



UACH
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Dirección de
Investigación y Posgrado

VOLUMEN XVII | NÚMERO 2 | PUBLICACIÓN CONTINUA 2023



TECNOCIENCIA CHIHUAHUA

Revista de ciencia y tecnología

Revista adherida a la
Declaración de San Francisco



DORA



Crossref

latindex
catálogo 2.0



DOAJ

MIAR

Matriz de Información para el
Análisis de Revistas



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

PERIÓDICA
Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias



UACH
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Directorio Institucional

Mtro. Luis Alfonso Rivera Campos

Rector

**C.P. Jesús Ignacio
Rodríguez Bejarano**

Secretario General

**Lic. Martha Lorena Mier
Calderón**

Directora Académica

**Dr. Luis Carlos Hinojos
Gallardo**

*Director de Investigación y
Posgrado*

**L.A.E. Alberto Eloy
Espino Dickens**

Director Administrativo

**Dra. Ruth del Carmen
Grajeda González**

*Directora de Extensión y
Difusión Cultural*

**M.A.P. Marcela Herrera
Sandoval**

*Directora de Planeación y
Desarrollo Institucional*



TECNOCENCIA CHIHUAHUA
Revista de ciencia y tecnología

Equipo Editorial

Editor responsable

Dr. Armando Quintero Ramos, Universidad Autónoma de Chihuahua, México. (SNII III)

Asistente editorial

M.E.S. Nancy Karina Venegas Hernández, Universidad Autónoma de Chihuahua, México.

Co-editores

Dr. Rubén Francisco González Laredo, Instituto Tecnológico de Durango, Durango, México. (SNII, Nivel III)

Dr. Javier Tarango Ortiz, Universidad Autónoma de Chihuahua, México. (SNII, Nivel II)

EQUIPO EDITORIAL

- **Alimentos y Biotecnología**

Dr. Benjamín Ramírez Wong, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. (SNI, Nivel III).

Dr. José Alberto Gallegos Infante, Instituto Tecnológico de Durango, Durango, México. (SNI, Nivel III)

Dr. José Rafael Minjares-Fuentes, Universidad Juárez del Estado de Durango, Gómez Palacio, Durango, México. (SNI, Nivel I)

Dra. María Marcela Rodríguez, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Olavarría, Argentina.

Dra. Valeria Soledad Eim Iznardo, Universidad de las Islas Baleares, Islas Baleares, España.

Efrén Delgado, Ph.D., New Mexico State University, Las Cruces, NM. Estados Unidos de Norteamérica.

Dra. Elizabeth Carvajal Millán, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, México. (SNI, Nivel III).

Dr. Fernando Martínez Bustos, CINVESTAV, Unidad Querétaro, Querétaro, México. (SNI, Nivel III)

Dr. León Raúl Hernández Ochoa, Universidad Autónoma de Chihuahua (SNI, Nivel I)

Dr. José de Jesús Zazueta Morales, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán México. (SNI, Nivel I)

Dr. Diego Bautista Genovese, [PLAPIQUI] Planta Piloto de Ingeniería Química-CONICET, Bahía Blanca Argentina.

Dra. Aracely Ochoa Martínez, Instituto Tecnológico de Durango, Durango, México. (SNI, Nivel I)

Dra. Deborah Murowaniecki Otero, Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahía, Brasil.

Dr. René Renato Balandrán Quintana, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (SNI, Nivel I)

Nancy Flores Ph.D., New Mexico State University, Las Cruces, NM Estados Unidos de Norteamérica.



- **Agricultura y Agropecuaria**

Dr. Gerardo Méndez Zamora, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. (SNI, Nivel I)

Dr. Iván Adrián García Galicia, Universidad Autónoma de Chihuahua (SNI, Nivel I)

Dr. Guillermo Fuentes Dávila, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México.

Dr. Víctor Arturo González Hernández, Colegio de Posgraduados. Estado de México, México (SNI, Nivel III)

Dra. Yolanda Salinas Moreno, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Departamento de Genética, México. (SNI, Nivel III)

Dr. Concepción Luján Álvarez, Universidad Autónoma de Chihuahua (SNI, Nivel I)

- **Química y Biología**

Dr. Eleuterio Burgueño Tapia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. México. (SNI, Nivel II)

Dra. Luz Estela González de Bashan, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (SNI, Nivel II)

Nadezhda Traycheva Petkova, PhD., University of Food Technologies, Technological Faculty, Department of Organic Chemistry and Inorganic Chemistry, Bulgaria.

Dr. Ricardo Vázquez Juárez, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR), México. (SNI, Nivel II)

Dra. Carmen Oralia Meléndez Pizarro, Universidad Autónoma de Chihuahua. (SNI, Nivel II)

Dr. David Morales Morales, Universidad Nacional Autónoma de México (SNI, Nivel III).

Dr. René Rojas Guerrero, Pontificia Universidad Católica de Chile: Santiago, Metropolitana, CL

Prasenjit Ghosh, Ph.D. Indian Institute of Technology Bombay: Mumbai, Maharashtra, IN

Dr. Johan Mendoza Chacón, Universidad Autónoma de Chihuahua (SNI, Nivel I)

• Salud y Cultura Física

Dr. Julián Esparza Romero, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD). Unidad Hermosillo, Sonora. México (SNI, Nivel II)

Dra. Carolina Jiménez Lira, Universidad Autónoma de Chihuahua. (SNI, Nivel I)

Dra. Jazmín Leticia Tobías Espinoza, Universidad Autónoma de Chihuahua. (SNI, Candidato a Investigador)

Dr. Arnulfo Ramos Jiménez, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. (SNI, Nivel I)

Dra. Silvia Giono Cerezo, Instituto Politécnico Nacional. (SNI, Nivel II)

Dra. América Chávez Martínez, Universidad Autónoma de Chihuahua. (SNI, Nivel I)

Dra. Susana Aideé González Chávez, Universidad Autónoma de Chihuahua. (SNI, Nivel II)

Dra. Mercedes Bermúdez Cortés, Universidad Autónoma de Chihuahua. (SNI, Nivel I)

• Ingeniería y Recursos Naturales

Dr. Francisco Paraguay Delgado, Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV) Chihuahua, México. (SNI, Nivel III)

Dr. Vladimir Villarreal Contreras, Universidad Tecnológica de Panamá. Panamá

Dr. Jesús Darío Landa Silva, School of Computer Science, University of Nottingham, Reino Unido.

Dr. Aldo Jonathan Muñoz Vázquez, Texas A&M University, College Station, USA

Dr. Humberto González Rodríguez, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León. (SNI, Nivel II)

Dra. Mélida Gutierrez, Missouri State University, Springfield, MO, USA.

Dra. Alicia Melgoza Castillo, Universidad Autónoma de Chihuahua. (SNI, Nivel I)

• Tecnología

M.C. Ricardo Talamás Abbud, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, México



CONTENIDO

Definición de la revista

7

Salud

Análisis de riesgos posturales en empresa mueblera con el método ergonómico Rapid Entire Body Assessment (REBA) e1119

Analysis of postural risks in furniture company with the ergonomic method Rapid Entire Body Assessment (REBA)

Nancy Guadalupe Rodríguez-Salinas, Yoselin Rodríguez-Tovar, María Teresa Gutiérrez-Escajeda, Emmanuel Morales-Chávez

Predicción de ovario poliquístico aplicando técnicas de Machine Learning e1193

Prediction of Polycystic Ovary Syndrome Applying Machine Learning Techniques

Carlos Eduardo Cañedo-Figueroa, Luisa Fernanda Blancarte-Flores, Wendy Sofia Guerra-Hernández, Daniela Licea-Abundez, Dafne Mariana Rivera-Lerma, Brianna Tena-Holguín

Dos eventos genéticos sobresalientes en carcinoma oral de células escamosas: Variante c.-93 G>A y metilación del promotor de MLH1 e1194

Two genetic events present in oral squamous cell carcinoma: c.-93 G>A variant and MLH1 promoter methylation

Anna Guadalupe López-Ceballos, José Miguel Moreno-Ortiz, Manuel Alejandro Rico-Méndez, Saúl Armando Beltrán-Ontiveros, Héctor Melesio Cuén-Díaz, Erik Lizárraga-Verdugo, Sofía Esmeralda Madueña-Angulo, Víctor Alfredo Contreras-Rodríguez, Perla Yareli Gutiérrez-Arzapalo

Inhibitory effects of *Buddleja scordioides* (salvilla) leaves on digestive enzymes and carbohydrate absorption in vivo e1221

Efectos inhibidores de las hojas de *Buddleja scordioides* (salvilla) sobre las enzimas digestivas y la absorción de carbohidratos in vivo

Laura Jazel Barragan-Zuñiga, Luis E. Simental-Mendía, Mayra Denise Herrera, Rubén Francisco González-Laredo, José Alberto Gallegos-Infante, José Salas-Pacheco, Martha Rocío Moreno-Jiménez, Nuria Elizabeth Rocha-Guzmán, Claudia Ivette Gamboa-Gomez

Agropecuaria

Actividad antifúngica de accesiones de maíz (*Zea mays* L.) de grano con presencia de fenoles coloridos e1172

Antifungal activity of corn (*Zea mays* L.) accessions of grain with presence of colored phenols

Yolanda Salinas-Moreno, Ricardo Resendiz-Valencia, Ramón Ignacio Arteaga-Garibay, Norma Yadira Zacamo-Velázquez

Química y Recursos Naturales

Valorización de la biomasa por medio de catálisis homogénea e1200

Biomass valorization by homogeneous catalysis

Diego Roa, Alma Arévalo, Juventino García-Alejandre

DEFINICIÓN DE LA REVISTA

TECNOCIENCIA CHIHUAHUA, es una revista multidisciplinaria, de publicación continua, que publica artículos y notas científicas, así como artículos de revisión *por invitación* originales e inéditos, en español e inglés, en formato electrónico de acceso abierto.

El objetivo de TECNOCIENCIA CHIHUAHUA es divulgar los resultados y avances de investigación originales e inéditas en las áreas temáticas de Alimentos, Biológica, Salud, Agropecuaria, Cultura Física, Ingeniería y Tecnología, Química y Recursos Naturales, dirigidos a investigadores, académicos, estudiantes y público con interés científico.

El contenido científico y calidad de los artículos son evaluados a través de un proceso de arbitraje de forma anónima en la modalidad de doble ciego por al menos dos árbitros especializados en la materia.

La revista TECNOCIENCIA CHIHUAHUA es editada y financiada por la Dirección de Investigación y Posgrado de la Universidad Autónoma de Chihuahua, México. La revista está adherida a la Declaración de San Francisco a través de DORA (Declaration on Research Assessment) se encuentra indexada en índices y portales especializados como DOAJ (Directory of Open Access Journals), MIAR (Matriz de Información para el Análisis de Revistas), Latindex 2.0, Periódica y en Redes Académicas como Biblat, Google Académico y Academia. La revista cuenta con el DOI (Digital Object Identifier) a través de la organización internacional Crossref.

Artículo Científico

Análisis de riesgos posturales en empresa mueblera con el método ergonómico Rapid Entire Body Assessment (REBA)

Analysis of postural risks in furniture company with the ergonomic
method Rapid Entire Body Assessment (REBA)

Nancy Guadalupe Rodríguez-Salinas^{1*}, Yoselin Rodríguez-Tovar¹, María Teresa Gutiérrez-Escajeda¹, Emmanuel Morales-Chávez¹

¹ Tecnológico Nacional de México, Campus Tecnológico de Delicias, Facultad de Ingeniería Industrial, Delicias, Chihuahua, México.

*Correspondencia: L18540109@delicias.tecnm.mx (Nancy Guadalupe Rodríguez Salinas)

DOI: <https://doi.org/10.54167/tch.v17i2.1119>

Recibido: 04 de diciembre de 2022; Aceptado: 27 de marzo de 2023

Publicado por la Universidad Autónoma de Chihuahua, a través de la Dirección de Investigación y Posgrado

Resumen

El análisis ergonómico de la estación y actividad laboral identifica factores de riesgo para los trabajadores, así como enfermedades de trabajo potenciales y es la base para el diseño de puestos ergonómicos. En el presente análisis se evaluó el riesgo postural al que están expuestos los seis trabajadores del área de tapicería en una fábrica de muebles en ciudad Delicias, Chihuahua, México. Se realizó un estudio preliminar a través de la Lista de Identificación Inicial de Riesgos y la de Evaluación de los Riesgos por el Diseño del Puesto de Trabajo. Posteriormente, se utilizó el diagrama de Corlett y Bishop para identificar las zonas corporales con incomodidad y se aplicó el método Rapid Entire Body Assessment (REBA) para evaluar carga postural evaluando aspectos como carga física, tipo de agarre y actividad muscular. Los resultados arrojaron que cuatro de los trabajadores están expuestos a un nivel de riesgo alto por posturas forzadas con puntuaciones REBA mayores a 9 (escala del 1 al 15), manifestando molestias en cabeza-cuello, brazo-mano y espalda. Las costureras presentan riesgo medio con puntuaciones REBA entre 4-7, esto sugiere una alta probabilidad de que los trabajadores del área de tapicería desarrollen algún trastorno musculoesquelético.

Palabras clave: trastornos musculoesqueléticos, ergonomía, riesgo laboral, método REBA, empresas mueblaras.

Abstract

The ergonomic analysis of the season and work activity identifies risk factors for workers as well as potential occupational diseases and is the basis for the design of ergonomic workstations. In the present analysis, the postural risk to which the six upholstery workers are exposed in a furniture factory in Ciudad Delicias, Chihuahua, Mexico. A preliminary study was carried out through the Initial Risk Identification List and the Risk Assessment by Workplace Design. Subsequently, the diagram of Corlett and Bishop was used to identify the body areas with discomfort and the Rapid Entire Body Assessment (REBA) method was applied to evaluate postural load evaluating aspects such as physical load, type of grip and muscle activity. The results showed that four of the workers are exposed to a high-risk level due to forced postures with REBA scores greater than 8 (scale from 1 to 15), manifesting discomfort in the head-neck, arm-hand and back. Seamstresses are at medium risk with REBA scores between 4-7, suggesting a high probability that upholstery workers will develop a musculoskeletal disorder.

Keywords: musculoskeletal disease, ergonomics, occupational hazard, REBA method, furniture companies.

1. Introducción

La ergonomía es una disciplina científica que comprende las interacciones entre las personas y los elementos que las rodean, aplica teorías, principios y métodos para optimizar el bienestar humano. Es decir, adapta las tareas al operador, su objetivo es cuidar la salud y el bienestar de los empleados (International Ergonomic Association, 2021). La Organización Internacional del Trabajo ha señalado que, a pesar de que algunos de los riesgos laborales han disminuido en los últimos años, existe un aumento en nuevas enfermedades de trabajo, entre los riesgos emergentes se incluyen los factores de riesgo ergonómico (Secretaría del Trabajo y Previsión Social, 2018).

