mayor estabilidad para el fragmento 4 presente en el compuesto **3e**.

REFERENCIAS

- Ayati A., Emami S., Asadipour A., Shafiee A., Foroumadi A.I. (2015). Recent applications of 1,3-thiazole core structure in the identification of new lead compounds and drug discovery. *Eur J Med Chem*, 97,699-718. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.015>
- Biernasiuk A. Kawczyńska M., Berecka-Rycerz A., Rosada B., Gumieniczek A., Malm A., Dzitko K. & Łączkowski K. Z. (2019). Synthesis, antimicrobial activity, and determination of the lipophilicity of ((cyclohex-3-enylmethylene)hydrazinyl)thiazole derivatives. *Med Chem Res*, 28,2023–2036. <https://doi.org/10.1007/s00044-019-02433-2>
- Calvo L. G. y Pumachagua.R. (2015). Evaluación teórica de nuevos derivados nitratoxycarbono de tetraedrano. *Rev Soc Quím Perú*. 81(1),14-23. Disponible en <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v81n1/a03v81n1.pdf>
- Chabi Doco R., Kpota Houngue MTA., Kpotin G. A., Kuevi U. A., Atohoun YGS., Mensah J-B. (2017). Comparative Study of the Antioxidant Properties of Trolox, Ascorbic Acid and Butyl Hydroxytolene (BHT) by the Methods of Quantum Chemistry. *J Chem Pharm Res*, 9(5),231-23. Disponible en <https://www.jocpr.com/articles/comparative-study-of-the-antioxidant-properties-of-trolox-ascorbic-acid-and-butyl-hydroxytolene-bht-by-the-methods-of-qu.pdf>
- Chandra A. K. and Nguyen M. T. (2002). Use of local softness for the interpretation of reaction mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.*, 3(4),310-323. <https://doi.org/10.3390/i3040310>
- Ghanty T. K. and Ghosh S. K. (1996). A density functional approach to hardness, polarizability, and valency of molecules in chemical reactions. *J Phy. Chem*, 100(30),12295-12298. <https://doi.org/10.1021/jp960276m>
- Grozav A., Găină L., Pilecki V., Crisan O., Silaghi-Dumitrescu L., Therrien B., Zaharia V. and Berindan-Neagoe L. (2014). The synthesis and antiproliferative activities of new arylidene-hydrazinyl-thiazole derivatives. *Int J Mol Sci*, 15(12),22059-22072. <https://doi.org/10.3390/ijms151222059>
- Kashyap S., Garg V.K., Sharma P.K., Kumar N., Dudhe R. & Gupta J.K. (2012). Thiazoles: having diverse biological activities. *Med Chem Res*. 21,2123-2132. <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9685-2>
- Koopmans T. (1934). Über die zuordnung von wellenfunktionen und eigenwerten zuden einzelnen elektronen einer atoms. *Physica*, 1(1-6),104-113. [https://doi.org/10.1016/S0031-8914\(34\)90011-2](https://doi.org/10.1016/S0031-8914(34)90011-2)
- Krishnamurty S. and Pal S. (2000) Intermolecular reactivity trends using the concept of group softness. *J. Phys. Chem. A*, 104(32),7639-7645. <https://doi.org/10.1021/jp0010280>
- Łączkowski K.Z., Sałat K., Misiura K., Podkowa A. and Malikowska N. (2016). Synthesis and anticonvulsant activities of novel 2-(cyclopentylmethylene)hydrazinyl-1,3-thiazoles in mouse models of seizures. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(6),1576–1582. <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1158172>
- López J.M., Ensuncho A.E. y Robles J. (2013). Estudio teórico de la reactividad química y biológica de cisplatino y algunos derivados con actividad anticancerosa. *Información Tecnológica*. 24(3),3-14. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000300002>
- López J.M., Ensuncho A.E. y Robles J.R. (2013). Descriptores globales y locales de la reactividad para el diseño de nuevos fármacos anticancerosos basados en cis-platino(II). *Quim Nova*, 36,(9):1308-1317. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000900006>
- Miari M., Shiroudi A., Poursamsian K., Oliaey A. R. and Hatamjafari, F. (2021). Theoretical investigations on the HOMO–LUMO gap and global reactivity descriptor studies, natural bond orbital, and nucleus-independent chemical shifts analyses of 3-phenylbenzo[d] thiazole-2(3H)-imine and its para-substituted derivatives: Solvent and substituent effects. *Journal of Chemical Research*, 147-158. <https://doi.org/10.1177/1747519820932091>
- Moncada J.L. y Salgado M.G. (2008). Caracterización de la reactividad intrínseca de los halobenzenos en el modelo conceptual de la teoría de funcionales de la densidad (TFD). *Quim. Nova*, 31(5),1255-1258. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500057>
- Mulliken R.S. (1934). A new electron affinity scale; together with data on valence states and on valence ionization potentials and electron affinities. *J. Chem. Phys.*, 2,782–793. <https://doi.org/10.1063/1.1749394>

- Ouattara O. and Ziao N. (2017). Quantum chemistry prediction of molecular lipophilicity using semi-empirical AM1 and Ab Initio HF/6-311++G Levels. *Computational Chemistry*, 5(1),38-50. <https://doi.org/10.4236/cc.2017.51004>
- Prades E.E., Casals H. M. y Hernández M.Y. (2017). Algunas propiedades moleculares de la 2-Hidroxiimino-1-feniletanona tiosemicarbazona utilizando aproximaciones teóricas. *Rev Cubana Quím*, 29(3),390-405. Disponible en <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443552968005>

UN MÉTODO EN FLUJO RÁPIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN MUESTRAS DE ALIMENTOS

Willmann Antonio Jiménez Morales¹ y María del Pilar Cañizares Macias²

RESUMEN

Introducción: El ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) es uno de los métodos más utilizados para la estimación de la capacidad antioxidante por captación de radicales peroxilo. A pesar de las muchas ventajas que tienen las metodologías actuales, los tiempos de análisis siguen siendo muy largos para este ensayo. En este trabajo se tiene como **objetivo:** desarrollar una metodología analítica para determinar la capacidad antioxidante de muestras alimenticias, empleando un sistema de análisis por inyección secuencial (SIA, por sus siglas en inglés). Los **materiales y métodos** fueron un sistema SIA con detección por fluorescencia, reactivos propios del ensayo, y muestras alimenticias. Los **resultados** de este trabajo fueron: que el método propuesto mejoró notablemente el tiempo de análisis de 90 minutos necesarios en el método estándar a 5 min por el método SIA, además se logró la reducción en consumo de reactivo y volúmenes empleados. Dicho método mostró una excelente precisión (DER <3%) con un límite de detección de 3.13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y porcentaje de recobro del 94.61%. En **conclusión:** los resultados del método SIA no mostraron una diferencia significativa con el método estándar al ser aplicado en muestras alimenticias, lo cual, lo convierte en otra alternativa confiable para determinar capacidad antioxidante.

