

QUÍMICA·CENTRAL

i-issn 1390-5562 | e-issn 2477-9121 | año 2021 | volumen 7 | número 2

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Revista Química Central es una revista bianual de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador reeditada en el año 2010 que tiene como objetivo difundir la actividad investigadora asociada a los campos de la Química, Ciencias de la Vida, Ciencias de la Salud y campos afines, con compromiso ético y de alta responsabilidad social y ambiental.

AUTORIDADES

Dr. Fernando Sempértégui Ontaneda, Ph. D.
RECTOR DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR

Dra. María Augusta Espín, Ph. D.
VICERRECTORA ACADÉMICA Y DE POSGRADO

Dra. María Mercedes Gavilánez, Ph. D.
VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN, DOCTORADOS E INNOVACIÓN

Dra. Martha Suárez, Ph.D.
DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

EDITORIA

Martha Suárez Heredia

CONSEJO EDITORIAL

Alex Palma Cando —Universidad Tecnológica Experimental Yachay (Ecuador)
Patricio Espinoza Montero —Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Ecuador)
Marvin Ricaurte Fernández —Universidad Tecnológica Experimental Yachay (Ecuador)
Ulrich Rainer Stahl —Universidad Central del Ecuador (Ecuador)
Favio Idrobo Espín —Universidad Central del Ecuador (Ecuador)
Andrés Fullana —Universidad de Alicante (España)

CONSEJO CIENTÍFICO

Juan Antelo —Universidad de Santiago de Compostela (España)
Giovanni Carabalí Sandoval —Universidad Nacional Autónoma de México (México)
Carlos Salazar Camacho —Universidad Técnica del Chocó (Colombia)
Katherine Vaca Escobar —Investigadora Senescyt (Ecuador)
Pablo Cisneros Pérez —Universidad IKIAM (Ecuador)
William Calero Cáceres —Universidad Técnica de Ambato (Ecuador)
Pablo Bonilla Valladares —Universidad Central del Ecuador (Ecuador)
Verónica Sánchez Peralta —Universidad Central del Ecuador (Ecuador)

Año 2021, vol. 7, n.º 2.

Frecuencia: bianual

pISSN: 1390-5592

eISSN: 2477-9121

Año de inicio: 2010

Idioma: español

fcq.quimica.central@uce.edu.ec

<https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/QUIMICA>

Ciudadela Universitaria, Jerónimo Leyton y Gatto Sobral

A. P. 17-03-1369, Quito-Ecuador

+593 2 3216 975 / +593 2 2523 710 / +593 2 2500 409

Edición general | Gustavo Pazmiño

Diseño y diagramación | Christian Echeverría

Corrección de textos | Marcelo Acuña

Portada | Christian Echeverría

Editorial Universitaria, 2021

Ciudadela Universitaria, av. América, s. n.

Quito, Ecuador

+593 (02) 2524 033

editorial@uce.edu.ec



Los contenidos pueden usarse libremente, sin fines comerciales y siempre y cuando se cite la fuente. Si se hacen cambios de cualquier tipo, debe guardarse el espíritu de libre acceso al contenido.

CONTENIDO

Presentación.....	4
Uso de la nanotecnología para el desarrollo de empaques alimenticios del sector pesquero..... Dennys Almachi Pablo Bonilla	5
Validación del método de cuantificación de lignina en biomasa de pino..... Lenin Márquez Paola Cuji Carlos Méndez Diego Flores	15
Pruebas bioquímicas para el tamizaje y diagnóstico oportuno de mucopolisacaridosis de población en riesgo..... Walkyrie Aguilar (†) Guadalupe Jibaja Lourdes Pazmiño	20
Evaluación de la actividad nootrópica del ácido clorogénico presente en el café para el tratamiento preventivo de enfermedades neurodegenerativas..... Elda Molina Elithsine Espinel Dayana Borja Javier Santamaría Carmita Reyes Jorge Grijalva Roy Vera	32
Utilización de Agrobacterium tumefaciens como generadora de tumores in vitro para el análisis de actividad antitumoral de metabolitos secundarios..... Andrea Parreño	40
Nanoemulsión de liberación controlada de ibuprofeno con lecitina de soya..... Pablo Bonilla Mariel Bonilla	44
Instrucciones para los autores	50

PRESENTACIÓN

Desde la historia de las ideas podemos decir que muchos de los progresos materiales como las innovaciones, entre otras, en la medicina, la farmacología y la cosmetología, han aportado comodidad y libertad al ciudadano. Muchos de estos aportes son ahora bienes considerados del contexto, como lógicamente preexistentes y cuyo valor es más bien monetario, de consumo. Sin embargo, la producción científica y tecnológica es un proceso que exige grandes esfuerzos y dedicación, cuyos resultados han brindado, en última instancia, facilidades y mayor libertad de acción para el beneficiario directo de estas ventajas.

La muestra que se presenta en la revista Química Central busca, en último término, contribuir al sostenimiento de la democracia, aquella de las libertades sociales y políticas en el marco de la seguridad que brinda el avance de resultados obtenidos en el país.

Desde la cuantificación directa de histaminas, que garantizará un producto alimenticio seguro e inocuo para los consumidores y la multifuncionalidad química de la lignina cuya experimentación permitirá ser replicada a futuro en diferentes investigaciones nacionales, pasando por la identificación de la actividad nootrópica en el extracto de la pulpa de café y la aplicación del método espectrofotométrico de azul de dimetil metileno que sirve para realizar diagnóstico de mucopolisacaridosis, hasta la revisión de la gran utilidad que presta el ensayo del disco de papa, y la seguridad en el empleo del principio activo bajo una cinética de liberación controlada para nanoemulsiones de tipo O/W; todos estos trabajos de investigación son aportes tanto a la medicina como a la industria farmacéutica, cosmetológica y química del país.

Desde la cuantificación directa de histaminas, que garantizará un producto alimenticio seguro e inocuo para los consumidores y la multifuncionalidad química de la lignina cuya experimentación permitirá ser replicada a futuro en diferentes investigaciones nacionales, pasando por la identificación de la actividad nootrópica en el extracto de la pulpa de café y la aplicación del método espectrofotométrico de azul de dimetil metileno que sirve para realizar diagnóstico de mucopolisacaridosis, hasta la revisión de la gran utilidad que presta el ensayo del disco de papa, y la seguridad en el empleo del principio activo bajo una cinética de liberación controlada para nanoemulsiones de tipo O/W; todos estos trabajos de investigación son aportes tanto a la medicina como a la industria farmacéutica, cosmetológica y química del país.

Finalmente, estos avances son ventajas obtenidas como fruto de las innovaciones científicas y tecnológicas basadas en la observación, experimentación y deducción. Al interior de estos trabajos, se hacen presentes la revisión científica y el diseño experimental como los ejes que sostienen el aporte con el que la revista Química Central desea incrementar el desarrollo nacional en democracia. Esta orientación última es la que hace al experimento una idea tan importante. La práctica del método científico, aparte de otras abstracciones, es probablemente la forma más directa de democracia en acción.

Martha Suárez Heredia
EDITORA

REVISTA QUÍMICA CENTRAL



Uso de la nanotecnología para el desarrollo de empaques alimenticios del sector pesquero

Use of nanotechnology for the development of food packaging in the fishing sector

Dennys Almachi^a | Pablo Bonilla^b

^a iD Universidad Central del Ecuador; dpalmachi@uce.edu.ec

^b iD Universidad Central del Ecuador; pmbonilla@uce.edu.ec

HISTORIAL DEL ARTÍCULO

Recepción: 23/08/2021
Aceptación: 20/12/2021

PALABRAS CLAVE

Puntos cuánticos de carbono, histaminas, actividad antibacterial.

ARTICLE HISTORY

Received: 23/08/2021
Accepted: 20/12/2021

KEY WORDS

Quantum carbon dots, histamines, antibacterial activity.

RESUMEN

En el presente artículo de revisión, se analizó la propuesta para desarrollar un empaque alimenticio para el sector pesquero funcionalizado con puntos cuánticos de carbono (CQD), que permita la cuantificación directa de histaminas (HIS). Se consideraron los buscadores Science Direct, Wiley, ACS Publication, Pubmed, Royal Society of Chemistry, SpringerLink, Igenta Connect, Plos One, Dovepress, Taylor y Francis y se encontraron solamente cuatro investigaciones que cuantificaron HIS a través de los CQD. Por lo tanto, se consideró esta metodología analítica para la elaboración del empaque inteligente; sin embargo, se determinó que la propuesta, posiblemente no se podría realizar debido a que las HIS se concentran en el músculo del marisco. De igual manera, se consideró la actividad antibacterial de los CQD y se encontraron varias investigaciones que demuestran la eliminación de tres bacterias productoras de HIS como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. Por lo tanto, los empaques funcionalizados con CQD serían una innovación disruptiva, ya que podrían evitar la formación de HIS, garantizando un producto seguro e inocuo a los consumidores.

ABSTRACT

In the present review article, it was analyzed the proposal to develop food packaging functionalized with quantum carbon dots (QCD) for the fishing sector in order to allow the direct quantification of histamines (HIS). The search engines Science Direct, Wiley, ACS Publication, Pubmed, Royal Society of Chemistry, SpringerLink, Igenta Connect, Plos One, Dovepress, Taylor and Francis were considered, and only four investigations were found that quantified HIS through QCD. Therefore, this analytical methodology for the development of intelligent packaging was considered. However, it was determined that this proposal, possibly could not be made because histamines are concentrated in the shellfish muscle. Likewise, the antibacterial activity of QCD was considered, and it was found that several investigations demonstrate the elimination of three HIS-producing bacteria such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*. Consequently, the packages functionalized with QCD, would be a disruptive innovation since they could avoid the formation of HIS, guaranteeing a safe, non-toxic, and harmless product to the consumers.

INTRODUCCIÓN

En la figura 1 se observan algunas aminos biogénicas (BA). La espermidina y espermina tienen importantes funciones fisiológicas relacionadas con el crecimiento y la proliferación celular.⁽¹⁾ Al contrario, la acumulación de BA genera toxicidad para el ser humano, por ejemplo, las diaminas, como la putrescina y cadaverina, pueden

potenciar la absorción de aminos vasoactivas debido a la saturación de las barreras intestinales,⁽²⁾ pueden reaccionar con el ion nitrito para formar nitrosaminas que son cancerígenas.⁽³⁾ Además, la intoxicación con histaminas (HIS) puede ocasionar erupción cutánea, urticaria, dolor de cabeza, diarrea, vómitos, irregularidades en la frecuencia cardíaca⁽⁴⁾ y representa el 39% de los brotes

asociados con mariscos en los Estados Unidos (ver Figura 1).⁽⁵⁾

La formación de BA se debe a la acción de enzimas amino descarboxilasas (EAD) que provienen de bacterias Gramnegativas como *Acromonas hydrophila*, *Escheria coli*, *Klebsiella* spp., *Hafnia alvei*, *Pseudomonas* sp., *Proteus morgani*, *Serratia* spp., y *Vibrio alginolyticus* ⁽⁶⁾. Por lo tanto, la cuantificación de BA es un parámetro importante para determinar la calidad e inocuidad de alimentos del sector pesquero.

Las EAD una vez formadas pueden seguir produciendo HIS a temperaturas entre 0-5°C, debido a que la actividad de las EAD es independiente de la temperatura. La problemática aumenta porque las HIS no alteran las propiedades organolépticas de los mariscos⁽⁷⁾ y no se destruyen por la cocción o fritura por ser termoestables.⁽⁸⁾ Por lo tanto, La Unión Europea ha establecido un límite mínimo de 100 ppm y un límite máximo de 200 ppm para HIS, en familias de pescados *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* y *Scombresosidae*, además, indica que el método analítico de referencia es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).⁽⁹⁾

Se debe considerar que la cuantificación de HIS por HPLC tendría costos significativos para las industrias del sector pesquero, debido a que se requieren reactivos de alta pureza, personal técnico calificado, adquisición del equipo con sus respectivos accesorios; además, en el proceso se generan residuos orgánicos que necesitan tratamiento. Por lo tanto, se deberían considerar los recientes avances en nanotecnología para la cuantificación de HIS; por ejemplo, en los puntos cuánticos de carbono (CQD); se ha observado una modificación de la fluorescencia en presencia de HIS, es decir, una respuesta analítica para su respectiva cuantificación.^(10, 11, 12,13)

Por otra parte, se ha demostrado que los CQD tienen actividad antibacteriana, debido que se pueden impregnar en la membrana celular; provocando irregularidades y la posterior fuga de componentes intracelulares. Los CQD también pueden ingresar a la célula y formar enlaces no covalentes con el ADN para alterar su conformación secundaria.⁽¹⁴⁾

Considerando lo antes mencionado, esta revisión bibliográfica tiene como objetivo analizar la viabilidad para el desarrollo de empaques funcionalizados con CQD para alimentos del sector pesquero, los cuales permitirían la cuantificación de HIS de forma directa, y posiblemente evitar la formación de histaminas (HIS), considerando la actividad antibacteriana de los puntos cuánticos de carbono (CQD).

PUNTOS CUÁNTICOS

Los puntos cuánticos (QD) son nanocristales semiconductores que tienen tamaños entre 1,5 nm y 10,0 nm; esto

equivale a la unión de aproximadamente 100 a 10.000 átomos.⁽¹⁵⁾ Por lo tanto, al encontrarse en la escala nanométrica, se rigen por las leyes de la mecánica cuántica⁽¹⁶⁾ y brindan excelentes propiedades físicas y químicas como, por ejemplo, amplios espectros de absorción y estrechas bandas de emisión que permiten obtener múltiples colores fluorescentes, tienen un alto rendimiento cuántico que les brinda un mayor brillo y fotoestabilidad.⁽¹⁷⁾

Cuando los semiconductores no nanoestructurados (SNN) absorben la luz, los electrones de la banda de valencia (VB) pasan a la banda de conducción (VC); se genera un hueco con carga positiva en la VB, por lo tanto, por interacciones coulombicas los regresan a la VB y lo hacen con la emisión de energía en forma de fotón. La distancia entre VB-VC se denomina banda prohibida (Eg).⁽¹⁸⁾ Debido a que los QD tienen un menor número de átomos con respecto a los SNN, la distancia entre VB-VC y la energía de Eg aumenta, esto se ve reflejado en la emisión de fotones de mayor energía,⁽¹⁵⁾ provocando que los QD tengan excelentes propiedades ópticas.

Para la preparación de los QD generalmente se utilizan elementos de los grupos II, III, V, VI de la tabla periódica, por ejemplo: CdS, CdSe, CdTe, InP, InAs.⁽¹⁷⁾

En el año 2004 se sintetizaron por primera vez los puntos cuánticos de carbono (CQD) que, con respecto a los QD, destacan por sus ventajas como: menor toxicidad, mayor biocompatibilidad, solubilidad en medios acuosos y abundancia.⁽¹⁹⁾ Por lo tanto, los CQD han sido tomados en cuenta por los científicos para el desarrollo de importantes investigaciones como la detección de la calidad e inocuidad de los alimentos,^(20, 21) la administración de fármacos,⁽¹⁹⁾ desarrollo de biosensores.⁽²²⁾

Las fuentes de carbono para la síntesis de CQD son muy variadas como, por ejemplo: ácido cítrico,^(10, 11) cáscara de naranja,⁽²³⁾ cáscara de sandía,⁽²⁴⁾ jugo de naranja,⁽²⁵⁾ café,⁽²⁶⁾ tapioca⁽²⁷⁾ y una diversidad de residuos orgánicos provenientes de los desperdicios de los alimentos.⁽²⁸⁾

SÍNTESIS DE PUNTOS CUÁNTICOS DE CARBONO

En el año 2004, se realizaba una síntesis de nanotubos de carbono, a través del método de descarga de arco; los investigadores notaron un subproducto fluorescente de diferentes colores. A estas partículas las denominaron «carbono fluorescente» ya que se trataba de material carbonoso a escala nanométrica y concluyeron que eran pequeños fragmentos de los nanotubos de carbono.⁽²⁹⁾

Desde entonces los investigadores se han enfocado en el diseño de rutas sintéticas para los CQD; utilizando dos enfoques: de arriba hacia abajo (top-down) y de abajo hacia arriba (bottom-up).⁽³⁰⁾

Los métodos top-down consisten en romper la fuente

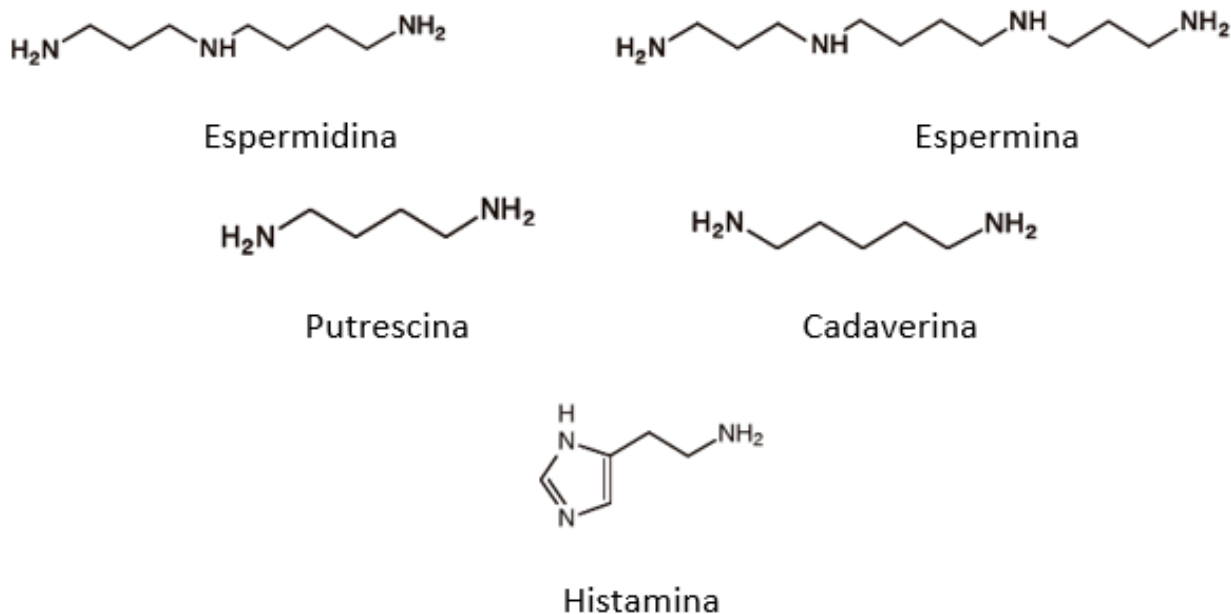


Figura 1. Aminas biogénicas

de carbono en fragmentos de tamaño nanométrico;⁽²¹⁾ y son: descarga de arco, ablación láser, nanolitografía por grabado de iones reactivos, oxidación electroquímica, exfoliación química, oxidación ácida. Estos métodos son costosos ya que requieren de equipos sofisticados y una gran cantidad de energía.⁽³¹⁾

Por el contrario, los métodos bottom-up consisten en tres pasos; en primer lugar, se dan reacciones de condensación, seguido de agregaciones por fuerzas de interacción, y finalmente, los polímeros se carbonizan para generar los CQD.⁽³²⁾ Son de bajo costo y amigables con el medio ambiente como: hidrotermal, solvotermal, asistido por microondas, asistido por sonicación.⁽³⁰⁾

PUNTOS CUÁNTICOS DE CARBONO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HISTAMINAS

En la tabla 1, se resumen las investigaciones que han utilizado los CQD para cuantificar las HIS; en donde se puede observar; la fuente de carbono y métodos para sintetizar los CQD, su respectiva caracterización como: tamaño de partícula, potencial z y rendimiento cuántico; además de una explicación del porqué los CQD pueden cuantificar las HIS con su respectivo límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

Anteriormente, se mencionaron las innumerables fuentes de carbono y varios métodos de síntesis de los CQD. Sin embargo, en los buscadores Science Direct, Wiley, ACS Publication, Pubmed, Royal Society of Chemistry, SpringerLink, Igenta Connect, Plos One, Dovepress, Taylor y Francis solamente se han encontrado cuatro investigaciones que han utilizado los CQD para cuantificar HIS, y sus años de publicación son entre 2017 y 2020. Por lo tanto, la industria alimenticia tiene varias posibilidades para seguir innovando en este campo de investigación, como la

propuesta planteada en esta revisión bibliográfica.

Se ha demostrado que las demás aminas biogénicas y sus aminoácidos precursores (tiranina, triptanina, histidina) no generan interferencias en la cuantificación de HIS; es decir, existe especificidad del método analítico. Esto se debe a que los CQD elaborados con citrato de sodio y tiosulfato de sodio; en presencia de HIS, tienen la mayor constante (Ksv) en el diagrama Stern-Volmer con respecto a las sustancias antes mencionadas.⁽¹²⁾

Por lo tanto, las demás aminas biogénicas, producto de la contaminación bacteriana y mala conservación de los mariscos, posiblemente no generarían interferencias en la cuantificación directa de HIS en el empaque. Sin embargo, la propuesta podría tener dificultades, porque gran parte de la HIS se concentra en el músculo del marisco y es necesario realizar su extracción; proceso que se realiza en la cuantificación de HIS por HPLC.⁽³³⁾

PUNTOS DE CARBONO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En la tabla 2 se pueden observar las investigaciones publicadas en el periodo 2016-2020; que han utilizado los cqd para inactivar bacterias. Se han seleccionado solamente las bacterias que pueden contaminar a los mariscos y son productoras de histamina (bph). Las investigaciones se han enfocado principalmente a la inactivación de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*; no se han encontrado inactivación de otras bph como *Acromonas hydrophila*, *Hafnia alvei*, *Proteus morgani*, *Serratia* spp. y *Vibrio alginolyticus*. Por lo tanto, se ha demostrado que los cqd tienen el potencial de inactivar tres bph y existe un antecedente significativo para el desarrollo de futuras investigaciones enfocadas con la temática propuesta en este artículo de investigación.

La actividad antibacteriana de los CQD se debe a que

sus grupos funcionales (amino, carboxilo, hidroxilo, sulfhidrilo) generan fuerzas electrostáticas con los componentes de la membrana celular (fosfolípidos, porinas, peptidoglicanos, etc), provocando su desestabilización y pérdida de sustancias intracelulares.^(34, 14) Además, los CQD se pueden difundir al interior de la célula y formar enlaces no covalentes con el ADN provocando el desenrollamiento de la doble hélice (ver Tabla 1).⁽³⁵⁾

Los CQD al estar en la escala nanométrica tienen una alta relación superficie/volumen; que les permite tener una mayor área de contacto con la membrana celular.⁽¹⁵⁾ Esta propiedad potencializa la actividad antibacteriana; por ejemplo, se determinó que la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la espermidina es >10 mg/mL, mientras que la MIC para los CQD de espermidina 2-4 ug/mL.⁽³⁶⁾

La actividad antibacteriana puede aumentar con el dopaje de los CQD; es decir, la modificación de los grupos funcionales de los CQD con uno o varios heteroátomos.⁽³⁴⁾ Por ejemplo, se determinó que la MIC de los CQD dopados con nitrógeno y zinc para *Escherichia coli* es 1 mg/ml; pero cuando se utilizó una solución de CQD, sin el dopaje de zinc y a la misma concentración, no se observó la inhibición del crecimiento bacteriano.⁽³⁷⁾

Otro de los factores que pueden potencializar la actividad antibacteriana, es la irradiación con luz visible a los CQD, por ejemplo: los CQD-ZnO (óxido de zinc recubierto con CQD) a una concentración de 0,1 mg/mL y en la oscuridad eliminan el 31,59% de *Escherichia coli*; mientras que al irradiarlos con luz visible el porcentaje de eliminación es del 96,94%; esto se debe a la formación de especies reactivas de oxígeno que tienen actividad antibacteriana.⁽³⁸⁾

De igual manera, se ha demostrado que la actividad antibacteriana no se ve afectada al adherir los CQD a matrices poliméricas; por ejemplo, los CQD en una matriz de polidimetilsiloxano, produce 5 reducciones logarítmicas *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* al ser irradiados con luz visible ($\lambda = 470$ nm) por 15 minutos.⁽³⁹⁾

Recientemente se ha demostrado que los CQD a una concentración del 12% y 48 horas de incubación reducen el 90,73% de histamina; 95,82% de cadaverina; 88,52% de tiranina; 42,09% de putrescina; producidas por *Escherichia coli*. El mecanismo de eliminación no está lo suficientemente claro debido a que los espectros infrarrojos de CQD-BA son los mismos a CQD, por lo tanto, se plantearon dos hipótesis: 1) la degradación

de BA por acción de los CQD, 2) los CQD se adhieren a las BA, a través de sus grupos funcionales, lo que hace imposible su detección.⁽⁴⁰⁾

Considerando que los CQD tienen la capacidad de inactivar tres bacterias productoras de histaminas, su actividad antibacteriana se potencializa con la irradiación de luz visible, la actividad antibacteriana no se ve afectada al adherir los CQD a matrices poliméricas y los CQD pueden degradar las aminas biogénicas; en este artículo de revisión se ha demostrado que los CQD son una excelente alternativa para el desarrollo de empaques de alimentos del sector pesquero, con la posibilidad de aumentar la vida útil de los productos y proporcionar a los consumidores alimentos inocuos (ver Tabla 2).

EMPAQUES FUNCIONALIZADOS CON PUNTOS CUÁNTICOS DE CARBONO

Los CQD funcionalizados en empaques mejoran las propiedades mecánicas, por ejemplo, la adición de CQD y antocianinas a una membrana de almidón, mejoró significativamente en la tracción y elongación de rotura. La funcionalización es posible por la formación de puentes de hidrógeno de los CQD y los grupos -OH del almidón termoplástico.⁽⁵⁸⁾ Además, el empaque tiene un indicador visual debido a que las antocianinas cambian de color a diferentes pH, lo que permitió detectar las aminas biogénicas de la carne de cerdo en descomposición.⁽⁵⁹⁾

SINOPSIS/PERSPECTIVA/PUNTO DE VISTA

Considerando que la intensidad de la fluorescencia de los puntos cuánticos de carbono (CQD), se modifica en presencia de histamina (HIS); en el presente artículo de revisión se analizó la viabilidad para desarrollar un empaque para mariscos funcionalizado con CQD, que permita la cuantificación directa de HIS. La propuesta es innovadora ya que los CQD mejoran las propiedades mecánicas de los empaques, pero la cuantificación de HIS podría complicarse, debido a que parte de la HIS se concentra en el músculo del marisco. Sin embargo, se podría aprovechar las propiedades antibacterianas de los CQD para eliminar las bacterias productoras de HIS y garantizar un producto inocuo a los consumidores.