Actualmente la ausencia de puestos ergonómicos en los centros de trabajo deriva en factores de riesgo laboral. Por lo anterior, las empresas y los especialistas en la salud laboral centran sus esfuerzos en identificar las condiciones de trabajo que representen un factor de riesgo ergonómico para los trabajadores, ya que estas podrían incrementar la probabilidad de desarrollar un trastorno musculoesquelético (TME) (CENEA, 2023). Russo et al. (2020), expone que las empresas subestiman los factores de riesgo asociados con estaciones de trabajo diseñadas sin considerar la ergonomía, de forma que los trabajadores perciben una exposición significativa a riesgos biomecánicos/ergonómicos en sus actividades laborales.

Se ha demostrado que la prevalencia de TME en poblaciones laborales tiene una relación causal entre diferentes factores de riesgo tales como movimientos repetitivos, posturas forzadas, manipulación de cargas pesadas, entre otros, con el desarrollo de TME (Ahn, *et al*, 2020; Hossain *et al.*, 2018). En México, estos trastornos son el primer tipo de enfermedad de trabajo, con 4607 casos en 2016, presentándose casos de dorsopatías, entesopatías, síndrome del túnel carpiano, lesiones de hombro, entre otros. La incidencia de estas enfermedades representó que, en promedio, cada día doce trabajadores sufrieron un trastorno musculoesquelético (Secretaría del Trabajo y Previsión Social, 2018).

En el país se reconocen diversas regiones que concentran la actividad de la fabricación de muebles de madera; una de estas, es la cuenca mueblera de la región de Delicias, Chihuahua, México. En 2019 el número de fábricas de muebles en la región aumentó 30%, generando alrededor de 3500 empleos directos (Meléndez, 2019). No obstante, la mayoría de estas fábricas desconocen los beneficios de la aplicación de la ergonomía en los puestos de trabajo. La principal causa de enfermedades laborales en el sector del mueble son sobreesfuerzos físicos relacionados con posturas forzadas durante el trabajo, movimientos repetitivos de mano-muñeca y brazos, manipulación manual de cargas, así como las que conciernen a la estación de trabajo; ubicación inadecuada de las herramientas y equipos, altura de mesa de trabajo inapropiada, entre otras; como efecto, los operadores de esta industria presentan diversos TME enfocados en el cuello, la espalda y extremidades superiores (Freire, 2019).

Lo anterior se demuestra en una evaluación de riesgo laboral en la fabricación de mobiliario de oficina en Ecuador. En este estudio se aplicó el método de evaluación ergonómica Ovako Working Analysis System (OWAS), el cual concluye que para los tres puestos evaluados se adoptan posturas perjudiciales para el sistema musculoesquelético; además, con la aplicación del método Rapid Upper Limb Assessment (RULA), se determinó un nivel de riesgo 4 (escala del 1 al 4, donde 4 indica riesgo alto) lo cual recomienda realizar cambios en el puesto de trabajo (Rosero, 2015). Debido a la similitud de actividades entre este antecedente y el presente estudio permite tener una noción de las posturas que se pueden encontrar, así como las bases para los posibles cambios a aplicar una vez obtenidos los resultados del análisis, además; el método RULA es la base del método Rapid Entire Body Assessment (REBA) lo cual permite conocer cómo se deben evaluar las extremidades superiores incluidas en este último método.

Asimismo, se realizó un diagnóstico ergonómico en la industria del mueble en Argentina, se aplicaron métodos ergonómicos como el REBA, Nivel de Actividad Manual (NAM) y la ecuación de National Institute for Occupational Safety and Health, USA (NIOSH). Se destacó que los trabajadores realizaban esfuerzos que comprometían su zona lumbar, así como a riesgos por desprendimientos de partículas de madera o expulsión de residuos (Del Rosso, 2015).

Por otro lado, un estudio realizado en 25 fábricas de muebles en Delicias, de las cuales, el 40% son micro empresas y el 53% son pequeñas empresas, arrojó que del total de trabajadores de la muestra el 8.24% son profesionistas, todos ellos en el área de administración y ventas. Por lo tanto, las fábricas de muebles en Delicias no cuentan con un profesional para el diseño ergonómico de los puestos de trabajo. Aunado a esto, el estudio menciona que la mayoría de las empresas cuentan con una antigüedad en el mercado de 31 a 40 años; no obstante, presentan fallas en planeación estratégica y capacitación de empleados; además, desconocen normativas sobre riesgos en el trabajo (Magaña *et al.*, 2020).

Por lo anterior y debido a la ausencia de investigaciones de este tipo en una región que se caracteriza por la industria del mueble, se realizó una evaluación de los factores de riesgo ergonómico presentes en una fábrica de muebles en ciudad Delicias. El objetivo fue evaluar el riesgo postural al que están expuestos los trabajadores y posibles TME a desarrollar para su consideración en estudios futuros, así como en el desarrollo de propuestas de mejora. Esto con la finalidad de dar notoriedad sobre la importancia de la ergonomía dentro de la empresa en busca de reducir el desarrollo de enfermedades profesionales y accidentes laborales a fin de fortalecer la seguridad en el trabajo.

La evaluación se realizó en el área de tapicería, ya que es aquella en donde se presentan mayores actividades con posturas forzadas y sobreesfuerzos físicos. Debido a la importancia de mantener condiciones laborales adecuadas, así como asegurar que las tareas, máquinas, equipos y herramientas se adapten a los trabajadores, se buscó responder las incógnitas sobre las condiciones laborales en las que se encuentran las estaciones de trabajo del área de tapicería, cuáles son los riesgos potenciales por sobreesfuerzos físicos a los que están expuestos los trabajadores derivados del diseño del método y puesto de trabajo, así como qué TME son más probables a desarrollar en los trabajadores, dadas las condiciones actuales.

2. Materiales y Métodos

La ergonomía es una ciencia asociada a la higiene y seguridad en las empresas: evalúa y determina los niveles de riesgo de los puestos de trabajo con el fin de identificar aquellos factores, posturas o condiciones que generen afecciones en la salud y disminuya el rendimiento de los trabajadores (Chávez y Moran, 2022). De esta forma, se diseñan propuestas de mejora para adaptar al trabajador las tareas y ambiente que lo rodean.

La evaluación de factores de riesgo ergonómico se realizó en el área de tapicería, esta se subdivide en: carpintería, costura y montaje, en la cual trabajan seis personas: dos costureras, tres montadores y un carpintero con un rango de edad de 17 a 47 años. Las actividades de esta área consisten en el armado del casco o armazón del sofá (estación de carpintería) de acuerdo con el diseño del mismo, posteriormente se cubre con materiales como espuma y mecanismos para su posterior tapizado con cubiertas textiles (estación de montaje), estas últimas realizadas de acuerdo con las plantillas del diseño y el tipo de tela especificada (estación de costura).

Para la evaluación, se obtuvo consentimiento escrito y firmado por parte de los trabajadores para uso de imágenes, se comunicó el objetivo del estudio y fines del mismo, así como su libertad de retirarse en cualquier momento de la evaluación. Se especificó que su identidad y nombre de la fábrica serían confidenciales. La cantidad de observaciones realizadas fue de 29 horas de la jornada laboral durante el periodo junio-agosto 2021, las observaciones se realizaron por conveniencia de acuerdo con el tiempo dispuesto por la empresa para las evaluaciones.

El estudio que se presenta es de enfoque cuantitativo ya que se fundamenta en la medición de las características del puesto de trabajo. Su alcance es descriptivo debido a que pretende especificar las características del grupo objeto de estudio: trabajadores del área de tapicería. Asimismo, es un estudio no experimental de tipo transeccional el cual describe la situación actual de las características del área de tapicería a través de la evaluación con métodos ergonómicos de la estación y actividad laboral.

2.1 Métodos

Como evaluación preliminar, se realizó el llenado de la lista de Identificación Inicial de Riesgos y la de Evaluación de los Riesgos por el Diseño del Puesto de Trabajo, sugeridas en el Manual para la Evaluación y Prevención de Riesgos Ergonómicos y Psicosociales en la pequeña y mediana empresa (PYME) del Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo de España (INSHT,

2003). Esto, con el objetivo de identificar los factores de riesgo ergonómico predominantes en la estación de trabajo, así como las actividades que propician dichos riesgos, entre los cuales se pueden encontrar: factores ambientales, diseño del puesto de trabajo, posturas y movimientos y seguridad para analizarlos a profundidad con un método avanzado: REBA. La evaluación se enfocó, principalmente, en los ítems de diseño del puesto de trabajo (altura, profundidad, alcances, espacio de trabajo y herramientas), manipulación manual de cargas, postura/repetitividad, fuerzas y seguridad.

2.1.1 Diagrama de Corlett y Bishop (BPD)

La escala BPD también conocida como diagrama de Corlett y Bishop (Fig. 1), consiste en realizar una prueba de confort donde se analizan las partes del cuerpo humano mediante una imagen y el trabajador selecciona aquellas partes en donde presenta un dolor o molestia (Navarrete y Saldias, 2018). La escala valora del 1 al 5 el nivel de molestia siendo el 5 el grado de mayor incomodidad. De acuerdo con los factores de riesgo observados a través del estudio preliminar, se optó por la aplicación de esta metodología para identificar con mayor precisión las zonas corporales afectadas por las posturas o sobreesfuerzos físicos. El BPD fue aplicado a los seis trabajadores del área de tapicería como una encuesta cara a cara, de esta forma los trabajadores indicaron las zonas del cuerpo donde presentaban dolor, así como el grado de intensidad. Además, los trabajadores expresaron otro tipo de inconformidades con respecto a las condiciones físicas del área en el que trabajaban (información registrada en la bitácora del estudio).

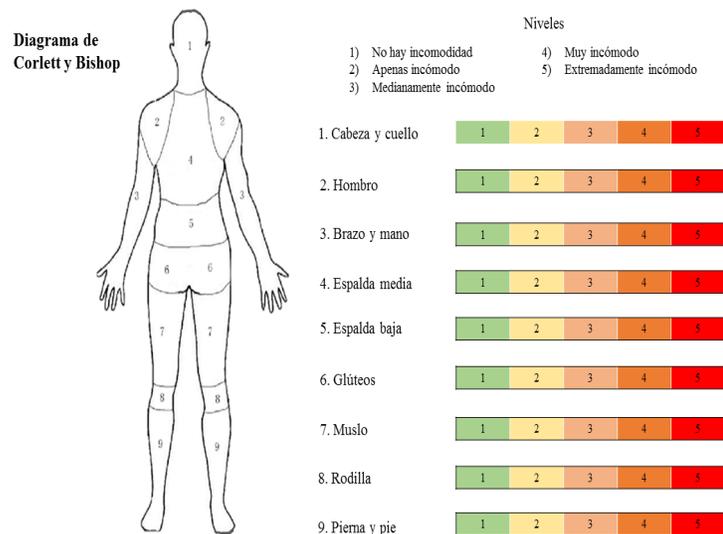


Figura 1. Diagrama de Corlett y Bishop (Obra: Modificado de Tosic *et al.*, 2021).
Figure 1. Diagram by Corlett and Bishop (Work: Modified from Tosic *et al.*, 2021).

2.1.2 Método REBA

El método REBA es un análisis postural que mide el riesgo de lesiones asociadas a una postura con sobreesfuerzo como suelen ser las de tipo musculoesquelético e indicar el nivel de actuación para cada postura (Diego-Mas, 2015). De forma detallada, REBA permite realizar evaluaciones completas en cuanto a extremidades y posturas en las que el tronco está en extensión y flexionado, este método valora aspectos como la carga o fuerza manejada, el tipo de agarre o actividad muscular desarrollada por el trabajador (ya sean posturas estáticas o dinámicas); además, considera la existencia de cambios bruscos de postura o inestabilidad en las mismas y si la postura de los brazos se mantiene a favor de la gravedad (Sánchez, 2017). También toma en consideración si la tarea es simétrica, de ser así, solo se analiza un brazo; y en caso de ser asimétrica analiza ambos brazos (Diego-Mas, 2015).

La aplicación de esta metodología conlleva la ejecución de los siguientes puntos:

- Determinar los ciclos de trabajo y observar al trabajador durante varios ciclos.
- Seleccionar las posturas a evaluar.
- Determinar si se evaluará el lado izquierdo del cuerpo o el derecho.
- Tomar los datos angulares requeridos por el software online Ergonautas.
- Determinar la puntuación para cada parte del cuerpo.
- Se obtienen puntuaciones parciales y finales para determinar existencia de riesgos y en su caso, el nivel de actuación.
- Determinar qué tipo de medidas deben adoptarse (revisa las puntuaciones de cada parte del cuerpo para determinar en dónde serán necesarias las correcciones).
- Rediseñar el puesto para mejorar la postura (en caso de ser necesario).

Tal aplicación consta de puntuaciones de dos grupos de análisis en los que se divide el cuerpo: A (piernas, tronco y cuello) y B (miembros superiores: brazos, antebrazos y muñecas) que se obtienen al otorgar una puntuación a cada miembro (según sea el ángulo en el que se encuentre) y se consulta la tabla correspondiente de acuerdo con el miembro evaluado. Una vez se han obtenido los resultados de ambos grupos se puede calcular la puntuación C que será modificada en caso de existir algún tipo de actividad muscular, el agarre de objetos y la fuerza aplicada para realizar la tarea, en donde la nueva puntuación es el valor final y con esta se puede determinar el nivel de actuación. De esta forma, puntuaciones entre 4-7 se consideran de un riesgo medio; puntuaciones entre 8-10 es un riesgo alto y puntuaciones entre 11-15 es un riesgo muy alto. Asimismo, niveles de actuación mayor a 2, indica que es necesario implementar medidas correctivas.

2.2 Procedimiento experimental

Las actividades realizadas por cada estación fueron observadas con el objetivo de describir de manera precisa las tareas y herramientas usadas por trabajador (Tabla 1). Asimismo, se realizó un layout de la distribución de la estación de trabajo, esto para conocer a profundidad la física del proceso y elementos involucrados con los que el operador interactúa al momento de realizar sus actividades laborales. De esta forma, se identificaron las actividades más frecuentes y candidatas a analizar.