Palabras clave: Análisis por inyección secuencial, bebidas, extractos, ORAC.

Parte del contenido de este trabajo, fue publicado en la revista Food Chemistry: Willmann Antonio Jiménez-Morales, María del Pilar Cañizares-Macias, José Pedraza-Chaverri. Fast ORAC-SIA method for antioxidant capacity determination in food samples. Food Chemistry, Volume 384, 2022, 132524, ISSN 0308-8146.

¹ Estudiante de Doctorado en Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. **Autor de correspondencia:** gfb.willmann.antonio@gmail.com.

² Profesor Investigador de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Los antioxidantes se han convertido en los compuestos esenciales del mundo nutricional, siendo significativos por su capacidad para proteger el daño celular oxidativo, que puede derivar en enfermedades como Alzheimer, cáncer, afecciones cardíacas, entre otras (Rajendran et al., 2014). Por tanto, es relevante conocer la importancia que juegan los antioxidantes como sustancias que retrasan, previenen o eliminan el daño oxidativo a una molécula diana (Halliwell & Gutteridge, 2015; Pisoschi & Pop, 2015).

Informes anteriores sugieren que varios antioxidantes endógenos y exógenos neutralizan los radicales libres y protegen el cuerpo manteniendo los equilibrios redox (Pham-Huy et al., 2008). Además, estos antioxidantes en ocasiones muestran un efecto sinérgico entre ellos, lo que resulta en una sobreestimación de su acción combinada (Antolovich et al., 2002; Sánchez-Moreno, 2002). De esta manera, la capacidad antioxidante total de los alimentos se considera como la suma de las interacciones redox sinérgicas entre las proporciones de todas las moléculas presentes en ellos (Pellegrini et al., 2003).

Varios ensayos como el ABTS^{•+} (radical catiónico 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) (Miller et al., 1993), el DPPH[•] (Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (Brand-Williams et al., 1995; Herald et al., 2012), la prueba del poder antioxidante reductor férrico (FRAP) (Benzie & Strain, 1996; Jiménez et al., 2008), entre otros, han sido propuestos para evaluar la capacidad antioxidante; pero generalmente consumen un tiempo de análisis prolongado, están limitados por las condiciones de pH, el disolvente y el tipo de muestra. La prueba de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) es uno de los métodos más utilizados para estimar la capacidad de captación de radicales peroxilo, debido a la similitud que tiene con el mecanismo de degradación oxidativa de los lípidos (Cao et al., 1993; López-Alarcón & Denicola, 2013; Prior, 2015; Re et al., 1999). El método ORAC se basa en una reacción cinética competitiva que involucra un generador de radicales libres, una sonda molecular oxidativa y un antioxidante. De esta forma, se mide la degradación

oxidativa de una molécula fluorescente, como la fluoresceína, después de mezclarla con un generador de radicales libres como el dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) (AAPH). A medida que avanza la reacción, la intensidad de la fluoresceína decae; por otro lado, cuando se agrega un compuesto antioxidante, se inhibe la descomposición de la fluorescencia (Huang et al., 2005).

Huang y colaboradores en 2002, desarrollaron y validaron un ensayo ORAC mejorado utilizando fluoresceína como sonda fluorescente y lo adaptaron a un formato de lector de microplacas de 96 pocillos. A pesar de las mejoras al método, aún se identifican dificultades y limitaciones, como el mal dispensado entre pozos que produce un error sistemático, provocando diferencias estadísticamente significativas en la determinación de capacidad antioxidante de disoluciones estándar en función de la posición de su placa (Mellado-Ortega et al., 2017).

Por ello, aplicar metodologías de análisis de flujo para determinar la capacidad antioxidante brinda ventajas significativas como la reproducibilidad del tiempo y la señal analítica, que son características importantes cuando la medición involucra reacciones con diferencias cinéticas (Kurbanoglu et al., 2018; Lima et al., 2005; Magalhães et al., 2009; Martins et al., 2013; Polášek et al., 2004). Otra característica es el control por computadora, que permite sistemas ajustables y flexibles a los parámetros de flujo sin manipulación física en el colector (Kolev, 2008). Sin embargo, la implementación de metodologías de flujo para determinar la actividad antioxidante no está muy explotada para el ensayo ORAC.

En el presente trabajo, publicado en la revista *Food Chemistry* (Jiménez-Morales et al., 2022), se propone un novedoso método SIA para determinar la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC utilizando fluoresceína como sonda oxidativa, sin tiempos de reacción prolongados y midiendo la altura de pico de la señal analítica. Los parámetros fisicoquímicos e hidrodinámicos se optimizaron mediante diseños de experimentos de superficie de respuesta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. La fluoresceína, el diclorhidrato de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) (AAPH), el ácido (\pm) -6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) y la vainillina se adquirieron de Sigma -Aldrich y fueron utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante. Fue preparado una disolución amortiguadora de fosfatos (Phosphate-Buffered Saline, PBS por sus siglas en inglés) $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$ a pH 7 y se almacenó a 4°C durante un máximo de 15 días. Se prepararon una solución madre de fluoresceína ($0.6 \mu\text{mol L}^{-1}$) y una solución madre Trolox ($400 \mu\text{mol L}^{-1}$) en PBS y se almacenaron a 4°C en ausencia de luz. A partir de las soluciones madre, se prepararon diariamente soluciones estándar para construir las curvas de calibración. Además, se utilizó una solución de 0.05 mol L^{-1} de AAPH en PBS.