Tabla 1. Cuantificación de HIS con CQD

Fuente de carbono	Método de síntesis	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Z (mV)	Rendimiento cuántico (%)	Límite de detección (LD) y cuantificación (LC)	Fenómeno de identificación	Referencia
Ácido cítrico, N-acetil-L-cisteína (Recubrimiento de Au)	Hidrotermal 200°C por 3 h	3,3 ^a 197,7 ± 56,2 ^b	-37,75 ^a - 31,66 ^b	-	LD ^a = 21,15 ppb LD ^b = 13 ppb	La fluorescencia se apagó con el péptido hisp3 por la posible formación de puentes de hidrógeno y se recuperó con la adición de HIS.	¹⁰
Ácido cítrico, glutatión (Dopaje de Fe ³⁺)	Hidrotermal 200°C por 5 min	28,4 ^c	- 38,2 ± 2,4 ^c + 27,6 ± 0,8 ^d	54,6% ^c 14,1 ^d	LC ^d = 4,3x10 ⁻⁷ M	La HIS contiene grupos amino que pueden coordinarse con el catión, provocando el apagado de la luminiscencia.	¹¹
Citrato de sodio, tiosulfato de sodio	Hidrotermal 200°C por 6 h	~ 5	-	38,7% ^e	LD ^e = 5.3 ppm	La HIS tiene mayor Ksv en el diagrama Stern-Volmer, con respecto a otras aminas biogénicas, lo que demuestra la fuerte afinidad.	¹²
CQD obtenidos de Beijing Beida Jubang Science and Technology Co. Ltd.	-	2-5	-	-	LD ^f = 70pM	La HIS fue extraída por un nanocomposito de Fe ₃ O ₄ @Au. La HIS fue atrapada por los antihistamínicos y existe un apagado de la fluorescencia.	¹³

a sin recubrimiento de Au

b con recubrimiento de Au

c sin dopaje con Fe³⁺

d con dopaje con Fe³⁺

e cqd funcionalizados en una matriz orgánica de 1,3,5-triformilfloroglucinol y 2,5-dimetil- p- fenilendiamina, y estabilizados con líquido iónico [VBIm][BF₄]

f se creó una membrana nanoporosa de alúmina funcionalizada con (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano (gpm) e inmovilizada con cqd con antihistamínicos.

Tabla 2. Actividad antibacteriana de los CQD

Fuente de carbono	Método de síntesis	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Z (mV)	Rendimiento cuántico (%)	Concentración mínima inhibitoria	Bacterias	Referencia
Vitamina C	Electroquímico	1,03-1,11		30	25 ug/mL	<i>Escherichia coli</i>	35
Ácido cítrico, tris (hidroximetil) aminometano, Poli(tetrafluoroetileno), acetato de zinc	Hidrotermal 200°C por 4 h	1,5-5 ^b	-	45,6 ^a 50,8 ^b	1 mg/mL ^b	<i>E. coli</i>	37
Tetrahidrocloruro de espermidina	Pirólisis 270°C por 3 h	6,33 ± 1,35	45	3,85	2-4 ug/mL	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	36
Extracto de aloe-vera	Pirólisis 190°C por 20 min	~ 6-8	-	12,3	-	<i>E. coli</i>	41
Hojas de Henna (<i>Lawsonia inermis</i>)	Hidrotermal 180°C por 12 h	5	-	28,7	1 mg/mL	<i>E. coli</i>	42
Tamarindo	Hidrotermal 180°C por 8 h	1-3		4	5 mg/mL	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43 44
Ácido cítrico, histamina	Microondas 130°C, 20 min 300 W	4,6	0-2	-	6,9 ug/mL 13,8 ug/mL	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	45
Ácido cítrico, cadaverina		3			9,7 ug/mL 19,4 ug/mL	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
Polivinilpirrolidona	Hidrotermal 200°C por 6 h	6,5	-6,47 ± 0,67	6	32 ug/mL	<i>Escherichia coli</i>	46
Poli (sodio-4-estireno sulfonato)		5	-47,18	9,5			
Cáscara de naranja, ácido cítrico	Hidrotermal 200°C por 6 h	2,9 ± 0,5	-	-	- ^c - ^d	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>	47
Aminoguanidina, ácido cítrico	Hidrotermal 150°C por 2 h	4,3 ± 0,5	-	3	0,5 mg/mL 1 mg/mL	<i>P. aeruginosa</i> PAO 1 A <i>P. aeruginosa</i> PAO 1 B	48
					> 1 mg/mL	<i>E. coli</i> K12 <i>E. coli</i> DIHO B	
2,2 '-(etilendioxi) -bis (etilamina); ácido málico	Hidrotermal 150°C por 2 h	2-7	-	~25	-	<i>Escherichia coli</i>	49
CQD obtenidos de (us Research Nanomaterials, Inc.); 2,2 '-(etilendioxi) -bis (etilamina)	Oxidación con ácido nítrico Hidrotermal 120 por 3 días	-	-	-	64 ug/mL	<i>Escherichia coli</i>	50

Polietilenglicol 400 (Dopado con Ga)	Ultrasonido	6 ^e	-20,3 ^e	~1 ^e	57,5 ppm ^e	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	51 52
	70% amplitud, 70 , 2 h	7 ± 2 ^f	16,7-29,2 ^f	~2 ^f	0,34 ppm ^f > 57,5 ppm ^e 1,36 ppm ^f	<i>P. aeruginosa</i> PA14 <i>P. aeruginosa</i> C3719	
Polivinilpirrolidona, dihidroxiacetofenona, nitrato de plata Óxido de zinc, grafito	Carbonización con H ₂ SO ₄ (36N)	14,1 ^g 114,5 ^h	-	-	0,1 mg/mL ⁱ	<i>Escherichia coli</i>	53
	Electroquímico, 15-60V, corriente continua, 120 h	Nanovarillas con un espaciado de 0,3277	-	-	0,1 mg/mL ^j	<i>Escherichia coli</i>	38
Óxido de titanio, grafito		37,62	-	-	1 ug/mL ^k	<i>Escherichia coli</i>	54
Ampicilina recubierta con CQD (ácido cítrico, etilendianina)	Hidrotermal	3,2 ± 0,8 ^l	-	32 ^l	25 ug/mL ⁿ	<i>E. coli</i> K12 - MG 1655	55
	250°C por 5 h	44 ± 10 ^m		19 ^m	14 ug/mL ^m		
CQD obtenidos de (US Research Nanomaterials, Inc.); 2,2'- (etilendioxi) -bis (etilamina); azul de metileno	Oxidación con ácido nítrico	-	-	-	5ug/mL CQD + 1ug/mL de azul de metileno ^o	<i>Escherichia coli</i>	56
	Hidrotermal 120°C por 3 días						
polioxi-etileno-polioxi-propileno-polioxi-etileno	Oxidación con ácido fosfórico	20	-	-	0,94 mg/mL ^p	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39 57
	250°C por 2 h						

a sin dopaje de Zn²⁺

b con dopaje de Zn²⁺

c zona de inhibición de 31 mm

d zona de inhibición de 19 mm

e sin dopaje de Ga³⁺

f con dopaje de Ga³⁺

g sin dopaje de Ag⁺

h con dopaje de Ag⁺

i los CQD con dopaje de Ag⁺ eliminan el 80%-90% de bacterias

j en oscuridad eliminan 31,59% de bacterias y al irradiar con luz visible se elimina 96,94% de bacterias

k al irradiar con luz visible se elimina 90,9% de bacterias

l CQD

m ampicilina recubierta con CQD

n ampicilina libre

o reduce 6,2 log de células viables

p. CQD en una matriz de polidimetilsiloxano; al ser irradiados con luz (λ= 470 nm) por 15 minutos, provoca 5 reducciones logarítmicas

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran de manera explícita, no tener conflictos de intereses que pudieren haber sesgado los resultados incluidos en el manuscrito.

REFERENCIAS

1. Prester L. Biogenic amines in ready-to-eat foods; Elsevier Inc. 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801916-0.00022-4>.
2. Bover-Cid S, Latorre-Moratalla ML, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. Processing contaminants: biogenic amines. *Encycl. Food Saf.* 2014, 2, 381-391. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00216-X>.
3. Núñez M, Medina M. Biogenic amines. *Encycl. Dairy Sci.* Second Ed. 2011, 1-4170.
4. Dalgaard P, Emborg J. Histamine fish poisoning: new information to control a common seafood safety issue; Woodhead Publishing Limited. 2009. <https://doi.org/10.1533/9781845696337.3.1140>.
5. Feng C, Teuber S, Gershwin ME. Histamine (scombroid) fish poisoning: a comprehensive review. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 2016, 50(1): 64-69. <https://doi.org/10.1007/s12016-015-8467-x>.
6. Costa MP, Rodrigues BL, Frasco BS, Conte-Junior CA. Biogenic amines as food quality index and chemical risk for human consumption; Elsevier Inc., 2018, vol. 13. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811442-1.00002-X>.
7. Schirone M, Viscaíno P, Tofalo R, Suzzi G. Histamine food poisoning. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2015, n.º January, 251-263. <https://doi.org/10.1007/164>.
8. Alp-Erbay E, Figueroa-Lopez KJ, Lagaron JM, Çağlak E, Torres-Giner S. The impact of electrospun films of poly(ϵ -caprolactone) filled with nanostructured zeolite and silica microparticles on in vitro histamine formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella paratyphi* A. *Food packag. Shelf life*, 2019, 22 (september). <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100414>.
9. Reglamento (CE) n.º 2073/2005. Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. 2005, vol. 48.
10. Shi R, Feng S, Park CY, Park KY, Son J, Park JP, Chun HS, Park TJ. Fluorescence detection of histamine based on specific binding bioreceptors and carbon quantum dots. *Biosens. Bioelectron.* 2020, 167(august): 112519. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112519>.
11. Toloza CAT, Khan S, Silva RLD, Romani EC, Larrude DG, Louro SRW, Freire FL, Aucélio RQ. Photoluminescence suppression effect caused by histamine on amino-functionalized graphene quantum dots with the mediation of Fe³⁺, Cu²⁺, Eu³⁺: Application in the analysis of spoiled tuna fish. *Microchem. J.* 2017, 133, 448-459. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.04.013>.
12. Zhang D, Wang Y, Xie J, Geng W, Liu H. Ionic-liquid-stabilized fluorescent probe based on s-doped carbon dot-embedded covalent-organic frameworks for determination of histamine. *Microchim. Acta* 2020, 187(1). <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3833-7>.
13. Mao Y, Zhang Y, Hu W, Ye W. Carbon dots-modified nanoporous membrane and Fe₃O₄@Au Magnet nanocomposites-based FRET assay for ultrasensitive histamine detection. 2019.
14. Chatzimitakos T, Stalikas C. Antimicrobial properties of carbon quantum dots; INC, 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819943-5.00014-2>.
15. Maxwell T, Nogueira Campos MG, Smith S, Doomra M, Thwin Z, Santra S. Quantum dots; Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816662-8.00015-1>.
16. Vukmirovic N, Wang L. *Comprehensive nanoscience and technology. Compr. Nanosci. Technol.* 2011, 175-211. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374396-1.00085-4>.
17. Pereira MGC, Leite ES, Pereira GAL, Fontes A, Santos BS. Quantum dots; Elsevier Inc., 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801578-0.00004-7>.
18. Carrillo C. Aportaciones de los puntos cuánticos a la nanociencia y nanotecnología analítica, 2011.
19. Nair A, Haponiuk JT, Thomas S, Gopi, S. Natural carbon-based quantum dots and their applications in drug delivery: a review. *Biomed. Pharmacother.* 2020, 132, 110834. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110834>.
20. Qu JH, Wei Q, Sun DW. Carbon dots: principles and their applications in food quality and safety detection. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2018, 58(14): 2466-2475. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1437712>.
21. Shi X, Wei W, Fu Z, Gao W, Zhang C, Zhao Q, Deng F, Lu X. Review on carbon dots in food safety applications. *Talanta.* 2019, 194, 809-821. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.005>.
22. Sing M. Carbon dots as optical nanoprobe for biosensors; Elsevier Inc., 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813900-4.00012-9>.
23. Surendran P, Lakshmanan A, Vinitha G, Ramalingam G, Rameshkumar P. Facile preparation of high fluorescent carbon quantum dots from orange waste peels for nonlinear optical applications. *Luminescence.* 2020, 35(2): 196-202. <https://doi.org/10.1002/bio.3713>.
24. Zhou J, Sheng Z, Han H, Zou M, Li C. Facile synthesis of fluorescent carbon dots using watermelon peel as a carbon source. *Mater. Lett.* 2012, 66(1): 222-224. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.08.081>.
25. Sahu S, Behera B, Maiti TK, Mohapatra S. Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents. *Chem. Commun.* 2012, 48(70): 8835-8837. <https://doi.org/10.1039/c2cc33796g>.
26. Jiang C, Wu H, Song X, Ma X, Wang J, Tan M. Presence of photoluminescent carbon dots in Nescafé® Original instant coffee: applications to bioimaging. *Talanta.* 2014, 127, 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.046>.

27. Pudza, MY, Abidin ZZ, Abdul-Rashid S, Yassin FM, Noor ASM, Abdullah M. Synthesis and characterization of fluorescent carbon dots from tapioca. *Chemistry Select.* 2019, 4 (14): 4140-4146. <https://doi.org/10.1002/slct.201900836>.
28. Fan H, Zhang M, Bhandari B, Yang C-hui. Food waste as a carbon source in carbon quantum dots technology and their applications in food safety detection; Elsevier Ltd., 2020, vol. 95. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.008>.
29. Jelinek R. Carbon quantum dots. Synthesis, properties and applications. 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43911-2>.
30. Sagbas S, Sahiner N. Carbon dots: preparation, properties, and application; Elsevier Ltd., 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102509-3.00022-5>.
31. Yuan F, Li S, Fan Z, Meng X, Fan L, Yang S. Shining Carbon Dots: Synthesis and biomedical and optoelectronic applications. *Nano Today*, 2016, 11(5): 565-586. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.08.006>.
32. Tejwan N, Saha SK, Das J. Multifaceted applications of green carbon dots synthesized from renewable sources. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2020, 275, 102046. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102046>.
33. Nadeem M, Naveed T, Rehman F, Xu Z. Determination of histamine in fish without derivatization by indirect reverse phase-HPLC Method. *Microchem. J.* 2019, 144 (June 2018): 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.09.010>.
34. Cui F, Ye Y, Ping J, Sun X. Carbon dots: current advances in pathogenic bacteria monitoring and prospect applications. *Biosens. Bioelectron.* 2020, 156 (July 2019): 112085. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112085>.
35. Li H, Huang J, Song Y, Zhang M, Wang H, Lu F, Huang H, Liu Y, Dai X, Gu Z, Yang Z, Zhou R, Kang Z. Degradable carbon dots with broad-spectrum antibacterial activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018, 10(32): 26936-26946. <https://doi.org/10.1021/acssami.8b08832>.
36. Jian, HJ, Wu RS, Lin TY, Li YJ, Lin HJ, Harroun SG, Lai JY, Huang CC. Super-cationic carbon quantum dots synthesized from spermidine as an eye drop formulation for topical treatment of bacterial keratitis. *ACS Nano.* 2017, 11 (7): 6703-6716. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b01023>.
37. Das P, Ganguly S, Bose M, Mondal S, Choudhary S, Gangopadhyay S, Das AK, Banerjee S, Das NC. Zinc and nitrogen ornamented bluish white luminescent carbon dots for engrossing bacteriostatic activity and fenton based bio-sensor. *Mater. Sci. Eng. C* 2018, 88(August 2017): 115-129. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.03.010>.
38. Kuang W, Zhong Q, Ye X, Yan Y, Yang Y, Zhang J, Huang L, Tan S, Shi Q. Antibacterial nanorods made of carbon quantum dots-ZnO under visible light irradiation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2019, 19(7): 3982-3990. <https://doi.org/10.1166/jnn.2019.16320>.
39. Marković ZM, Kováčová M, Humpolíček P, Budimir MD, Vajdák J, Kubát P, Mičušík M, Švajdlénková H, Danko M, Capáková Z, Lehocký M, Todorović Marković BM, Špitalský Z. Antibacterial photodynamic activity of carbon quantum dots/polydimethylsiloxane nanocomposites against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2019, 26 (April): 342-349. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.019>.
40. Ghorbani M, Molaei R, Moradi M, Tajik H, Salimi F, Kousheh SA, Koutamehr ME. Carbon dots-assisted degradation of some common biogenic amines: an in vitro study. *Lwt* 2021, 136(P1): 110320. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110320>.
41. Devi P, Thakur A, Bhardwaj SK, Saini S, Rajput P, Kumar P. Metal ion sensing and light activated antimicrobial activity of Aloe-Vera derived carbon dots. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* 2018, 29 (20): 17254-17261. <https://doi.org/10.1007/s10854-018-9819-0>.
42. Shahshahanipour M, Rezaei B, Ensafi AA, Etemadifar Z. An ancient plant for the synthesis of a novel carbon dot and its applications as an antibacterial agent and probe for sensing of an anti-cancer drug. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 98(January): 826-833. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.041>.
43. Asha Jhonsi M, Thulasi S. A novel fluorescent carbon dots derived from tamarind. *Chem. Phys. Lett.* 2016, 661, 179-184. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2016.08.081>.
44. Jhonsi MA, Ananth DA, Nambirajan G, Sivasudha T, Yamini R, Bera S, Kathiravan A. Antimicrobial activity, cytotoxicity and DNA binding studies of carbon dots. *Spectrochim. Acta-Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2018, 196(2017): 295-302. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.02.030>.
45. Gagic M, Kociova S, Smerkova K, Michalkova H, Setka M, Svec P, Pribyl J, Masilko J, Balkova R, Heger Z, Richtera L, Adam V, Milosavljevic V. One-pot synthesis of natural amine-modified biocompatible carbon quantum dots with antibacterial activity. *J. Colloid Interface Sci.* 2020, 580, 30-48. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.06.125>.
46. Travlou NA, Giannakoudakis DA, Algarra M, Labe-lla AM, Rodríguez-Castellón E, Bandosz TJ. S- and N-doped carbon quantum dots: surface chemistry dependent antibacterial activity. *Carbon N. Y.* 2018, 135, 104-111. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2018.04.018>.
47. Lakshmanan A, Surendran P, Manivannan N, Sathish M, Balalakshmi C, Suganthy N, Rameshkumar P, Kaviyarasu K, Ramalingam G. Superficial preparation of biocompatible carbon quantum dots for antimicrobial applications. *Mater. Today Proc.* 2019, 36 (xxxx): 171-174. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.02.694>.
48. Otis G, Bhattacharya S, Malka O, Kolusheva S, Bolel P,

- Porgador A, Jelinek R. Selective labeling and growth inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by Aminoguanidine carbon dots. *ACS Infect. Dis.* 2019, 5(2), 292-302. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00270>.
49. Anand SR, Bhati A, Saini D, Gunture; Chauhan N, Khare P, Sonkar SK. Antibacterial nitrogen-doped carbon dots as a reversible «fluorescent nanoswitch» and fluorescent ink. *ACS Omega* 2019, 4(1): 1581-1591. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03191>.
50. Dong X, Awak MA, Tomlinson N, Tang Y, Sun YP, Yang L. Antibacterial effects of carbon dots in combination with other antimicrobial reagents. *PLoS One* 2017, 12 (9): 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185324>.
51. Kumar VB, Natan M, Jacobi G, Porat Z, Banin E, Gedanken A. Ga@C-dots as an antibacterial agent for the eradication of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Nanomedicine* 2017, 12, 725-730. <https://doi.org/10.2147/IJN.S116150>.
52. Kumar VB, Perelshtein I, Lipovsky A, Porat Z, Gedanken A. The sonochemical synthesis of Ga@C-dots particles. *rsc Adv.* 2015, 5(32): 25533-25540. <https://doi.org/10.1039/c5ra01101a>.
53. Roh SG, Robby AI, Phuong PTM, In I, Park SY. Photoluminescence-tunable fluorescent carbon dots-deposited silver nanoparticle for detection and killing of bacteria. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 97, 613-623. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.070>.
54. Yan Y, Kuang W, Shi L, Ye X, Yang Y, Xie X, Shi Q, Tan S. Carbon quantum dot-decorated TiO₂ for fast and sustainable antibacterial properties under visible-light. *J. Alloys Compd.* 2019, 777, 234-243. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.10.191>.
55. Jijie R, Barras A, Bouckaert J, Dumitrascu N, Szunertits S, Boukherroub R. Enhanced antibacterial activity of carbon dots functionalized with ampicillin combined with visible light triggered photodynamic effects. *Colloids surfaces B Biointerfaces* 2018, 170(April): 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.040>.
56. Dong X, Bond AE, Pan N, Coleman M, Tang Y, Sun YP, Yang L. Synergistic photoactivated antimicrobial effects of carbon dots combined with dye photosensitizers. *Int. J. Nanomedicine* 2018, 13, 8025-8035. <https://doi.org/10.2147/IJN.S183086>.
57. Stanković NK, Bodik M, Šiffalović P, Kotlar M, Mičušik M, Špitalsky Z, Danko M, Milivojević DD, Kleinova A, Kubat P, Capakova Z, Humpolíček P, Lehocky, M, Todorović Marković BM, Marković ZM. Antibacterial and antibiofouling properties of light triggered fluorescent hydrophobic carbon quantum dots Langmuir-Blodgett thin films. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2018, 6(3): 4154-4163. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b04566>.
58. Chen J, Long Z, Wang S, Meng Y, Zhang G, Nie S. Biodegradable blends of graphene quantum dots and thermoplastic starch with solid-state photoluminescent and conductive properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 139, 367-376. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.211>.
59. Koshy RR, Koshy JT, Mary SK, Sadanandan S, Jisha S, Pothan LA. Preparation of pH sensitive film based on starch/carbon nano dots incorporating anthocyanin for monitoring spoilage of pork. *Food Control.* 2021, 126, 108039. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108039>.

REVISTA QUÍMICA CENTRAL



Validación del método de cuantificación de lignina en biomasa de pino

Validation of the lignin quantification method in pine biomass

Lenin Márquez^a | Paola Cuji^b | Carlos Méndez^c | Diego Flores^d

^a iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

^b iD Instituto de Investigación Geológico y Energético, Ecuador

^c iD Instituto de Investigación Geológico y Energético, Ecuador

^d iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

HISTORIAL DEL ARTÍCULO

Recepción: 13/08/2021

Aceptación: 21/12/2021

PALABRAS CLAVE

Lignina, biomasa de pino, NREL/TP-510-42618, espectroscopía UV-Vis, validación de método.

ARTICLE HISTORY

Received: 13/08/2021

Accepted: 21/12/2021

KEY WORDS

Lignin, pine biomass, NREL/TP-510-42618, UV-Vis spectroscopy, method validation.

RESUMEN

La lignina es uno de los compuestos más abundantes en el mundo vegetal enfocada a ser el reemplazo del petróleo en diversas aplicaciones. La presente investigación consistió en la validación del método «Determinación de lignina en biomasa» basada en la metodología NREL/TP-510-42618 del Laboratorio Nacional de Energías Renovables de Estados Unidos, aplicada a biomasa de pino. Mediante previa cuantificación de humedad y ensayo de extractivos en agua y etanol para la eliminación de los materiales interferentes, la lignina se cuantificó aplicando las técnicas de gravimetría y espectroscopía UV-Vis a una longitud de onda de 240 nm, obteniendo el contenido de lignina soluble e insoluble. A partir de los resultados del contenido de lignina, se evidenció la influencia de las condiciones ambientales en cada nivel de ensayo, sin embargo, esta influencia no ocasionó una desviación significativa al compararla con la ecuación de Horwitz. Concluyendo así que las condiciones escogidas y establecidas de experimentación del rango sugerido por la metodología NREL, permiten un correcto desempeño del método aplicado a biomasa de pino, permitiendo ser replicada a futuro en diferentes investigaciones en el país.

ABSTRACT

Lignin is one of the most abundant compounds in the plant world, focused on being a replacement for oil in various applications. This research consists of the validation of the method «Determination of lignin in biomass» based on the NREL/TP-510-42618 methodology of the United States National Renewable Energy Laboratory, applied to pine biomass. By prior moisture quantification and testing of extractives in water and ethanol to eliminate interfering materials, lignin was quantified applying gravimetry and UV-Vis spectroscopy techniques at a wavelength of 240 nm, obtaining the soluble lignin content, and insoluble. From the results of the lignin content, the influence of the environmental conditions at each test level is evidenced, however, this influence did not cause a significant deviation when compared with the Horwitz equation. Thus, concluding that the chosen and established experimentation conditions of the range suggested by the NREL methodology allow a correct performance of the method applied to pine biomass, allowing it to be replicated in the future in different investigations in the country.

INTRODUCCIÓN

La lignina es un polímero fenólico, amorfo y tridimensional del mundo vegetal, compuesto por anillos aromáticos en su estructura, responsable de la unión de las fibras de celulosa, capaz de impedir el flujo de agua a través de las capas de la planta, estableciendo una resistencia al ataque de microorganismos (Palacios, 2016).

La lignina corresponde a un material renovable que se encuentra en la mayor parte de la naturaleza, cambiando su composición en función del tipo de planta, además tiene diferente aplicación si se cuantifica la lignina en el tallo, las hojas o cáscaras del fruto. La lignina en las hojas sirve como indicador para determinar la nutrición foliar, es decir, para suministrar la cantidad idónea

de nutrientes para el desarrollo y mantenimiento de la planta, o a su vez, modificar el grado de descomposición, siendo el eje fundamental para aumentar la productividad (Eddine, 2006).

Mediante la extracción de la lignina existe una amplia gama aplicativa: al calentarla a altas temperaturas mediante un proceso de pirólisis catalizada se transforma en carbón activado, útil para el tratamiento de aguas residuales (Cordero, *et al.*, 2007).

Por su propiedad de cohesión aumenta la adhesión de la estructura del betún, aumentando la rigidez más de dos veces superior al de una mezcla convencional (Ren, *et al.*, 2021). Extraída de biomasa procedente de residuos de café o bagazo de caña de azúcar, y adicionada en un 0,3% para la elaboración de plastificantes aumenta la resistencia a la compresión del material (Martínez, *et al.*, 2007).

Además, Akhemedov junto con su equipo de investigación, descubrieron acción antimicrobiana y antitumoral a través de extractivos y derivados de material lignocelulósico mediante estudios realizados en animales, donde se demostró en ratones que inhibe el crecimiento de sarcomas y la promoción de tumores cancerígenos en la piel (Cruz, *et al.*, 1997).