Tabla 1. Actividades generales por estación de trabajo**Table 1.** General activities by workstation

Estación	Actividades
Carpintería	El carpintero transporta la materia prima del área de descarga de madera al área de maquinado para cortar la madera en tiras largas (habilitado), con una sierra circular de banco.
	Transporta las tiras madera a su área de trabajo, es necesario hacer dos viajes para transportar. Las tiras que por el momento no se utilicen se colocan en un estante.
	Una vez en su mesa de trabajo, comienza a hacer cortes en las tiras de madera de acuerdo con las medidas correspondientes para la fabricación del armazón, esto con el péndulo radial de extensión.
	Realiza un armado previo en donde construye la forma básica del casco o armazón, utiliza pistola de grapa de casco de 2 pulgadas y la pistola tapicera medida 5012.
	Comienza el armado con más detalle utiliza pistolas, taladro, martillo, escuadra y segueta, una vez terminado este es bajado de la mesa, depende del tamaño del casco, puede ser bajado por el carpintero o puede necesitar la ayuda de otra persona
Costura	La estación de costura recibe las telas y verifican que sean los metros y tela especificada.
	La costurera 1 corta la tela de acuerdo con las plantillas de la sala a tapizar, utiliza cinta métrica de costura o un metro.
	Costurera 2 une las piezas de tela cortadas en la máquina de coser.
Montaje	El armazón se su mesa de trabajo, redondea esquinas con un martillo y colocan cuerda con pistola de grapas.
	Se coloca rafia, banda elástica o resortes al armazón con pistola de grapas, posteriormente tela de rafia, de acuerdo con el tipo de sala o silla se pueden colocar otros elementos como el cartón, finalmente se coloca el pegamento para la esponja.
	Colocan las fundas en los brazos, cojines (asiento) y vistas (respaldo).

Posteriormente, se realizó el llenado de las listas para identificación de riesgos laborales. A partir de esta evaluación se determinó que uno de los principales riesgos en el área de tapicería era por posturas forzadas, ya que el 80% de las actividades observadas involucraban al menos una postura potencialmente riesgosa.

Se seleccionó el método REBA para el análisis ya que permite valorar el riesgo postural en el cuerpo completo y se especializa en los riesgos de tipo musculoesquelético. Permite, además, evaluar por postura, de forma que se obtienen resultados precisos por trabajador en una tarea específica. Se seleccionaron las posturas de acuerdo con los siguientes criterios:

- La postura es la más frecuente o representativa de la tarea.

- Existe una clara desviación con la posición neutral.
- Posiciones que tienen relación directa con las zonas del cuerpo que presentaron mayor puntuación en el BPD.

Para el procesamiento de datos se utilizó el software Ergonautas proporcionado por la Universidad Politécnica de Valencia, sitio destinado para herramientas que permiten la evaluación ergonómica en el trabajo y prevención de riesgos laborales. Este software analiza las fotografías de las posturas de los trabajadores y realiza fichas con el nivel de riesgo al que está expuesto cada operador. Con esto se evaluó uno de los factores que influyen en el desarrollo de TME y que se consideró uno de los principales elementos de riesgo en la tapicería. Por su parte, los resultados de esta metodología sentaron las bases para evaluaciones de repetitividad y esfuerzo físico que se realizaron posteriormente y permitieron el desarrollo de propuestas de acción para el área evaluada.

3. Resultados

La identificación de riesgos preliminar se realizó a través de las listas de evaluación. De acuerdo con los resultados, se determinó que los principales factores de riesgo ergonómico en el área de tapicería son los ambientales, los referentes al diseño del puesto de trabajo, así como la postura y repetitividad. Los ítems en común que presentaron las tres estaciones de trabajo son:

- Factores ambientales: La temperatura es inadecuada, se presentan altas temperaturas en verano y bajas temperaturas en invierno. Por otro lado, el ruido impide que el trabajador se comunique con otros empleados, por lo que debe forzar la voz para tener una conversación, se llega a un rango de 72-84 dB. Aunado a esto, la carpintería cuenta con un techo de lámina aproximadamente a 5 metros del suelo lo que aumenta la sensación térmica.
- Diseño del puesto de trabajo: Las mesas de trabajo son inestables y no pueden ajustarse a la altura necesaria para la tarea; además, se acumulan desperdicios de material en la estación de trabajo. Por su parte, en la estación de costura el espacio es insuficiente para el desplazamiento del trabajador. Asimismo, en la estación de carpintería el empleado debe caminar hacia otra área para usar una herramienta de corte en múltiples ocasiones (Fig. 2).
- Posturas y movimientos: Existen posturas forzadas que podrían aumentar el riesgo de padecer trastornos musculoesqueléticos, se realizan movimientos repetitivos principalmente en extremidades superiores. Existe inclinación de tronco, cabeza-cuello, posturas forzadas en mano-muñeca y sobreesfuerzos físicos, principalmente en las tareas de carpintería y montaje. Además, los trabajadores, a excepción de una costurera, permanecen de pie durante toda la jornada laboral.
- Seguridad: Los trabajadores no usan equipo de protección personal, los flujos de salida se encuentran obstaculizados; además, no existe delimitación de áreas para materiales y producto terminado.



Figura 2. Área de tapicería (Obra: Creación de los autores).
Figure 2. Upholstery area (Work: Creation of the authors).

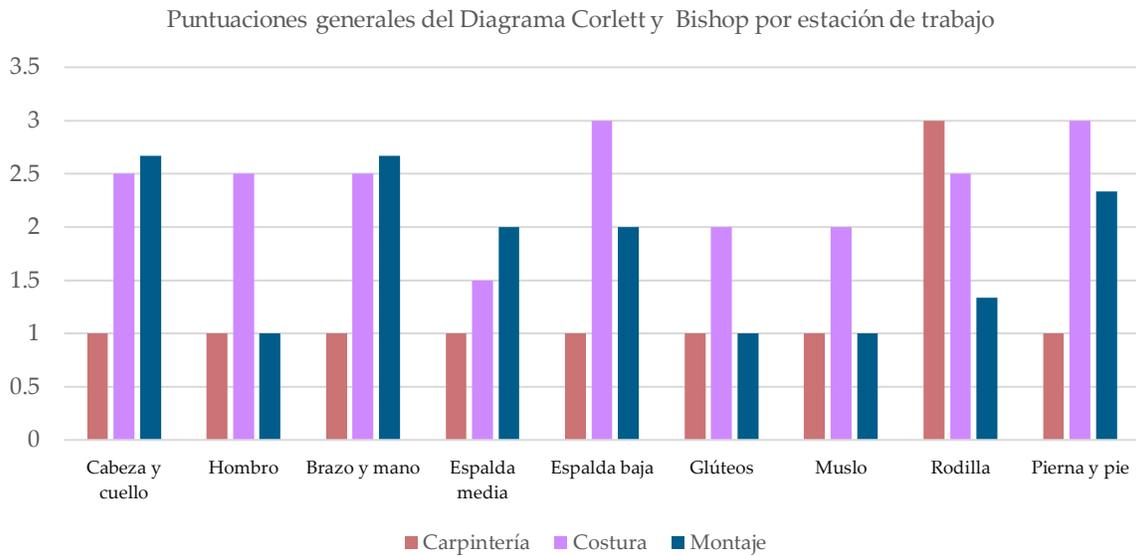


Figura 3. Puntuaciones generales del diagrama de Corlett y Bishop por estación (Obra: Creación de los autores).
Figure 3. Corlett and Bishop diagram overall scores by station (Work: Creation of the authors).

Por otro lado, la aplicación del diagrama BPD a los seis trabajadores del área de tapicería arrojó que las zonas corporales donde se presentan mayores puntuaciones fueron: cabeza-cuello, brazo-mano, pierna-pie y espalda baja. Las trabajadoras de costura fueron quienes manifestaron mayor

incomodidad. Del mismo modo, al clasificar la información por estación (Fig. 3) se identifica que las estaciones con mayores puntajes son costura y montaje, se observa que:

- El área de montaje presenta puntuaciones más altas en cabeza-cuello y brazo-mano.
- El área de costura presenta puntuaciones altas en hombro, espalda baja, glúteos, muslo y pierna-pie.
- En el área de carpintería, las puntuaciones son bajas a excepción de la rodilla.

Para la aplicación del REBA, se seleccionaron las posturas de cada trabajador de acuerdo con los criterios descritos para, posteriormente, realizar las fichas de riesgo de cada una de ellas con el software online Ergonautas, de acuerdo con el tipo de tarea. Las posturas predominantes en cada área fueron:

- Carpintería: Inclinación de tronco al tomar grapas, inclinación de cuello al trazar en la madera, posición de cuclillas al trabajar piezas pequeñas y postura incómoda de brazos al usar herramientas (Fig. 4).



Figura 4. Posturas adoptadas en la tarea de carpintería (Obra: Creación de los autores).

Figure 4. Postures adopted in the task of carpentry (Work: Creation of the authors).

- Costura: Inclinación de cuello y tronco al coser los forros de cada armazón, inclinación de tronco al medir las telas, postura incómoda de mano-muñeca al coser telas texturizadas, elevación de hombros al descoser y flexión de codo al cortar y medir telas (Fig. 5).



Figura 5. Posturas adoptadas en la tarea de costura (Obra: Creación de los autores).

Figure 5. Postures adopted in the sewing task (Work: Creation of the authors).

- Montaje: Flexión de codo al tapizar, postura incómoda de cuello y hombro al estirar telas y usar la pistola de grapas, postura incómoda mano-muñeca al usar la pistola de grapas, inclinación de tronco al acomodar el armazón y estirar las telas, uso de fuerza al tensionar telas y posición incómoda de piernas, también se consideró la manipulación manual de cargas (Fig. 6).



Figura 6. Posturas adoptadas en la tarea de montaje (Obra: Creación de los autores).

Figure 6. Postures adopted in the task of assembly (Work: Creation of the authors).

Se obtuvo una puntuación REBA que indica el nivel de riesgo de la postura evaluada y, de acuerdo con esta, se determina el nivel de actuación, el cual indica que tan necesarias son las acciones correctivas. Para cada trabajador se obtuvo la ficha de riesgo de cada postura representativa, posteriormente se agruparon por trabajador y por tipo de actividad. El software evalúa el grado de

inclinación de las extremidades, rotación de cuello, muñecas, brazos, fuerza aplicada, posición estática o dinámica, entre otros (Tabla 2).

Tabla 2. Puntuación REBA y nivel de actuación por postura.

Table 2. REBA score and performance level by posture.

Estación de Trabajo	Operador	Posturas	Puntuación REBA	Nivel de actuación
Montaje	Trabajador 1	1. Tensión de telas en posición de pie	11	4
		2. Tapizado en posición sentada	7	2
		3. Tapizado en posición de pie (sin pistola)	6	2
		4. Tapizado con en posición de pie (con pistola)	6	2
		5. Tensión de telas en posición sentada	9	3
		6. Tapizado con pistola (posición de muñeca)	8	3
	Trabajador 2	1. Tensión de telas	12	4
		2. Tapizado en posición sentada	12	4
		3. Tapizado de pie	13	4
		4. Tapizado con pistola (posición de muñeca)	10	3
	Trabajador 3	1. Acomodo de armazón	11	4
		2. Tapizado de pie	5	2
3. Tapizado de pie (sin pistola)		8	3	
4. Aplicación de pegamento a la esponja		5	2	
5. Tapizado de forma inclinada		9	3	
6. Tapizado por encima del hombro		9	3	
Costura	Trabajador 4	1. Trabajo en la máquina de coser	5	2
	Trabajador 5	1. Toma de medidas de las telas	5	2
		2. Recorte de las telas	5	2
Carpintería	Trabajador 6	3. Acomodo de telas	6	2
		1. Corte de madera	10	3
		2. Uso de taladro	11	4
		3. Diseño de piezas	5	2
		4. Uso de pistola de grapas	10	3

Se observó que la estación de carpintería y montaje presentaron puntuaciones mayores a 9, lo que indica que es necesaria la actuación cuanto antes (Tabla 3). De esta forma, resulta evidente que todas las estaciones necesitan acciones correctivas para reducir posturas forzadas, sobre todo, las que involucran la inclinación y torsión lateral de troco y cuello, posturas forzadas en brazos y mano-muñeca, así como alcances por encima del hombro aunado al manejo de carga manual, principalmente en las estaciones de montaje y carpintería.

Tabla 3. Puntuación REBA y nivel de actuación por estación de trabajo**Table 3.** REBA score and performance level per workstation

Estación de trabajo	Puntuación general REBA por empleado		Puntuación REBA por estación	Nivel de actuación
Carpintería	Carpintero	9	9	3
Costura	Costurera 1	5	5.5	2
	Costurera 2	6		
Montaje	Montador 1	12	9.3	3
	Montador 2	8		
	Montador 3	8		

Las discrepancias en puntuaciones entre trabajadores que realizan la misma tarea se deben a factores como complejión y altura del trabajador. Además, el riesgo de lesiones y desarrollo de enfermedades profesionales aumenta si no se utiliza el equipo de protección personal de acuerdo con el tipo de actividad. Asimismo, aumenta el riesgo la distribución física de la estación, el tipo y peso de la herramienta, duración y repetitividad, así como las condiciones ambientales y estrés laboral.

4. Discusión

Los resultados de esta investigación concuerdan con lo expuesto con las enfermedades laborales por trabajos con la madera (Vicente y López, 2020), la cual destaca que los trabajos con muebles desarrollan enfermedades causadas por movimientos repetitivos principalmente giros en brazos y extensión de muñecas. Estas afecciones están ligadas a TME específicos por las actividades realizadas en este tipo de trabajo.

La relación de los TME con las actividades laborales, se demuestra, también, en una valoración realizada a un colectivo de limpieza en donde se mejoraron los hábitos posturales para prevenir estos trastornos. Entre las mejoras que se observaron para prevenir TME fueron; flexión de piernas, espalda recta, alternancia en brazos y búsqueda de puntos de apoyo (Puig et al., 2020). Lo mismo ocurre en un análisis realizado a técnicos de laboratorio donde el 84.5% presentaron dolencias musculares, siendo el cuello la zona más afectada. Las principales causas asociadas fueron posturas forzadas y movimientos repetitivos (García y López, 2020).

Resulta evidente el riesgo por enfermedades profesionales a los que están sometidos los empleados en dichas fábricas, semejante a lo obtenido en la evaluación de la carga postural en una carpintería industrial en España donde se utilizó el método OWAS para la evaluación de la carga postural. El estudio concluyó que es evidente la posibilidad de que los trabajadores sufran algún daño a la salud por movimientos, posturas y sobreesfuerzos físicos si no se diseña el puesto de trabajo desde una perspectiva ergonómica. El estudio resalta también que, en 2016 en la industria del mueble, se

presentaron lesiones en extremidades superiores (48.8%); extremidades inferiores (23.3%); espalda (14.8%) y cabeza (5.5%) (Monroy, 2017). Lo anterior, resalta las zonas corporales con mayor nivel de riesgo al realizar actividades en este sector.