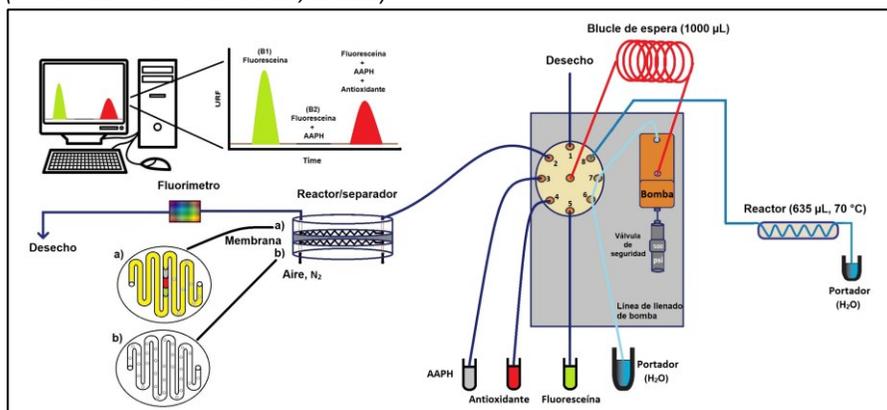
Muestras

Las muestras de alimentos analizadas fueron néctar de arándano, néctar de uva, jugo de uva y arándano, néctar de manzana, arándano, vino tinto carmenere y vino tinto merlot, granos de café (honey y lavado) y vainas de vainilla compradas en supermercados locales de Ciudad de México. Las muestras se analizaron utilizando el método propuesto ORAC-SIA y el método estándar de microplaca ORAC. Los extractos de vainilla se obtuvieron de las vainas de vainilla mediante el uso de un horno microondas focalizado Maxidigest MX 350 siguiendo la literatura reportada (Rojas-López & Cañizares-Macías, 2013), después de la extracción, los extractos se filtraron y se recogieron. Para los extractos de café, en primer lugar, se pesaron 0.9 g de café molido y se mezclaron en 20 mL de agua destilada a 87°C con agitación magnética durante 5 min; luego se filtraron y recolectaron. Todas las muestras se diluyeron en agua destilada.

Construcción de la configuración ORAC-SIA

La fig. 1, muestra la representación esquemática del colector SIA para determinar la capacidad antioxidante por ORAC. Las disoluciones de reactivos y muestras se aspiraron y propulsaron a través de una válvula multiposición de 8 puertos integrada en el equipo FIALab SICrom. El sistema de detección consistió en un fluorómetro de tubo fotomultiplicador Fialab (PMT-FL) equipado con filtros de emisión y excitación ($\lambda_{ex} = 486 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$) y una celda de flujo Hellma de 10 mm de paso óptico. La programación de la inyección secuencial se logró mediante el control computarizado de la válvula multiposición y la bomba de jeringa incorporada al equipo, utilizando el software FIALab.

Figura 1. Representación esquemática del sistema de inyección secuencial para evaluar capacidad antioxidante por el método ORAC (Jiménez-Morales et al., 2022).



Procedimiento del método ORAC-SIA

En el ensayo ORAC, la capacidad antioxidante de la muestra, reactivo o analito depende de la intensidad registrada por la fluoresceína, que disminuye continuamente debido a la oxidación que sufre al reaccionar con radicales peroxilo (AAPH). Cuando hay un compuesto antioxidante, la disminución de la señal de fluorescencia es mayor o menor dependiendo del poder antioxidante. Por lo tanto,

el método ORAC-SIA consistió en dos pasos de medición: 1) disminución de la intensidad de la fluoresceína por reacción con AAPH, y 2) protección de la intensidad de la fluoresceína por la presencia de un antioxidante. En la Tabla 1, se muestra la programación de ORAC-SIA.

Tabla 1. Programación del sistema SIA para evaluar capacidad antioxidante por ORAC (Jiménez-Morales et al., 2022).

Paso	Acción	Válvula de inyección (puerto)	Descripción	Caudal ($\mu\text{L/s}$)	Dirección de flujo	Tiempo (s)
1	Llenado de bomba	6	La bomba es llenada con 3.5 mL de agua.	50	Inverso	70
2	Aspirado AAPH $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$	3	Se aspira $10 \mu\text{L}$ del reactivo AAPH al bucle de espera.	10	Inverso	1
3	Aspirado antioxidante	4	Se aspira $10 \mu\text{L}$ del Antioxidante al bucle de espera.	10	Inverso	1
4	Aspirado fluoresceína $2.25 \mu\text{mol L}^{-1}$	5	Se aspira $10 \mu\text{L}$ del reactivo fluoresceína al bucle de espera.	10	Inverso	1
5	Dispensado hacia el reactor	8	Se dispensa $400 \mu\text{L}$ del bucle de espera al reactor.	20	Hacia delante	20
6	Aspirado hacia el bucle de espera	8	Se aspira $600 \mu\text{L}$ del reactor al bucle de espera.	20	Inverso	30
7	Dispensado hacia el detector	2	Se dispensa $3730 \mu\text{L}$ del bucle de espera al detector.	20	Hacia delante	186.5

Medición de la capacidad antioxidante

Para cuantificar la capacidad antioxidante, se midió la intensidad máxima del pico SIA (señal analítica) de fluoresceína cuando el compuesto antioxidante/muestra se aspira junto con fluoresceína y AAPH, y posteriormente se transformó a porcentajes

de protección utilizando dos blancos de referencia: señal de fluoresceína sin AAPH (B1) y señal de fluoresceína con AAPH (B2). El valor del porcentaje de protección (%PP) se definió como el grado de protección de la intensidad de la fluoresceína con AAPH al aspirar una concentración de antioxidante definida utilizando la expresión matemática:

$$\%PP = \frac{I_S - I_{B2}}{I_{B1} - I_{B2}} \times 100$$

donde I_S representa la intensidad de la señal después de la reacción entre la muestra, AAPH y fluoresceína; I_{B1} e I_{B2} corresponden a las intensidades de las señales en blanco de fluoresceína sin y con AAPH, respectivamente. Para calcular el porcentaje de reacción (% PR), el porcentaje de protección calculado (% PP) se restó al 100%.

Optimización del método ORAC-SIA

Se utilizó un diseño compuesto central en 2 bloques con 3 puntos centrales por bloque (14 experimentos), para optimizar las concentraciones de fluoresceína y AAPH, tomando como variables de respuesta: porcentajes de reacción entre fluoresceína y AAPH sin antioxidante y el porcentaje de protección utilizando vainillina a 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Usando fluoresceína 2.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y AAPH 0.05 mol L^{-1} , tomando como variable de respuesta el porcentaje de reacción entre el AAPH y la fluoresceína, se evaluaron los tiempos de espera deteniendo el flujo en el reactor a 30, 20, 10 y 0 s. A través de un diseño de experimento factorial 2^2 , se optimizaron los volúmenes de aspirado y caudales para AAPH 0.05 mol L^{-1} , fluoresceína 2.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y vainillina 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a volúmenes de 5 y 10 μL y caudales de 5 y 20 $\mu\text{L s}^{-1}$, tomando como variables de respuesta el porcentaje de reacción y protección.