El objetivo esencial de esta investigación es, además de verificar que el método NREL/TP-510-42618 es adecuado para la cuantificación de lignina en biomasa de pino, transmitir e informar la importancia de este compuesto que se encuentra presente en la naturaleza, teniendo un alto potencial en la industria química. Si bien hoy por hoy, puede que no reemplace en ciertas aplicaciones al petróleo en relación costo-beneficio, es una realidad que el petróleo con el paso del tiempo dejará de existir, momento en el cual la lignina llegará a convertirse en uno de los biopolímeros motores del mundo.

PARTE EXPERIMENTAL

DISEÑO EXPERIMENTAL

Fundamentado en la optimización de recursos y tiempo, el diseño experimental se estructuró para que cada ensayo de cuantificación de lignina total, definido mediante el modelo de la figura 1, se realice 3 veces (ver Figura 1).

Previamente a la cuantificación de lignina, debe determinarse la humedad antes y después del ensayo de extractivos, procedimiento que sirve para eliminar cualquier sustancia interferente.

REACTIVOS, SOLVENTES Y EQUIPOS

Para el desarrollo experimental se empleó la norma NREL/TP-510-42618 Determinación de lignina en biomasa,

siendo un proceso sistemático que debe llevarse a cabo con procedimientos simultáneos como son: NREL/TP-510-42621 - Determinación de humedad en la muestra, NREL/TP-510-42619 - Determinación de extractivos en biomasa.

Se utilizó material de referencia de pino del NIST, agua de grado HPLC, alcohol etílico y ácido sulfúrico concentrado grado reactivo; los equipos empleados fueron: balanza analítica, horno de secado, rotavapor, bomba de vacío, mufla, espectrofotómetro uv-Vis, equipo de extracción Soxhlet.

METODOLOGÍA

Determinación de humedad

Se secan los platos de pesaje a 105°C durante 4 horas, se enfrían en un desecador, registrando el peso hasta mantenerse constante, se coloca la muestra y se realiza el mismo procedimiento.

Determinación de extractivos

Se secan los matraces con núcleos de ebullición a 105°C durante 8 horas, se enfrían en un desecador, registrando el peso hasta mantenerse constante. Se instala el equipo de extracción Soxhlet, previamente vertido 190 mL de agua en el matraz y colocando la muestra en un dedal de extracción, se ajusta la manta calefactora para proporcionar un mínimo de 4-5 ciclos de sifón por hora, una vez terminado el proceso, se lleva al rotavapor para eliminar el solvente y después se seca el matraz en el horno a 40°C durante 24 horas, a continuación, se enfría en un desecador. La muestra en el dedal se introduce nuevamente en el equipo Soxhlet, previamente vertido 190 mL de alcohol etílico en un nuevo matraz, se realiza el mismo procedimiento, pero esta vez ajustando la manta calefactora a un mínimo de 6-10 ciclos de sifón por hora.

Determinación de lignina total

Se colocan los crisoles de filtración sin muestra en un horno mufla a 575°C por un mínimo de cuatro horas, se enfrían en un desecador, registrando el peso hasta mantenerse constante. Se toma la muestra seca en un tubo de presión y se adicionan 3 mL de ácido sulfúrico al 72%, agitando cada 5 minutos a baño María a 35°C durante 60 minutos.

Una vez terminado se agrega 84 mL de agua y se introduce en el autoclave durante 30 minutos a 120°C. Cuando se enfrían los tubos se procede a filtrar la suspensión. Los crisoles de filtración se secan a 105°C durante 4 horas, enfriando en un desecador hasta peso constante.

Mientras tanto, el líquido se diluye hasta alcanzar una absorbancia entre 0,7-1,0 y se analiza por espectrofotometría uv-Vis a una longitud de onda de 240 nm, tomando como referencia un blanco con agua.

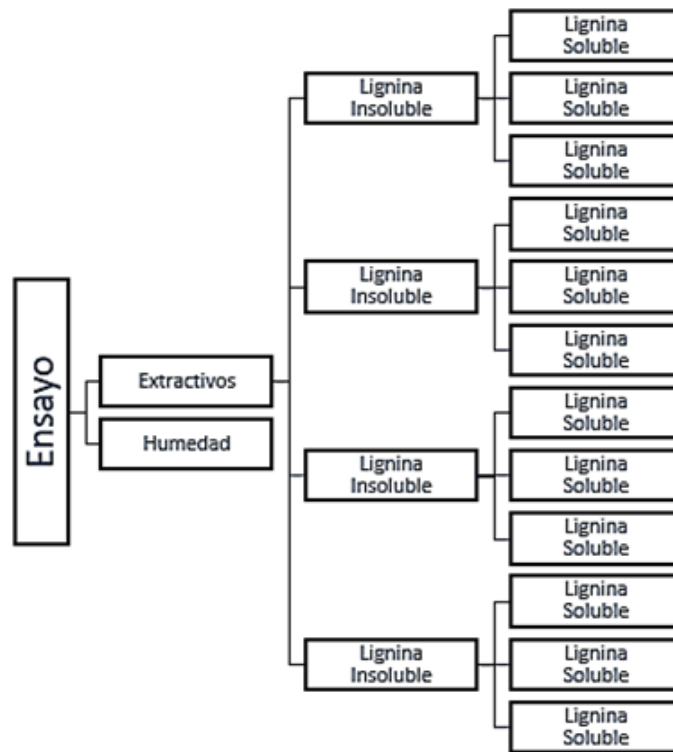


Figura 1. Aminas biogénicas

Tabla 1. Resultados de los ensayos de humedad

	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3
% humedad	3,8356	3,8356	3,6072
	3,9043	3,9043	3,5575
Promedio	3,8700	3,8700	3,8700

Tabla 2. Resultados de los ensayos de extractivos

	ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3
% extractivos en agua	4,5217	3,5152	4,0913
% extractivos en alcohol	1,0200	1,2508	1,4377
% extractivos total	5,5417	4,7660	5,5289

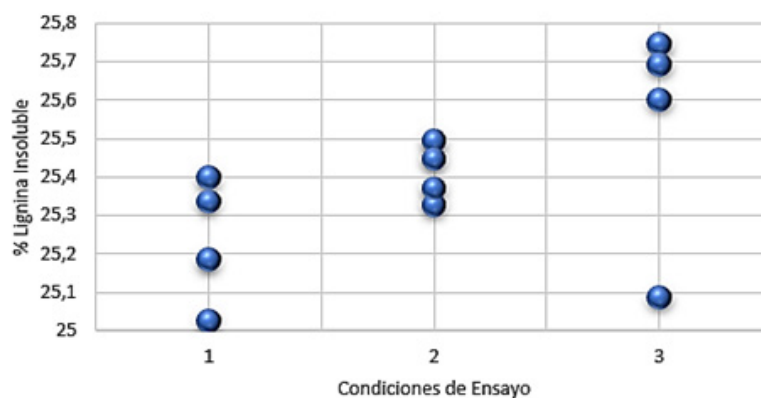


Figura 2. Resultados del porcentaje de lignina insoluble

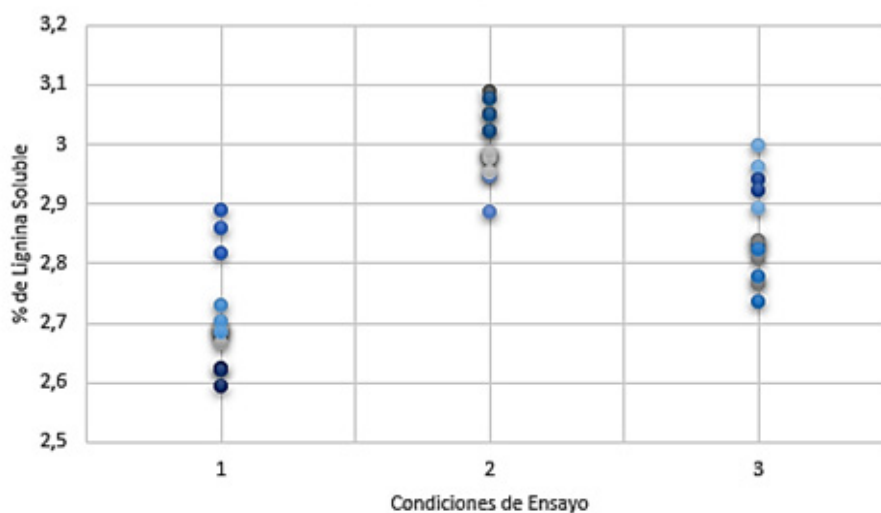


Figura 3. Resultados del porcentaje de lignina soluble

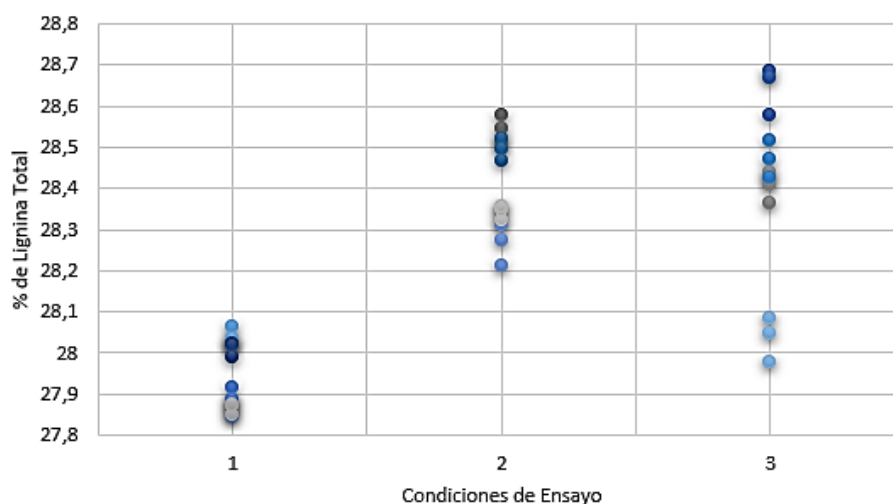


Figura 4. Resultados del porcentaje de lignina total

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS DE HUMEDAD

El ensayo de humedad representa el contenido de agua presente en la muestra (ver Tabla 1).

RESULTADOS DE EXTRACTIVOS

El ensayo de extractivos determina la presencia de sustancias solubles o afines al alcohol y al agua, que interfieren en el resultado como pueden ser: azúcares no estructurales, material nitrogenado e inorgánico (ver Tabla 2).

RESULTADOS DE LIGNINA INSOLUBLE

La figura 2 indica el contenido de lignina insoluble determinada a partir de 4 repeticiones en cada ensayo (ver Figura 2).

RESULTADOS DE LIGNINA SOLUBLE

La figura 3 representa el contenido de la lignina soluble determinada mediante 3 réplicas en cada repetición a una longitud de onda de 240 nm (ver Figura 3).

RESULTADOS DE LIGNINA TOTAL

La figura 4 presenta la cantidad de lignina total equivalente a la suma de la lignina soluble e insoluble (ver Figura 4).

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

La estadística refleja la credibilidad o, a su vez, la manera en que se pueden interpretar los resultados de la investigación, por consiguiente, a continuación, se manifiestan

las características de desempeño del método.

Repetibilidad

El coeficiente de variación de repetibilidad refleja la dispersión de los datos de los ensayos realizados bajo las mismas condiciones.

$$\%CVr = \frac{Sr}{\bar{X}} * 100 \quad (1)$$

$$\%CVr = \frac{0,1603}{28,2503} * 100$$

$$\%CVr = 0,57$$

Reproducibilidad

El coeficiente de variación de reproducibilidad refleja la dispersión de los datos de los ensayos realizados bajo diferentes condiciones.

$$\%CVR = \frac{SR}{\bar{X}} * 100 \quad (2)$$

$$\%CVR = \frac{0,5376}{28,2503} * 100$$

$$\%CVR = 1,90$$

Veracidad

La veracidad del método determina la exactitud, al comparar un valor referencial y el valor obtenido de manera experimental.

$$\%Recuperación = \frac{Valor\ Calculado}{Valor\ Verdadero} * 100 \quad (3)$$

$$\%Recuperación = \frac{28,25}{28,2} * 100$$

$$\%Recuperación = 100,18\%$$

El método se desarrolló utilizando reactivos de alta pureza, pudiendo la variabilidad de las características de desempeño verse afectadas si se utilizara otro tipo de reactivos, en este sentido, es de suma importancia continuar con investigaciones aplicadas a diferentes materias primas, al mismo tiempo que permitan la optimización del proceso, llegando a ser de gran utilidad en un futuro para el desarrollo de productos con mayor valor agregado y de economía circular sostenible en nuestro país.

Las gráficas del contenido de lignina nos permiten apreciar la variabilidad en los ensayos, manifestando dispersión en los valores influenciados por las condiciones ambientales, pudiendo ser considerados en el resultado final como fuente de incertidumbre de error tipo A.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados de las ecuaciones 1 y 2 correspondientes a 0,57% y 1,90%, se concluye que el método demuestra tener repetibilidad y reproducibilidad, debido a que estos valores no sobrepasan los objetivos 1,21% y

2,42% calculados mediante la ecuación de Horwitz, es decir, que los datos aseguran la precisión del método.

En vista de que el valor de veracidad equivalente a 100,18%, no sobrepasa el límite establecido de 98%-102%, se concluye que el método garantiza resultados con valores exactos.

El desarrollo del método establece que las condiciones experimentales establecidas reflejan un buen desempeño para la cuantificación del contenido de lignina en biomasa de pino.

REFERENCIAS

1. Palacios M. Caracterización química de la biomasa procedente de las hojas, pseudotallo, raquis y pseudopeciolo de la planta de banano y su relación con el poder calorífico. Tesis de Titulación. Cuenca. Universidad de Cuenca. 2016.
2. Eddine N. Despolimerización de lignina para su aprovechamiento en adhesivos para producir tableros de partículas. Tesis Doctoral. Tarragona. Universidad Rovira i Virgili, abril de 2006.
3. Cordero T, Rodríguez J, Bedia J. Preparación de materiales de carbono a partir de lignina. *Óptica Pura y Aplicada*. 2007, 40 (2): 161-168.
4. Ren S, Liu X, Zhang Y, Lin P, Apostolidis P, Erkens S, Li M. & Xu J. Multi-scale characterization of lignin modified bitumen using experimental and molecular dynamics simulation methods. *Construction and Building Materials*. 2021, 287, n.o 123058. (Visitado 24 de diciembre de 2021). <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2021.123058>
5. Martínez J, Jiménez J, Ramírez W, Rojo P. Modificación de resinas fenólicas con lignina procedente del pulpeo alcalino del bagazo de caña. *Scientia et Technica Año xiii*. 2007, n.o 36, 683-688.
6. Cruz R, Dopico D, Figueredo J, Rodríguez R, Martínez G. Uso de lignina de bagazo con fines medicinales. *Rev. Med. Exp. ins*. 1997, 14 (1): 67-71.
7. Sluiter A, Hames B, Ruiz R & Scarlata C. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass - NREL/TP-510-42618, Procedimiento de laboratorio analítico: NREL, EE. UU., agosto de 2012.

REVISTA QUÍMICA CENTRAL



Pruebas bioquímicas para el tamizaje y diagnóstico oportuno de mucopolisacaridosis de población en riesgo

Biochemical tests for screening and timely diagnosis of Mucopolysaccharidosis for population at risk

Walkyrie Aguilar (†)^a | Guadalupe Jibaja^b | Lourdes Pazmiño^c

^a iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

^b iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

^c iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

HISTORIAL DEL ARTÍCULO

Recepción: 31/08/2021

Aceptación: 15/12/2021

PALABRAS CLAVE

Mucopolisacaridosis, MPS, glicosaminoglicanos, GAG, tamizaje, diagnóstico.

ARTICLE HISTORY

Received: 13/08/2021

Accepted: 21/12/2021

KEY WORDS

Mucopolysaccharidosis, MPS, glycosaminoglycans, GAG, screening, diagnosis.

RESUMEN

Las mucopolisacaridosis son enfermedades raras, de baja prevalencia y de depósito lisosomal. Se producen por la acumulación de diferentes tipos de glucosaminoglicanos debido al defecto genético que produce la ausencia de la enzima respectiva para su degradación. En el presente trabajo se proponen pruebas bioquímicas para el tamizaje y diagnóstico oportuno de mucopolisacaridosis para población ecuatoriana en riesgo. Se utilizó el método espectrofotométrico con azul de dimetil metileno para determinar las concentraciones de diferentes glucosaminoglicanos en muestras de orina de pacientes diagnosticados con mucopolisacaridosis y pacientes sanos. Se realizó la electroforesis en gel de agarosa para clasificar el tipo de mucopolisacaridosis. Se obtuvo la concentración de glucosaminoglicanos en muestras de orina, con una diferencia estadísticamente significativa entre pacientes con diagnóstico de mucopolisacaridosis y pacientes aparentemente sanos. Sin embargo, la técnica de electroforesis no permitió clasificar los diversos tipos de mucopolisacaridosis. Las concentraciones de glucosaminoglicanos de pacientes con mucopolisacaridosis son más elevadas que las de pacientes aparentemente sanos por lo que la técnica es válida para la determinación de glucosaminoglicanos por el método espectrofotométrico de azul de dimetil metileno, y sirve para realizar el tamizaje y diagnóstico de mucopolisacaridosis. La clasificación del tipo de mucopolisacaridosis por electroforesis en agarosa, no brindó resultados concluyentes.

ABSTRACT

Mucopolysaccharidosis are rare, low prevalence diseases and are of lysosomal deposit. They are produced by the accumulation of different types of glycosaminoglycans due to the genetic defect that produces the absence of the respective enzymes for their degradation. We propose biochemical tests for the screening and timely diagnosis of mucopolysaccharidosis for the Ecuadorian population at risk. Spectrophotometry with dimethyl methylene blue reagent was used to determine concentrations of glycosaminoglycans in urine samples, from patients with mucopolysaccharidosis diagnosis and healthy patients. Agarose gel electrophoresis was used to classify the type of mucopolysaccharidosis. In the present investigation we determined the concentration of glycosaminoglycans in urine samples, with a statistically significant difference between healthy patients and patients with a diagnosis of MPS. However, the electrophoresis technique did not allow classifying the various types of mucopolysaccharidosis. The concentrations of glycosaminoglycans in patients with mucopolysaccharidosis are higher than those of healthy patients, therefore the technique is valid for the determination of glycosaminoglycans. Spectrophotometry with dimethyl methylene blue is suitable for the screening and diagnosis of mucopolysaccharidosis. The methodology used for the correct classification of the type of mucopolysaccharidosis, by electrophoresis in agarose, did not give conclusive results.

INTRODUCCIÓN

Las MPS, enfermedades de depósito lisosomal, son errores innatos del metabolismo (EIM) debido a los GAG que se acumulan por el déficit de por lo menos una de las 11 enzimas que degradan a estos polisacáridos sulfurados. Los GAG son polímeros lineales formados por unidades repetidas como son los disacáridos, de carácter ácido.

Generan la matriz extracelular, formando moléculas de mayor complejidad como los proteoglicanos (Lin *et al.*, 2019; Stapleton *et al.*, 2018; Kobayashi, 2019; Kubaski *et al.*, 2020a, Wilson *et al.*, 2018). Estos compuestos son degradados por enzimas específicas que, en caso de presentarse en menor concentración, producen una acumu-

lación a nivel de los lisosomas, y cuya concentración en exceso es excretada por la orina. Las MPS son enfermedades genéticas (González Andrade *et al.*, 2017) que se transmiten como enfermedades autosómicas recesivas y ligadas al cromosoma X, como el síndrome de Hunter. La acumulación sistemática de GAG, como del heparán sulfato, dermatán sulfato, condroitín sulfato, y/o queratán sulfato se asocia con síndromes clínicos específicos (Poswar *et al.*, 2019). Las formas más sencillas se caracterizan por anomalías de los huesos y enanismo, deterioro progresivo cardiopulmonar y muerte en el período de la infancia o adulto joven. Las formas más progresivas pueden desarrollar retardo mental y se presentan con un retardo en el desarrollo, facies específicas y anomalías de los huesos (Kubaski *et al.*, 2020b). Por otro lado, las funciones auditivas, visuales y cardiovasculares, como la movilidad articular pueden estar comprometidas (Kobayashi, 2019). El retardo mental es característico de la MPS tipos I, II y III. El manejo de soporte y paliativo para las complicaciones respiratorias y cardiovasculares, como auditivas e hidrocefalia, pueden mejorar notablemente la calidad de vida de estos pacientes y sus familias.

Las MPS aparecen, en la mayoría de los casos, durante la infancia sin síntomas clínicos evidentes al momento del nacimiento. Los pacientes con MPS demuestran un rango amplio de síntomas multistémicos con un curso crónico y progresivo, debilitando al sistema óseo y cardiopulmonar, cornea, piel, hígado, cerebro y meninges (Gomes Bicalho *et al.*, 2011).

Los tratamientos han demostrado que son más efectivos cuando más temprano se realice el diagnóstico. Existen varias alternativas terapéuticas para tratar las MPS, como el reemplazo enzimático, trasplante de médula ósea, trasplante de sangre de cordón umbilical, terapia y edición génica (Kubaski *et al.*, 2020a). Los GAG se determinan por varios métodos (Lin *et al.*, 2019; Colón *et al.*, 2017; Kubaski *et al.*, 2020b).

Los pacientes de la población ecuatoriana diagnosticados con MPS lo han sido en laboratorios de fuera del país, como es el caso de pacientes de la Fundación Fepel Dasha. En los laboratorios de diagnóstico del Ecuador no se han comprobado estas pruebas, por tanto, se limita el acceso al diagnóstico a todos aquellos pacientes que presentan mayor riesgo de desarrollar estas enfermedades genéticas MPS. El laboratorio de Docencia de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador (UCE), cuenta con los equipos y los profesionales (bioquímicos clínicos) para realizar y validar las pruebas para diagnosticar las MPS.

El objetivo es proponer pruebas bioquímicas para el diagnóstico oportuno de MPS desde el laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias Químicas, UCE.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES Y REACTIVOS

Los equipos utilizados fueron: equipo de espectrofotometría Fisher Scientific SP-2100UVPC y equipo de electroforesis horizontal biostep gelco GH200 series; además de los reactivos 1,9-Dimethyl-Methylene Blue Zinc Chloride Double Salt Dye Content grado p.a. pureza > 80% (1 g); etanol grado p.a. pureza 96% (1 L); ácido fórmico (100 mL); formiato de sodio (250 g); condroitín sulfato (500 mg), dermatán sulfato (25 mg); heparán sulfato proteoglicano (1 mg); gel de agarosa (100 g); tampón TAE (10X) (1 L) (Tris base, 48,4 g; ácido acético glacial, 11,4 mL; 0,5 M EDTA pH 8; 20 mL); tampón de carga (40% Sacarosa, 4 g; 3% glicerol, 3 mL; 0,025% azul bromofenol, 25 mg); agua destilada; azul de Coomassie (0,25g); metanol grado p.a. pureza 96% (90 mL) y ácido acético glacial (10 mL).

MÉTODOS

Se realizó la validación de las pruebas de bioquímicas de GAG en espectrofotometría con el reactivo DBM. El método utilizado se basó en una patente (Sampedro *et al.*, 2015).

Se desarrolló la validación de las pruebas de tamizaje y diagnóstico de laboratorio clínico al determinar la concentración de GAG en muestras de pacientes que presentan los diferentes tipos de MPS, y que pertenecen a la fundación Fepel Dasha y con pacientes aparentemente sanos, estudiantes de la UCE (grupo control) que se atendieron en el laboratorio clínico de la Facultad Ciencias Químicas, UCE. Otros colaboradores fueron, el laboratorio docente de Análisis Clínico y Fundación Fepel Dasha y sus pacientes con diagnóstico de MPS. Para el grupo de estudio, el criterio de inclusión fue el diagnóstico previo de MPS (realizado en laboratorios extranjeros ya que en nuestro país no se realiza esta prueba) mientras que para el grupo control el criterio de inclusión fue ser estudiantes aparentemente de la UCE que acudieron al servicio de laboratorio clínico.

El objetivo de la presente investigación no fue diagnosticar a los pacientes, sino utilizar las muestras de los pacientes diagnosticados con algún tipo de MPS (se utilizó muestreo no probabilístico por conveniencia, pacientes de la Fundación Fepel Dasha diagnosticados con un tipo de MPS, muestra disponible en el periodo de tiempo de la investigación).

No fue necesario realizar un emparejamiento y cegamiento de los pacientes que intervinieron en la investigación ya que ésta no fue un estudio epidemiológico.

Se aplicó consentimiento informado, documento firmado por el paciente o su representante. El representante

del paciente firmó la declaración de confidencialidad conociendo que toda información de los pacientes será manejada con absoluta confidencialidad por parte de los investigadores, y que los datos de filiación serán utilizados exclusivamente para garantizar la veracidad de los mismos.

Determinación de concentración de GAG en orina, por el método espectrofotométrico con DMB

Con ayuda del analizador Fisher Scientific SP-2100UVPC, localizado en el Laboratorio de Análisis Clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, se prepararon soluciones acuosas de concentraciones de GAG de 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de condroitin sulfato, dermatán sulfato y heparán sulfato de la casa comercial Sigma Aldrich, midiendo su absorbancia con la disolución de azul de dimetilmetileno (DMB), de 0,35 mmol/L disuelto en etanol y en tampón formiato de sodio. Posterior a ello, se procedió a leer la absorbancia del complejo DMB-GAG de cada estándar y las muestras de orina de pacientes con MPS de diferentes tipos, a condiciones óptimas de pH 4, longitud de onda 528 nm, tiempo de reacción 5 minutos, y temperatura ambiente en un rango de 20-25°C. El reactivo DMB es capaz de unirse específicamente a los GAG sulfatados debido a la carga negativa de éstos. Se calcula por medio de la ley de Beer la concentración de GAG comparando con la concentración de los estándares (Aranzadi *et al.*, 2002; Cueva, 2019).

Procedimiento con prueba de azul de dimetilmetileno (DMB) por electroforesis en gel de agarosa.

Para la clasificación del tipo de MPS, se preparó el gel de agarosa. Pesar 0,4 g de agarosa, cantidad necesaria para obtener la concentración deseada 0,8% en función del volumen de gel aproximadamente de 10 x 10 cm ajustando a 50 mL con el buffer para la electroforesis. Se calentó la mezcla en un horno de microondas por un minuto, hasta observar que toda la agarosa se ha fundido. Se procedió a enfriar la solución de agarosa hasta una temperatura de unos 50°C. Mientras la solución de agarosa se enfría, se prepara el molde en el que se va a elaborar el gel, sellando los bordes, colocándolo en el dispositivo previsto para ello, y colocando el peine en la posición deseada. Se vierte cuidadosamente la solución de agarosa sobre el molde nivelado y se deja que solidifique durante al menos 30 min. Una vez que el gel se solidificó, se procedió a retirar el sellado de los bordes y colocar el molde con el gel en la cámara de electroforesis. Luego, se pinchó cuidadosamente con el peine para que queden libres los pocillos para lo cual se depositaron las muestras (la solución del gel de agarosa presentó un pH cercano a 8,3 sin necesidad de ajustarla).