Asimismo, los resultados de las metodologías aplicadas en este estudio permiten el diseño de propuestas de mejora, lo que se traduce en beneficios a la salud de los empleados y a la productividad de la empresa. Como prueba de esto, la empresa Vínculos-Agrícolas, aplicó los métodos REBA, OWAS y el Job Strain Index (JSI). En el estudio se encontraron niveles de riesgo altos lo que permitió implementar mejoras que comprendieron la reubicación de las estaciones de trabajo, así como capacitación sobre seguridad y salud ocupacional. De este modo, se redujeron los desperdicios y ausencias por permisos médicos (Álvarez y Ojeda, 2018).

De igual forma, en un estudio realizado en el sector de manufactura en área de inspección, se aplicó el método ergonómico RULA donde se evaluó a 15 trabajadores, los cuales tienen que realizar inspección de al menos 1080 componentes en su jornada de trabajo; al realizar la evaluación se identificó que presentaban dolencias en cuello, espalda y en manos, se determinó la necesidad de hacer modificaciones en la tarea para eliminar posturas incómodas (Nieves, et. al 2020). Esto, destaca los beneficios de la aplicación de la ergonomía en los centros de trabajo. Además, "hay evidencias que muestran que las intervenciones con un enfoque concentrado en los problemas de organización del trabajo tienen el potencial de reducir el estrés laboral y, a su vez, los síntomas del cuello y las extremidades superiores" (Torrano, 2021).

5. Conclusiones

Al comparar las metodologías aplicadas durante el estudio, se concluye que existe un riesgo alto por posturas forzadas y sobreesfuerzos físicos en el área de tapicería. Del mismo modo, se identifican factores de riesgo ambientales y de seguridad. Por lo anterior, existe una alta probabilidad de que los trabajadores padezcan algún TME debido a las condiciones actuales las cuales incluyen las condiciones físicas de la estación y el método de trabajo.

De este modo, tomando en consideración las zonas corporales en riesgo por posturas forzadas y sobreesfuerzos, aunado a las molestias expresadas por los trabajadores en el BPD, algunos de los trastornos con mayor probabilidad de desarrollarse son: tendinitis; debido a una repetida tensión en los tendones de la muñeca, síndrome del túnel carpiano; esto por causa de esfuerzos repetidos de la muñeca en posturas forzadas, síndrome cervical por tensión, ocasionado cuando el cuello se mantiene durante largos periodos flexionado y lumbalgia; causado por levantamiento, empuje o arrastre de cargas pesadas, flexión y giro del tronco.

De acuerdo con los resultados de este estudio, las alternativas de mejora para las estaciones de trabajo se centran en equipo y herramienta de trabajo adecuada (adaptada al trabajador y tipo de tarea), distribución del área adaptada al empleado, orden, limpieza y seguridad (uso de equipo de protección personal), esto en las tres estaciones: carpintería, costura y montaje, con el objetivo de disminuir los factores de riesgo evaluados.

Las tres estaciones (carpintería, costura y montaje) coinciden en la necesidad de: adaptación de la altura de las mesas para el trabajador y el tipo de carga, la utilización de elementos que faciliten la ejecución de sus tareas o que reduzcan el esfuerzo empleado, colocación de sillas adecuadas para la

tarea. Del mismo modo, en seguridad, se recomienda anclar las estanterías al suelo y pared para evitar accidentes (área de costura), así como hacer apilamientos de los armazones menores a los dos metros. Se recomienda el uso de equipo de protección personal como mascarilla, tapones para los oídos, ropa, lentes de seguridad y calzado adecuado, así como almacenar sustancias líquidas y flamables en un lugar específico, ventilado y seco.

Se recomienda tener a disposición los materiales para la actividad laboral, evitar cargas superiores a los 25 kg, utilizar carretillas o plataformas rodantes para manejar las cargas más pesadas, almacenar el material a la altura de los nudillos y codos para evitar alcances por encima del hombro. Para el caso de posturas forzadas se recomienda implementar superficies giratorias que eviten que el operador tenga que empujar y/o tirar de la pieza, colocar contenedores que sean fáciles de mover para disposición del material y alternar entre la posición de pie y sentado durante la jornada. Para el caso de los movimientos repetitivos, se considera pertinente realizar estiramientos y pausas durante las tareas, uso de canilleras y muñequeras

Asimismo, para mejorar las condiciones laborales de los trabajadores, se debe partir de la estandarización en el puesto y método de trabajo. Es de suma importancia estudiar a profundidad el proceso para eliminar desperdicios e identificar oportunidades de mejora. A su vez es imprescindible seguir la normativa en materia de seguridad en el trabajo y manuales de ergonomía especializados en el tipo de actividad laboral. Por otro lado, a pesar de que es ampliamente conocido el nivel de riesgo ergonómico en la industria del mueble, es de suma importancia realizar evaluaciones e investigaciones de este tipo para que cada empresa cree un conocimiento profundo de su situación que le permita proteger su recurso humano.

Por lo anterior, destaca notablemente la importancia de la ergonomía en los centros de trabajo para evitar accidentes laborales y el desarrollo de TME. La Organización Mundial de la Salud (2021) enfatiza que: “los TME son la principal causa de discapacidad en todo el mundo y el dolor lumbar es la causa más frecuente de discapacidad”. Además, los TME son multifactoriales, es decir, múltiples aspectos del entorno laboral contribuyen a su causa. Debido a su naturaleza multifactorial, resulta imprescindible continuar con los estudios para evaluar el riesgo en el trabajo y la probabilidad de desarrollo de enfermedades profesionales.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

5. Referencias

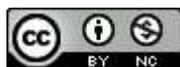
- Álvarez, C. & Ojeda, Y. (2018). *Implementación de un sistema ergonómico basado en la salud ocupacional para aumentar la productividad del área de envasado-retail de la empresa Vínculos Agrícolas* [Tesis de licenciatura, Universidad de San Martín de Porres]. Repositorio de la Universidad de San Martín de Porres. <https://repositorio.usmp.edu.pe/handle/20.500.12727/4355>
- Ahn, G., Hur, S. & Jung, M.C. (2020). *Bayesian network model to diagnose WMSDs with working characteristics*. *Int J Occup Saf Ergon*, 26(2):336-347. <https://doi.org/10.1080/10803548.2018.1502131>

- CENEA (2023). *Los riesgos laborales ergonómicos*. <https://www.cenea.eu/riesgos-ergonomicos/>
- Chávez, Y. & Moran, B. (2022). *La ergonomía y los métodos de evaluación de carga postural*. Alfa publicaciones, 4(1.1): 279–292. <https://doi.org/10.33262/ap.v4i1.1.159>
- Del Rosso, M. (2015). *Diagnóstico ergonómico en la industria del mueble*. VII Pre Congreso Regional de Especialistas en Estudios del Trabajo [Trabajo de investigación, Universidad Nacional de Cuyo]. Sistema Integrado de Documentación – UNCuyo. <https://bdigital.uncu.edu.ar/fichas.php?idobjeto=10423>
- Diego-Mas, J. A. (2015). *Evaluación postural mediante el método REBA*. Ergonautas. Universitat Politècnica de Valencia. <https://www.ergonautas.upv.es/metodos/reba/reba-ayuda.php>
- Freire, B. (2019). *Evaluación de datos experimentales en un Modelo Opensim del comportamiento del movimiento de flexo extensión del cuello* [Tesis de licenciatura, Escuela Politécnica Nacional]. Repositorio Digital Institucional de la Escuela Politécnica Nacional. <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/19948>
- García González G., López González M.J. (2020). Trastornos musculoesqueléticos en los técnicos de laboratorio. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales*, 23(2), 282-286. <https://doi.org/10.12961/aprl.2020.23.02.11>
- Gómez, K. (2020). *Evaluación ergonómica postural en trabajadores del área de inspección en industria maquiladora*. Memoria en extenso. Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Chetumal, 12(2), 392-398. <http://cathi.uacj.mx/20.500.11961/11920>
- Hossain, M.D., Aftab, A., Al Imam, M.H., Mahmud, I., Chowdhury, I.A., Kabir, R.I. & Sarker, M. (2018). *Prevalence of work-related musculoskeletal disorders (WMSDs) and ergonomic risk assessment among readymade garment workers of Bangladesh: a cross sectional study*. PLoS One, 13(7): e0200122 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200122>
- INSST (2003). *Manual para la evaluación y prevención de riesgos ergonómicos y psicosociales en PYME*. Instituto Nacional de Seguridad en el Trabajo de España. <https://bit.ly/42TLzBQ>
- International Ergonomic Association (2021). *What Is Ergonomics (HFE)?* <https://iea.cc/what-is-ergonomics/>
- Magaña, J., Talamantes, T., Villarreal, V., Kiessling, C. & Palacios, A. (2020). *Análisis descriptivo de la industria de muebles de madera de Delicias, Chihuahua*. Biológico Agropecuario, Tuxpan 8(1): 1-12. <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v8i1.4>
- Meléndez, J. (2019). *Se incrementa en 30 % el número de fábricas de muebles en Delicias*. El Diario de Chihuahua. <https://bit.ly/41dsgm0>
- Monroy, R. (2017). *Evaluación de condiciones de trabajo en una carpintería industrial* [Tesis de grado, Universidad Politécnica de Catalunya]. <http://hdl.handle.net/2117/116416>
- Navarrete, E. & Saldías, E. (2018). *Percepción del Peso de una Carga Según Composición Corporal en Asistentes de Buses Interurbanos*. Ciencia y Trabajo, 20(61): 7-13. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-24492018000100007>
- OMS (2021). *Trastornos Musculoesqueléticos*. Organización Mundial de la Salud. <https://bit.ly/3zT92q6>

- Puig Aventin V., Gallego Fernández Y., Moreno M.P. (2020). *Prevención de Trastornos Musculoesqueléticos mediante la mejora de Hábitos Posturales: experiencia en el colectivo de limpieza*. Arch Prev Riesgos Labor 23(2): 164-181. <https://doi.org/10.12961/apr.2020.23.02.04>
- Rosero, R. (2015). *Evaluación del riesgo laboral en la fabricación de mobiliario de oficinas en el taller de la empresa Integra Soluciones y propuesta de medidas de prevención* [Tesis de grado, Universidad Internacional SEK]. Repositorio de la Universidad Internacional SEK Ecuador. <http://repositorio.uisek.edu.ec/handle/123456789/1325>
- Russo, F., Di Tecco, C., Fontana, L., Adamo, G., Papale, A., Denaro, V. & Iavicoli, S. (2020). *Prevalence of work-related musculoskeletal disorders in Italian workers: is there an underestimation of the related occupational risk factors?* BMC Musculoskeletal Disorders 21:738. <https://doi.org/10.1186/s12891-020-03742-z>
- Sánchez, I. (2017). *Evaluación de la Carga Física Postural: ¿OWAS, RULA o REBA?* Prevensionar.com <https://prevencionar.com/2017/11/30/evaluacion-la-carga-fisica-postural-owas-rula-reba/>
- Secretaría del Trabajo y Previsión Social (STPS). (2018). *Las enfermedades de trabajo y los trastornos musculoesqueléticos por ejercicio o motivo del trabajo, en México*. Secretaría del Trabajo y Previsión Social. http://trabajoseguro.stps.gob.mx/bol079/vinculos/notas_6.html
- Torrano, F. (2021). *Trastornos musculoesqueléticos y riesgos psicosociales de los técnicos de prevención de riesgos laborales*. Arch Prev Riesgos Labor 24(3): 316-320. <https://doi.org/10.12961/apr.2021.24.03.09>
- Tosic, L., Thoma, M., Voglis, S., Hofer, A., Bektas, D., Pangalu, A., Regli, L. & Germans, M. (2021). *Evaluation of patient Stress level caused by radiological Investigations in early Postoperative Phase After Craniotomy (IPAST-CRANIO): protocol of a Swiss prospective cohort study*. BMJ Open 12(9): 112-131. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2022-061452>
- Vicente, J. & López-Guillén, A. (2020). *Las enfermedades laborales por trabajos con la madera*. Medicina y Seguridad en el Trabajo, 66(259): 112-131. <https://dx.doi.org/10.4321/s0465-546x2020000200005>

2023 TECNOCENCIA CHIHUAHUA

Esta obra está bajo la Licencia Creative Commons Atribución No Comercial 4.0 Internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Artículo Científico

Predicción de ovario poliquístico aplicando técnicas de Machine Learning

Prediction of Polycystic Ovary Syndrome Applying Machine Learning Techniques

Carlos Eduardo Cañedo Figueroa^{1*}, Luisa Fernanda Blancarte Flores¹, Wendy Sofía Guerra Hernández¹, Daniela Licea Abúndez¹, Dafne Mariana Rivera Lerma¹ y Brianna Tena Holguín¹

¹Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas. Circuito Universitario 31109, UACH Campus II, 31125 Chihuahua, Chih. México.

*Correspondencia: ccanedo@uach.mx (Carlos Eduardo Cañedo Figueroa)

DOI: <https://doi.org/10.54167/tch.v17i2.1193>

Recibido: 30 de marzo de 2023; Aceptado: 19 de junio de 2023

Publicado por la Universidad Autónoma de Chihuahua, a través de la Dirección de Investigación y Posgrado

Resumen

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es una de las endocrinopatías más comunes entre las mujeres que se encuentran en edad reproductiva. Hay estudios que exponen que esta patología afecta entre el 3-15 % de toda la población femenina. En el presente documento se describe el uso y la comparación de algunos algoritmos de machine learning con la finalidad de ofrecer una ventana de oportunidad en la clasificación de datos de forma eficiente. Por lo que se utilizaron tres algoritmos para realizar un diagnóstico del SOP contemplando 18 características extraídas de la base de datos "PCOS Dataset" alojada en la plataforma Kaggle.com. Se diseñaron una Red Neuronal Artificial (RNA) con un 97.5 % de F1, un algoritmo Bayesiano con un 97.6 % de F1 y un algoritmo de los K-Vecinos más Cercanos (KNN por sus siglas en inglés) con un 100 % de F1. El análisis realizado demostró que el algoritmo KNN clasifica los datos utilizados de forma óptima, lo que sugiere que puede ser utilizado para obtener diagnósticos en aplicaciones de laboratorio para obtener una evaluación complementaria.

Palabras clave: ovario poliquístico, red neuronal artificial, red Bayesiana, KNN, machine learning.

Abstract

Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is one of the most common endocrinopathies among women of reproductive age. Studies show that this pathology affects between 3-15 % of the entire female

population. This paper describes the use and comparison of some machine learning algorithms with the aim of offering a window of opportunity in the classification of data in an efficient way. We used three machine learning algorithms to perform a diagnosis of the PCOS using 18 features extracted from the "PCOS Dataset" hosted on the Kaggle.com platform. An Artificial Neural Network (ANN) with 97.5 % F1, a Bayesian algorithm with 97.6 % F1 and a K-Nearest Neighbors (KNN) algorithm with 100 % F1 were designed. The analysis performed showed that the KNN algorithm classifies the data used optimally, suggesting that it can be used to obtain diagnostics in laboratory applications to obtain a complementary evaluation.