Validación del método ORAC-SIA

Para la estimación del intervalo lineal, se prepararon estándares de trolox a concentraciones de 10 hasta 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a partir de una solución madre de 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Una vez establecido el

intervalo lineal, diariamente durante siete días se prepararon curvas de calibración para construir una curva de calibración promedio. La reproducibilidad y repetibilidad *intra* del laboratorio se evaluó preparando por duplicado durante siete días disoluciones acuosas de vino carmenere al 0.2% de concentración, determinando la capacidad antioxidante de cada una expresada en $\mu\text{mol L}^{-1}$ de trolox. Los resultados fueron analizados a través de una ANOVA de un factor. El porcentaje de recobro se determinó a partir de una muestra de jugo de arándano al 0.66% fortificado con $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de trolox.

RESULTADOS

Optimización del método propuesto

Por medio del software STATGRAPHICS se realizó el análisis de los datos a través de un ANOVA teniendo como objetivo maximizar el %PP. Con un nivel de significancia de 95%, el análisis del diseño mostró que las concentraciones de AAPH y fluoresceína influyen de manera negativa sobre la respuesta y afectan significativamente la cuantificación de la capacidad antioxidante. Para el caso del volumen de aspirado y caudales, ambos factores influyen de manera positiva, pero no afectan significativamente sobre la medición y sin presentar interacciones. Por tanto, los valores óptimos de las concentraciones de fluoresceína y AAPH fueron de $2.25 \mu\text{mol L}^{-1}$ y 0.05mol L^{-1} , al usar concentraciones de 25 y $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ del estándar de vainillina. En cuanto a los diferentes tiempos de espera deteniendo el flujo para la reacción, no se observaron diferencias significativas al suprimir dicho tiempo, por lo que la reacción no necesitó de un tiempo de reacción. Por otro lado, para los volúmenes de aspirado y caudales se obtuvieron los valores de $10 \mu\text{L}$ de volumen aspirado y un caudal de $20 \mu\text{L s}^{-1}$ al emplear vainillina a $25 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Parámetros de validación del método ORAC-SIA

Con la finalidad de obtener un mejor estimado de la curva de calibración entre un día y otro, se decidió construir una curva

diariamente durante 7 días, para obtener una curva promedio. Dicha curva se utilizó en la cuantificación de capacidad antioxidante, teniendo como pendiente 1.15 ± 0.02 , ordenada al origen 3.89 ± 0.89 , límites de detección y cuantificación de 3.13 y 9.48 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente y un intervalo lineal de 10 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Al evaluar la repetibilidad y reproducibilidad, se obtuvieron porcentajes de repetibilidad y reproducibilidad de 1.96 y 2.60%. El porcentaje de recobro fue 94.61%.

Evaluación de la capacidad antioxidante en muestras alimenticias

Para comparar el ensayo ORAC por SIA y por microplaca, se midieron capacidades antioxidantes de 9 muestras por ambos métodos, utilizando diluciones acuosas. En la tabla 2, se presentan las capacidades antioxidantes de las muestras evaluadas por ambos métodos, expresando los resultados en μmol de trolox por mL de muestra correspondiente a la curva de calibración de cada método. Después de realizar una prueba estadística de t de Student para datos emparejados, se determinó con un 95% de confiabilidad (α de 0.05 a dos colas), que ambos métodos no muestran diferencias significativas en sus resultados ($t_0 = 0.84$ y $t_c = 2.26$).

Tabla 2. Comparación de valores de capacidad antioxidante expresados en $\mu\text{mol trolox mL}^{-1}$ de muestra, realizados por el método SIA y microplaca (Jiménez-Morales et al., 2022).

Muestras	SIA Capacidad antioxidante ^a	Microplaca Capacidad antioxidante ^a
Extracto de vainilla	42.99 ± 4.60	43.49 ± 1.51
Vino tinto Merlot	21.94 ± 0.99	20.23 ± 2.02
Vino tinto Carmenere	18.84 ± 2.65	17.97 ± 2.85
Extracto de café Honey	7.27 ± 0.61	6.98 ± 0.00
Extracto de café lavado	9.57 ± 0.03	9.59 ± 0.12
Néctar de manzana con arándano	4.04 ± 0.09	3.94 ± 0.19
Néctar de uva	2.45 ± 0.16	2.70 ± 0.24
Jugo de uva y arándano	2.74 ± 0.25	3.15 ± 0.28
Néctar de arándano	1.74 ± 0.03	1.78 ± 0.01

^a Unidades expresadas en $\mu\text{mol trolox mL}^{-1}$ de muestra.

DISCUSIÓN

Al no haber diferencias significativas en los valores de capacidad antioxidante de las 9 muestras analizadas tanto por SIA y lote, quedó demostrado que el método ORAC por SIA puede ser utilizado como alternativa para cuantificar la capacidad antioxidante de muestras como extractos y bebidas, mostrando una correlación del 99% con el método en lote de referencia. El tiempo de reacción fue reducida de 90 min por el método en microplaca a 5 min por SIA, permitiendo analizar 4 muestras por triplicado en una hora, se incrementó la energía de activación para llevar a cabo la reacción entre fluoresceína y AAPH, dando como resultado el no requerir un tiempo de espera pausando el flujo en el sistema para que proceda la reacción. Fue necesario el uso de una celda de extracción para eliminar el exceso de burbujas formadas por la reacción. Acorde a los criterios de la AOAC (AOAC International, 2002), los valores de la validación se encuentran dentro de los rangos aceptables para precisión intermedia ($\leq 3\%$ RSD) y recuperación (85-110%), lo que nos demuestra que la metodología no solo es precisa, de igual forma no presenta efecto matriz.

CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un nuevo método de flujo ORAC para medir la capacidad antioxidante en muestras de alimentos utilizando un sistema SIA. El nuevo método es más simple, barato, rápido y eficiente, en comparación con el método de microplacas. Las principales ventajas del método propuesto incluyen la reducción del tiempo de reacción y la concentración del reactivo AAPH, así como excelente precisión, por lo que reduce los errores de medición. El método proporciona una frecuencia de muestreo de 12 muestras por hora. La configuración ORAC-SIA que aquí se propone, es una estrategia ecológica que puede ayudar a reducir los efectos nocivos de las actividades analíticas y muestra un gran potencial como metodología alternativa, para cuantificar la capacidad antioxidante de

muestras de alimentos, pudiendo ser fácilmente implementada en la industria alimentaria.