Preparación del buffer de corrida para la electroforesis

Para la solución TAE 10X, se pesó Tris base, 48,4 g; se usó ácido acético glacial, 11,4 mL; 0,5 M EDTA pH 8, 20 mL y

se ajustó a 1 L con agua bidestilada. Se tomó una alícuota de 50 mL del buffer para la electroforesis y se llevó a 1 L con agua bidestilada hasta tener un TAE 0,5X. Esta solución se añadió luego en la cámara de electroforesis hasta que cubra el gel unos 3-5 mm. El EDTA se preparó previamente, añadiendo al agua bidestilada (un volumen 20% inferior al volumen final deseado) la cantidad de 18,61 g de EDTA y se disolvió en 70 mL de agua destilada para obtener una concentración final de 0,5 M. Se ajustó el pH con NaOH hasta obtener una solución pH 8. Se ajustó el volumen a 100 mL. El TAE se diluyó con agua destilada antes de cada electroforesis para lograr la concentración de uso de 0,5X. Se procedió a verificar con un potenciómetro el pH de la solución amortiguadora, la misma que tuvo un pH cercano a 8,3 sin necesidad de ajustarla. En la electroforesis, el amortiguador ejerce dos funciones: por un lado, lleva la carga eléctrica y, por otro, determina la carga neta de las moléculas que se separan.

Preparación de las muestras y estándares.

Se precipitó 50 μL de las muestras de orina y con los diferentes estándares con 1000 μL de DMB por 5 min a 20-25°C, y se procedió a centrifugar a 10.000 g durante 10 minutos, luego se descartó el sobrenadante. Con el precipitado que quedó, se mezcló 100 μL con un buffer de carga (6X); 0,025% azul de bromofenol, 25 mg; 40% sacarosa, 4 g; o 3% glicerol, 3 mL y ajustar a 10 mL con agua destilada. El volumen total estuvo determinado por el tamaño de los pocillos, habitualmente de 10 μL . (Antes de cargar la muestra de orina, previamente agitar. Se almacenaron los buffers bajo refrigeración para evitar el crecimiento de hongos entre 2 y 8°C.)

Carga de las muestras y estándares en el gel de electroforesis

Se cargaron en los pocillos las muestras que se prepararon. Al momento de sumergir las muestras en la cámara de electroforesis, se aseguró que los pocillos del gel estaban totalmente cubiertos por el buffer. Se procedió a conectar los cables a la fuente de alimentación, uno positivo y otro negativo (frecuentemente representados por colores rojo y negro, respectivamente), y se aplicó un voltaje de 80 V con un valor de corriente aproximado 40 mA durante 1 h 30 minutos. Se tuvo en cuenta que los GAG migraron hacia el cátodo, por lo que debe disponerse correctamente la orientación del gel y de los cables. Se realizó la electroforesis hasta que el frente de corrida (visualizado como una línea azul por el colorante del buffer) llegó a los límites de la parte inferior a un 25% aproximadamente 40 a 60 minutos de la longitud total del gel. En ese momento se detuvo la electroforesis. Finalizada la electroforesis se procedió al desmontaje del equipo, se desconectaron los electrodos de la fuente de poder ya apagada y se removió el sistema que contiene el gel de agarosa. Se enjuagaron con agua destilada todos los componentes de electrofo-

resis al terminar la corrida. Se procedió a reutilizar el buffer de electroforesis hasta 6 veces.

Tinción del gel y visualización

Terminada la electroforesis, se realizó la tinción, y para ello se sacó el gel de su molde cuidadosamente; se sumergió luego en una disolución azul de Coomasie; 0,25 g en 90 mL de metanol (96%): H₂O (v/v 1:1) y 10 mL de ácido acético glacial y con suave movimiento rotatorio, durante 5 minutos. Se realizó la coloración del gel por más de dos horas, debido a que el colorante puede quedar retenido fuertemente en el gel generando un fondo oscuro por sobre tinción que impediría la visualización de los GAG. Se procedió a filtrar la solución de azul de Coomasie a través de un papel Whatman N.º 1 para eliminar los residuos extraños; antes de usar se dejó en reposo por una semana en un frasco oscuro. Culminado el tiempo de incubación, se depositó el colorante en el frasco original. Finalizada la tinción, se sumergió en una disolución preparada de decoloración lenta (10 mL de ácido acético 10% más 5 mL de metanol más 85 mL agua destilada), o en una disolución de decoloración rápida (10 mL de ácido acético 10% más 50 mL de metanol más 40 mL agua destilada), durante 24 a 48 horas. Se lavó el gel para quitar los residuos que dejó el colorante y no se fijó a las moléculas, luego se lavó con agua destilada para frenar la decoloración.

Se retiró el colorante con movimiento constante, y se cambió la solución por una nueva (esto de lo hace cuantas veces sea necesario según el desteñido). Se procedió a seguir desteñiendo hasta que las bandas de los GAG se apreciaron claramente. El ácido acético puede ser utilizado en concentraciones de 5% o 10%. Los GAG se visualizaron como bandas y se compararon con los estándares.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se evidenció que la disolución de DMB, de la casa comercial de Sigma Aldrich, se debe preparar a una concentración de 0,35 mmol/L preferiblemente disuelto en etanol y en tampón formiato de sodio, para que la absorbancia aumente conforme se va formando el complejo DMB-GAG de cada estándar y muestra, teniendo una relación lineal en función de la Ley de Beer, y al límite de cuantificación de los estándares, lo que condujo a condiciones óptimas de pH 4, longitud de onda 528 nm, tiempo de reacción 5 minutos, y temperatura ambiente en un rango de 20-25°C; condiciones en las cuales es capaz de unirse específicamente a los GAG sulfatados debido a su carga negativa.

Estos valores fueron comparados y se obtuvieron resultados similares en relación con los indicados por el autor De La Cruz (De la Cruz Amorós *et al.*, 1999) (ver Tabla 1).

Los cálculos de los parámetros estadísticos para la determinación de concentración de GAG con los estándares (Tabla 2; Tabla 3) muestran las curvas de calibración, donde se midió la señal de respuesta por triplicado de cuatro soluciones con concentraciones espaciadas en forma independiente (n = 12) a lo largo del intervalo 10, 25, 50 y 100 µg/mL para cada GAG. Los resultados fueron expresados como valores medios y al aplicar la prueba de hipótesis con ANOVA de un solo factor, existe diferencias estadísticamente significativas, con un intervalo de confianza del 95% (p < 0,05) (dos colas y 3 grados de libertad), por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, demostrando que sí se puede obtener la concentración de GAG en muestras de orina, de esta manera se puede comparar con el rango de referencia, se encuentran concentraciones superiores o inferiores al límite de cuantificación. De igual manera, los resultados de la figura 1 evidencian un comportamiento de una manera aproximadamente normal demostrada con la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, Anderson-Darling y Ryan-Joiner, por el modelo de regresión de los mínimos cuadrados, aplicándose un ajuste lineal de dispersión obtenido en cada una de las curvas, y estableciéndose con los valores máximos y mínimos como se distancian respecto de la media con un intervalo de confianza del 95% (p < 0,05) en aquellas variables cuantitativas en las que se realizó dicho ajuste, que en función de un pH entre 3 y 6 se tiene un mejor comportamiento con una clara diferencia de los máximos de absorbancia en los que presentaban los complejos DMB-GAG. El autor De la Cruz obtuvo resultados de absorbancia máximas en muestras en pH entre 3 y 6. Para la precisión, los coeficientes de variación fueron de 0,61% para coindroitin sulfato, 0,59% para dermatán sulfato y 0,97% para heparán sulfato. Los límites de detección que se obtuvieron fueron de 0,11 µg/mL para coindroitin sulfato, 0,08 µg/mL para dermatán sulfato y 0,14 µg/mL para heparán sulfato, comparándose con las concentraciones de las muestras de orina que fueron mayores a los límites de detección, indicando que el método es válido. Se puede decir que el intervalo de concentración de las curvas de calibración fue de 10 y 100 µg/mL para cada GAG. 0,0142 A/µg/mL para coindroitin sulfato, 0,0090 A/µg/mL para dermatán sulfato y 0,0158 A/µg/mL para heparán sulfato, que corresponde a la pendiente de la recta de calibración, indicando que el método es sensible y se puede determinar GAG (ver Tabla 2 y Figuras 1, 2, 3 y 4).

En la actualidad los pacientes son diagnosticados en países extranjeros. Generalmente son atendidos cuando la enfermedad ya ha avanzado en su desarrollo, en la mayoría de los casos solo se aplican cuidados paliativos, comprometiendo la salud del paciente, el bienestar y la economía familiar, pese a que la Ley Orgánica de la Salud protege y garantiza su diagnóstico y tratamiento (González Andrade *et al.*, 2017) (ver Tabla 3 y Figuras 5 y 6).

Tabla 1. Programación del analizador Fisher Scientific SP-2100UVPC para determinar GAGs

General	
Modo de medición	Absorbancia
Modo de reacción	UV-VIS
Modo de calibración	Regresión lineal
Blanco	Azul de dimetilmetileno
Longitud de onda	528 nm
Temperatura	20-25°C
Unidades	µg/mL
Análisis	
Volumen de muestra	50 µL
Reactivo	Azul de dimetilmetileno
Volumen	1000 µL
Tiempo de incubación	5 minutos
Cálculos	
Dirección de la reacción	Incremento
Cálculo	Punto final
Calibración	
Intervalo de calibración	Cada corrida
Número de estándares	4
STD1:	10
STD2:	25
STD3:	50
STD4:	100

UV-VIS: luz de visibilidad ultravioleta, nm: nanómetros, µg: microgramos, ml: mililitros uL: microlitros, STD: estándar.

Tabla 2. Valores medios de absorbancia reales de las soluciones estándar para el condroitin sulfato y prueba de precisión, límite de detección, linealidad, sensibilidad y correlación

Solución de chondroitin sulfato (µg/mL)	Absorbancia
10	0,411
25	0,421
50	0,445
100	0,544
Promedio	0,455
sd	0,003
CV (%)	0,61
LD (µg/mL)	0,11
Linealidad (µg/mL)	10 a 100
Sensibilidad (A/µg/mL)	0,0142
Correlación	0,9637 p < 0,018

µg: microgramos, mL: mililitros, SD: desviación estándar. CV: coeficiente de variación, LD: límite de detección.

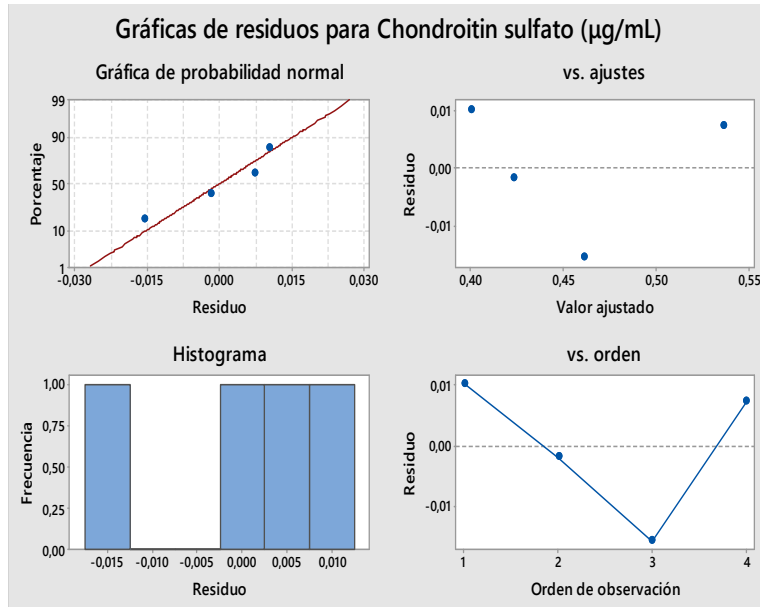


Figura 1. Línea ajustada chondroitin sulfato (µg/mL)

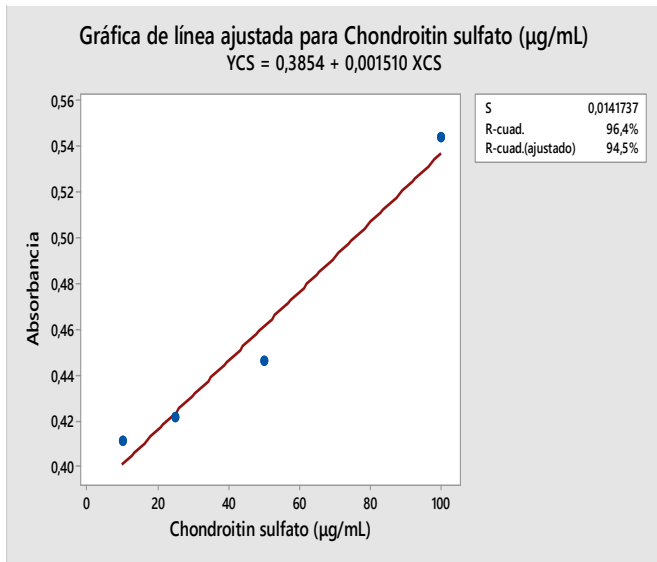


Figura 2. Residuos de chondroitin sulfato (µg/mL).

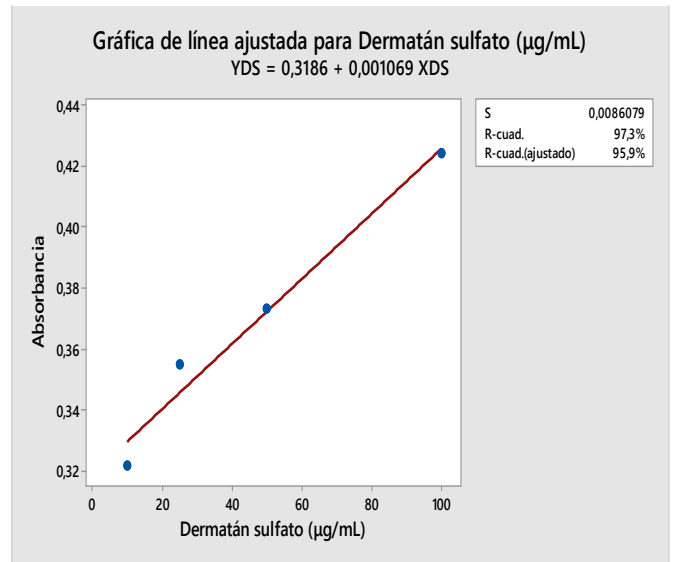


Figura 3. Línea ajustada para dermatán sulfato (µg/mL).

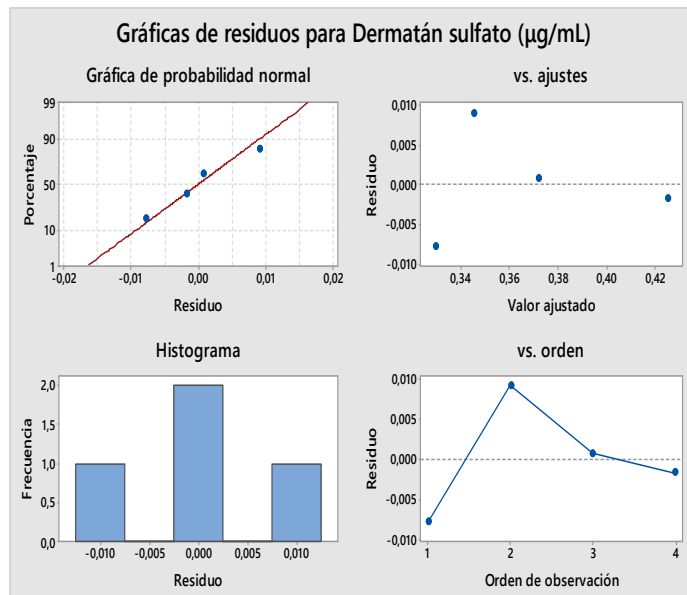


Figura 4. Línea de residuos para dermatán sulfato (µg/mL).

Tabla 3. Valores de absorbancia reales de las soluciones estándar para el heparán sulfato y prueba de precisión, límite de detección, linealidad, sensibilidad y correlación

Solución de heparán sulfato (µg/mL)	Absorbancia
10	0,355
25	0,364
50	0,372
100	0,454
Promedio	0,386
sd	0,004
cv (%)	0,97
LD (µg/mL)	0,14
Linealidad (µg/mL)	10-100
Sensibilidad (A/µg/mL)	0,0158
Correlación	0,9198 $p < 0,041$

µg: microgramos, mL: mililitros, A: absorbancia. SD: desviación estándar, cv: coeficiente de variación, LD: límite de detección.

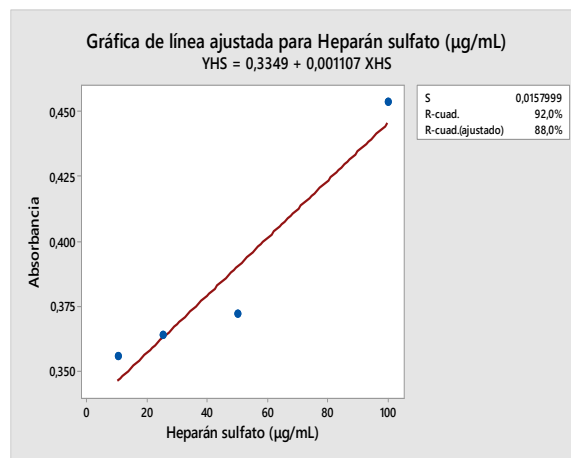


Figura 5. Línea ajustada para heparán sulfato (µg/mL)

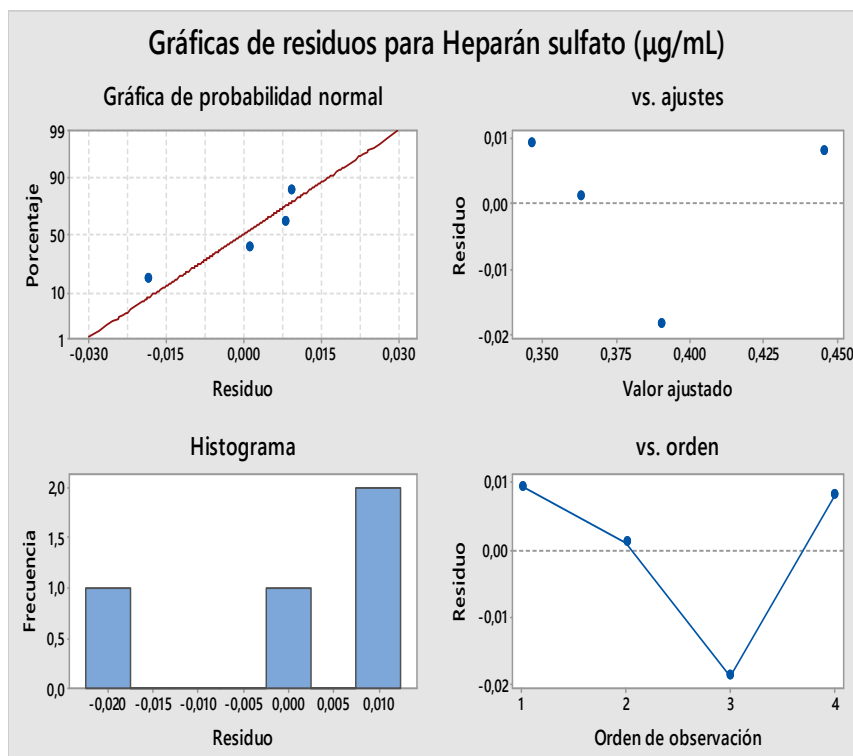


Figura 6. Línea de residuos para heparán sulfato (µg/mL)

Tabla 4. Frecuencia por grupos de edad/género para cada glucosaminoglicano con la prueba de DMB.

Edad	Frecuencia (n)%	Frecuencia masculina (n)(%)	Frecuencia femenina (n)(%)
18-19	97 (41)	25 (28)	72 (49)
20-34	138 (59)	63 (72)	75 (51)
Total	235 (100)	88 (37)	147 (63)

Edad	Concentración (µg/mL)			
	condroitin sulfato	dermatán sulfato	heparán sulfato	CV%
18-19	6,53 ± 0,002	8,36 ± 0,002	7,55 ± 0,002	0,74
20-34	6,48 ± 0,002	8,29 ± 0,002	7,50 ± 0,002	0,59

cv: coeficiente de variación. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. ANOVA: F = 7,22, p < 0,001.

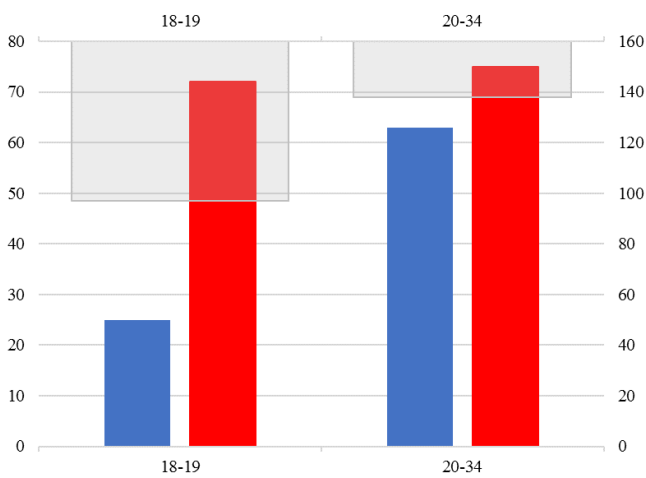


Figura 7. Frecuencia de la población estudiada por grupos de edad y género

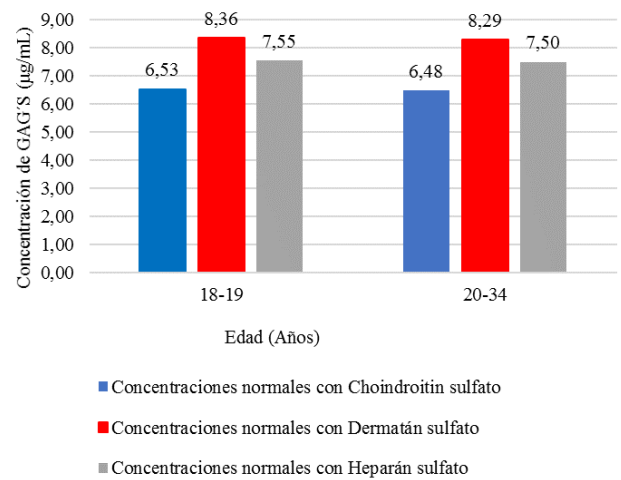


Figura 8. Valores de glucosaminoglicanos en muestras de orina con la prueba de azul de dimetilmetileno según la edad. Mann-Whitney: p < 0.017.