Keywords: polycystic ovary, artificial neural network, Bayesian network, KNN, machine learning.

1. Introducción

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es una de las endocrinopatías más comunes entre las mujeres que se encuentran en edad reproductiva (Guadamuz-Delgado, *et al.*, 2022). Hay estudios que exponen que esta patología afecta entre el 3-15 % de toda la población femenina (Mubasher-Hassan, *et al.*, 2020). La principal causa de este trastorno es una anormalidad en los ovarios, pero algunos agentes adicionales tales como el sobrepeso y factores ambientales pueden influir en el desarrollo de los síntomas individuales del SOP (Aguayo-González, 2023). Actualmente se han estado utilizando los Criterios de Rotterdam (2003) para su diagnóstico. Este trastorno es diagnosticado si se cumplen dos de las tres condiciones que presentan estos criterios: 1) Hiperandrogenismo clínico o bioquímico, 2) Anormalidades en la ovulación (Oligoovulación crónica), y 3) Poliquistosis ovárica por ecografía y un volumen ovárico mayor a 10 ml (Carvajal, *et al.*, 2010).

Esta anomalía es un trastorno endocrino que se diagnostica después de descartar otras patologías con síntomas similares, como pueden ser la hiperplasia suprarrenal congénita no clásica, tumores productores de andrógenos, el síndrome de Cushing y otras formas de hiperandrogenismo. Esto hace que su diagnóstico sea complejo, ya que existe una alta heterogeneidad de su expresión clínica, Esto toma importancia debido a comorbilidades metabólicas y trastornos reproductivos (Mubasher Hassan, 2020).

La evidencia sugiere que el hiperandrogenismo es el factor más determinante en la fisiopatología del SOP, lo que se puede determinar si se observan síntomas como hipertensión, acné, menstruación irregular y producción inmoderada de andrógenos. Cabe destacar que el SOP es una de las principales causas de infertilidad femenina, ya que impide la correcta evolución de los folículos. (Winykamien *et al.*, 2016).

Actualmente se ha reportado el uso automatizado de imágenes de ultrasonido para la detección de SOP y hay algunos trabajos de Machine Learning (Alam-Suha *et al.*, 2022). En este trabajo fueron utilizados tres métodos de Machine Learning: Clasificador Bayesiano Ingenuo (NB), K-Nearest Neighbors (KNN) y Red Neuronal Artificial (ANN). Para poder hacer uso de estos fue necesario elegir las principales características responsables del SOP y gracias a ellas lograr crear un modelo predictivo para la identificación del SOP con la finalidad de generar un algoritmo que sirva como apoyo a los especialistas de salud y con ello evitar el error humano.

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales

Para el desarrollo de este proyecto fue necesario tener acceso a la plataforma de datos que se encuentra en la página de Kaggle.com (Moheddine, 2022). Para el desarrollo de los métodos se utilizó una versión de Matlab con licencia de estudiante en un equipo portátil de la compañía HP con procesador Intel Core i7 y 8 gigabytes de memoria RAM bajo el sistema operativo de Windows 11 para 64 bits.

2.2 métodos

Procesar y seleccionar correctamente los atributos más característicos del SOP fue indispensable para obtener información fundamentada con el objetivo de ofrecer un respaldo estadístico ante un diagnóstico realizado por un médico.

Parte de la metodología incluyó la modificación de una base de datos existente y la elaboración de distintos algoritmos de Machine Learning: Clasificador Bayesiano Ingenuo (NB), Red Neuronal Artificial (ANN), y el Algoritmo del Vecino más Cercano (KNN). Después de realizar los diferentes algoritmos, con el objetivo de comprobar que los métodos aplicados fueron adecuados, se realizó un análisis de tipo F1 Score donde se evalúa la veracidad de todos los algoritmos.

2.3 Base de datos

La base de datos (DB) utilizada fue la PCOS_Dataset (Moheddine, 2022) que contiene el historial clínico de 541 pacientes diagnosticados con o sin SOP. Los datos son de libre uso dentro de la plataforma Kaggle.com y tienen oculta la información sensible de los participantes. Por lo que solo se puede tener acceso a la información de sus variables respecto al SOP y las clases a las que corresponden. Fue necesario hacer una reorganización y filtración de los datos ya que se contaba con varios diagnósticos y características como el grupo sanguíneo, si presentaba un embarazo, si había practicado un aborto anteriormente y cuántos, en caso de estar en un matrimonio, cuántos años tenía, si presentó algún aumento de peso y medidas morfológicas. Así como características de sus hábitos, tales como la actividad física o el consumo de comida chatarra. Por lo que, DB se focalizó en 18 de 44 características, utilizando sólo aquellas que poseen información numérica distinta de valores 1 y 0 ya que esto podría afectar el desarrollo de algoritmos. En la Tabla 1 se enlistan las 18 que fueron utilizadas.

Si bien los datos obtenidos de DB contiene 541 registros, se utilizaron 237 registros (68 de la clase PCOS + y 169 de la clase PCOS -), los cuales contienen las características indicadas en la Tabla 1 de forma completa, el resto de los registros, indicaban espacios vacíos, por lo que fueron descartados. A su vez, se dividió en cuatro partes de forma aleatoria: 65 % de la clase positiva (BDP), 65 % de la clase negativa (BDN), el 35 % restante de la clase positiva (BDTP) y el 35 % restante de la clase negativa (BDTN) esto para obtener datos con los cuales realizar pruebas después del entrenamiento de los algoritmos generados.

Tabla 1. Características utilizadas de la base de datos.**Table 1.** Used database characteristics.

No.	Característica
1	Índice de Masa Corporal (BMI)
2	Hemoglobina
3	Gonadotrofina Coriónica Humana I (I β -HCG)
4	Gonadotropina Coriónica Humana II (II β -HCG)
5	Hormona Estimulante del Folículo (FSH)
6	Hormona Luteinizante (LH)
7	Relación FSH/LH
8	Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH)
9	Hormona antimülleriana (AMH)
10	Prolactina (PRL)
11	Vitamina D3
12	Progesterona (PRG)
13	Glucosa en Sangre (RBS)
14	Presión Sistólica
15	Presión Diastólica
16	Cantidad de folículos en el ovario izquierdo
17	Cantidad de folículos en el ovario derecho
18	Tamaño del Endometrio

2.4 Clasificador bayesiano ingenuo

Para el desarrollo del primer algoritmo, se optó por un clasificador Bayesiano Ingenuo (NB), mediante el cual se le asigna una etiqueta a un elemento según sus características, rasgos o propiedades, mediante el análisis de los datos basado en la ecuación Ec. (1) del teorema de Bayes.

$$P(A|B) = \frac{P(B|A)P(A)}{P(B)} \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde "A" y "B" son eventos aleatorios. Siendo la probabilidad del evento "A" en el evento "B" en términos de la distribución de la probabilidad condicional del evento "B" en el evento "A"

multiplicado por la distribución de probabilidad marginal de "A" (Palomar, et al., 2017). El algoritmo se puede describir tal cual como se muestra en la Fig. 1.

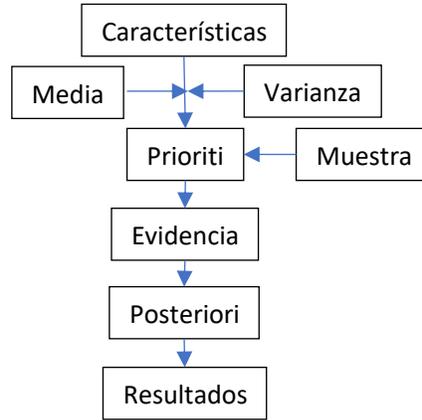


Figura 1. Diagrama de flujo del algoritmo Bayesiano.

Figure 1. Diagram of Bayesian algorithm.

Una vez realizados los cálculos se tomó en cuenta la condición que se puede observar en la Ec. (2) para la clasificación del dato muestra, en donde $Z(1)$ hace referencia a la probabilidad de que el vector característico sea positivo y $Z(2)$ a la probabilidad obtenida del vector como negativo.

$$Clase = \begin{cases} positivo & \text{si } Z(1) > Z(2) \\ negativo & \text{si } Z(2) \geq Z(1) \end{cases} \quad \text{Ec. (2)}$$

La variable *Clase* podría quedar dentro de una de las dos clases tomando en cuenta los intervalos calculados: si toma el valor de *-positivo-*, entonces, los datos ingresados provienen de un paciente con SOP, en cambio si el resultado se encontró fuera del intervalo, los datos pertenecen a un paciente sin SOP.

2.5 Red neuronal (ANN)

Una red neuronal artificial es el conjunto de secuencias matemáticas que pueden recibir datos a modo de características, cuentan con una función de activación, una polarización y sus respectivos puntos sinápticos, que al momento de ser entrenada por medio de diversos algoritmos puede clasificar un dato muestra (García-Chavez et al., 2021).

La estructura de la red neuronal (ver Fig. 2) fue base para el desarrollo del siguiente algoritmo de clasificación, se entrenó con los siguientes hiper parámetros de forma experimental:

- factor de aprendizaje de 0.01,
- 3,000 épocas
- 5 neuronas
- Una capa oculta,
- Verificación de mínimos locales de 2,000
- Error máximo 1e-25.

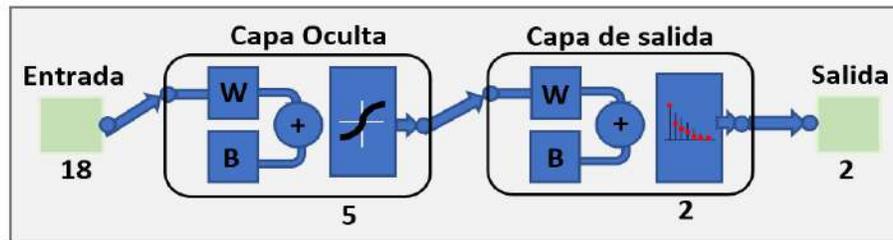


Figura 2. Estructura de la Red Neuronal Artificial.

Figure 2. ANN structure.

Para el entrenamiento de la red neuronal se utilizó el algoritmo de gradiente descendente basado en retro propagación utilizando *BDP* y *BDN* con las 18 características de la Tabla 1 como conjuntos de entrenamiento.

Para poder hacer uso de la red neuronal entrenada, se utilizó la Ec. (3), considerando que $Muestra_i$ es el vector característico por evaluar. La matriz de confusión obtenida después del entrenamiento quedo como se muestra en el Fig. 3.

$$y = ANN(Muestra_i)$$

Ec. (3)

		Entrenamiento			
		1	2	100%	0.0%
Clase de salida	1	7 17.4%	0 0.0%	100%	0.0%
	2	0 0.0%	128 82.6%	100%	0.0%
		100%	100%	100%	0.0%
		1	2		
		Clase objetivo			

Figura 3. Matriz de confusión de la red neuronal.

Figure 3. Confusion matrix of ANN.

K vecinos cercanos (KNN)

El algoritmo del vecino más cercano es una de las formas más sencillas de Machine Learning para poder clasificar una base de datos usando un modelo de entrenamiento tomando las distancias euclidianas entre los datos vecinos que se encuentren más cercanos; dándose a sí mismo opciones para su propia modificación con el objetivo de reducir las limitaciones y obstáculos, así como mejorar su precisión y aplicabilidad (Uddin *et al.*, 2022).

Se realizó una comparación de las distancias obtenidas para efectuar la clasificación adecuada y mediante la función “fitcknn” ejecutada en Matlab®, se programó el KNN con las 18 variables de la Tabla 1.

3. Resultados y discusión

Las métricas de los resultados obtenidos por cada algoritmo se obtuvieron mediante las ecs. (4)-(7) con lo que se logró obtener la Precisión, Recall, Exactitud y F1 score. En donde *TP* (*True Positive*) son los verdaderos positivos, *TN* (*True Negative*) verdaderos negativos, *FN* (*False Negative*) falsos negativos y *FP* (*False Positive*) falsos positivos, obtenidos al pasar los datos de *BDTP* y *BDTN* por los algoritmos desarrollados.

$$\text{Precisión} = \frac{TP}{FP + TP} \quad \text{Ec. (4)}$$

$$\text{Recall} = \frac{TP}{TP + FN} \quad \text{Ec. (5)}$$

$$\text{Exactitud} = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \quad \text{Ec. (6)}$$

$$F1 = 2 \left(\frac{\text{Precisión} \cdot \text{Recall}}{\text{Precisión} + \text{Recall}} \right) \quad \text{Ec. (7)}$$

Al analizar las métricas de los resultados de cada algoritmo desarrollado en conjunto con los algoritmos de otros autores se obtuvieron los datos expuestos en la Tabla 2, en los que la precisión máxima fue obtenida mediante el algoritmo de aprendizaje supervisado KNN con un valor del 100 %. Con un F1 score de 97.5 % para el algoritmo bayesiano, 97.6 % para ANN y 100 % para KNN.

Tabla 2. Comparación de resultados obtenidos.**Table 2.** Comparison of results obtained.

	Precisión	Recall	Exactitud	F1 Score
Bayesiano	95.1 %	100 %	97.6 %	97.5 %
ANN	97.6 %	97.6 %	98.8 %	97.6 %
KNN	100 %	100 %	100 %	100 %
Bayes (Prapty y Shitu, 2020)	80 %	80 %	93 %	80 %
Random Forest (Prapty y Shitu, 2020)	84 %	84 %	93.5 %	84 %
KNN (Denny <i>et al.</i> , 2019)	83.33 %	-	86.58 %	40.98 %
KNN (Madhumitha <i>et al.</i> , 2021)	97 %	95 %	97 %	95.98 %
Bayes (Mubasher-Hassan y Mirza, 2020)	94 %	76 %	81 %	84 %

Los datos expuestos en la Tabla 2 sugieren que el uso de algoritmos de agrupamiento basadas en las 18 características que se utilizaron en el presente estudio son óptimos para la detección y clasificación de SOP. Superior 2.4 % en comparación con la red neuronal desarrollada y a 2.5 % del algoritmo Bayesiano desarrollado.

Se puede denotar una diferencia en la puntuación del F1 score con los autores (Prapty *et al.*, 2020) quienes utilizaron características booleanas como el ciclo menstrual regular, grosor del cabello, pérdida de cabello y la denotación de cambios físicos en el cuerpo. De igual manera (Denny *et al.*, 2019) trabajo con datos que pueden ser considerados como booleanos dentro de su conjunto de datos.