REFERENCIAS

- Antolovich M., Prenzler P. D., Patsalides E., McDonald S. & Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183–198. <https://doi.org/10.1039/b009171p>
- AOAC International. (2002). Guidelines for single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1661). https://members.aoac.org/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf
- Benzie I. F. F. & Strain J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E. & Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cao G., Alessio H. M. & Cutler R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 303–311. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90027-R](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90027-R)
- Halliwell B. & Gutteridge J. M. C. (2015). Free radicals in biology & medicine. In *Oxford University Press: Vol. 5 ed.* <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>
- Herald T. J., Gadgil P. & Tilley M. (2012). High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(11), 2326–2331. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5633>
- Huang D., Boxin Ou. & Prior R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Jimenez D., Giuffrida F., Vanrobaeys F., Golay P. A., Cotting C., Lardeau A. & Keely B. J. (2008). High-throughput methods to assess lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of food extracts in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3470–3477. <https://doi.org/10.1021/jf703723s>
- Jiménez-Morales W. A., Cañizares-Macias M. del P. & Pedraza-Chaverri J. (2022). Fast ORAC-SIA method for antioxidant capacity determination in food samples. *Food Chemistry*, 384, 132524. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132524>
- Kolev S. D.M. (2008). Advances in flow injection analysis and related techniques. In *Comprehensive Analytical Chemistry*, 54. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(08\)00615-6](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(08)00615-6)
- Kurbanoglu S., Unal M. A. & Ozkan S. A. (2018). Recent developments on electrochemical flow injection in pharmaceuticals and biologically important compounds. *Electrochimica Acta*, 287, 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.04.217>
- Lima M. J. R., Tóth I. v. & Rangel A. O. S. S. (2005). A new approach for the sequential injection spectrophotometric determination of the total antioxidant activity. *Talanta*, 68(2), 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.06.058>
- López-Alarcón C. & Denicola A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>
- Magalhães L. M., Santos M., Segundo M. A., Reis S. & Lima J. L. F. C. (2009). Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta*, 77(5), 1559–1566. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.10.034>
- Martins A. C., Bukman L., Vargas A. M. M., Barizão É. O., Moraes J. C. G., Visentainer J. v. & Almeida V. C. (2013). The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system : Optimising the conditions using the response surface methodology. *Food Chemistry*, 138(1), 574–580. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.143>

- o Mellado-Ortega E., Zabalgoageazcoa I., Vázquez de Aldana B. R. & Arellano J. B. (2017). Solutions to decrease a systematic error related to AAPH addition in the fluorescence-based ORAC assay. *Analytical Biochemistry*, 519, 27–29. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.009>
- o Miller N. J., Rice-Evans C., Davies M. J., Gopinathan V. & Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407–412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>
- o Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., del Rio D., Salvatore S., Bianchi M. & Brighenti F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, 133(9), 2812–2819. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>
- o Pham-Huy L. A., He H. & Pham-Huy C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89–96. <https://doi.org/10.17094/ataunivbd.483253>
- o Pisoschi A. M. & Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- o Polášek M., Skála P., Opletal L. & Jahodář L. (2004). Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379(5–6), 754–758. <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2559-4>
- o Prior R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 18, 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>
- o Rajendran P., Nandakumar N., Rengarajan T., Palaniswami R., Gnanadhas E. N., Lakshminarasaiah U., Gopas J. & Nishigaki I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, 436, 332–347. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>
- o Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Min Y. & Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10), 1231–1237.
- o Rojas-López A. & Cañizares-Macías M. P. (2013). Antioxidant capacity in vanilla extracts obtained by applying focused microwaves. *Food and Nutrition Sciences*, 4(08), 244–253. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.48A030>
- o Sánchez-Moreno C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121–137. <https://doi.org/10.1106/108201302026770>

CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA UTILIZANDO COMO AGENTE REDUCTOR *ALOE VERA*

Yareth Aparicio Luna¹ y Antonio Canseco Urbietta^{1,2}, Ivonne Arisbeth Díaz Santiago^{1,2} y Yosemite Arjuna León Nataret³

RESUMEN

Introducción: El término nanopartícula se refiere a aquella partícula donde una o más de sus dimensiones miden menos de 0.1 milésimas de milímetro (100 nanómetros). La síntesis de nanopartículas de plata en disolución requiere del empleo de métodos que permitan obtener un control preciso sobre el tamaño y la forma de las nanopartículas. Un factor que influye en su morfología, es el uso del agente reductor, el borohidruro de sodio es el más empleado; sin embargo, su mal uso puede provocar daños a la salud y al ambiente. **Objetivo:** Caracterizar nanopartículas de plata a través de la reducción del metal ($\text{Ag}^{+1} \rightarrow \text{Ag}^0$) usando extracto de *Aloe vera*. **Materiales y métodos:** Se obtuvo el extracto de *Aloe vera* y se agregaron volúmenes distintos de dicho extracto a una solución de nitrato de plata 0.001 M y polivinilpirrolidina 0.001 M, se dejó reposar por 48 horas y se observó por microscopía de fuerza atómica, para describir la morfología de las nanopartículas de plata. **Resultados:** Después de transcurridas las 48 horas, se observó el cambio de coloración, pasando de incoloro a café, identificándose las nanopartículas de plata con morfologías triangulares y esféricas. **Conclusiones:** El extracto de *Aloe vera* es una alternativa como agente reductor para la síntesis de nanopartículas de plata, mientras que el uso de polivinilpirrolidina, mejoró su dispersión.

PALABRAS CLAVE: *Aloe vera*, nanopartículas, plata, polivinilpirrolidina.

¹ Facultad de Ciencias Químicas, UABJO. Autor de correspondencia: urbietta.gfb@gmail.com

² Miembro del CA Investigación Traslacional y Acompañamiento Social.

³ Instituto de Nanotecnología Aplicada. CEO-Spectronics Corporation, Tultepec, México.

La ciencia de los nanomateriales trata acerca de la síntesis, exploración y búsqueda de las posibles aplicaciones de nanopartículas (NPs), caracterizadas a su vez por tener al menos una de sus dimensiones en el rango de los nanómetros (González, 2015). Lo que hace relevante su estudio, es que su comportamiento va a depender de sus propiedades que pueden ser controladas modificando su tamaño y forma (Mendoza, 2003).