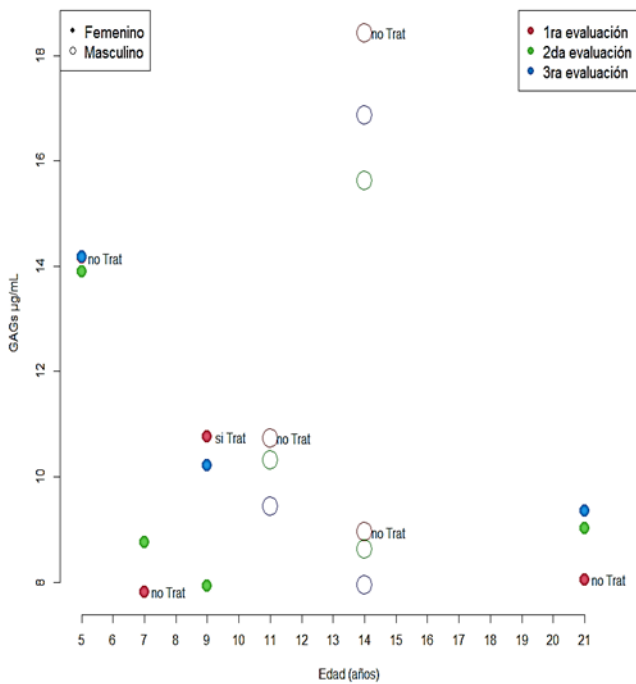


Figura 9. Correlaciones entre variables. Concentración de GAGs, edad, sexo, tratamiento. No existe correlación entre las variables, concentración de GAGs µg/mL- edad y sexo del paciente

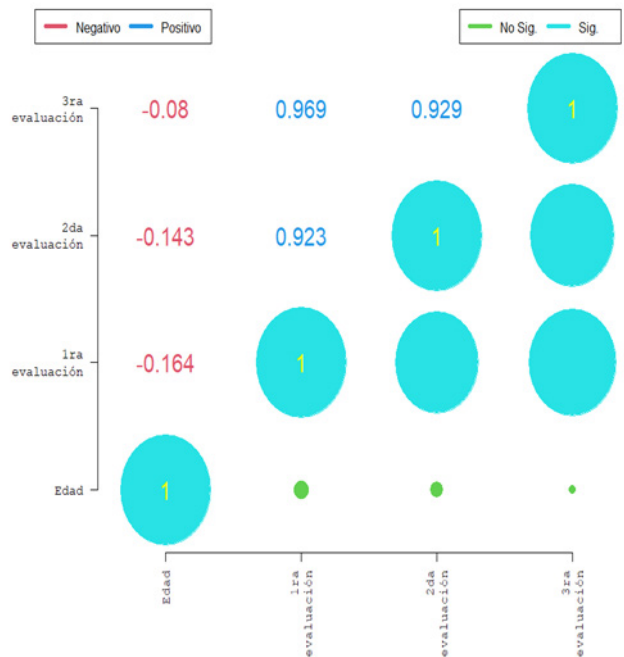


Figura 10. Correlación entre Pacientes (con edad)

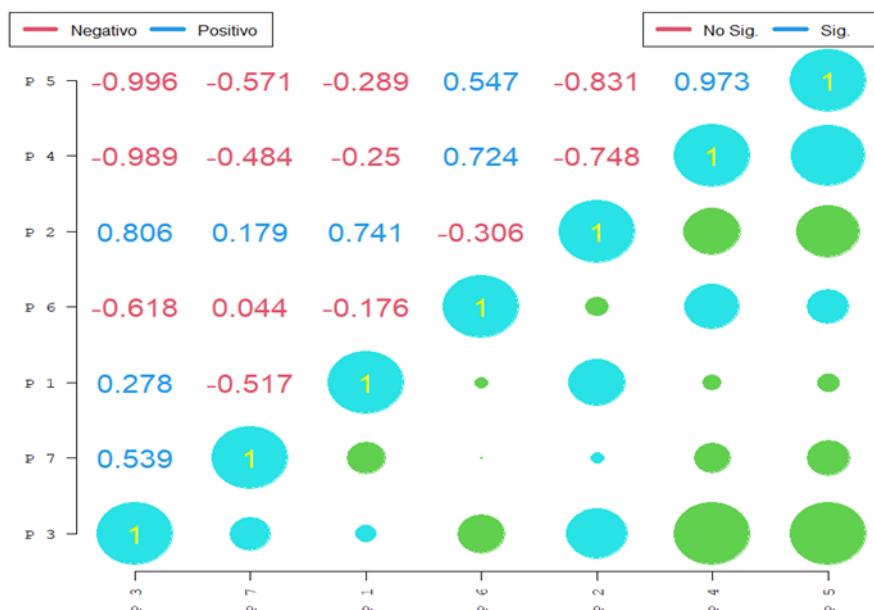


Figura 11. Correlación entre pacientes (sin edad)

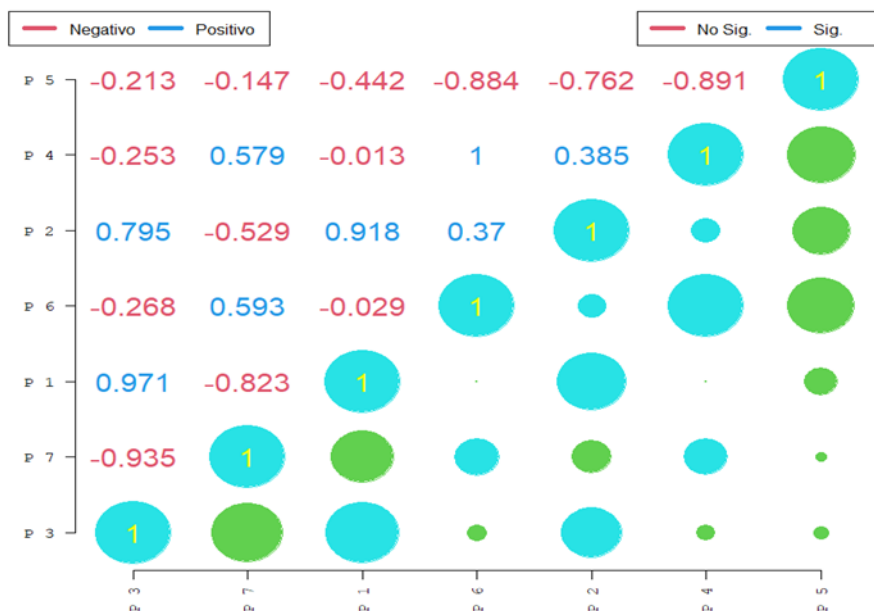


Figura 12. Correlación ACP con edad

De acuerdo, a los resultados obtenidos de los exámenes con muestras de estudiantes de la Universidad Central del Ecuador con la prueba de azul de dimetilmileno (DMB) por el procedimiento de espectrofotometría para la determinación de concentración de GAG, (ver Tabla 4 y Figuras 7, 8, 9), en relación a pruebas bioquímicas convencionales del laboratorio clínico, se observa valores considerados normales, donde, se realizaron biometría hemática, glucosa, urea, ácido úrico, colesterol, triglicéridos y creatinina, no evidenciándose la presencia de enfermedades que pueden aumentar la excreción urinaria de GAG, cómo tampoco en otros factores fenotípicos como rasgos faciales toscos, por lo que, no fue necesario la aplicación de la electroforesis para el tipo de MPS, quedando así en procedimientos estandarizados para futuras determinaciones.

De acuerdo con el valor de R (Stapleton *et al.*, 2018) éste es significativo, lo que indica que no afecta la interpretación de variables significativas. De esta manera se comprueba la relación significativa entre los GAG y la edad (ver Figuras 10, 11, 12).

El R (Stapleton *et al.*, 2018) indica que el modelo tiene un buen ajuste y, al examinar la gráfica de línea ajustada y la gráfica de residuos, muestra relación entre GAG de pacientes con MPS y las edades de los pacientes.

Kubaski F. y su equipo de investigación realizaron la determinación de GAG en orina de pacientes con diferentes tipos de MPS y, de diferentes edades, encontrándose que los valores varían por la edad y el tipo de MPS (ver Figuras 13.1, 13.2, 14, 15).

Sabir E. y su equipo de investigación realizaron estudios de concentración de GAG por el método espectrofotométrico DMB en orina de pacientes con MPS, además realizaron investigaciones de estabilidad de las muestras a diferentes temperaturas, lo que fue tomado en cuenta para la presente investigación.

Se desarrollaron parámetros de linealidad, sensibilidad y correlación. En la determinación de la concentración de GAG en orina de pacientes aparentemente sanos que acudieron al laboratorio clínico de la Facultad de Ciencias Químicas de la UCE, lo que demuestra que existe linealidad en los datos obtenidos por espectrofotometría con el reactivo DMB. Se cumple con una distribución homogénea, repetibilidad en los datos y que se realizó previamente el análisis de GAG con muestras de pacientes diagnosticados con MPS.

Para realizar el análisis de la concentración de GAG en muestras de orina de pacientes diagnosticados con MPS se varió el tiempo de reacción del reactivo con los GAG presentes en la orina, y se encontró la absorbancia incrementaba hasta el minuto 5 de la reacción indicando que ésta se ha completado.

CONCLUSIONES

Se concluye que sí se puede medir concentraciones de GAG en muestras de orina, en relación al rango de referencia.

Los valores de GAG de pacientes diagnosticados con MPS son significativamente mayores a los pacientes sanos. Los valores promedio de pacientes sanos comparados con estándares de dermatán son 8,38 mg/mL, condroitin 6,54 mg/mL, y con heparán 7,58 mg/mL. Los valores de pacientes con MPS IV (condroitin) fueron 9,64 mg/mL comparados con pacientes sanos que fueron de 6,54 mg/mL por lo que concluimos que los valores en los pacientes con MPS IV son significativamente más altos. La metodología utilizada para clasificar las diversas MPS del país fue por electroforesis horizontal con una temperatura de 25°C, de agarosa al 2,5%. No fue posible obtener la separación de los GAG para su correcta identificación. Los valores de pacientes con MPS II (dermatán y heparán) son 7,90 a 16,98 mg/mL comparados con pacientes sanos, que van de 7,58 a 8,38 mg/mL. Los pacientes con MPS III (heparán) son 8,58 a 8,81 mg/mL comparados con pacientes sanos que tienen un valor de 7,58 mg/mL. Los valores promedio de pacientes es de 8,38 mg/mL de dermatán en los pacientes sanos. El promedio de 6,54 mg/mL de condroitin en los pacientes sanos. El promedio de 7,58 mg/mL de heparán en los pacientes sanos. En las muestras de pacientes con MPS IV, se obtuvieron concentraciones ligeramente mayores de queratán y condroitin, 9,64 mg/mL comparados con sanos 9,54 mg/mL. Adicionalmente se obtuvo en MPS II, concentraciones mayores de dermatán y heparán, desde 7,90 y 16,98 mg/mL, comparados con sanos 7,58 y 8,38 mg/mL.

La metodología utilizada para clasificar los diferentes tipos de MPS por electroforesis horizontal a una temperatura de 25°C, con agarosa al 2,5%, no dio resultados analíticos concluyentes. No fue posible obtener la separación de los GAG para su correcta identificación. Se repitió este análisis con una estricta revisión del mismo, pero no se obtuvieron datos válidos.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno reportado por los autores.

AGRADECIMIENTOS Y PATROCINIO

Se expresa un fraterno agradecimiento a la Universidad Central del Ecuador, a la Dirección de Investigación, a la Unidad de Investigación Formativa, Facultad de Ciencias Químicas, Fundación Fepel Dasha. Los autores declaran que los recursos financieros para la elaboración de la presente investigación proceden del fondo de investigación semilla de la UCE.

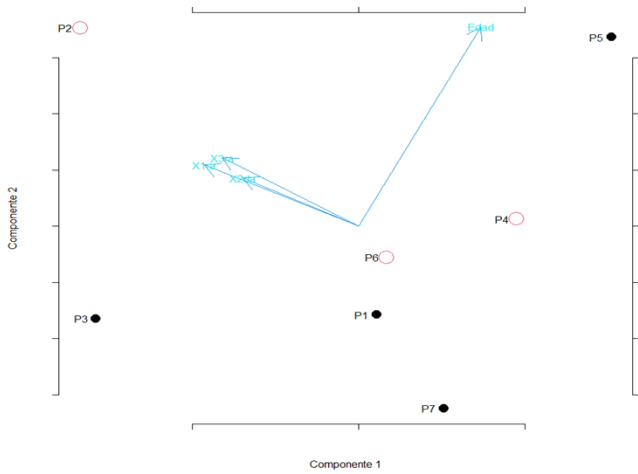


Figura 13.1. Correlación ACP sin edad

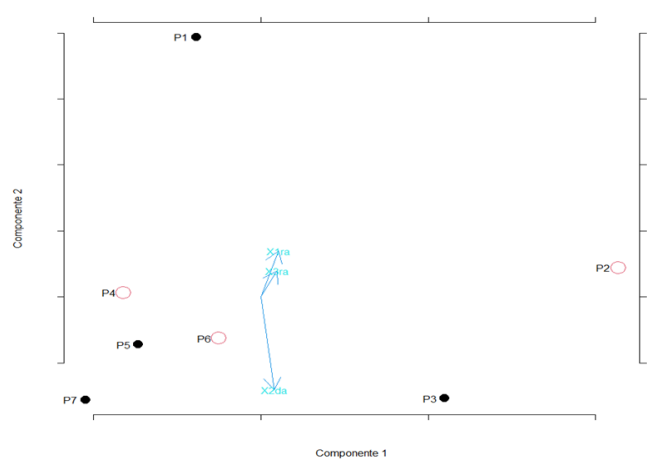


Figura 13.2. Correlación ACP sin edad

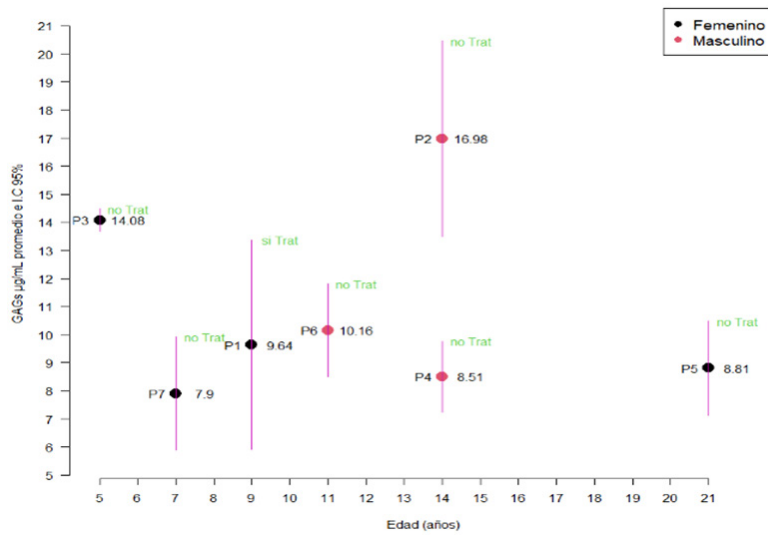


Figura 14. GAG's ug/ml. Promedio al IC 95% edad(años). El valor promedio de GAG's y su intervalo de confianza son utilizados para el cálculo de R cuadrado.

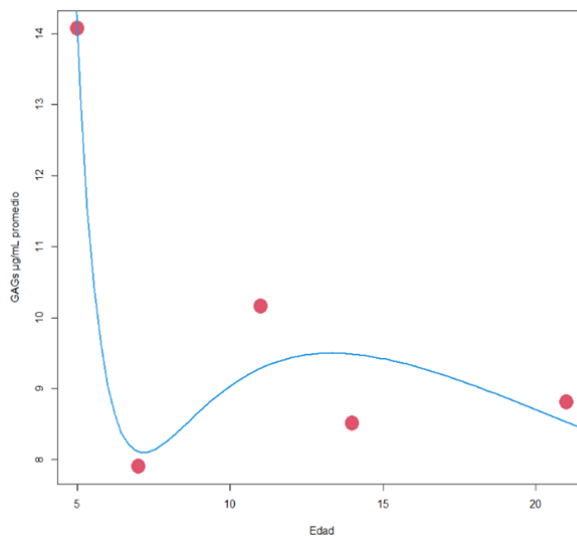


Figura 15. R2. De acuerdo con el valor de R2 éste es significativo, lo que indica que no afecta la interpretación de variables significativas. De esta manera se comprueba la relación significativa entre los GAG's y la edad. El R2 indica que el modelo tiene un buen ajuste y, al examinar la gráfica de línea ajustada y la gráfica de residuos, muestra relación entre GAG's de pacientes con MPS y las edades de los pacientes.

REFERENCIAS

1. Aranzadi E, Leiva E, Relaño E. Modificación de la técnica de determinación de mucopolisacáridos que utiliza azul de dimetilmetileno. *Rev Diagn Biol.* 2002; 51, 13-5.
2. Colón C, Álvarez JV, Castaño, C, Gutiérrez Solana LG, Márquez AM, O'Collaghan M, et al. A selective screening program for the early detection of mucopolysaccharidosis: Results of the FIND project-A 2-year follow-up study. *Med (United States).* 2017; 96, 6887.
3. Cueva F. Análisis de pruebas bioquímicas de glucosaminoglicanos en orina de estudiantes que acuden al Laboratorio Clínico FCQ-UCE, junio-2019. *Univ Cent del Ecuador Fac Ciencias Químicas.* 2019; 4, 1-21.
4. De la Cruz Amorós V, Cortés Castell E, Moya M. Excreción urinaria de mucopolisacáridos en la edad pediátrica y en la adolescencia. *An Esp Pediatr.* 1999; 50, 361-6.
5. Centro de Genética Médica (CEGEMED), una prioridad en la atención de salud de los ecuatorianos que no puede posponerse. *Rev Fac Ciencias Médicas [Online]* 2017; 42, artículo 1. https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CIENCIAS_MEDICAS/article/view/1509/1458
6. Kobayashi H. Recent trends in mucopolysaccharidosis research. *J. Hum Genet. [Online]* 2019, 64, artículo 2. <http://dx.doi.org/10.1038/s10038-018-0534-8>
7. Kubaski F, De Oliveira Poswar F, Michelin Tirelli K, Burin MG, Rojas Malaga D, Brusius Facchin AD, et al. Diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Diagnostics.* 2020; 10, 172.
8. Kubaski F, Sousa I, Amorim T, Pereira D, Trometer J, Souza A, et al. Neonatal screening for MPS disorders in Latin America: a survey of pilot initiatives. *Int J Neonatal Screen.* 2020; 6, 90.
9. Lin HY, Lee C, Lo YT, Tu RY, Chang YH, Chang CY, et al. An at-risk population screening program for mucopolysaccharidoses by measuring urinary glycosaminoglycans in Taiwan. *Diagnostics.* 2019; 9, 1-16.
10. Poswar F, Vairo F, Burin M, Michelin Tirelli K, Brusius Facchin A, Kubaski F, et al. Lysosomal diseases: overview on current diagnosis and treatment. *Genet Mol Biol.* 2019; 42, 165-77.
11. Sabir E, Lafhal K, Ezoubeiri A, Harkati I, Sbyea S, Ald amiz-Echevarr L, Andrade F, Ait Babram M, Mrabih Rabou F, Draiss G, Noureddine Rada N, Bouskraou M, Karim A, Fdil N. Usefulness of urinary glycosaminoglycans assay for a mucopolysaccharidosis-specific screening. *Pediatrics International* 2020; 62, 1077-1085.
12. Sampedro A, Álvarez González V, Colón Mejezas C, González MA, Lamas González O. Método para la separación de la fracción unida a glucosaminoglicanos y sus aplicaciones. 2 608 814, 2015.
13. Stapleton M, Arunkumar N, Kubaski F, Mason RW, Tadao, O.; Tomatsu, S. Clinical presentation and diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Mol Genet Metab. [Online].* 2018, 125, artículo 1-2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.01.003>
14. Wilson A, Lavery C, Stewart F, Thomas S, Cavell D, Brandon R, et al. Mucopolysaccharidosis and adulthood: genetics, inheritance, and reproductive options. *J Child Sci.* 2018; 8, 38-43.
15. Gomes Bicalho C, Morais Rezende M, Carrilho Moinhos Nogueira A, Melo Calvoso Paulon R, Xavier Acosta A. The importance of the otorhinolaryngologic evaluation in mucopolysaccharidosis patients. *Intl Arch. Otorhinolaryngol.* 2011; 15, 290-294

REVISTA QUÍMICA CENTRAL



Evaluación de la actividad nootrópica del ácido clorogénico presente en el café para el tratamiento preventivo de enfermedades neurodegenerativas

Evaluation of the nootropic activity of the chlorogenic acid present in coffee for the preventive treatment of neurodegenerative diseases

Elda Molina^a | Elithsine Espinel^b | Dayana Borja^c | Javier Santamaría^d | Carmita Reyes^e | Jorge Grijalva^f | Roy Vera^g

^a iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

^b iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

^c iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

^d iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

^e iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

^f iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

^g iD University of Saskatchewan, Canadá

HISTORIAL DEL ARTÍCULO

Recepción: 20/09/2021

Aceptación: 20/11/2021

PALABRAS CLAVE

Ácido clorogénico, actividad nootrópica, aprendizaje, memoria.

ARTICLE HISTORY

Received: 20/09/2021

Accepted: 20/11/2021

KEY WORDS

Chlorogenic acid, nootropic activity, learning, memory.

RESUMEN

El aumento de enfermedades neurodegenerativas ha conducido a la búsqueda de productos con actividad nootrópica para la prevención o tratamiento de esas patologías. En este estudio buscamos evaluar la actividad nootrópica del extracto de la pulpa del café arábica (*Coffea arabica*) en mamíferos menores. En la primera fase se cuantificaron los fenoles totales en la pulpa de café mediante el método Folin-Ciocalteu extraídos con maceración dinámica y asistida. Los datos se analizaron mediante ADEVA y la prueba post-hoc de Duncan. En la segunda fase se utilizaron 24 ratones (*Mus musculus*) de 32,5 g de peso promedio. Los ratones fueron divididos en cuatro grupos y asignados a los siguientes tratamientos: agua (control negativo), ginkgo biloba (control positivo) y dos dosis de extracto de pulpa de café. Los ratones se sometieron a pruebas de aprendizaje en el laberinto acuático de Morris y el laberinto radial de 8 brazos. Se registró el tiempo de latencia y el tiempo que demoraron los ratones en visitar los 8 brazos del laberinto. El extracto de la pulpa de café arábica refleja actividad nootrópica, cuya dosis 100 mg/kg de peso/día de ácido clorogénico (ACG) contribuye al mejoramiento de las propiedades cognitivas.

ABSTRACT

The increase in neurodegenerative diseases has led to the search for products with nootropic activity as adjuvants for the prevention or treatment of these pathologies. In this study, we aim to evaluate the nootropic activity of the arabica coffee pulp extract (*Coffea arabica*) in small mammals. In the first phase, total phenols were quantified from the coffee samples with the Folin-Ciocalteu method by using both dynamic and assisted maceration. Data were analyzed using ANOVA and Duncan's post-hoc test. In the second phase, twenty-four mice (*Mus musculus*) of 32.5 g on average were used. These animals were split up into four groups and assigned to one of the following treatments: water as negative control, Ginkgo Biloba as positive control, and two doses of coffee pulp extract. The mice were subjected to training and learning tests in the eight-arm-radial and Morris's aquatic labyrinth. The latency-time and time that each mouse takes to visit the eight arms of the labyrinth were recorded. The extract of arabica coffee pulp reflects nootropic activity, whose dose 100 mg/kg of weight/day of chlorogenic acid (ACG) contributes to the improvement of cognitive properties.

INTRODUCCIÓN

La actividad nootrópica tiene relación con las funciones cognitivas del cerebro, dado que sus atributos consisten en combatir la falta de concentración, la pérdida de memoria y la fatiga cerebral, cuyos síntomas se agravan con la edad.

Las enfermedades asociadas con el deterioro cognitivo (neurodegenerativas crónicas) se han incrementado progresivamente a nivel global provocando un panorama de detrimento de la calidad de vida de los pacientes. En general, las demencias primarias no son curables y producen un daño progresivo e irreversible del cerebro. El

Alzhéimer, Parkinson y la degeneración frontotemporal son enfermedades neurodegenerativas responsables del 50 al 60% del total de casos de demencia, como lo menciona la Organización Mundial de la Salud,⁽¹⁾ y los costos estimados de los tratamientos alcanzan 235 billones de dólares anuales. Sin embargo, solamente el 11% de estos costos corresponden a América Latina y el Caribe donde viven cerca del 44% de las personas con demencia,⁽²⁾ a pesar de existir muchos casos de demencia. De hecho, los presupuestos empleados en esta amplia región no son suficientes, en razón de la falta de accesibilidad a los servicios médicos integrales tal como el Seguro Social en el Ecuador, la falta de conocimiento de las enfermedades neurodegenerativas y también por los altos costos que representa este tratamiento.

La prevalencia de enfermedades neurodegenerativas se incrementa conforme aumenta la edad de la población. En el país, la esperanza de vida alcanza los 75 años y va en aumento, según las cifras de la Encuesta Salud y Bienestar del Adulto Mayor realizada por el INEC en el 2010 (SABE I y II). Sin embargo, esta cifra variará, proyectándose un incremento a 80,5 años para el año 2050. Esta tendencia, conjuntamente con un aumento de la proporción de adultos mayores, se vería reflejado en un escalamiento del desarrollo de algún tipo de demencia en la población. Por ejemplo, en la década de los 70 en Ecuador, los adultos mayores representaban el 4,2% de la población total, y para el 2050, se espera un aumento al 16 por ciento (Freire *et al.*, 2010).

Considerando que dos de cada diez casos en el país presentan deterioro cognitivo en adultos mayores de 60 años, el tamaño absoluto de la población con deterioro cognitivo se incrementaría en similar magnitud, un comportamiento poblacional análogo a otros países de América Latina.⁽⁴⁾

Por lo tanto, el desarrollo y acceso a tratamientos efectivos es una prioridad, a sabiendas de que este tipo de enfermedades crece de manera exponencial a partir de los 65 años. Es por ello que este estudio, planteó evaluar una alternativa basada en la utilización de productos naturales que estimulen las propiedades cognitivas, para beneficio de personas encaminadas hacia la tercera edad que tienen antecedentes familiares de padecer enfermedades neurodegenerativas.

En respuesta a esa realidad, el desarrollo y uso de fármacos con actividad nootrópica o también denominadas drogas inteligentes,⁽⁵⁾ en su mayoría de origen sintético, se han incrementado. Sin embargo, el origen de las enfermedades neurodegenerativas también está relacionado con factores genéticos y ambientales, incluyendo la dieta y el riesgo de padecer algún tipo de demencia.⁽⁶⁾ Por ejemplo, la alta ingestión de carbohidratos y gluten están asociados con un deterioro cerebral acelerado. También, elevados niveles de glucosa (indicadores como hemoglobina A1C) se asocian con el estrés oxidativo y glicación

con efectos en el deterioro cognitivo y con enfermedades tales como alzhéimer, parkinson, esclerosis múltiple, autismo y depresión,⁽⁷⁾ Al existir una aparente relación entre la presencia del estrés oxidativo y el déficit cognitivo, se ha propuesto el uso de antioxidantes como terapia farmacológica con el fin de inhibir la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS) o bien promover su captura e inactivación,⁽⁸⁾ al fomentar el consumo de productos con actividad antioxidante.

Con estos antecedentes, se ha intensificado la búsqueda de fuentes de origen natural con propiedades antioxidantes con la finalidad de prevenir o tratar dichas patologías. El café es una de las bebidas más consumidas y populares de todo el planeta, y en el país no es la excepción. Estudios recientes indican que algunos de sus constituyentes, entre ellos, los compuestos fenólicos, representados por el ácido clorogénico, poseen propiedades antioxidantes.⁽⁹⁾ Por lo tanto, esta investigación tiene el objetivo de evaluar la actividad nootrópica del ácido clorogénico presente en el extracto de café a través de un estudio preclínico utilizando ratones como mamíferos menores para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

PARTE EXPERIMENTAL

Se realizó un estudio experimental en dos fases. La primera fase consistió en cuantificar los fenoles totales para cuyo propósito se procedió a identificar los parámetros de calidad del café. La obtención de muestras de pulpa se basó en la definición de parámetros de estabilidad, solubilidad y concentración del principio activo. Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y en el Laboratorio de OSP de alimentos de la Universidad Central del Ecuador. La segunda fase consistió en evaluar la actividad nootrópica del extracto del café, utilizando 24 ratones de la especie *Mus musculus BALB/c* como unidades experimentales, con un peso promedio de 32,5g (35 ± 5 g en machos y 30 ± 5 g en hembras). Estos ratones fueron adquiridos en el Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación y transportados de forma adecuada e higiénica hasta las instalaciones de Centro de Biología de la Institución.

En el Centro de Biología, se preparó un lugar específico para el alojamiento de los animales, con condiciones ambientales ideales de temperatura, humedad, ventilación, alumbrado e interacción con otros animales, para evitar problemas de estrés. Diariamente los animales recibieron cantidades óptimas de alimentación y agua, de acuerdo a sus requerimientos. De igual manera, recibieron atención veterinaria especializada, para lo cual se usó un programa de vigilancia sanitaria y prevención de enfermedades. De esta forma, se dio cumplimiento a los

protocolos internacionales de bienestar animal establecidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

DESCRIPCIÓN DE LA FASE 1

Control de calidad de la pulpa de café arábica

Se cosecharon alrededor de 2 kg de frutos de café arábica en estado maduro, es decir, 32 semanas después de la floración.^(10, 11) La pulpa de cada fruto se obtuvo por extrusión y posterior secamiento a 50°C durante 12 horas hasta obtener entre 6 y 10% de humedad para facilitar la molienda. Se determinaron las cenizas totales de todas las muestras,⁽¹²⁾ para estimar el valor nutricional del café del cual provino la pulpa de café. Para conocer la carga microbiana se realizó un control microbiológico antes y después de la desinfección de la muestra con el fin de corroborar que dicha carga cumple con los límites establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Finalmente, se determinó la fibra cruda y grasa cruda, cuyos valores se compararon con estudios previos.⁽¹³⁾

Obtención de extracto etanólico y metanólico

Los extractos del café se obtuvieron a través de dos métodos de extracción: maceración dinámica y maceración asistida por ultrasonido, utilizando solventes metanol y etanol: agua. Una vez concentradas las muestras, se cuantificaron los fenoles totales de cada extracto, en tres repeticiones por cada tratamiento que se describe más adelante.