(Madhumitha *et al.*, 2021) y (Mubasher Hassan *et al.*, 2020) quienes utilizaron datos obtenidos de imágenes, lograron generar algoritmos competitivos, sin embargo, se puede notar una diferencia en el F1 score de sus métricas con las generadas en el presente documento.

Tras una comparación de los resultados de los distintos trabajos con el presente, es posible identificar una gran disparidad de valores con una diferencia de 3 % hasta 20 % en la precisión, de 5 % a 20 % en el recall, de 3 % a 19 % en la exactitud y de 16 % hasta 59 % en el F1 score. Los resultados obtenidos sugieren que el desarrollo de algoritmos de machine learning tienen un mejor desempeño cuando se involucran datos no booleanos dentro de entrenamiento incrementado las métricas que se puedan obtener.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos, muestran que en términos generales es recomendable utilizar características descriptivas no booleanas para el desarrollo de algoritmos de machine learning. De igual manera se deberán validar los algoritmos generados utilizando información de algunas otras anomalías similares para obtener una evaluación complementaria de lo desarrollado en este documento.

Es necesario destacar que la presencia del Síndrome de Ovario Poliquístico en la salud femenina ha alcanzado un importante interés dentro de los factores de riesgo para las mujeres en edad reproductiva, puesto que es una anomalía que afecta directamente en los problemas de infertilidad y de salud materna.

Se puede concluir que el uso de inteligencia artificial para el diagnóstico de este tipo de enfermedades puede ser muy útil. Por lo tanto, se puede generar alguna aplicación que resulte práctico en laboratorios para el pre diagnóstico de la existencia del SOP, así como también el desarrollo de herramientas de asistencia al médico.

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Autónoma de Chihuahua y a los creadores del repositorio de la base de datos Aya Moheddine y su equipo por la disposición de colocar su aportación en la plataforma de libre acceso Kaggle.com en pro del desarrollo científico y el bienestar de la humanidad.

Conflicto de intereses

Los autores de este artículo declaran no tener ningún conflicto de interés.

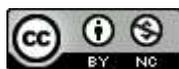
5. Referencias

- Aguayo-González, P. 2016. Sobrepeso y obesidad, factores de riesgo para desarrollar síndrome de ovario poliquístico. <https://www.gob.mx/salud/prensa/sobrepeso-y-obesidad-factores-de-riesgo-para-desarrollar-sindrome-de-ovario-poliquistico>
- Suha, S.A. & Islam, M.N. 2022. An extended machine learning technique for polycystic ovary syndrome detection using ovary ultrasound image. Nature Scientific Reports 12: 17123. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21724-0> *
- Cañedo-Figueroa, C. E. & García-Chávez, H. 2021. Diseño de algoritmo compuesto por Machine Learning y un modelo probabilístico para la detección de diabetes. Memorias Del Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica 8(1), 57–60. <https://memoriascnib.mx/index.php/memorias/article/view/828>
- Carvajal, R., Herrera, G. & Porcile, J., 2010. Espectro Fenotípico Del Síndrome De Ovario Poliquístico. Rev Chil Obstet Ginecol, 75(2): 124 – 132. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75262010000200009>
- Denny, A., Raj, A., Ashok, A., Maneesh-Ram, C. & George, R. 2019. i-HOPE: Detection and Prediction System for Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Using Machine Learning Techniques. En: TENCON 2019 - 2019 IEEE Region 10 Conference (TENCON), Kochi, India, 2019, pp. 673-678. <https://doi.org/10.1109/TENCON.2019.8929674>

- Guadamuz-Delgado, J., Miranda-Saavedra, M. & Mora-Miranda, N. 2022. Actualización sobre el síndrome de ovario poliquístico. *Revista Médica Sinergia* 7(5): e801. <https://doi.org/10.31434/rms.v7i5.801>
- Madhumitha, J., Kalaiyarasi, M. & Ram, S. S. 2021. Automated Polycystic Ovarian Syndrome Identification with Follicle Recognition. En 2021 3rd International Conference on Signal Processing and Communication (ICPSC), 98-102. <https://doi.org/10.1109/ICSPC51351.2021.9451720>
- Moheddine, A., 2022. PCOS_Dataset Kaggle. https://www.kaggle.com/datasets/ayamoheddine/pcos-dataset?select=PCOS_data.csv
- Mubasher-Hassan, M. & Mirza, T. 2020. Comparative Analysis of Machine Learning Algorithms in Diagnosis of Polycystic Ovarian Syndrome. *Int J Comput Appl*, 175(17), 42-53. <https://www.ijcaonline.org/archives/volume175/number17/31548-2020920688>
- Palomar, L. & Guerrero, J. 2017. El teorema de bayes y el diagnóstico clínico. *Memorias del Congreso Internacional Sobre la Enseñanza y Aplicación de las Matemáticas*, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. <https://bit.ly/3JBftTU>
- Prapty, A. S. & Shitu, T. T. 2020. An Efficient Decision Tree Establishment and Performance Analysis with Different Machine Learning Approaches on Polycystic Ovary Syndrome. En: 23rd International Conference on Computer and Information Technology (ICCIT), DHAKA, Bangladesh, 2020, pp. 1-5. <https://doi.org/10.1109/ICCIT51783.2020.9392666>
- Uddin, S., Haque, I., Lu, H., Moni, M. A. & Gide, E. 2022. Comparative performance analysis of K-nearest neighbour (KNN) algorithm and its different variants for disease prediction. *Sci Rep*, 12(1): 6256. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10358-x>
- Winnykamien, I., Dalibón, A. & Knoblovits, P. 2016. Síndrome de ovario poliquístico. *Rev. Hosp. Ital. B. Aires* 37(1): 10-20. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-966680>

2023 TECNOCENCIA CHIHUAHUA

Esta obra está bajo la Licencia Creative Commons Atribución No Comercial 4.0 Internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Artículo de Revisión

Dos eventos genéticos sobresalientes en carcinoma oral de células escamosas: Variante c.-93 G>A y metilación del promotor de *MLH1*

Two genetic events present in oral squamous cell carcinoma: c.-93 G>A variant and *MLH1* promoter methylation

Anna Guadalupe López Ceballos¹, José Miguel Moreno Ortiz¹, Manuel Alejandro Rico Méndez¹, Saúl Armando Beltrán Ontiveros², Héctor Melesio Cuén Díaz², Erik Lizárraga Verdugo², Sofía Esmeralda Madueña Angulo², Víctor Alfredo Contreras Rodríguez³, Perla Yareli Gutiérrez Arzapalo^{2*}

¹ Instituto de Genética Humana “Dr. Enrique Corona Rivera”. Departamento de Biología Molecular y Genómica. Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. Sierra Mojada 950, Col. Independencia, C.P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México

² Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán Rosales 80030, Sinaloa, México.

³ Unidad Académica de Criminalística, Criminología y Ciencias Forenses, Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán Rosales 80040, Sinaloa, México.

*Correspondencia: perla.gutierrez@uas.edu.mx (Perla Yareli Gutiérrez Arzapalo)

DOI: <https://doi.org/10.54167/tch.v17i2.1194>

Recibido: 01 de abril de 2023; Aceptado: 22 de junio de 2023

Publicado por la Universidad Autónoma de Chihuahua, a través de la Dirección de Investigación y Posgrado

Resumen

El cáncer oral en México, se ubica en el lugar 21 en incidencia y 24 en mortalidad, sin embargo, cada década su incidencia aumenta debido a la exposición a factores de riesgo que han sido asociados a esta neoplasia: consumo de tabaco y alcohol, exposiciones virales y eventos genéticos específicos dentro de los que destacan la presencia de la variante c.-93G>A y la metilación del gen *MLH1*, por lo que el objetivo de la presente revisión se centra en describir el impacto de estos dos eventos en el desarrollo de cáncer oral de células escamosas (COCE). Se ha propuesto que la SNV c.-93G>A en el gen *MLH1* puede estar relacionada con alteraciones en la tasa transcripcional, además de asociarse con el riesgo y pronóstico del COCE, mientras que la metilación se ha asociado con una disminución e incluso supresión de la expresión proteica. Ambas alteraciones repercuten sobre la expresión de la proteína, afectado el proceso de reparación del DNA y al ser parte esencial de fisiopatología es relevante realizar el análisis de la variante c.-93 G>A y la metilación del gen *MLH1* en pacientes con carcinoma oral de células escamosas.

Palabras clave: cáncer oral, metilación, *MLH1*, c.-93G>A.

Abstract

Oral cancer in Mexico ranks 21st in incidence and 24th in mortality, however, its incidence increases every decade due to exposure to risk factors that have been associated with this neoplasm, among the most relevant are: tobacco and alcohol consumption, viral exposures and specific genetic events, among which the methylation of the promoter of the *MLH1* gene and the presence of the c.-93G>A variant stand out, for which the objective of this review is focused on describing the impact of these two events on the development of oral squamous cell cancer. In this review it becomes evident that *MLH1* methylation is an epigenetic event involved in gene silencing, on the other hand the presence of the c.-93G>A variant is associated with alterations in the transcriptional rate of the gene, so both events affect the expression of the protein, affected the repair process and therefore a participant in the development of squamous cell oral cancer. As it is an essential part of pathophysiology, it is relevant to analyze the c.-93 G>A variant and the methylation of the *MLH1* gene in patients with oral squamous cell carcinoma.

Keywords: oral cancer, methylation, *MLH1*, c.-93G>A.

1. Introducción

El Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE) es la neoplasia maligna de la cavidad oral que incluye algunas estructuras tales como: mucosa bucal, piso de la lengua, lengua anterior, crestas alveolares, trigono retromolar, paladar duro y parte interna de los labios (Chamoli, *et al.*, 2021), siendo la lengua el sitio donde se desarrolla con mayor frecuencia y asociándose con mayor mortalidad en comparación con otros sitios de la cavidad oral (Almangush *et al.*, 2020).

En el año 2020, GLOBOCAN reportó que los cánceres de labio y la cavidad oral representaron el décimo-séptimo lugar tanto en incidencia como en mortalidad en el mundo, mientras que en México, para el mismo año, los cánceres de la cavidad oral se posicionaron en el lugar veintiuno de incidencia y veinticuatro en mortalidad (Ferlay *et al.*, 2019; Sung *et al.*, 2020), estimándose además, que su incidencia varía entre el 1 % y 5 % de todos los cánceres (De la Fuente-Hernández *et al.*, 2014) aumentando cada década, en parte, a la exposición a factores de riesgo tales como: consumo de alcohol y tabaco, presencia del Virus del Papiloma Humano (VPH) y el Virus de Epstein-Barr (VEB), de hecho, en países de Sudamérica y de Europa central y oriental, el VPH es responsable de un porcentaje elevado de esta neoplasia en jóvenes (Chamoli, *et al.*, 2021; Ali, 2022). Antecedentes familiares de cáncer, exposición a rayos ultravioleta, dietas bajas en antioxidantes, inmunosupresión y lesiones orales son desencadenantes de esta neoplasia maligna (Tenore *et al.*, 2020).

Por otro lado, algunos estudios genéticos asocian el desarrollo de COCE con alteraciones genéticas específicas, dentro de las que se encuentra la presencia de variantes de un solo nucleótido (SNV por sus siglas en inglés), metilación e incluso deleciones en el cromosoma 3 (González-Ramírez *et al.*, 2011; Senghore *et al.*, 2019; Chamoli *et al.*, 2021). En esta región se localiza el gen *MLH1*, el cual,

participa en el Sistema de Reparación de Malos Apareamientos del DNA (MMR). Se ha reportado que la reducción de la expresión de *MLH1* podría estar relacionada al desarrollo de COCE, específicamente la presencia de la variante c.-93G>A de *MLH1* se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar COCE y un peor pronóstico (Jha *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014; Senghore *et al.*, 2019), además, la metilación de la región promotora de *MLH1* conllevaría una posible inactivación del gen, y la disminución o ausencia de la expresión de la proteína con implicaciones en la reparación del DNA y el desarrollo del cáncer (Czerninski *et al.*, 2009; González-Ramírez *et al.*, 2011).

MLH1 como parte del sistema de reparación de malos apareamientos

La proteína MutL, homólogo 1 (MLH1) es un componente fundamental del sistema MMR, responsable de corregir los apareamientos de bases erróneos en el DNA cometidos de manera natural durante la replicación por las DNA polimerasas, manteniendo así, la estabilidad del genoma (Liu *et al.*, 2017). El sistema MMR en eucariotas actúa mediante heterodímeros. Las proteínas MutS, homólogo 6 (MSH6) y MutS, homólogo 3 (MSH3) forman heterodímeros con la proteína MutS, homólogo 2 (MSH2); el primer complejo está conformado por MSH2 y MSH6 denominado "MutS α " que, reconoce variantes de un solo nucleótido (SNV) e inserciones-delecciones (INDELS) de 1-2 bases. Por otra parte, MSH2 y MSH3 forman el segundo complejo, "MutS β " que reconoce SNV e INDELS de mayor tamaño. Por otro lado, la proteína MLH1 y la proteína de segregación posmeiótica aumentada de tipo 2 (PMS2) forman el heterodímero "MutL α " que regula la escisión del fragmento mal apareado (Gupta y Heinen 2019).

El mecanismo de acción del sistema MMR (Kunkel y Erie, 2015; Traver *et al.*, 2015; Kadyrova & Kadyrov 2016; Li & Martin, 2016; Gupta y Heinen 2019; Tamura *et al.*, 2019) se describe a continuación, ilustrándose en la Fig. 1:

1. La reparación inicia cuando MutS identifica y se une al apareamiento erróneo, posteriormente se desliza por el DNA y trae consigo el reclutamiento de MutL α (el cual contiene a MLH1) uniéndose a la doble cadena de DNA, junto con MutS α reclutan a PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación) quien activa a MutL α y promueve que PMS2 ejerza una actividad endonucleasa, generando sitios de entrada potenciales para la exonucleasa 1 (EXO1) para regular la escisión de la cadena con el error. Posteriormente, MSH2 recluta a la helicasa MCM9 quien elimina la cadena alterada.
2. Una vez conjuntado el complejo proteico (MutS α / MutL α / EXO1/ MCM9), comienza la escisión por MutS α , partiendo del apareamiento erróneo y se disocia una vez cumplida su función. Para finalizar la reparación, la polimerasa δ se encargará de la resíntesis correcta de DNA, seguido de una ligadura por la enzima DNA ligasa 1.

De manera normal, el sistema MMR trabaja constitutivamente y con una alta regulación, sin embargo, fallas en su funcionamiento pueden dar lugar a mutaciones e inestabilidad genómica, lo que a su vez puede conducir a la aparición del cáncer. En este sentido, se ha informado que los tumores desarrollados por pacientes con deficiencias en las vías de reparación del sistema MMR (dMMR) pueden llegar a tener una tasa de mutabilidad aproximadamente 1000 veces mayor que aquellos desarrollados por individuos con las vías del sistema intactas, además, se ha demostrado que las células deficientes en MMR suelen ser resistentes a la muerte inducida por varios agentes quimioterápicos importantes (Sedhome, 2019).