Las nanopartículas de plata (NPs-Ag), se han incorporado a diversos materiales, ya que tienen diferentes aplicaciones biomédicas por su alto efecto antimicrobiano demostrado contra especies de bacterias tanto gram positivas como negativas (Liu, Dai, Fu & Hsu, 2010); en dimensiones nanométricas manifiestan propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes a la misma materia, pero en escala mayor (Foladori, 2016). Además, presentan una toxicidad nula en tejidos humanos al utilizarse en bajas concentraciones, por lo que son ampliamente utilizadas en el área médica como acondicionadores de tejidos, catéteres, cubierta de materiales, así como en algunos productos dentales (Allaker, 2010).

La síntesis de NPs-Ag en disolución, requiere del empleo de métodos que permitan obtener un control preciso sobre el tamaño y la forma de las NPs, para así conseguir un conjunto de partículas libres que presenten una propiedad determinada. Uno de los métodos más importantes, es el de Top-down, que por sus características se basa en partir de un material macroscópico y mediante técnicas físicas se logra un producto nanométrico (Leyva, 2013). Este método emplea como reductor al borohidruro de sodio (NaBH_4), el cual permite obtener NPs estables con un tamaño y morfología adecuada, pero la toxicidad de dicho reductor hacia la salud y al ambiente es considerable, por tal motivo, se ha optado por reemplazarlo mediante extractos vegetales, los cuales permiten la obtención de dispersiones estables (Flores, 2014), constituyendo al método denominado síntesis verde o método Green, debido a la menor cantidad de desechos tóxicos que produce.

Dicho método, consiste en utilizar componentes orgánicos de elementos vegetales como extracto de flores, frutos, cáscaras, entre otros, como agentes reductores capaces de disminuir a escala nanométrica las NPs-Ag (Cardeño y Londoño, 2014). Al respecto, la *Aloe vera* es una planta constituida por una mezcla compleja de compuestos como vitaminas, minerales, alicina, saponinas, carbohidratos, enzimas, aminoácidos y lípidos (Domínguez-Fernández et al., 2012), además de poseer propiedades benéficas para la salud, presenta potencial como agente reductor.

Finalmente, para caracterizar las NPs-Ag, es necesario el uso de la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM de sus siglas en inglés Atomic Force Microscope), siendo su principal aplicación la creación de imágenes de superficies en alta resolución (García, 2016); cuyas mediciones son realizadas mediante el reflejo de un láser en la parte posterior de una sonda, el cual al ser reflejado incide en un fotodetector que manda la información al controlador del microscopio para poder generar la imagen (López y Solares, 2014), convirtiéndose en una técnica importante en el análisis de la superficie de materiales, que permite construir una imagen en 3D de la zona de estudio para observar sus características morfológicas en bajas dimensiones (desde decenas de nanómetros hasta algunos cientos de micrómetros), además de obtener información de las propiedades mecánicas y eléctricas de las muestras que se estudian (Hernández y Karthik, 2018). De acuerdo con lo anterior, el objetivo del presente estudio fue caracterizar nanopartículas de plata empleando como agente reductor el extracto de *Aloe vera*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El método de síntesis empleado fue la combinación de los métodos de Química verde y Top-down. Se prepararon soluciones estándares por separado de nitrato de plata (AgNO_3) 0.001 M y de agente estabilizante polivinilpirrolidina (PVP) 0.001 M. La planta de *Aloe vera* se colectó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias

Químicas de la UABJO. Se cortaron las hojas y se dejaron reposar por 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con abundante agua potable y se sumergieron en hipoclorito de sodio al 15% durante 15 minutos, después se enjuagaron con agua desionizada y se cortaron las capas que protegen el gel (córte), finalmente se llevaron a trituración para obtener el extracto, el cual se utilizó tal como se obtuvo.

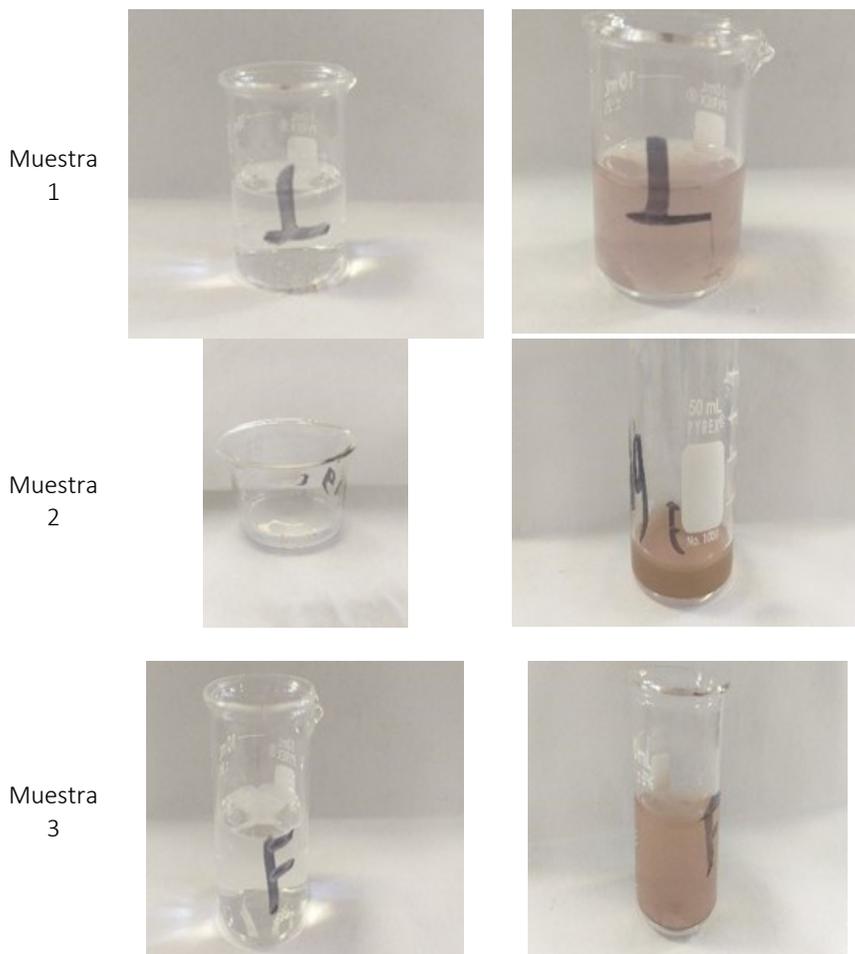
Dicho extracto fue utilizado para preparar tres muestras que corresponden al mismo número de reacciones distintas bajo las siguientes proporciones: 1) 3 mL de AgNO_3 + 1 mL de PVP + 2.5 mL de extracto; 2) 5 mL de AgNO_3 + 0.3 mL de extracto y; 3) 5 mL de AgNO_3 + 2 mL de PVP + 3 mL de extracto; los cuales se dejaron reposar por un máximo de 48 horas, observando los cambios físicos presentados a partir de las 2 horas hasta finalizar el tiempo.