Maceración dinámica.- Consistió en someter la muestra a una extracción sucesiva con agua: etanol al 96,6% (50:50) y metanol al 99,9% en relación (1:10 w/v materia seca/solvente) y con la ayuda de un agitador gravitatorio a 200 rpm durante 20 horas a temperatura ambiente, se centrifugó y se procedió a concentrar el extracto en un rotavapor, a una temperatura de 40°C, hasta la mitad del volumen inicial, luego de lo cual se almacenó a 0°C en frascos ámbar hasta su posterior evaluación.⁽¹⁴⁾

Maceración asistida por ultrasonido.- El procedimiento fue similar al método anterior, pero en lugar de ocupar el agitador gravitatorio, se utilizó el equipo de ultrasonido por 45 minutos y a 45 Khz.⁽¹⁴⁾

Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se determinó según el método de Folin-Ciocalteu,⁽¹⁵⁾ utilizando el ácido gálico como estándar. Se prepararon soluciones patrones de 500, 250, 150, 100, 50 ppm y por regresión lineal se construyó una curva de calibración hasta obtener un coeficiente de regresión de 0,9975.

DESCRIPCIÓN DE LA FASE 2

Administración de tratamientos

La administración de los tratamientos se realizó por vía oral/día durante 7 semanas a un grupo de 24 ratones *Mus musculus* (50% machos y 50% hembras), constituyendo cada ratón una unidad experimental. En este estudio se compararon cuatro tratamientos: como control negativo se empleó el agua (0 mg/kg peso corporal); control positivo el ginkgo biloba (240 mg/kg peso corporal) y el extracto de la pulpa de café en dos dosis: dosis 1 (10 mg/kg peso corporal/ ACG), dosis 2 (100 mg/kg peso corporal/ ACG), con la proyección de encontrar la dosis segura para futuros estudios clínicos. Cabe mencionar que se tomó en consideración las dosis (tratamientos) del extracto de café arábica, dado que el ácido clorogénico (ACG) es el bioactivo que le confiere la capacidad antioxidante a dicha muestra.⁽¹⁶⁾ La primera dosis fue adaptada del estudio del Consejo Superior de Investigación Científica de España y la Universidad de Granada que administran a los animales de experimentación 10 mg (ACG) / kg corporal / día (equivalentes a la ingesta de ácidos clorogénicos por consumo moderado de café), con el objeto de comparar el efecto antiglicante entre varios extractos de café.⁽¹⁷⁾ La segunda dosis de 100 mg (ACG) / kg corporal / día se obtuvo sobre la base de productos comercializados a nivel mundial con dicha concentración.

Los ratones se pesaron cada 8 días, durante el transcurso de dos semanas se realizaron las dos pruebas de aprendizaje utilizando los métodos de laberinto acuático de Morris y el laberinto radial de 8 brazos,⁽¹⁸⁾ tal como se explica a continuación.

Pruebas de aprendizaje

Los ratones fueron entrenados por cinco días consecutivos en ambos laberintos, luego de lo cual se sometieron a un período de evaluación de 7 días consecutivos, siguiendo el protocolo estipulado por Wenk.⁽¹⁸⁾

En el laberinto acuático de Morris se empleó un tanque circular lleno de agua a una temperatura de 25°C y un diámetro aproximado de 100 cm y de profundidad 30 cm. El tanque se dividió en cuatro cuadrantes iguales, donde se colocó una plataforma de escape cuadrada de 10 cm de longitud. Durante el entrenamiento, el primer día se sumergió la plataforma hasta los 8 centímetros de longitud para que los ratones puedan observar la ubicación de la misma; y, a medida que trascurrieron los días de entrenamiento, se procedió a sumergir en su totalidad la plataforma hasta 1 cm por debajo de la superficie del agua, posición que se mantuvo durante los siguientes días de evaluación.⁽¹⁸⁾

En el laberinto radial de 8 brazos se empleó un aparato compuesto de 8 brazos / ramificaciones idénticas de 35 cm de longitud x 5 cm de ancho. Estas ramificaciones fueron distribuidas radialmente y unidas a una plataforma

central con un diámetro de 20 cm para acomodar a los animales y permitir que se movilizan fácilmente entre los brazos. El primer día, se ambientó a los ratones por 20 minutos con acceso libre a todos los brazos. Se colocaron dos ratones para facilitar la adaptación y aclimatación, a partir de segundo día hasta finalizar los días de evaluación, se realizó este proceso individualmente.

Registro y análisis de datos

Cuantificación de fenoles totales.- Las muestras fueron analizadas por triplicado en un barrido en el espectrofotómetro UV-VIS a 760 nm y los fenoles totales se expresaron en miliequivalentes de ácido gálico por mililitro de muestra (meq GA/ml muestra). Estos datos a la vez, se convirtieron en miliequivalentes de ácido clorogénico por mililitro de muestra (meq ACG / ml muestra) al reemplazar el peso equivalente de dicho bioactivos.

Pruebas de aprendizaje.- En el método de laberinto acuático de Morris se registró el tiempo de latencia, que consiste en el tiempo que cada ratón tardó en trasladarse desde el punto de partida de este laberinto hasta llegar a la plataforma y permanecer en ella durante 10 segundos. Este procedimiento se repitió cuatro veces al día; para ello, al ratón se le dejó descansar brevemente antes de iniciar el siguiente ensayo durante 5 minutos por siete días consecutivos.

En el método de laberinto radial de 8 brazos se registró el tiempo que transcurrió para que los ratones visiten los 8 brazos del laberinto. En este ensayo se consideró el número de desaciertos que tuvo cada ratón, es decir, cuando el roedor ingresó más de una vez a un brazo ya visitado. Este procedimiento fue repetido por siete días consecutivos.

Análisis estadístico

Para los fenoles totales, se hizo un análisis de varianza (ANOVA) con el fin de determinar diferencias entre extractos de pulpa de café. Seguidamente se aplicó la prueba post-hoc de Duncan⁽¹⁹⁾ cuando los factores en el ANOVA resultaron significativos. Estos procedimientos se realizaron en el software SEDEX V1.0.

Los datos obtenidos en las evaluaciones de aprendizaje fueron analizados utilizando un modelo lineal mixto para considerar la estructura anidada de los datos en el tiempo, evitando el problema de pseudo-replicación temporal. En este modelo estadístico, los cuatro tratamientos (dosis), el sexo de los ratones y los 7 días de experimentación, además de las interacciones entre éstos, fueron analizados como factores fijos; en tanto, las cuatro repeticiones diarias del experimento se analizaron como efecto aleatorio. Es decir, se consideró que la respuesta en tiempo de latencia de los ratones no varía durante las repeticiones diarias, sino que esta variación del efecto de las dosis es observada en el transcurso de la

semana. Adicionalmente, la variable respuesta (tiempo de latencia) fue transformada utilizando logaritmo natural. Esta transformación permitió ajustar adecuadamente el modelo a los datos y cumplir con las asunciones de normalidad, homogeneidad de varianzas y linealidad. Finalmente, se aplicó un análisis post-hoc utilizando la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher en casos donde los parámetros del modelo resultaron significativos.

Al igual que con el laberinto acuático de Morris, los datos obtenidos en laberinto radial de 8 brazos fueron analizados utilizando un modelo lineal mixto para considerar la estructura anidada de los datos en el tiempo. En este modelo estadístico, los cuatro tratamientos, el sexo de los ratones y los 7 días de experimentación, además de las interacciones entre éstos, fueron analizados como factores fijos. Adicionalmente, el número de desaciertos fue colocado como covariable y los seis ratones o sujetos experimentales se analizaron como efecto aleatorio. Por tanto, se asumió que la respuesta en el tiempo de latencia no varía dentro del grupo de ratones tratados con similar dosis. En este procedimiento, la variable respuesta (tiempo) fue transformada usando logaritmo natural para cumplir con las asunciones de normalidad, homogeneidad de varianzas y linealidad, y se aplicó la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher como análisis post-hoc en casos donde los parámetros del modelo resultaron significativos. Los procedimientos estadísticos fueron ejecutados en el software R.⁽²⁰⁾

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La identificación taxonómica de la planta de café proveniente del cantón El Carmen de la provincia de Manabí, confirmó la especie *Coffea arabica*. Los resultados de los parámetros de control de calidad de la pulpa de café fueron: 6,20% de humedad, 23% de fibra cruda, 1,28% de grasa cruda y 0,85% de cenizas totales (base seca). De igual forma, los criterios de control microbiológico cumplen con lo establecido por la OMS,⁽²¹⁾ para microorganismos aerobios, enterobacterias, mohos y levaduras.

En la tabla 1, se puede observar los promedios de tres muestras de los fenoles totales por los dos métodos de maceración y los dos métodos de extracción. La mayor cantidad de fenoles totales obtenidos del extracto de la pulpa de café arábica se registró por el método de maceración dinámica utilizando solvente etanol: agua 50:50 ($P < 0,05$). Contrariamente, la menor extracción se alcanzó con el método de maceración asistida por ultrasonido utilizando metanol como solvente (ver Tabla 1).

De acuerdo con la tabla 1, la maceración dinámica acusó la mejor respuesta en la recuperación de fenoles totales, debido probablemente a que la muestra permaneció mayor tiempo en contacto con el solvente en comparación con la

maceración asistida por ultrasonido. De otra parte, el solvente etanol: agua arrojó mejores resultados, lo cual se explica por la presencia de agua que incrementa el volumen del material vegetal, y por efecto, la superficie de contacto con el solvente y la matriz vegetal. Se conoce que el agua incrementa la constante dieléctrica de la mezcla etanol: agua y con ello la polaridad del solvente, lo que mejora la capacidad extractiva por parte del solvente y probablemente de la muestra que contenga compuestos afines a la polaridad, tal como afirman otros estudios realizados por varios autores,⁽²²⁾ quienes concluyen que, a mayor constante dieléctrica, mayor es la concentración de polifenoles.

Las propiedades cognitivas aparentemente se ven influenciadas por estímulos que influyen en el aprendizaje, tal como se puede observar en la figura 1 (ver Figura 1). Al respecto, se destaca la existencia de roedores evaluados en este trabajo, cuyo tiempo de latencia se incrementó, debido aparentemente al miedo a ser introducidos a la piscina, cuya emoción habría provocado que esos ejemplares únicamente deambulen alrededor del lugar y no lleguen a la plataforma, por causa de una condición de estrés.⁽²³⁾

De hecho, los procesos cognitivos como la memoria, el aprendizaje y atención, están ligados a un condicionamiento del miedo, es decir, a la memoria emocional,^(24, 25) incluso se ha demostrado que el estrés deteriora las tareas de memoria hipocampo-aprendizaje, como se puede observar en la figura indicada. De igual forma, en dos pruebas de aprendizaje, se evidenciaron diferencias entre hembras y machos, debido aparentemente a variables fisiológicas y comportamentales del individuo. Al respecto, Marrocco y McEwen⁽²⁶⁾ sugieren la existencia de una relación entre hipocampo con las hormonas sexuales.

En la tabla 2, se registran los promedios del tiempo de latencia en el laberinto acuático de Morris. No se registraron diferencias significativas entre los tratamientos Control y Ginkgo Biloba ($P > 0,05$), aunque esta variable fue afectada por el sexo de los ratones y los días de evaluación, tal como se evidencia en las figuras 1 y 2, respectivamente. La comparación entre dosis de extractos de pulpa administrados, no reflejaron diferencias estadísticas ($P > 0,05$) en esta variable. La comparación entre los tratamientos Control y Ginkgo Biloba demuestra diferencias ($P < 0,05$) respecto de los tratamientos a diferentes dosis de extracto de pulpa de café (ver Tabla 2).

De acuerdo con los resultados expresados en la tabla 2 y figura 2, se evidencia, a partir del segundo día de evaluación, una disminución del tiempo de latencia. Sin embargo, parece incrementar a partir del cuarto día, hecho que probablemente se explique por cuanto al ser introducidos repetidamente los ratones, terminaron por habituarse al espacio, y consecuentemente, se tomaron más tiempo de lo que normalmente realizaron en los primeros días de evaluación (ver Figura 2).

En la tabla 3, se expresan los promedios de desaciertos obtenidos en el método de laberinto radial de 8 brazos

(ver Tabla 3). No se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos control, ginkgo biloba y el tratamiento con la dosis más baja de extracto de pulpa de café ($P > 0,05$). Sin embargo, estos tres tratamientos reflejan diferencias respecto de la mayor dosis de extracto de café administrado ($P < 0,05$). El sexo y día de evaluación afectaron la respuesta animal, tal como se puede observar en la figura 3, lo cual significa que conforme aumentó los días de evaluación, disminuyó el número de desaciertos, siendo más notorio en las hembras respecto de los machos (ver Figura 3).

De otra parte, se pudo observar que tanto los machos como las hembras que fueron administrados el extracto de la pulpa de café de concentración (10 mg/kilogramo del peso corporal/día) requirieron mayor tiempo para alcanzar el objetivo. Sin embargo, en el caso de los animales que recibieron el extracto de la pulpa de café a concentración (100 mg/kilogramo de peso/día) acusaron el mismo tiempo de latencia promedio independientemente del sexo.

En el laberinto radial de 8 brazos, se observó que la dosis de 10 mg/kilogramo del peso/día del extracto de la pulpa café, incrementa únicamente la memoria de trabajo y no la memoria espacial. Por el contrario, la dosis de 100 mg/kilogramo de peso/día del extracto, parece tener mayor efectividad en ambos tipos de memoria, este asociado al concepto de unión y las relaciones cuantitativas, es decir, la relación dosis / concentración-respuesta, el cual sugiere que la magnitud de los efectos farmacológicos distales inducidos por los ligandos es proporcional a la fracción de ocupación de los receptores como lo mencionan Waldman y Terzic,⁽²⁷⁾ por lo que se concluye que los 100 mg de ácido clorogénico administrados a los ratones ocuparon en su totalidad los receptores del sitio de acción.

CONCLUSIÓN

Se evaluó la actividad nootrópica del extracto de la pulpa de café arábica (*Coffea arabica*) en animales menores y se comprobó que el ácido clorogénico presente en el extracto de la pulpa de café tiene actividad nootrópica, y que la dosis 100 mg / kilogramo del peso corporal / día de ácido clorogénico, demuestra mayor efectividad en el mejoramiento de las propiedades cognitivas de aprendizaje y memoria, hecho que podría beneficiar a una población humana con problemas neurocognitivos o que es propensa a padecerlos por sus antecedentes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Centro de Biología, en especial a la Dra. Vet. Daniela Balseca. De igual manera, al Laboratorio de osp de Alimentos de la Universidad Central

Tabla 1. Promedio y desviación estándar de fenoles totales obtenidos de la pulpa de café en dos tipos de maceración y dos métodos de extracción (etanol: agua y metanol)

Tipo de maceración	Etanol: agua (meq ACG ml ⁻¹)	Metanol (meq ACG ml ⁻¹)
Maceración dinámica	0,364 ± 0,00091 a	0,231 ± 0,00057 b
Maceración asistida por ultrasonido	0,258 ± 0,00065 bc	0,166 ± 0,00042 b

Letras distintas reflejan diferencias estadísticas significativas entre los cuatro valores (P < 0,05).

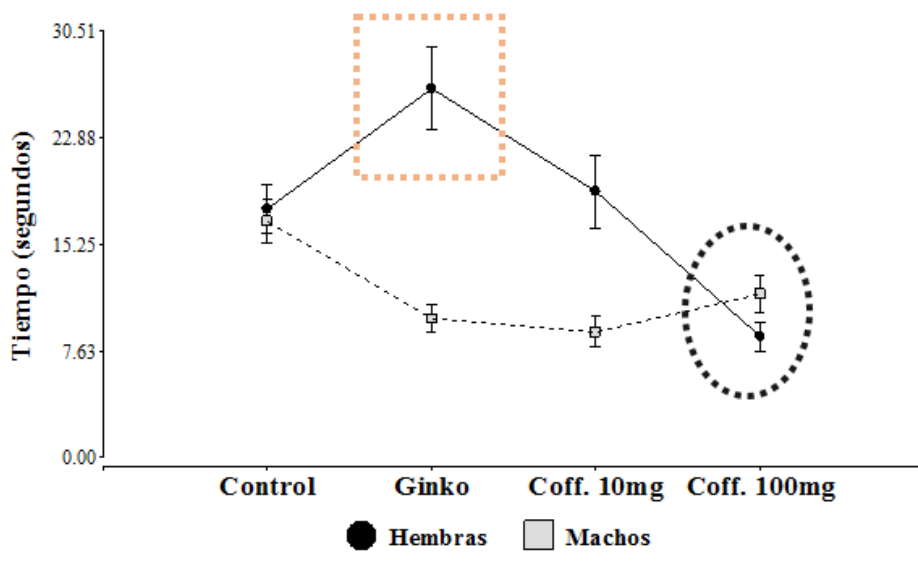


Figura 1. Memoria emocional. Variación en el tiempo de latencia de ratones machos y hembras, sometidos a dos dosis de extracto de café en el laberinto acuático de Morris

Tabla 2. Resultados del análisis estadístico de la variable tiempo de respuesta (s) en el laberinto acuático de Morris

Tratamientos	Tiempo (s)
Control	17,32 ±15,20 a
Ginkgo Biloba	18,15 ±22,14 a
Extracto de la pulpa de café (10 mg ACG)	13,98 ±19,10 b
Extracto de la pulpa de café (100 mg ACG)	10,16 ±11,18 b

Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas (P < 0,05).

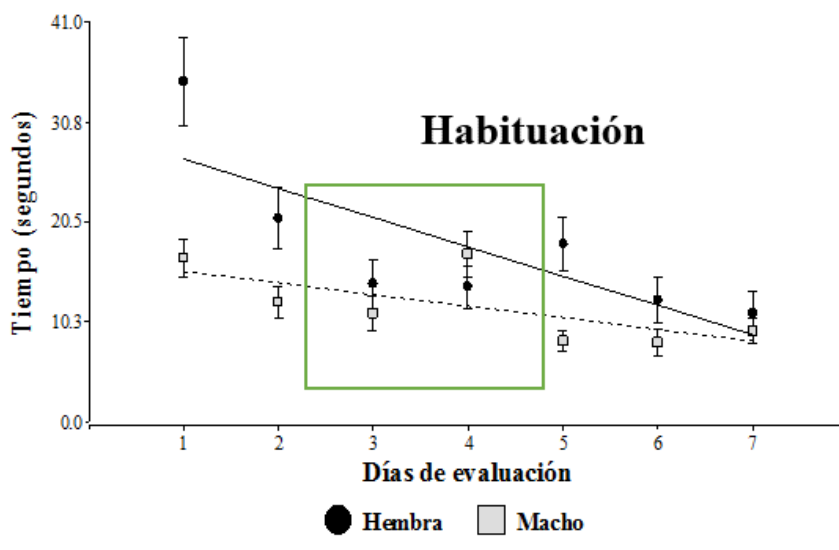


Figura 2. Variación en el tiempo de latencia de ratones machos y hembras, sometidos a dos dosis de extracto de café, en función de los días de evaluación en el laberinto acuático de Morris

Tabla 3. Resultados del análisis estadístico de la variable número de desaciertos en el laberinto radial de 8 brazos.

Tratamientos	Número de desaciertos
Control	3,13 ± 1,81 a
Ginkgo Biloba	3,33 ± 2,39 a
Extracto de la pulpa de café (10 mg ACG)	2,17 ± 1,51 a
Extracto de la pulpa de café (100 mg ACG)	2,07 ± 1,47 b

Letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas (P < 0,05).

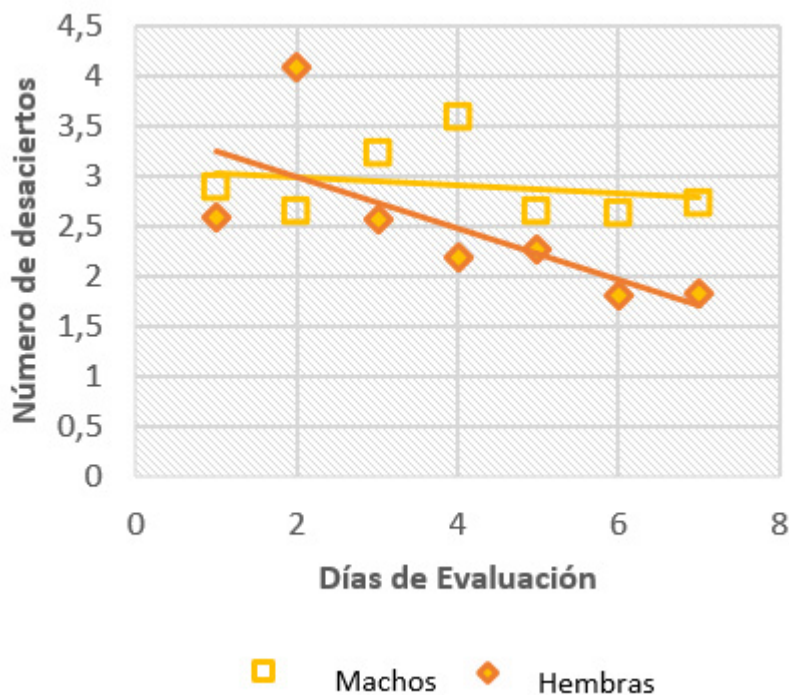


Figura 3. Número de desaciertos de ratones machos y hembras, sometidos a dos dosis de extracto de café, en función de los días de evaluación en el laberinto radial de 8 brazos

del Ecuador, y a la Dra. Isabel Fierro, exdecana de la Facultad de Ciencias Químicas.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

FINANCIAMIENTO

Fondos de investigación del proyecto semilla «Determinación de la actividad nootrópica en plantas de uso común en la dieta ecuatoriana», Universidad Central del Ecuador, 2017.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Demencia: una prioridad de salud pública [Internet]. 2012. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/75263> (visitado 12 de jul. de 2018).
2. Llibre Rodríguez J, Gutiérrez Herrera RF. Demencias y enfermedad de Alzheimer en América Latina y el Caribe. *Rev Cuba Salud Pública*. 2014; 40(3): 378-87.
3. Freire, WB, Rojas E, Pazmiño L, Fornasini M, Tito S, Buendía P, Waters WF, Salinas J, Álvarez P. Encuesta Nacional de Salud, Bienestar y Envejecimiento SABE I; Resumen Ejecutivo: Ministerio de Salud Pública/ Instituto Nacional de Estadística y Censos, Ecu, 2009-2010.
4. Sánchez J, Vásquez D, Zúñiga J. Prevalencia de deterioro cognitivo y factores asociados en adultos mayores

- jubilados de los servicios sociales del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social. Tesis, Universidad de Cuenca, enero 2013.
5. Ruiz J. Drogas inteligentes: plantas, nutrientes y fármacos para potenciar el intelecto. Paidotribo. 2005.
 6. Hernando V. Nutrición y deterioro cognitivo. Nutrición hospitalaria. [Internet]. 2016; 33(4): 49-52. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.346> (visitado 04 de mayo de 2018).
 7. Caamaño A. La alimentación en las enfermedades neurodegenerativas: el rol de carbohidratos, gluten y grasas. Tesis, Universidad San Francisco de Quito, diciembre 2015.
 8. Martínez J, Boll C, Hernández M, Rubio M, Sánchez M, Ríos C. Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas. Mensaje bioquímico. 2010, xxxiv: 43-59.
 9. Pérez L, Chávez K, Medina L, Gámez N. Compuestos fenólicos, melanoidinas y actividad antioxidante de café verde y procesado de las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. Biotecnia. [Internet]. 2013; 15(1): 51-56. <https://doi.org/10.18633/bt.v15i1.136> (visitado 13 de jul. de 2018).
 10. Ramos P, Sanz J, Oliveros, C. Identificación y clasificación de frutos de café en tiempo real, a través de la medición de color. Cenicafé. 2010; 61(4): 315-26.
 11. Marín S, Arcila J, Montoya E, Oliveros C. Relación entre el estado de madurez del fruto del café y las características de beneficio rendimiento y calidad de la bebida. Cenicafé. 2004; 54(4): 297-315.
 12. Farmacopea herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de la salud. 2.ª ed. México. 2013.
 13. Norma venezolana de café. Venezuela. Café elaborado. Determinación de fibra cruda. COVENIN 430-82. [Internet]. 2014. <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/430-82.pdf> (visitado 10 de ene. de 2018).
 14. Tobón N. Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la pulpa de café (*Coffea arabica* L.) variedad Castillo. Tesis, Corporación universitaria Lassallista. 2015.
 15. Arroyo J, Bonilla P, Tomás G, Huamán J. Estudio fitoquímico del extracto etanólico y de las fracciones de las hojas de *Piper Aduncum* «matico». Rev Per Quím Ing Quím. 2011; 14(1 y 2): 62-7.
 16. Martínez S, Hernández F, Aguilar C, Rodríguez R. Extractos de pulpa de café: una revisión sobre antioxidantes polifenólicos y su actividad antimicrobiana. Investigación y Ciencia. [Internet]. 2019; 27(77): 73-79. <https://doi.org/10.33064/iycuaa2019772124> (visitado 5 de dic. de 2020).
 17. Fernández B, Nicolai M, Picariello G, Ferranti P, Mesa M, Del Castillo M. Estudio in vivo del efecto antiglicante de los compuestos del café. XVII Reunión de la Sociedad Española de Nutrición. [Internet], Santiago de Compostela, nov 3-5, 2016. Sitio Web DIGITAL.CSIC <https://digital.csic.es/handle/10261/151691> (visitado 7 de ago. de 2018)
 18. Wenk GL. Assessment of spatial memory using the radial arm maze and Morris water maze. Curr Protoc Neurosci. [Internet]. 2004 May; Chapter 8: Unit 8.5A. DOI: 10.1002/0471142301.ns0805as26. PMID: 18428607.
 19. Fallas J. Análisis de variancia: comparando tres o más medias. [Internet]. 2012. http://www.ucipfg.com/Repositorio/MGAP/MGAP-05/BLOQUE-ACADEMICO/Unidad-2/complementarias/analisis_de_varianza_2012.pdf
 20. The R Foundation. R: The R Project for Statistical Computing. RCore team. [Internet]. 2018. <https://www.r-project.org/>
 21. Organización Mundial de la Salud. Quality control methods for medicinal plant materials [Internet]. 1998. Gen,71-81.
 22. Rivas B, Leal I, Loaiza L, Morillo Y, Colina, J. Phenolic compounds and antioxidant activity in extracts of four oregano species. Rev Téc Ing Univ Zulia. 2017; 40(3): 134-42.
 23. Moreno R, Pedraza C, Gallo, M. Neurogénesis hipocampal adulta y envejecimiento cognitivo. Escritos Psicol / Psychol Writings. 2013; 6(3): 14-24.
 24. Aguado, L. Aprendizaje y memoria. Rev. Neurol. 2001; 32(4): 373-81.
 25. Vicens P, Redolat R, Carrasco M. Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. Psicothema. [Internet]. 2003; 15(4): 539-544. <http://www.psicothema.com/psicothema.asp?id=1104> (visitado 12 mar. de 2020).
 26. Marrocco J, McEwen BS. Sex in the brain: hormones and sex differences. Dialogues Clin Neurosci. 2016; 18(4): 373-83.
 27. Waldman S, Terzic A. Farmacología y terapéutica: principios para la práctica. Manual Moderno: México D. F. 2010.