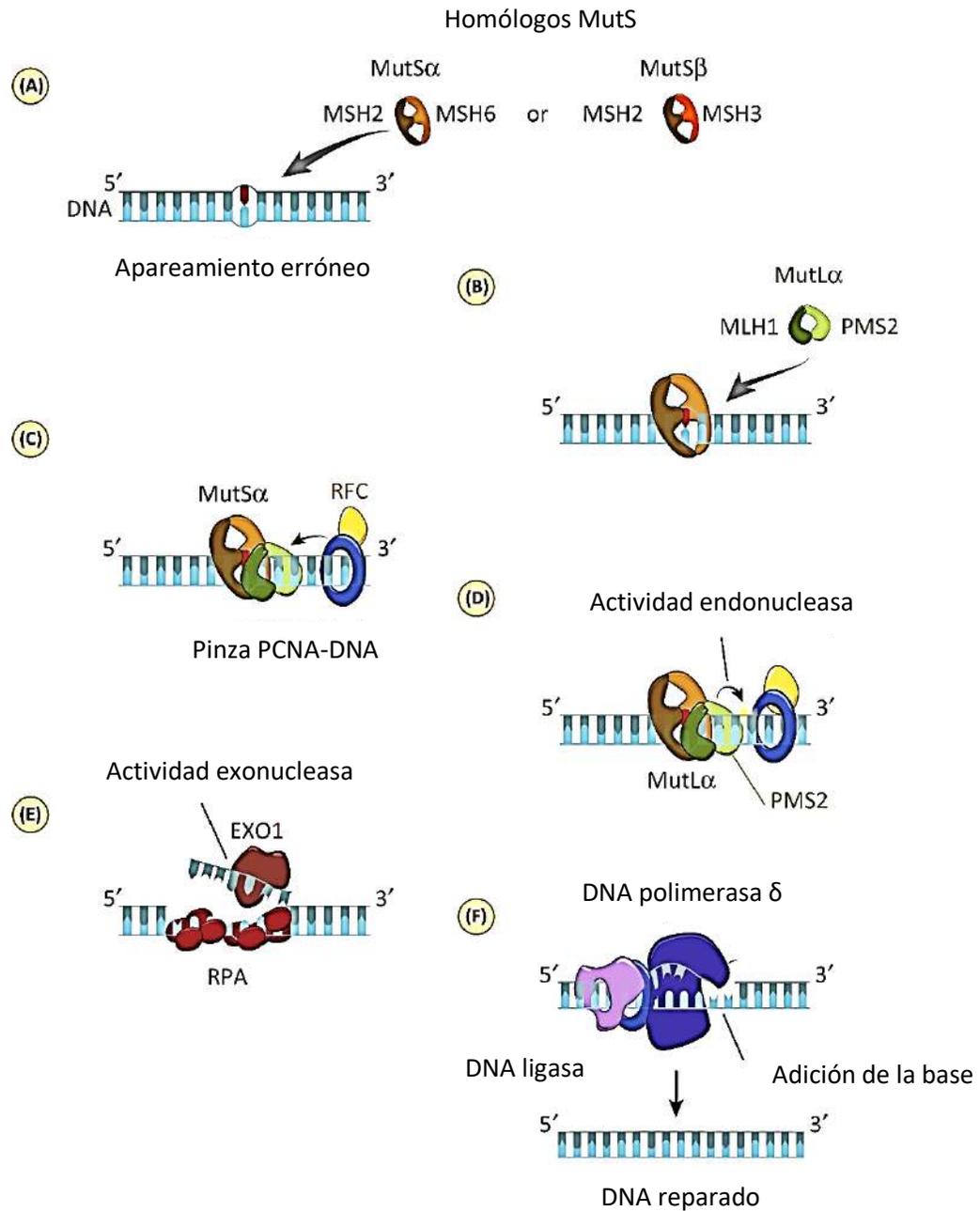


Figura 1. Participación de MLH1 como parte del mecanismo de reparación del sistema MMR.

A) Identificación de un mal apareamiento por MutSα, **B)** Reclutamiento de MutLα, **C)** Formación del complejo entre MutSα y MutLα e interacción con PCNA, **D)** Acción endonucleasa de PMS2, **E)** Entrada de EXO1 y escisión de la cadena, **F)** Síntesis de la nueva cadena. (Adaptado de Li & Martin, 2016)

Figure 1. Involvement of MLH1 as part of the repair mechanism of the MMR system.

A) Identification of mispairing by MutSα, **B)** MutLα recruitment, **C)** Complex formation between MutSα and MutLα and interaction with PCNA, **D)** Endonuclease action of PMS2, **E)** EXO1 entry and chain scission, **F)** Synthesis of the new chain. (Adapted from Li & Martin, 2016).

MLH1

La proteína MLH1 (mutL homólogo 1) localizada en el núcleo, con una masa de 84.6 KDa y 756 aminoácidos, está conformada por tres dominios: un dominio ATPasa y dos dominios para la interacción con MutS homólogo y con la proteína PMS2. Es codificada por el gen *MLH1*, localizado en 3p22.2, contiene 19 exones y comprende una región de 57,360 pb, generando además un transcrito de 2,524 pb (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology, 2023).

La región promotora de este gen está conformada por 1,787 pb (Ito, 1999) y cuenta con secuencias de control transcripcional importantes situadas entre -300 y -220 pb del codón de inicio de la transcripción (ATG). En primera instancia se destaca una caja CCAAT, ubicada específicamente en -282, misma que se ha reportado como el principal mediador de la tasa transcripcional del gen, con aproximadamente un 60 % de la fuerza total del promotor y es reconocida por el factor nuclear NF-Y. Por otra parte, se ha propuesto que el 40 % restante de la actividad transcripcional de este gen corresponde a la secuencia ubicada entre -273_-222 y otras secuencias localizadas a lo largo del promotor. Similarmente, se han descrito elementos *cis* y sitios de unión a proteínas esenciales de c.-301_c.-76, y adicionalmente, las regiones de -250_-151 y de -273_-4 se describen como críticos para la regulación de la transcripción de *MLH1*. Este gen, cuenta también con una isla CpG de gran tamaño en su promotor, el cual comparte de manera bidireccional con EPM2A/P1 (Quaresima *et al.*, 2001; Morak, *et al.*, 2018).

Estudios en diferentes poblaciones han reportado que la metilación del promotor del gen *MLH1* está asociada con diversos factores de riesgo clínico-patológicos del cáncer, como la edad avanzada, el sexo femenino y la ubicación proximal del tumor (Levine *et al.*, 2016). Además, se ha propuesto que las variantes en los genes MMR son étnico específicas, lo que resalta la necesidad de su estudio en distintas poblaciones (Zhang *et al.*, 2020).

Participación de MLH1 en cáncer

Tanto la metilación como la expresión de los genes del sistema MMR, especialmente *MLH1*, han sido estudiados en múltiples tipos de tumores malignos (Lima *et al.*, 2022), incluyendo variantes genéticas con potencial de generar alteraciones transcripcionales que pueden conducir a dMMR, mismas que han sido descritas en algunos tipos de cáncer como: colorrectal, de próstata, gastrointestinal, de endometrio y de ovario (Lynch, 2015; Sedhome, 2019).

Específicamente en cáncer colorrectal, se ha reportado que de 8-21 % de los casos pueden estar asociados con la pérdida de la expresión de *MLH1*, misma que puede ser consecuencia de metilación del promotor de dicho gen o la presencia de variantes (Rashid *et al.*, 2019). En este sentido, dentro de las pocas investigaciones al respecto que se han realizado en México, Moreno-Ortiz *et al.*, (2021) analizaron la metilación del promotor de *MLH1* en tumores colorrectales de pacientes mexicanos, encontrando una frecuencia de metilación del 25 %, siendo, además, pacientes de sexo femenino mayores de 45 años quienes mostraron una mayor frecuencia de metilación. Mientras que, en lo concerniente a variantes en este gen, se han descrito en individuos con CCR esporádico y hereditario, tanto en regiones codificantes como en zonas reguladoras (Nassiri *et al.*, 2013), sin embargo, la más estudiada hasta el momento es la variante c.-93G>A, la cual ha sido reportada como un factor de riesgo para desarrollar CCR (Muñiz-Mendoza *et al.*, 2012) además de estar relacionada con la

hipermetilación del promotor (Miyakura, 2014) y la pérdida de expresión de la proteína (Fennell *et al.*, 2018) e la inestabilidad de microsatélites (MSI) tanto en CCR como cáncer de endometrio (Russell *et al.*, 2021).

Por otro lado, en cáncer de ovario se ha reportado que el porcentaje de casos con inestabilidad de microsatélites va de 2-10 %, llegando a alcanzar hasta el 20 % en el subgrupo endometriode y en su mayoría, suele estar relacionado con la metilación del promotor *MLH1* (Fraune, 2020; Evrard, 2021). De manera similar, Shilpa *et al.* (2014) estudiaron la relación de la MSI, la metilación del promotor y la expresión de proteínas de los genes MMR en el carcinoma epitelial de ovario. Encontrando MSI en >60 % de las muestras tumorales, con metilación de *MLH1* en 37.5 % de estas, pero sin pérdida total de la expresión de los genes MMR. Debido a que no hubo correlación entre MSI, metilación del promotor y expresión de proteínas de los genes MMR, se sugiere que cada uno puede funcionar de forma independiente y contribuir a la aparición y/o desarrollo del cáncer (Shilpa *et al.*, 2014). Adicionalmente, en cuanto las variantes génicas en *MLH1* y su relación con este tipo de cáncer, han sido hasta el momento, poco estudiadas. Destacando un análisis de casos y controles realizado en China en el que se evaluó la asociación entre la variante c.-93 G>A (rs1800734) y el riesgo de desarrollar cáncer de ovario. Encontrando que el alelo A (alterno o variante) puede afectar la susceptibilidad al cáncer ovario en la población estudiada, al aumentar el riesgo de padecerlo (Niu *et al.*, 2015).

Participación de *MLH1* en carcinoma oral de células escamosas

La metilación y la presencia de SNV, específicamente la c.-93 G>A, son eventos moleculares estudiados ampliamente en diferentes tipos de cáncer debido a la importancia que tienen en los procesos carcinogénicos (Lynch, 2015; Sedhome, 2019; Lima *et al.*, 2022), sin embargo, a pesar de su relevancia y estar bien caracterizados en algunas neoplasias, en COCE, desafortunadamente la situación es totalmente contraria. El COCE es un cáncer pobremente estudiado tanto a nivel nacional como internacional, aun cuando es una patología agresiva (De la Fuente-Hernández *et al.*, 2014; Chamoli, *et al.*, 2021), y con grandes repercusiones para la calidad de vida de los pacientes que la padecen (Almangush *et al.*, 2020).

En este sentido, se describen las investigaciones reportadas hasta el momento que buscan elucidar la relación de estos fenómenos de regulación molecular (metilación y SNV c.-93 G>A en *MLH1*) con el COCE.

Variante c.-93 G>A de *MHL1* en carcinoma oral de células escamosas

En 2019, Senghore y su equipo de colaboradores reportaron una asociación entre la SNV c.-93 G>A (rs1800734) con una mayor tasa de supervivencia general y supervivencia libre de la enfermedad en portadores del genotipo GG para pacientes con COCE que recibieron quimiorradioterapia concurrente adyuvante, en este estudio se incluyeron 319 individuos, concluyendo que la variante podría servir como biomarcador predictor en pacientes con esta enfermedad (Senghore *et al.*, 2019). De manera similar, otro estudio realizado con 185 pacientes concluyó que el genotipo AA tuvo un mal pronóstico, tanto en la tasa de supervivencia general,

como en la supervivencia libre de la enfermedad de pacientes varones con COCE, especialmente en aquellos con estadio avanzado (Lin *et al.*, 2014).

En contraste, en un estudio de casos y controles realizado en pacientes indios asiáticos, en el que se genotipificaron 242 pacientes con COCE fumadores de tabaco y 205 controles sanos, se encontró que la frecuencia del genotipo AA (c.-93 G>A) fue significativamente menor en pacientes en comparación con los controles (21.49 % vs. 47.8 %), mientras que el genotipo GG tuvo una prevalencia significativamente mayor en pacientes en comparación con controles sanos (41.32 % vs. 13.66 %), por otro lado, según la misma investigación, el genotipo AG y el genotipo GG parecen ser de riesgo para COCE en comparación con el genotipo AA en la población estudiada. En relación con la distribución alélica, se mostró que el alelo G es significativamente mayor en los pacientes, estando asociado con un mayor riesgo de padecer este tipo de cáncer en comparación con el alelo A. En conjunto, los mencionados resultados sugieren que la variante rs1800734 se asocia con un mayor riesgo de COCE relacionado con el consumo de tabaco en indios asiáticos y podría ser útil para detectar poblaciones susceptibles, lo que pone de manifiesto la naturaleza étnico-específica de las variantes en genes MMR (Jha *et al.*, 2013).

Metilación de *MLH1* en carcinoma oral de células escamosas

Por otro lado, respecto a la De la Fuente-Hernández *et al.*, 2014, cuando se presenta en regiones promotoras, puede conducir a la inactivación de la expresión de cualquier gen (Tse, *et al.*, 2017), como es el caso en *MLH1*. En 2011, González-Ramírez analizó el perfil de metilación de *MLH1* y la expresión proteica en COCE, se trató de un estudio de casos y controles que incluyó 50 casos y 200 controles, detectando metilación en el promotor de *MLH1* en 38 (76 %) casos, pero en ninguna de las muestras control. De las 38 muestras de COCE con metilación del promotor, 12 (32 %) no mostraron expresión para la proteína y corresponden a estadios clínicos tempranos (10 en estadio II y 2 en estadio I). Mientras que las muestras no metiladas sí expresaron *MLH1*. El análisis de regresión logística múltiple mostró un OR de 16,54 para la metilación del gen *MLH1* y estadios tempranos de COCE. Lo que condujo a la propuesta de que la metilación de *MLH1* es un evento temprano que se mantiene durante la progresión tumoral en este tipo de neoplasia (González-Ramírez *et al.*, 2011).

Del mismo modo, en otro estudio en que se analizaron 28 muestras de pacientes con COCE y 6 muestras de pacientes sanos se reportó hipermetilación del promotor de *MLH1* en el 50 % (14/28) de los casos, destacándose que el 100 % de los pacientes con neoplasias malignas orales múltiples presentaron hipermetilación en comparación con el 31,5 % de los pacientes con tumor único (Czerninski *et al.*, 2009).