Al finalizar el proceso de síntesis, se tomó una microgota de cada muestra y se colocó en un sustrato de Grafito Piroclítico Altamente Ordenado (HOPG) para su observación al microscopio de fuerza atómica, para describir las características morfológicas de las NPs-Ag formadas, la cual se comparó con la solución patrón de AgNO_3 previamente preparada, sin agente estabilizante ni extracto vegetal.

RESULTADOS

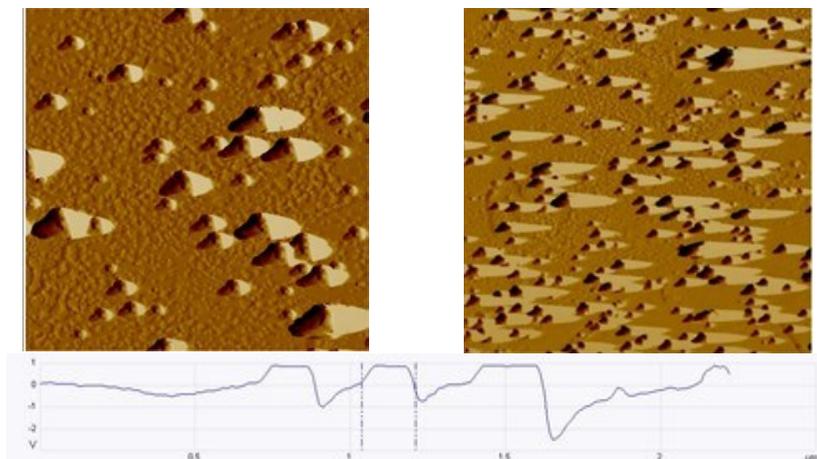
En los primeros minutos de iniciadas las reacciones, todas son incoloras. Después de las 48 horas, presentaron un color café (fig. 1).

Figura 1. Aspecto de las muestras al principio (izquierda) y a las 48 horas (derecha) después de iniciadas las reacciones. Fuente: Elaboración propia.



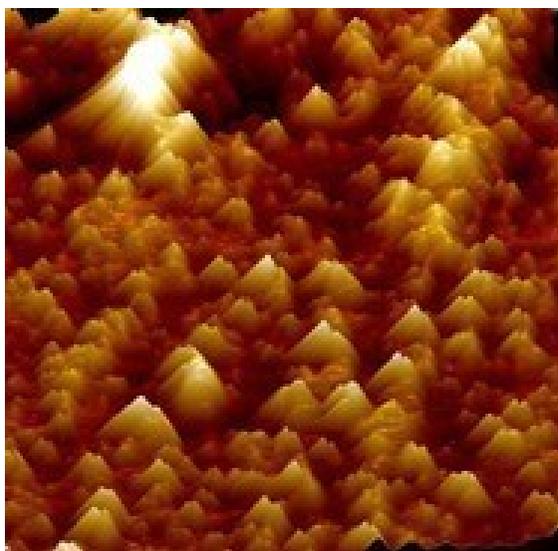
La solución patrón de AgNO_3 , presento cúmulos en forma triangular cuyo tamaño varió, también se observó que no estaban distribuidas homogéneamente, ya que en algunas zonas se encontraban las nanopartículas muy cercanas (fig. 2).

Figura 2. Imagen obtenida por microscopía de fuerza atómica (arriba) e imagen de las medidas de la solución patrón de AgNO_3 (abajo).



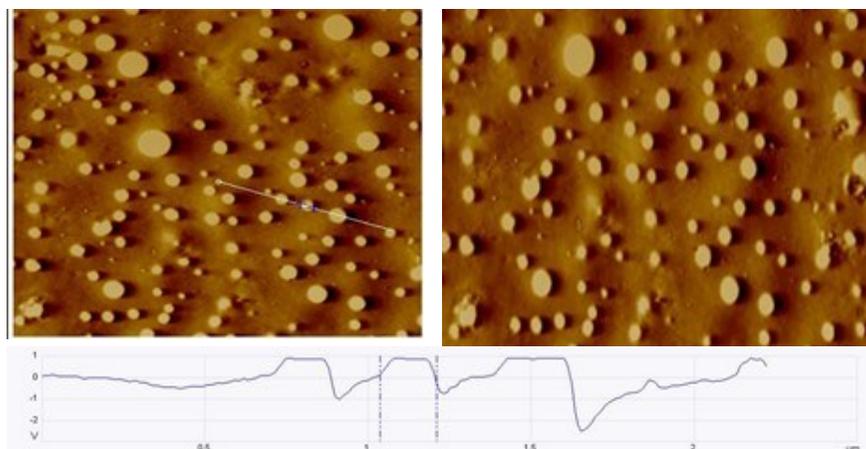
La muestra 2, no mostró la formación de NPs-Ag. La muestra 1 presentó NPs-Ag de forma triangular dando un aspecto de aglomeración, con un tamaño homogéneo entre sí de aproximadamente de 300 nanómetros (Fig. 3).

Figura 3. Imagen obtenida por microscopía de fuerza atómica de la muestra 2 a las dos horas.



La muestra 3 presentó NPs-Ag que fueron de forma esférica con un tamaño de aproximadamente 100 a 200 nm, se observaron más dispersas, su tamaño sigue variando predominando las nanopartículas de mayor volumen (Fig. 4).

Figura 4. Imagen obtenida por microscopia de fuerza atómica de la muestra 3 (arriba) a las 48 horas de iniciada la reacción e imagen de las medidas de las NPs-Ag a 176 nm (abajo).



DISCUSIÓN

Los cambios de coloración de incoloro a café, observados durante el proceso de formación de las NPs-Ag, son característicos de este tipo de reacciones, lo cual coincide con lo obtenido por Amaguaña (2018), Camacho y Deschamps (2013) y Cardeño y Londoño (2014), quienes utilizaron al extracto acuoso de hojas de sensitiva (*Mimosa albida*), pulpa de papel y ajo (*Allium sativum*) como agente reductor, respectivamente. Lo que sugiere que *Aloe vera*, presenta potencial como agente reductor.