REVISTA QUÍMICA CENTRAL



Utilización de *Agrobacterium tumefaciens* como generadora de tumores in vitro para el análisis de actividad antitumoral de metabolitos secundarios

Use of *Agrobacterium tumefaciens* as a generator of tumors in vitro for the analysis of antitumor activity of secondary metabolites

Andrea Parreño^a

^a iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

HISTORIAL DEL ARTÍCULO

Recepción: 20/09/2021
Aceptación: 20/11/2021

PALABRAS CLAVE

Ensayo de disco de papa, tumores, inhibición, actividad antitumoral.

RESUMEN

El presente artículo de revisión habla sobre el ensayo de disco de papa desarrollado entre los años 1955 y 1982 usando cepas de *Agrobacterium tumefaciens* para generar tumores, veremos por qué puede ser usado para probar actividad antitumoral de diversos metabolitos secundarios estudiados y de las ventajas que tiene este *screening* en comparación con otros ensayos a base de líneas celulares, además de la importancia de su uso en diversas publicaciones actuales, especialmente en países en vías de desarrollo donde la medicina ancestral aún es ampliamente usada.

ARTICLE HISTORY

Received: 20/09/2021
Accepted: 20/11/2021

KEY WORDS

Potato discs assay, tumors, inhibition, antitumoral activity.

ABSTRACT

This review article discusses the potato disc assay developed between 1955 and 1982 using *Agrobacterium tumefaciens* strains to generate tumors, we will see why it can be used to test antitumor activity of various secondary metabolites and the advantages of this screening compared with other tests based on cell lines in addition to the importance of its use in various current publications, especially in developing countries where ancestral medicine is still widely used.

INTRODUCCIÓN

La *agalla de corona* es una enfermedad de carácter vegetal que infecta a la mayoría de las plantas dicotiledóneas, su principal característica es producir agallas a nivel de las raíces y cuello de las mismas. El microorganismo causante de esta enfermedad es *Agrobacterium tumefa-*

ciens actualmente llamada *Rhizobium radiobacter*, que es una bacteria móvil en forma de varilla, gram negativo, perteneciente a la familia Rhizobiaceae. Esta bacteria ingresa a los tejidos vegetales a través de heridas frescas en una amplia gama de plantas que, como se mencionó anteriormente, incluyen muchas dicotiledóneas, aunque

también se observa la infección en pocas monocotiledóneas y algunas gimnospermas (Hajivand, 2013, citado por Rahman *et al.*, 2020).

Las cepas patógenas comparten la característica de contener un plásmido llamado Ti por sus siglas en inglés (tumor-inducing) de entre 200 y 800 kpb, el mecanismo por el que infecta a la planta se debe a la transferencia de ADN del plásmido Ti a las células vegetales, los genes insertados influyen indirectamente en la biosíntesis de auxinas y citoquininas que causa una división celular descontrolada y tumorigenicidad. La capacidad de esta bacteria de transferir su ADN es ampliamente usado en varios bioensayos (Hajivand, 2013, citado por Rahman *et al.*, 2020), especialmente para la transformación y mejoramiento de plantas (plantas transgénicas), transformación de hongos y también para varios estudios moleculares; además de estos ensayos *A. tumefaciens* sigue siendo usada para evaluar actividad antitumoral y antimetabólica de diversos metabolitos; esta revisión se enfocará en la importancia del uso de *A. tumefaciens* como generador de tumores en discos de papa y revisaremos algunas investigaciones actuales donde sigue siendo usada como screening inicial para compuestos que recientemente son estudiados y que podrían tener capacidades antitumorales.

ENSAYO DE DISCO DE PAPA COMO SCREENING INICIAL PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL

El primer ensayo semicuantitativo para inducción de tumores mediante *A. tumefaciens* fue desarrollado en 1955 por Klein y Tenenbau, quienes utilizaron tejido de raíz de zanahoria, desafortunadamente debido a la limitada utilidad que tenía para la evaluación bioquímica asociada con la conversión de células normales a células tumorales este tejido fue descartado y reemplazado por el ensayo realizado por Anand y Heberlein quienes probaron los discos de papa; la simplicidad del procedimiento y la homogeneidad del tejido, junto con el hecho de que el bioensayo es cuantitativo, hizo que este sistema sea ideal para la investigación bioquímica de compuestos con posible capacidad antitumoral (1977).

Para el año de 1981 Galsky *et al.* compararon este ensayo con ensayos en líneas celulares. Tomaron la información de varios compuestos con actividad antitumoral probados en ensayos de leucemia de ratón (P388) y compararon los mismos en el ensayo de disco de papa; observaron que existía una posible correlación y establecieron varias ventajas sobre otros modelos celulares. También se demostró que la acción antitumoral de estos compuestos no era por antibiosis (incapacidad de organismos de vivir en inmediaciones de otros) ni por inhibición de la unión bacteriana a los sitios de unión al tumor.

En estudios preliminares entre 1980 y 1983, efectuados en la Universidad de Purdue, se modificó el ensayo de disco de papa de Galsky para hacerlo un ensayo de rutina y ser usado como preselección antitumoral en extractos crudos de plantas. Dentro de las modificaciones hechas existen dos que son las más notables: 1. Usar DMSO (dimetil sulfoxido) como solvente universal para los extractos de plantas; y 2. usar una solución de yodo / yoduro de potasio para teñir las células de fondo que contienen almidón, es decir, las células no tumorales (normales) para facilitar el conteo de tumores (Ferrigni *et al.*, 1982), además de las modificaciones hechas probaron su efectividad con una evaluación estadística apropiada y se observó que los resultados del cribado de plantas del ensayo de disco de papa estaban fuertemente asociados con los resultados de 3PS (P388), con lo que definitivamente se concluyó que este ensayo podría emplearse rutinariamente y que podía ser usado como una preselección comparativamente rápida, económica, segura, que ahorra animales y es estadísticamente confiable para la actividad antitumoral in vivo (Ferrigni *et al.*, 1982, citado por McLaughlin & Rogers, 1998).

ENSAYO DE DISCO DE PAPA

El ensayo de Ferrigni *et al.*, con las modificaciones hechas por Galsky es el ensayo de elección, algunos investigadores lo modifican dependiendo de las necesidades del estudio, pero generalmente el protocolo inicia con un cultivo 48 horas de *A. tumefaciens* en medio de extracto de levadura (YEM), que es ajustado a 1×10^9 UFC con dimetil sulfoxido (DMSO).

Por otro lado, se lavan y desinfectan papas Russet (*Solanum tuberosum* L.), utilizando hipoclorito de sodio, se cortan para que la superficie quede sin cáscara; éstas se colocan nuevamente en hipoclorito de sodio para su desinfección y se procede a cortar en el centro de la papa con ayuda de un taladro de corchos de aproximadamente 10 mm de diámetro; al cilindro obtenido se le cortan y descartan los extremos y el restante es fraccionado en cilindros **más pequeños** de 5 mm de espesor, todo esto se realiza bajo condiciones asépticas y en cámara de flujo.

Los cilindros obtenidos se colocan en una placa con agar al 1,5% y se inoculan con 50 μ l la mezcla de extracto (solución)/agua/bacteria apropiada y se incuban a temperatura ambiente durante 12 días.

Al finalizar el tiempo de incubación, los discos se tiñen con reactivo de Lugol y son observados en un microscopio de disección, donde se puede evidenciar el tejido de papa de color azul oscuro a marrón y los tumores de color crema a naranja.

Para calcular el porcentaje de inhibición se considera la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Promedio de tumores en la muestra}}{\text{Promedio de tumores en el control}} \times 100 \quad (1)$$

El ensayo previamente descrito eventualmente se utiliza como parte de un screening inicial para evaluar actividad biológica en plantas debido a su bajo costo y al fácil uso por lo que esto resulta ser una ventaja para preseleccionar extractos y ampliar el estudio de su actividad antitumoral en caso de obtener una inhibición importante de tumores.

SU USO COMO SCREENING INICIAL DE COM- PUESTOS CON CAPACIDADES ANTITUMORALES EN INVESTIGACIONES ACTUALES.

En la búsqueda de nuevos medicamentos para tratar diferentes enfermedades los investigadores observan la medicina tradicional o medicina ancestral y las diferentes plantas usadas en ésta. Para empezar a analizar la actividad antitumoral de dichas plantas y los extractos obtenidos de éstas, el ensayo de disco de papa resulta ser una de las primeras opciones debido a su bajo costo y facilidad de implementación. Actualmente existen varias publicaciones donde se refiere la utilización de este ensayo, por lo que en este apartado se resumirán las más relevantes.

Myanmar es un país en vías de desarrollo conocido como el jardín botánico del mundo por su alta producción de plantas medicinales. Aquí, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80% de la población depende exclusivamente de esta medicina, por lo que Lae *et al.* en su estudio quisieron determinar las características fitoquímicas y algunas actividades biológicas de los extractos obtenidos de *Phyllanthus Albizzoides*, una planta medicinal muy usada. En esta investigación se encontró que el extracto etanólico de la corteza del tallo mostraba una significativa inhibición de tumores provocados por *A. tumefaciens* en disco de papa, además se encontró fuerte actividad antioxidante, antimicrobiana y antidiabética de estos extractos; el autor concluye que su estudio puede contribuir con el uso extendido de los tallos de la planta en la medicina tradicional de su país (2019).

Otra revisión actual donde se muestra el uso de este ensayo es el realizado por Thakur *et al.*, la investigación proporciona información sobre valores nutricionales, fitoquímica y aspectos farmacológicos modernos de un fruto muy utilizado en la India llamado manzana de madera (*Feronia limonia*), que ha sido subutilizada y descuidada. La investigación utilizó el disco de papa para evaluar actividad antitumoral y aunque se encontró que esta era poco significativa, se llegó a la conclusión que este fruto tiene diversas capacidades medicinales que se necesitan continuar investigando (2020).

En el artículo publicado por Tun *et al.*, se evaluó la actividad antitumoral de los extractos obtenidos de los

tallos de *Allamanda cathartica* L, se encontró que los extractos de etanol, acetato de etilo y éter de petróleo tenían una significativa inhibición de los tumores, dependiente de la concentración de los mismos. Por otro lado, se encontró actividad antioxidante y antimicrobiana especialmente en los extractos con etanol, por lo que los autores concluyen que el estudio podría contribuir a que los tallos de *A. cathartica* se puedan utilizar en la formulación de la medicina tradicional, además de que se puede continuar investigando su capacidad antitumoral con otros ensayos en líneas celulares más complejas (2020).

PERSPECTIVA/PUNTO DE VISTA

El Ecuador es un país megadiverso con gran variedad de vegetación, dentro de las plantas que han sido reportadas la cuarta parte son endémicas y de estas el 7% fueron catalogadas como útiles (De la Torre *et al.*, 2008)

El 60% de estas plantas halladas en Ecuador tienen usos medicinales, pero aún falta seguir investigando y profundizando el estudio de los metabolitos contenidos y sus propiedades bioquímicas y biológicas; como ha quedado evidenciado en los estudios reportados en este artículo de revisión el ensayo de disco de papa es viable y económico como screening inicial para determinar propiedades antitumorales, sin embargo, en el Ecuador no se ha reportado su uso estandarizado destacando así la importancia de desarrollar esta metodología y además aislar y mantener la cepa de *A. tumefaciens* generadora de tumores para que pueda ser usada como un ensayo de rutina en nuevas investigaciones.

REFERENCIAS

1. Anan V, Heberlein G. Crown gall tumorigenesis in potato tuber tissue. *Amer. J. Bot.* [online]. 1977; 64(2): 153-158, <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1977.tb15713.x>
2. Coker P, Radecke J, Guy C, Camper N. Potato disc tumor induction assay: a multiple mode of drug action assay. *Phytomedicine.* [online]. 2003; 10, 133-138, <https://doi.org/10.1078/094471103321659834>
3. Ferrigni N, Putman J, Anderson B, Jacobsen L, Nichols D, Moore D, Maclaughlin J. Modification and evaluation of the potato disc assay and antitumor screening of Euphorbiaceae seeds. *Journal of natural products.* [online]. 1982; 45, 679-687. <https://doi.org/10.1021/np50024a005>
4. Galsky A, Kozimo R, Piotrowsky D, Powell R. The crown-gall potato disk bioassay as a primary screen for compounds with antitumoral activity. *JNCI.* [online]. 1981; 67, 689-692. <https://academic.oup.com/jnci/article/67/3/689/950120>
5. Lae K, Su S, Win N, Than N, Ngwe H. Isolation of

- lasiodiplodin and evaluation of some biological activities of the stem barks of *Phyllanthus albizzioides* (Kurz) Hook.f. *SciMedicine Journal*. [online]. 2019; 1(4): 199-216. https://www.researchgate.net/publication/339253872_Isolation_of_Lasiodiplodin_and_Evaluation_of_some_Biological_Activities_of_the_Stem_Barks_of_Phyllanthus_Albizzioides_Kurz_Hookf
6. McLaughlin J, Rogers L, The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal*. [online]. 1998; 32, 513-524. <https://doi.org/10.1177/009286159803200223>
 7. Rahman S, Ahmand K, Ali N, Idrees M. Isolation and characterization of *agrobacterium tumefaciens* strains from malakander farm, University of Agriculture, Peshawar. *Pakistan Journal of Zoology*. [online]. 2020; 52, 2019-2021. <https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/20181021061044>
 8. Thakur N, Chugh V, Dwivedi S. Wood apple: an underutilized miracle fruit of India. *The Pharma Innovation Journal*. 2020; 9, 198-202. <https://www.thepharmajournal.com/archives/?year=2020&vol=9&issue=10&ArticleId=5227>
 9. De la Torre H, Navarrete P, Muriel M, Macía M, Balslev H. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. *Journal of ethnopharmacology*. 2008; 20, 122, 583.
 10. Tun Y, Lae K, Win N, Ngwe H. Phytochemical constituents and some biological activities of the stem of *Allamanda Cathartica* L. (Shewewa-Pan. *J. Myanmar Acad. Arts Sci*. 2020; 18, 11-26. https://www.researchgate.net/publication/342987674_PHYTOCHEMICAL_CONSTITUENTS_AND_SOME_BIOLOGICAL_ACTIVITIES_OF_THE_STEMS_OF_ALLAMANDA_CATHARTICA_L_SHWEWA-PAN

REVISTA QUÍMICA CENTRAL



Nanoemulsion de liberación controlada de ibuprofeno con lecitina de soya

Controlled release nano-emulsion with ibuprofen and soy lecithin

Pablo Bonilla^a | Mariel Bonilla^b

^a iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

^b iD Universidad Central del Ecuador, Ecuador

HISTORIAL DEL ARTÍCULO

Recepción: 31/08/2021

Aceptación: 15/12/2021

PALABRAS CLAVE

Nanoemulsión, lecitina de soya, liberación controlada, microscopio fuerza atómica.

ARTICLE HISTORY

Received: 31/08/2021

Accepted: 15/12/2021

KEY WORDS

Nano-emulsion, soy lecithin, drug delivery system, atomic force microscopy.

RESUMEN

En el presente trabajo se elaboraron nanoemulsiones de tipo O/W a partir de lecitina de soya, agua y mezclas de aceites de soya, maíz, canola y girasol; estas formulaciones se estudiaron para determinar su eficacia como medio de transporte de un fármaco lipofílico. Se solubilizó previamente la mayor cantidad de fármaco modelo en la fase oleosa, para la fase acuosa se utilizó agua tipo I; como surfactante se utilizó lecitina de soya grado alimenticio. Para la elaboración de las nanoemulsiones se utilizaron métodos de alta energía como agitación Vortex®, homogeneizador UltraTurrax® y ultrasonido. Para caracterizar las nanoemulsiones se utilizó un equipo de dispersión de luz dinámica (DLS), el cual permitirá medir el tamaño de gota, además para determinar la estabilidad se midió el potencial Z de la nanoemulsión, también se realizaron observaciones al microscopio y determinación del tamaño de gota en el microscopio de fuerza atómica (AFM). Se realizaron pruebas de liberación del fármaco en un equipo de disolución acoplado con un espectrofotómetro UV-vis, que se utilizó para encontrar la cinética de liberación de la forma farmacéutica elaborada comparándola con estándares comerciales. El ensayo de liberación de las formulaciones permitió obtener aquella que dio el mayor porcentaje de liberación del principio activo con una cinética de liberación controlada.

ABSTRACT

In the present work have been made O/W (oil in water) nano-emulsions using soy lecithin, water, and blends of soy, canola, corn, and sunflower oils. These formulations were studied to determine their efficiency as drug delivery systems for lipophilic drugs. The nano-emulsions were composed of two phases: the oil phase which contained an amount of model drug (Ibuprofen) on it, and the aqueous phase that was distilled water. The surfactant used was food grade soy lecithin. The elaboration of the nano-emulsions was made using high energy methods of agitation such as vortex, ultra turrax homogenizer, and point ultrasound. To characterize the nano-emulsions were used dynamic light scattering equipment (DLS), which allows us to measure the size of the droplets. To determine the stability of the nano-emulsions were made measurements with optical microscopy and with an atomic force microscope (AFM). Through the characterization, we determined the emulsions with major stability, and we proceed to make the drug release tests in a dissolution apparatus coupled with an Ultraviolet-visible Spectrophotometer to study the release kinetics of the pharmaceutical form.

INTRODUCCIÓN

Las nanoemulsiones son dispersiones líquido-líquido que son cinéticamente estables, éstas tienen un tamaño de gota del orden de los 100 nanómetros. Sus tamaños de partícula pequeños permiten que exista mayor área de superficie y que tengan mayor estabilidad.^(1,2)

Las propiedades fisicoquímicas que tienen efecto sobre una nanoemulsión son:

1. velocidad de disolución en la formulación;
2. tamaño de partícula y cristalinidad del fármaco;
3. pH de la formulación y pKa del fármaco;

- lipofilidad del fármaco;
- viscosidad de la formulación, afecta a la difusión del fármaco hacia los tejidos.³

Mediante procesos de alta energía como la cizalla obtenida por medios mecánicos se puede mejorar la estabilidad de los sistemas coloidales, a fin de evitar el proceso de maduración de Ostwald. Este mecanismo depende del grado de polidispersión de las gotas y de las interacciones entre éstas.⁽⁴⁾ a translucent oil in water emulsion (a so-called 'mini-emulsion') En el desarrollo de esta investigación no solo se busca mejorar la estabilidad en la formulación de una emulsión con un principio activo muy insoluble como el ibuprofeno, sino también mejorar la solubilidad del mismo dispersando dicho activo en una matriz oleosa de aceites vegetales de los cuales el mejor resultado fue obtenido al dispersar en aceite de soya ayudado de un tensioactivo de origen vegetal lecitina de soya.^(5,6) unpredictable plasma concentrations. Drugs can be delivered in a controlled pattern over a long period of time by the controlled or modified release drug delivery systems. They include dosage forms for oral and transdermal administration as well as injectable and implantable systems. For most of drugs, oral route remains as the most acceptable route of administration. Certain molecules may have low oral bioavailability because of solubility or permeability limitations. Development of an extended release dosage form also requires reasonable absorption throughout the gastro-intestinal tract (GIT)⁽⁷⁾

Cinética de liberación de fármacos

La concentración del fármaco depende de cinco procesos: liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación.⁽⁷⁾

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES Y REACTIVOS

Reactivos:

- aceite de soya puro, donación empresa de aceites y grasas, 10 ml;
- lecitina de soya grado alimenticio, compra comercial 5 gramos;
- ibuprofeno en polvo del 99,7% de pureza, donación empresa farmacéutica, 1 gramo;
- agua tipo 1;
- fosfato monobásico de sodio, PBS, Sigma-Aldrich.

Materiales:

- 20 tubos de ensayo de 20 cm de largo y 1 cm de diámetro con tapa;
- 10 pipetas plásticas desechables de 3 ml;

- bolsas de diálisis Cellu-Sep, 12.000-14.000 daltons;
- filtros de PDE de 0,2 micras;
- micropipetas de 10,10 y 5000 microlitros de capacidad.

Equipos:

- balanza analítica, marca Mettler Toledo, precisión: $\pm 0,0001$ g;
- vortex mixer, marca Fischer Scientific;
- ultra turrax, marca IKA, modelo T10BS1;
- placa de calefacción con agitador analógico y magnético de laboratorio con 5 posiciones, marca IKA, modelo RT 5 Power. Puestos de agitación sincronizados de 0 a 1100 rpm;
- ultrasonido puntual, modelo GEX 130, potencia 130 W;
- disolutor, marca Colplay con 6 posiciones;
- calorímetro diferencial de barrido, Q2000;
- equipo de dispersión de luz dinámica (DLS), marca Horiba SZ 1000;
- espectroscopio UV-vis, marca Varian;
- microscopio de fuerza atómica, marca Park System, modelo NX10.

MÉTODOS

Formulación de nanoemulsiones

Las nanoemulsiones se realizaron mezclando primero el fármaco modelo con el aceite o mezcla de aceites; de esta manera se determinó la máxima solubilidad del fármaco modelo en la fase oleosa, después se procedió a pesar una cantidad de lecitina y se calentó la mezcla hasta 60°C con agitación en vortex durante 3 minutos y Ultra Turrax durante 5 minutos, a la mezcla anterior se le añadió una cantidad específica de agua. Finalmente, para disminuir el tamaño de partícula se agitó la nanoemulsión por ultrasonido a 33% de potencia durante 3 minutos.

Caracterización de nanoemulsiones

Para caracterizar las nanoemulsiones se determinó su pH, conductividad y se utilizó colorante a la grasa y colorante acuoso para determinar si la emulsión es o/w o w/o. Para determinar la interacción del fármaco con el aceite se realizaron lecturas en el calorímetro diferencial de barrido (DSC). Además, se midió el tamaño promedio de partícula y la polidispersión en un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS) Horiba SZ-100. Con este mismo equipo se determinó el potencial Z de la nanoemulsión para determinar su estabilidad mediante la separación de cargas. También se realizaron observaciones al microscopio y mediciones del tamaño de partícula mediante un lente acoplado al microscopio; se determinó el tamaño de gota con el microscopio de fuerza atómica (AFM), para comparar el tamaño de gota obtenido por los diferentes métodos de caracterización.

Estabilidad de las nanoemulsiones

Para medir la estabilidad de las nanoemulsiones se midió la altura de separación de fases, su temperatura de descomposición, también se observaron las nanoemulsiones en el microscopio después de 1 mes y se realizó la curva de distribución de tamaños y, finalmente, se centrifugó las nanoemulsiones para observar su estabilidad y además medir la cantidad de fármaco presente en cada una de las fases de separación.

Pruebas de liberación controlada de fármaco

Medio de Liberación: Se preparó una solución de fosfato monobásico de sodio (PBS) 0,2 N y se ajustó con NaOH hasta un pH de 7,2.

Condiciones Sink: La concentración de ibuprofeno disuelto en PBS no debió exceder el 0,04% de ibuprofeno por cada 100 g de solución de PBS.

La formulación de las nanoemulsiones se realizó variando la cantidad de tensioactivo, agua y aceite, además se variaron los tipos de aceite y al final se eligió las formulaciones con mejores características fisicoquímicas y fueron las que contenían aceite de soya. Todas las mezclas de aceites se realizaron en una proporción de 50/50. El ibuprofeno fue previamente solubilizado en el aceite o en las mezclas de aceites hasta alcanzar su máxima solubilidad. Se prepararon nanoemulsiones de tipo o/w. En el gráfico de la figura 1 se identifican las regiones del triángulo de Gibbs de las mejores formulaciones (ver Figura 1).

En el diagrama ternario se observa que las formulaciones seleccionadas se encuentran en el área izquierda del triángulo de Gibbs, esta zona se caracteriza porque el porcentaje de agua es mayor al del aceite y del tensioactivo, además en esta zona se forman emulsiones del tipo o/w. El fármaco fue disuelto en el aceite previamente a la formulación de las nanoemulsiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOEMULSIONES

Tipo de nanoemulsión

Se determinó que las nanoemulsiones obtenidas eran o/w, mediante prueba de colorantes.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se utilizó calorimetría de barrido diferencial (DSC) para determinar la interacción existente entre el fármaco y el aceite de la emulsión (ver Figura 2).

En los termogramas de la figura 2 se observa el pico de fusión del ibuprofeno en una matriz de aceite de soya, se puede ver que el pico no es tan definido como el pico del ibuprofeno solo y la temperatura de fusión bajó a 71,92°C, esto se debe a su interacción con el aceite, por lo que baja su punto de fusión según propiedades coligativas. Además, se puede identificar que en ambos casos la entalpía (ΔH) es positiva, por lo tanto, al fusionarse los sistemas absorben energía; sin embargo, en el caso del ibuprofeno micronizado la entalpía es mayor que en el sistema del aceite con el ibuprofeno, es decir, el fármaco solo absorbe más energía que el fármaco en la matriz de aceite de soya.

DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

Polidispersión

Se observó que la polidispersión disminuye al utilizar la agitación con ultrasonido. Los valores de la polidispersión en ambos casos fueron menores a 0,5, lo que nos indica que los tamaños de gotas de las formulaciones tienden a distribuirse alrededor de un valor medio y con ligera dispersión lo que hace de estas nanoemulsiones más estables. Se realizó el análisis de varianza de la polidispersión en el equipo DLS y señala que las varianzas no son iguales entre las formulaciones y tampoco son iguales al ser agitadas con ultrasonido y sin ultrasonido.

Potencial Z

Los valores promedio del potencial zeta para las nanoemulsiones fue de entre -48 y -87 mV los cuales son valores menores a -25 mV, esto nos demuestra que las nanoemulsiones son estables puesto que las fuerzas de repulsión son mayores que las de atracción y disminuye el riesgo de que las gotas se unan y se inicien procesos de maduración Ostwald.

Ensayos de liberación

Los resultados de los ensayos de liberación se describen en la figura 3, en la cual se comparan los procesos de difusión acumulativa del principio activo con el tiempo y se llega a establecer que en comparación con una formulación de ibuprofeno comercial que es de liberación rápida, las formulaciones de la presente investigación son de liberación retardada debido a que se llega a porcentajes de alrededor del 60% luego de alrededor de 16 horas, mientras la forma comercial llega a la liberación total del fármaco alrededor de las 8 horas (ver Figura 3).

Cinética de liberación

Se determinó la cinética de liberación que siguen las nanoemulsiones propuestas para establecer si son formas farmacéuticas de liberación controlada. La formulación IS2TB tiene una cinética de liberación controlada que si-

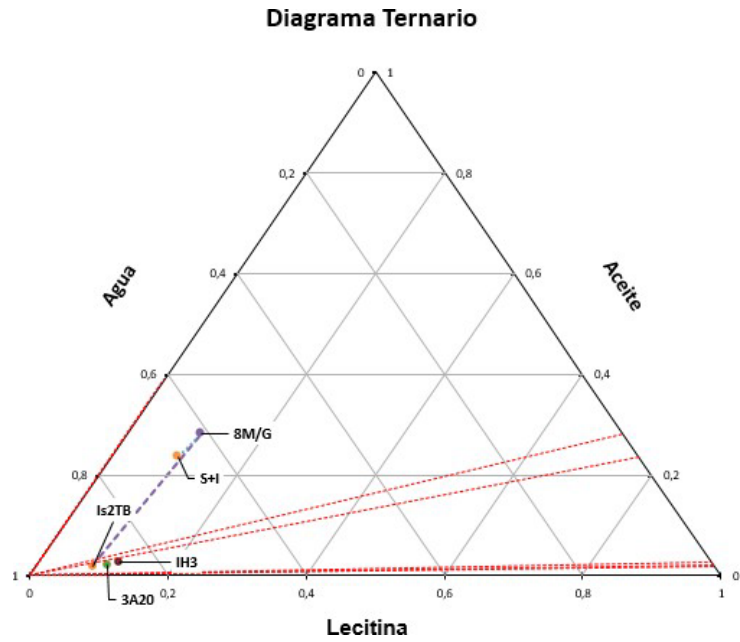


Figura 1. Diagrama de fases para las nanoemulsiones elaboradas

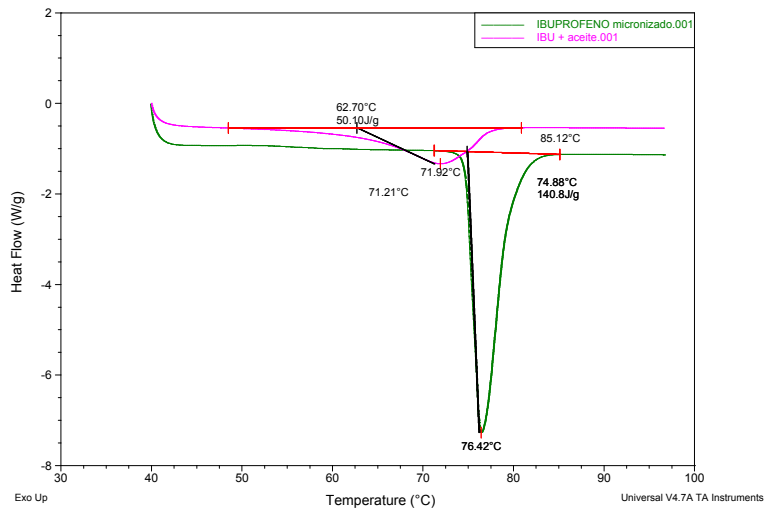


Figura 2. Termogramas del ibuprofeno y del fármaco en la matriz de la nanoemulsión

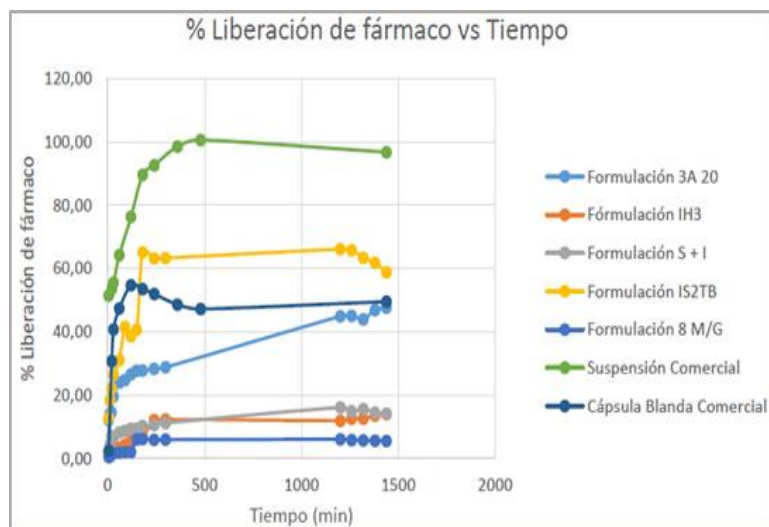


Figura 3. Comparación de los porcentajes de liberación de las formulaciones preparadas y de las formulaciones comerciales.

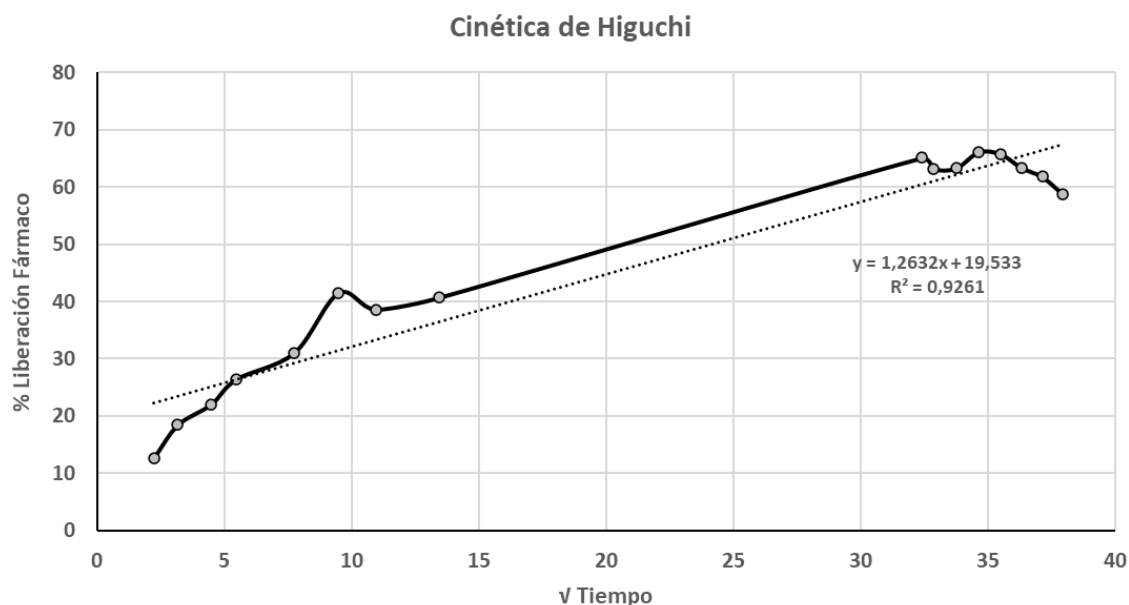
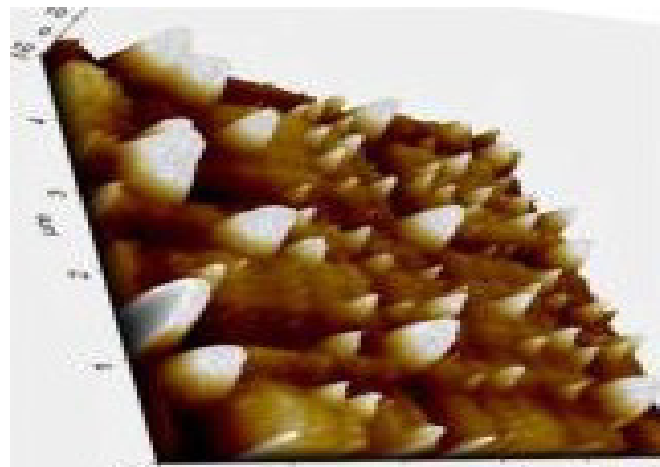
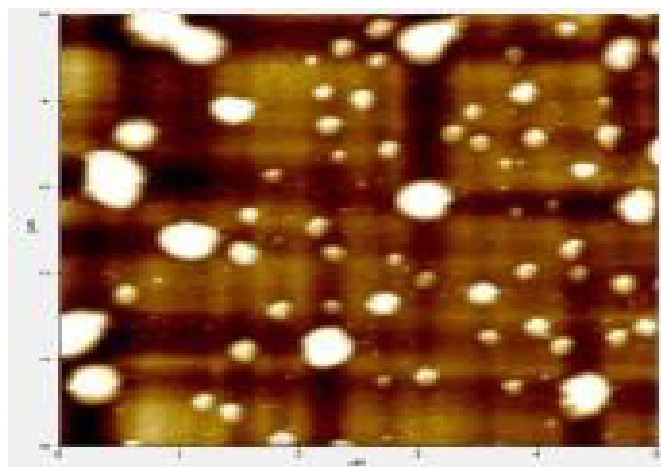


Figura 4. Cinética de liberación. Formulación IS2TB



Figuras 5-6. Imágenes de nanoemulsión en microscopio de fuerza atómica

Izquierda: Imagen 2-D

Derecha: Imagen 3-D

Tabla 1. Valor del factor de correlación R2 para la cinética de liberación

Orden Cinético/ Formulación	3A20	IH3	IS2TB	S+I	8M/G	Suspensión Comercial	Cápsula blanda
Orden 0	0,8956	0,9342	0,8490	0,7559	0,9189	0,3892	0,2433
Orden 1	0,8012	0,7596	0,7219	0,4886	0,8012	0,3702	0,1834
Orden 2	0,5897	0,4796	0,5268	0,2194	0,4856	0,3489	0,1423
Higuchi	0,9348	0,9403	0,9261	0,8721	0,9648	0,6222	0,4334

que el modelo de Higuchi, el coeficiente de correlación obtenido con este modelo cinético fue de 0,9261. La figura 4 describe los valores para determinar el tipo de cinética (ver Figura 4).

En la tabla 1 se observa los valores de los coeficientes de correlación comparativos de las diferentes cinéticas y de las diversas formulaciones en comparación con los de la cinética de Higuchi lo que corrobora el hecho que todas las formulaciones obtenidas son de liberación retardada y la formulación IS2TB es la que mejor se ajusta en su valor de correlación. Los valores de correlación de las formulaciones de ibuprofeno comerciales son de rápida liberación y no siguen una cinética determinada sea de primero, segundo u orden cero (ver Tabla 1).

Microscopía AFM

Se realizó la determinación del tamaño de gota mediante AFM y se obtuvo tamaño de gota promedio de 195,6 nm. Las figuras 5 y 6 describen la topografía de las gotas de la nanoemulsión IS2TB en plano 2D y 3D, respectivamente (ver Figuras 5 y 6).

CONCLUSIONES

Se elaboraron nanoemulsiones de liberación controlada con lecitina de soya y con un fármaco lipofílico (ibuprofeno). Se obtuvieron cinco fórmulas estables 3A20, IH3, S+I, IS2TB y 8M/G, a las cuales se les realizó los ensayos de liberación para determinar la formulación más efectiva, es decir, aquella que liberó la mayor cantidad de fármaco lipofílico considerando que el ibuprofeno tiene baja solubilidad en medios acuosos. Se caracterizaron las nanoemulsiones elaboradas mediante diferentes técnicas. Con los resultados obtenidos se concluye que la mejor nanoemulsión fue IS2TB, la cual es estable debido a que el valor del potencial Z es menor a -25 mV. En cuanto a la polidispersión se determinó que la nanoemulsión seleccionada poseía una polidispersión menor a 0,5. Además, existe una posible relación o formación de enlaces débiles entre el fármaco y el vehículo lo que se determinó mediante el termograma DSC al desplazarse el punto de fusión del fármaco. En cuanto al AFM, la morfología de las gotas de la nanoemulsión es definida por la capa de lecitina que rodea la misma y le confiere fortaleza mecánica para resistir deformaciones o rupturas y así evitar procesos de desestabilización o coalescencia. La formulación que libero mayor cantidad de principio activo fue la nanoemulsión IS2TB, compuesta por la mezcla de aceites de soya/girasol en una proporción de 50/50; esta formulación contenía una cantidad de ibuprofeno de 0,28% y fue estable incluso después de 3 meses de preparada, esta formulación presentó una cinética de liberación controlada del modelo de Higuchi con el valor más alto de correlación de 0,9261.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran de manera explícita, no tener conflictos de intereses que pudieren haber sesgado los resultados incluidos en el manuscrito.

AGRADECIMIENTOS Y PATROCINIO

A los técnicos docentes y autoridades de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador por dar las facilidades de uso de las instalaciones e insumos para llevar a cabo este trabajo.

REFERENCIAS

1. Gupta A, Eral HB, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*. Royal Society of Chemistry. 2016; 2826-2841. <https://doi.org/10.1039/c5sm02958a>.
2. Adamson AW, Gast AP, Alice P. *Physical chemistry of surfaces*. 1997; 784.
3. Rodríguez LJ. *Sistemas coloidales en farmacia: características generales*. 2007.
4. Katsumoto Y, Ushiki H, Mendiboure B, Gracia A, Lachaise J. Evolutionary behaviour of miniemulsion phases: II. Growth mechanism of miniemulsion droplets. *J. Phys. Condens. Matter*. 2000; 12(15): 3569-3583. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/12/15/306>.
5. Gupta BP, Thakur N, Jain NP, Banweer J, Jain S. Osmotically controlled drug delivery system with associated drugs. 2010; vol. 13.
6. Verma RK, Mishra B, Garg S. Drug development and industrial pharmacy osmotically controlled oral drug delivery*. 2000. <https://doi.org/10.1081/DDC-100101287>.
7. Ferrandis Tébar V. *Farmacocinética y farmacodinamia*. I Curso de Farmacología para Fisioterapeutas. Farmacocinética y farmacodinamia.

La revista QUÍMICA CENTRAL publica artículos originales en todos los campos de la química que contengan resultados de investigaciones experimentales, teóricas o aplicadas, que no hayan sido publicados anteriormente ni que estén bajo consideración en otras revistas.

RECEPCIÓN DE MANUSCRITOS

Los manuscritos se recibirán solamente por vía electrónica, en formato de Microsoft *Office Word* u *Open Office Writer* para *Windows*, a la página <https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/QUIMICA/about/submissions>, con copia al correo del Consejo Editorial (revista.fcq@uce.edu.ec) con un máximo de 5 MB por archivo. Los manuscritos para ser evaluados no deben haber sido anteriormente publicados en ningún medio físico o electrónico. El manuscrito debe ir acompañado de una carta en el formato definido solicitando al Consejo Editorial su publicación e indicando que el mismo no ha sido publicado previamente, ni está siendo evaluado para su publicación en otra revista y que todos los autores que aparecen en el manuscrito conocen y aceptan el contenido del mismo.

REVISIÓN Y PUBLICACIÓN

Cada manuscrito recibido será sometido a un proceso de evaluación por revisores calificados. La identidad de los revisores es confidencial y sus nombres no serán revelados al autor. La decisión sobre la publicación del manuscrito se notificará por correo electrónico a la persona de contacto junto con el informe de los revisores.

FORMATO DEL MANUSCRITO

El manuscrito debe ser redactado en tamaño de papel A4 (21 x 29,7 cm), márgenes derecho, izquierdo, superior e inferior de 2,0 cm. Todo el texto debe estar escrito usando fuente *Times New Roman* según la plantilla, usar cursiva para los nombres en latín de organismos vivos. No sangrar la primera línea de cada párrafo luego de punto aparte o de un título. No van espacios en blanco entre los párrafos. Deberá emplearse el Sistema Internacional de Unidades (SI). No utilizar división automática de palabras para separar sílabas. No emplear notas al pie de página. Después del número va punto y espacio, la primera letra con mayúscula. El límite del manuscrito es de 5000 palabras.

ORGANIZACIÓN DEL MANUSCRITO

Las secciones del manuscrito son:

- Título
- Autores
- Filiación
- Resumen y palabras claves
- Title
- *Abstract* y *Key words*
- Introducción
- Parte experimental.
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Agradecimientos (opcional)
- Referencias
- Información de soporte

TÍTULO

El título debe ser claro, conciso y escogido cuidadosamente para reflejar el contenido del trabajo reportado. No utilizar abreviaturas.

AUTORES

Nombre del autor y apellido, en caso de utilizar los dos apellidos unirlos por un guión. Listar los autores del trabajo que han hecho una sustancial contribución al trabajo, seguido de número como superíndice que indique la filiación. El nombre del líder académico a quien va dirigida la correspondencia se marcará con un asterisco (*). Deben omitirse todos los títulos, ocupaciones y grados académicos como Prof., Coord., Dr., Lcdo., M. Sc., Ph. D.

FILIACIÓN

Lugar donde se realizó la investigación seguida de la filiación, departamento o centro, universidad o institución, ciudad, país.

AUTOR DE CORRESPONDENCIA

El correo electrónico institucional del autor de correspondencia. Si el autor a quien va dirigida la correspondencia ya no está en la institución donde el trabajo fue realizado, colocar la dirección actual como una nota al pie de página marcada con doble asterisco (**).

RESUMEN

Todos los manuscritos deben tener un resumen del trabajo realizado. Contiene una clara indicación del objetivo, los resultados más importantes y las conclusiones para que los lectores puedan determinar si el texto completo será de su interés. Debe estructurarse en un solo párrafo, no debe exceder las 200 palabras y no debe incluir ecuaciones ni referencias.

PALABRAS CLAVE

Colocar de tres a cinco palabras clave que faciliten la difusión del manuscrito.

TITLE, ABSTRACT Y KEY WORDS

Poner el título, el resumen y las palabras clave del manuscrito en inglés,

INTRODUCCIÓN

En la introducción debe indicarse claramente el propósito y los objetivos de la investigación. No debe incluirse una revisión extensa de trabajos previos, solamente una revisión bibliográfica relevante. La introducción no debe extenderse a más una página.

PARTE EXPERIMENTAL

Esta sección debe presentar una descripción clara y sin ambigüedades de los materiales, métodos y equipos utilizados con suficiente detalle que permita la reproducción del trabajo por otros investigadores. Deben evitarse descripciones repetitivas de un procedimiento general. La sección debe estar dividida en subsecciones. Debe indicarse explícitamente las precauciones de manejo de material peligroso o de procedimientos peligrosos y, en caso de uso de animales, la aprobación correspondiente por el comité ético local.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La función de esta sección es presentar objetivamente los principales resultados y su interpretación en una secuencia lógica. No debe incluir detalles experimentales y debe redactarse en tiempo pasado. Se recomienda utilizar tablas,

esquemas y figuras para mostrar los resultados. No debe presentarse el mismo resultado en tablas y en figuras. De ser necesario indicar el procedimiento estadístico empleado para analizar los resultados y reportar el nivel de significancia utilizado. Debe relacionarse los resultados del artículo con lo encontrado en otros estudios similares.

CONCLUSIONES

Esta sección resume brevemente las principales conclusiones del trabajo y no debe ser un duplicado de la información del resumen (*abstract*) ni repetir puntos de la discusión. La conclusión debe estar basada en la evidencia presentada.

AGRADECIMIENTOS (OPCIONAL)

Esta sección puede usarse para agradecer discusiones de otros investigadores o asistencia técnica de personas que no son coautores del trabajo. También puede agradecerse la asistencia económica o donación de reactivos.

REFERENCIAS

Deben listarse y enumerarse todas las referencias bibliográficas en el orden que aparecen en el manuscrito. En el texto del manuscrito, la referencia se cita usando números arábigos como superíndices, después de un punto o una coma. No deberá incluirse en la referencia material bibliográfico que no haya sido señalado explícitamente con un número en el texto. Los nombres de revistas deben ir abreviados. Para el formato de las referencias utilizar las guías de la *American Chemical Society* (ACS).

INFORMACIÓN DE SOPORTE

De requerirse en esta sección se puede añadir información extra que ayuda a entender o evidenciar o resaltar un hecho o discusión abordado en la parte de discusiones.

ECUACIONES

Las ecuaciones deben estar enumeradas consecutivamente, con el número entre paréntesis (1) y alineado a la derecha. Se puede utilizar el editor de ecuaciones de *Word* o *MathType*.

ESTRUCTURAS QUÍMICAS

Las estructuras químicas deben dibujarse usando cualquier programa para el efecto como ChemDraw formato ACS 1996, Isis/Draw, ChemSketch u otros.

CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS

Para todos los compuestos nuevos, debe proveerse evidencia que permita establecer su identidad y grado de pureza. La evidencia de la identidad de compuestos nuevos debe incluir espectros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, HRMS o datos de análisis elemental. Para compuestos sintetizados, y que han sido previamente reportados en la literatura, debe citarse el método de preparación y los datos de la bibliografía las técnicas empleadas para determinar su pureza.

FIGURAS, ESQUEMAS Y TABLAS

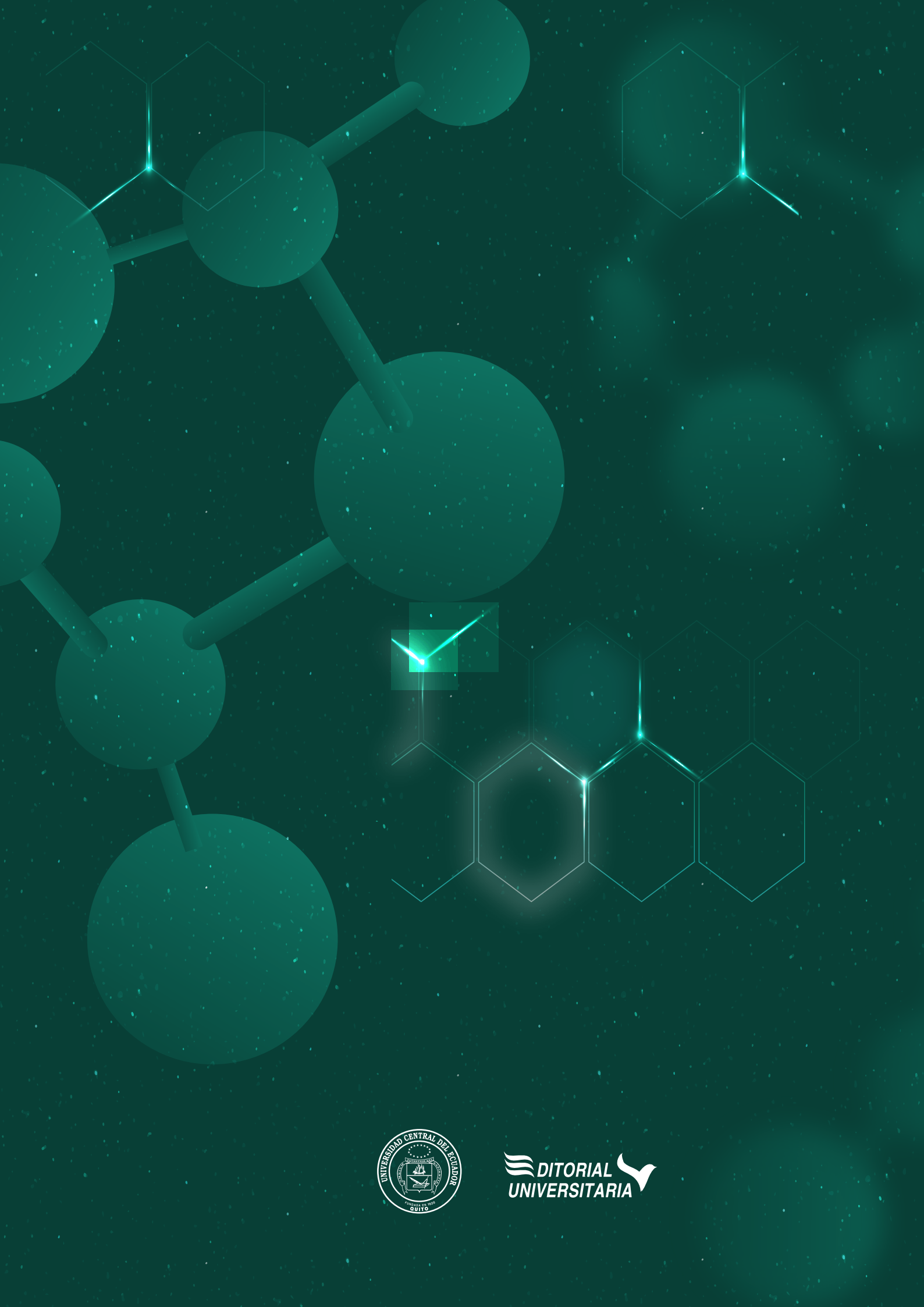
Todas las figuras, esquemas y tablas deben mencionarse en el texto en orden consecutivo y numeradas independientemente con números arábigos. Los esquemas y las figuras llevarán la descripción al final del gráfico, pie de figura. Esta descripción debe ser clara y permitirá entender la figura sin necesidad leer el cuerpo del manuscrito. Las imágenes deben directamente en el cuerpo del manuscrito en formato TIFF o JPGE. Las tablas estarán en formato de *Word* o similar y no insertadas como imagen, el título de cada tabla debe ir en la parte superior de la tabla. Comprobar que las leyendas sean legibles.

BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Anderson, G. (2004). How to write a paper in scientific journal style and format. Re-cuperado el 15 de enero de 2010, de sitio Web de Bates College: <http://abacus.bates.edu/~ganderso/biology/resources/writing/H17wtoc.html>
- Coghill, A. M. & Garson, L. R. (Edits.). (2006). The ACS Style (ed.). The ACS Style Guide: Effective Communication of Scientific Information (third ed.). New York: Oxford University Press.
- Day, R. A (2005). Cómo escribir y publicar trabajos científicos (tercera ed., vol. 598). (M. Sáenz, Trad.) Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud.



Esta revista, que usó tipografía *Minion Pro* tamaño 11, se terminó de diagramar para su versión digital en Editorial Universitaria en el mes de diciembre de 2021 siendo rector de la Universidad Central del Ecuador el Dr. Fernando Sempértegui Ontaneda y director de Editorial Universitaria el Prof. Gustavo Pazmiño.



DITORIAL
UNIVERSITARIA