Al transcurrir las 48 horas de reacción, la muestra viró completamente al color café debido a la reducción provocada por *Aloe vera* sobre la Ag ($\text{Ag}^{+1} \rightarrow \text{Ag}^0$), tal como lo describe Escobar

(2015), al utilizar y comparar precursores orgánicos e inorgánicos. Al respecto, Chandran, Chaudhary, Pasricha, Ahmad & Sastry (2006), mencionan que el extracto de dicha planta contiene ácidos y diversos compuestos orgánicos, que en conjunto reaccionan con los iones de Ag^{+1} a diferentes tiempos, temperaturas y concentraciones, manifestando la coloración que indica la generación de las NPs-Ag observadas.

En la muestra 2, no se observó ninguna estructura morfológica debido a la ausencia del PVP a diferencia de las muestras 1 y 3. Las estructuras morfológicas triangulares y esféricas obtenidas, coinciden con lo descrito por Huang et al. (2007) y Pilaquina et al. (2019), quienes utilizaron hojas de *Cinnamomum camphora* secas al sol y extractos de ajo (*Allium sativum*), respectivamente. Por otro lado, las NPs-Ag obtenidas variaron en tamaño y estructura dependiendo de la relación en las concentraciones de AgNO_3 y el PVP, coincidiendo con lo reportado por Morales, Morán, Quintana y Estrada (2009). Finalmente, la síntesis de NPs-Ag empleada en el presente estudio, presenta diversas ventajas comparada con otros métodos, el más importante que es amigable con el ambiente. Es necesario continuar con la estandarización y caracterización de las NPs-Ag, para reducir el tamaño de las NPs a través de la utilización del extracto de *Aloe vera* como agente reductor.

CONCLUSIONES

El extracto de *Aloe vera* es una alternativa como agente reductor para la síntesis de NPs-Ag. El uso de PVP mejora la dispersión de NPs-Ag. Se obtuvieron NPs-Ag de 100 a 200 nm.

REFERENCIAS

- Allaker R.P. (2010) The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. *J Dent Res.*, 89(11),1175-86. <https://doi.org/10.1177/0022034510377794>
- Amaguaña P.D.I. (2018) *Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata usando como reductor químico el extracto acuoso de las hojas de sensitiva (Mimosa albida) [Tesis de Licenciatura].*

- Pontificia Universidad del Ecuador.
<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/15265/den.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- o Camacho P.J.D. y Deschamps M.L.A. (2013). Síntesis de nanopartículas de plata y modificación con pulpa de papel para aplicación antimicrobial [Tesis para optar al grado de Ingeniero Químico]. Universidad de Cartagena. <https://repositorio.unicartagena.edu.co/bitstream/handle/11227/73/Tesis%20Entrega%20Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 - o Cardeño C.L. y Londoño M. E. (2014). Síntesis verde de nanopartículas de plata mediante el uso del ajo (*Allium sativum*). *Revista Soluciones de Postgrado*, 6(12),129–140. Disponible de <https://revistas.eia.edu.co/index.php/SDP/article/view/604>
 - o Chandran S.P., Chaudhary M., Pasricha R., Ahmad A., Sastry M. (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. *Biotechnol Prog.*, 22(2),577-83. <https://doi.org/10.1021/bp0501423>
 - o Domínguez-Fernández R.N., Arzate-Vázquez I., Chanona-Pérez J. J., Welti-Chanes J. S., Alvarado-González J. S., Calderón-Domínguez G., Garibay-Febles V. y Gutiérrez-López G. F. (2012). El gel de *Aloe vera*: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Rev. Mex. Ing. Quím*, 11(1), 23-43. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v11n1/v11n1a3.pdf>
 - o Escobar F.E. (2015) Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia de infrarrojos (FT-IR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM). [Tesis de Licenciatura]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/9933/TESIS%20-%20VANESSA%20ESCOBAR%20FALCON%3%8d.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 - o Flores C.Y. (2014). Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida [Tesis Doctoral]. Universidad Nacional de La Plata, <https://doi.org/10.35537/10915/34946>
 - o Foladori G. (2016) Políticas públicas en nanotecnología en América Latina. *Problemas del Desarrollo*, 47(186),59-81. <http://www.scielo.org.mx/pdf/prode/v47n186/0301-7036-prode-47-186-00059.pdf>
 - o García A.J. (2016). Análisis del comportamiento micromecánico del asfalto. *Revista Infraestructura Vial*, 18(31), 39-45. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/vial/article/view/27763/28157>
 - o González V.V.J. (2015). Nanomateriales de carbono, síntesis, funcionalización y aplicaciones [Tesis Doctoral]. Universidad Carlos III de Madrid. <https://e-archivo.uc3m.es/handle/10016/21605#preview>
 - o Hernández A.G. y Karthik T. V. K. (2018) Microscopía de fuerza atómica para el análisis de materiales. *TEPEXI Boletín Científico de la Escuela Superior Tepeji del Río*, 5(10). <https://doi.org/10.29057/estr.v5i10.3304>
 - o Huang J., Li Q., Sun D., Lu Y., Su Y., Yang X., Wang H., Wang Y., Shao W. & He N. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, 18(10),105104. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/10/105104>
 - o Leyva G.G. (2013) Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación en Discapacidad*, 2(1),18-22. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invidis/ir-2013/ir131c.pdf>
 - o Liu HL, Dai SA, Fu KY, Hsu SH. (2010) Antibacterial properties of silver nanoparticles in three different sizes and their nanocomposites with a new waterborne polyurethane. *Int J Nanomedicine*. 19(5),1017-28. <https://doi.org/10.2147/IJN.S14572>
 - o López E. A. y Solares S. D. (2014). El microscopio de fuerza atómica: métodos y aplicaciones. *Revista de la Universidad del Valle Guatemala*, 28(1),14-23. https://www.uvg.edu.gt/descargables/revista-uvg/Revista%2028_.pdf
 - o Mendoza L.D. (2003). Nanomateriales: nuevas propiedades a menores dimensiones. *Ciencia*, 23-29. https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/54_1/nanomateriales.pdf

- Morales J., Morán J., Quintana M. y Estrada W. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta sol-gel a partir de nitrato de plata. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(2),177-184. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v75n2/a04v75n2.pdf>
- Pilaquina F.F., Pazmiño K., Robalino T.A., Jara N.E., López F.F., Meneses O.L., Vizuete A.K. & Debut M.A. (2019) Síntesis verde de nanopartículas de plata usando el extracto acuoso de las hojas de ajo (*Allium sativum*). *infoANALÍTICA*, 7(2),41-55. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7113299>



CIENCIAS QUÍMICAS
UABJO