Adicionalmente, se ha postulado que *MLH1* puede estar asociado con la resistencia a los tratamientos de quimioterapia por regulación epigenética (Adachi *et al.*, 2010). Sin embargo, los estudios aún no son concluyentes para demostrar los efectos de la terapia combinada con un fármaco epigenético (5-aza-2CdR) y cisplatino (CDDP) en COCE. Por lo que recientemente, Lima *et al.*, 2022, realizaron un estudio con el objetivo de investigar los efectos de CDDP en combinación con 5-aza-2CdR en la metilación de los genes *MGMT* y *MLH1* en células de cáncer oral, en donde líneas celulares de COCE (SCC-9, SCC-15 y SCC-25) se sometieron a 72 horas de tratamiento: CDDP 0,1 μM (o 4,44 μM SCC-9), 0,1 μM y 0,3 μM 5-aza-2CdR (o 1 μM y 3 μM SCC-9), y los fármacos en combinación, para posteriormente evaluar metilación del ADN de los genes mediante Methylation Sensitivity High-Resolution Melting (MS-HRM), evidenciando que todos los tratamientos redujeron la viabilidad

celular. En el caso particular del gen *MLH1*, se observó una desmetilación, además, en el análisis de los tratamientos con dosis bajas y fármacos combinados se presentó una disminución de la expresión proteica en SCC-9 y SCC-25; sin embargo, con las dosis altas de 5-aza-2CdR y combinación de fármacos con CDDP aumentó la expresión de *MLH1* en SCC-9, estos resultados que sugieren que los fármacos epigenéticos empleados en el estudio, asociados con la quimioterapia pueden tener potencial clínico traslacional como estrategia terapéutica para prevenir o contrarrestar la resistencia del cáncer, sin embargo, es indispensable llevar a cabo más investigaciones al respecto para poder comprobar esta teoría (Lima *et al*, 2022).

Conclusiones

La presencia de variantes y/o metilación en regiones promotoras de genes importantes para procesos carcinogénicos, como *MLH1*, puede impactar considerablemente en el riesgo de desarrollo y progresión de tumores. Particularmente en COCE, se ha postulado que la SNV c.-93G>A en el gen *MLH1* puede relacionarse con el riesgo y pronóstico de la enfermedad, teniendo una naturaleza étnico-específica, lo que pone de manifiesto la necesidad de realizar investigaciones centradas en esta y otras variantes de MMR en diversos grupos poblacionales, con el objetivo de identificar las características genotípicas de cada uno de ellos, y con base en esto determinar mejores estrategias en beneficio para los pacientes. Respecto a la metilación del promotor de este gen, se ha demostrado su presencia en una proporción importante de pacientes con COCE y suele asociarse con una disminución e incluso supresión de la expresión proteica. Sin dejar de lado el hecho de que podría tener implicaciones en la resistencia a agentes quimioterapéuticos o respuesta a tratamientos, sin embargo, aún no existen datos concluyentes al respecto, por lo que es importante continuar investigando.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés

Referencias

- Adachi, M., Ijichi, K., Hasegawa, Y., Nakamura, H., Ogawa, T. & Kanematsu, N. (2010). Human *MLH1* status can potentially predict cisplatin sensitivity but not microsatellite instability in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1(1): 93-96. https://doi.org/10.3892/etm_00000017
- Ali, K. (2022). Oral cancer - the fight must go on against all odds. *Evid Based Dent* 23, 4-5. <https://doi.org/10.1038/s41432-022-0243-1>
- Almangush, A., Mäkitie, AA., Triantafyllou, A., de Bree, R., Strojan, P., Rinaldo, A., Hernandez-Prera, JC., Suárez, C., Kowalski, LP., Ferlito, A. & Leivo, I. (2020). Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. *Oral Oncol.*, 104799. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104799>

- Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology. (2023). <https://atlasgeneticsoncology.org/>
- Chamoli, A., Gosavi, AS., Shirwadkar, UP., Wangdale, KV., Behera, SK., Kurrey, NK., Kalia, K. & Mandoli, A. (2021). Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. *Oral Oncol*;121:105451. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105451>
- Czerninski, R., Krichevsky, S., Ashhab, Y., Gazit, D., Patel, V. & Ben-Yehuda, D. (2009). Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral diseases* 15(3): 206-213. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2008.01510.x>
- De la Fuente Hernández, J., Muñoz Mújica, P., Patrón Bolaños, CE., Ramírez Trujillo, MA., Rojas Mercado, HJ. & Acosta Torres, LS. (2014). Aumento de la incidencia de carcinoma oral de células escamosas. *Salud (i) Ciencia* 20(6):636-642. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-796464>
- Evrard, C. & Alexandre, J. (2021). Predictive and Prognostic Value of Microsatellite Instability in Gynecologic Cancer (Endometrial and Ovarian). *Cancers (Basel)* 13(10): 2434. <https://doi.org/10.3390/cancers13102434>
- Fennell, L. J., Jamieson, S., McKeone, D., Corish, T., Rohdmann, M., Furner, T., Bettington, M., Liu, C., Kawamata, F., Bond, C., Van De Pols, J., Leggett, B. & Whitehall, V. (2018). *MLH1*-93 G/a polymorphism is associated with *MLH1* promoter methylation and protein loss in dysplastic sessile serrated adenomas with BRAF^{V600E} mutation. *BMC cancer* 18: 35. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3946-5>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, DM., Piñeros, M., Znaor, A. & Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 144(8):1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Fraune, C., Rosebrock, J., Simon, R., Hube-Magg, C., Makrypidi-Fraune, G., Kluth, M., ... & Burandt, E. (2020). High homogeneity of MMR deficiency in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 156(3): 669-675. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.12.031>
- Gonzalez-Ramirez, I., Ramirez-Amador, V., Irigoyen-Camacho, M. E., Sánchez-Pérez, Y., Anaya-Saavedra, G., Granados-Garcia, M., García-Vázquez, M. & Garcia-Cuellar, C. M. (2011). hMLH1 promoter methylation is an early event in oral cancer. *Oral oncology* 47(1): 22-26. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.10.002>
- Gupta, D. & Heinen, C. D. (2019). The mismatch repair-dependent DNA damage response: Mechanisms and implications. *DNA repair (Amst)* 78: 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.03.009>
- Ito, E., Yanagisawa, Y., Iwahashi, Y., Suzuki, Y., Nagasaki, H., Akiyama, Y., Sugano, S., Yuasa, Y. & Maruyama, K. (1999). A Core Promoter and a Frequent Single-Nucleotide Polymorphism of the Mismatch Repair Gene hMLH1. *Biochemical and biophysical research communications* 256(3): 488-494. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0368>
- Jha, R., Gaur, P., Sharma, S. C. & Das, S. N. (2013). Single nucleotide polymorphism in hMLH1 promoter and risk of tobacco-related oral carcinoma in high-risk Asian Indians. *Gene* 526(2): 223-227. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.05.014>

- Kadyrova, L. Y. & Kadyrov, F. A. (2016). Endonuclease activities of MutL α and its homologs in DNA mismatch repair. *DNA repair (Amst)* 38: 42–49. <https://doi.org/10.1016%2Fj.dnarep.2015.11.023>
- Kunkel, T. A. & Erie, D. A. (2015). Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annual review of genetics* 49: 291–313. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-054722>
- Levine, A. J., Phipps, A. I., Baron, J. A., Buchanan, D. D., Ahnen, D. J., Cohen, S. A., ... & Weisenberger, D. J. (2016). Clinicopathologic risk factor distributions for MLH1 promoter region methylation in CIMP-positive tumors. *Cancer, Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 25(1): 68–75. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-15-0935>
- Li SKH. & Martin A. (2016). Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. *Trends Mol Med.* 22(4):274-289. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.02.003>
- Lima, D. G., do Amaral, G. C. L. S., Planello, A. C., Borgato, G. B., Guimarães, G. N. & de Souza, A. P. (2022). Combined therapy with cisplatin and 5-AZA-2CdR modifies methylation and expression of DNA repair genes in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 15(3): 131-144. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8986466/>
- Lin, L.H., Lin, M.W., Mar, K., Lin, C.S., Ji, D.D., Lee, W.P., Lee, H.S., Cheng, M.F. & Hsia, K. T. (2014). The hMLH1– 93G> A Promoter Polymorphism is Associates with Outcomes in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Annals of surgical oncology* 21(13): 4270-4277. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3897-x>
- Liu, D., Keijzers, G. & Rasmussen, L. J. (2017). DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 773: 174–187. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.07.001>
- Lynch, H. T., Snyder, C. L., Shaw, T. G., Heinen, C. D. & Hitchins, M. P. (2015). Milestones of Lynch syndrome: 1895–2015. *Nature Reviews Cancer* 15(3): 181-194. <https://doi.org/10.1038/nrc3878>
- Miyakura, Y., Tahara, M., Lefor, A. T., Yasuda, Y. & Sugano, K. (2014). Haplotype defined by the MLH1-93G/A polymorphism is associated with MLH1 promoter hypermethylation in sporadic colorectal cancers. *BMC Research Notes* 7: 835. <https://doi.org/10.1186%2F1756-0500-7-835>
- Morak, M., Ibisler, A., Keller, G., Jesjusen, E., Laner, A., Gonzales-Fassrainer, D., ... & Holinski-Feder, E. (2018). Comprehensive analysis of the MLH1 promoter region in 480 patients with colorectal cancer and 1150 controls reveals new variants including one with a heritable constitutional MLH1 epimutation. *Journal of Medical Genetics* 55(4): 240-248. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104744>
- Moreno-Ortiz, J. M., Jiménez-García, J., Gutiérrez-Angulo, M., Ayala-Madrigal, M.L, González-Mercado, A., González-Villaseñor, C. O., Flores-López, B. A., Alvizo-Rodríguez, C., Hernández-Sandoval, J. A., Fernández-Galindo, M. A., Maciel-Gutiérrez, V., Ramírez-Plascencia, H. & Ramírez-Ramírez, R. (2021). Elevada frecuencia de metilación del promotor de MLH1 mediada por sexo y edad en tumores colorrectales de pacientes mexicanos. *Gaceta Médica de México* 157(6): 638-644. <https://doi.org/10.24875/gmm.21000293>
- Muniz-Mendoza, R., Ayala-Madrigal, M. L., Partida-Perez, M., Peregrina-Sandoval, J., Leal-Ugarte, E., Macias-Gomez, N., ... & Gutierrez-Angulo, M. (2012). MLH1 and XRCC1 polymorphisms in Mexican patients with colorectal cancer. *Genet. Mol. Res.* 11(3): 2315-2320. <https://doi.org/10.4238/2012.june.27.6>

- Nassiri, M., Kooshyar, M. M., Roudbar, Z., Mahdavi, M. & Doosti, M. (2013). Genes and SNPs associated with non-hereditary and hereditary colorectal cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 14(10): 5609-5614. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.10.5609>
- Niu, L., Li, S., Liang, H. & Li, H. (2015). The hMLH1- 93G> A polymorphism and risk of ovarian cancer in the chinese population. *PloS One* 14(5): e0218032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218032>
- Quaresima, B., Faniello, M. C., Baudi, F., Cuda, G., Grandinetti, C., Tassone, P., Costanzo, F. & Venuta, S. (2001). Transcriptional regulation of the mismatch repair gene hMLH1. *Gene* 275(2): 261–265. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00656-4](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00656-4)
- Rashid, S., Freitas, M. O., Cucchi, D., Bridge, G., Yao, Z., Gay, L., Williams, M., Wang, J., Suraweera, N., Silver, A., McDonald, S., Chelala, C., Szabadkai, G. & Martin, S. A. (2019). *MLH1* deficiency leads to deregulated mitochondrial metabolism. *Cell death & disease* 10: 795. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2018-y>
- Russell, H., Kedzierska, K., Buchanan, D. D., Thomas, R., Tham, E., Mints, M., Keränen, A., Giles, G. G., Southey, M. C., Milne, R. L., Tomlinson, I., Church, D., Spurdle, A. B., O'Mara, T. A. & Lewis, A. (2020). The *MLH1* polymorphism rs1800734 and risk of endometrial cancer with microsatellite instability. *Clinical epigenetics*, 12(1):102. <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01058-w>
- Sedhom, R., & Antonarakis, E. S. (2019). Clinical implications of mismatch repair deficiency in prostate cancer. *Future Oncology* 15(20): 2395-2411. <https://doi.org/10.2217%2Ffon-2019-0068>
- Senghore, T., Wang, W. C., Chien, H. T., Chen, Y. X., Young, C. K., Huang, S. F. & Yeh, C. C. (2019). Polymorphisms of mismatch repair pathway genes predict clinical outcomes in oral squamous cell carcinoma patients receiving adjuvant concurrent chemoradiotherapy. *Cancers (Basel)* 11(5): 598. <https://doi.org/10.3390/cancers11050598>
- Shilpa, V., Bhagat, R., Premalata, C. S., Pallavi, V. R. & Krishnamoorthy, L. (2014). Microsatellite instability, promoter methylation and protein expression of the DNA mismatch repair genes in epithelial ovarian cancer. *Genomics* 104(4): 257-263. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.08.016>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, RL., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 71(3):209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tamura, K., Kaneda, M., Futagawa, M., Takeshita, M., Kim, S., Nakama, M., Kawashita, N. & Tatsumi-Miyajima, J. (2019). Genetic and genomic basis of the mismatch repair system involved in Lynch syndrome. *International journal of clinical oncology* 24(9): 999–1011. <https://doi.org/10.1007/s10147-019-01494-y>
- Tenore, G., Nuvoli, A., Mohsen, A., Cassoni, A., Battisti, A., Terenzi, V., ... & Romeo, U. (2020). Tobacco, alcohol and family history of cancer as risk factors of Oral Squamous Cell Carcinoma: Case-control retrospective study. *Applied Sciences* 10(11): 3896. <https://doi.org/10.3390/app10113896>
- Traver, S., Coulombe, P., Peiffer, I., Hutchins, J. R., Kitzmann, M., Latreille, D. & Méchali, M. (2015). MCM9 Is Required for Mammalian DNA Mismatch Repair. *Molecular cell* 59(5): 831–839. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.010>

Tse, JW., Jenkins, LJ., Chionh, F. & Mariadason, JM. (2017). Aberrant DNA methylation in colorectal cancer: What should we target? *Trends Cancer* 3(10):698-712. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.08.003>

Zhang, L., Bhaskaran, S. P., Huang, T., Dong, H., Chandratre, K., Wu, X., ... & Wang, S. M. (2020). Variants of DNA mismatch repair genes derived from 33,998 Chinese individuals with and without cancer reveal their highly ethnic-specific nature. *European Journal of Cancer* 125: 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.11.004>

2023 TECNOCENCIA CHIHUAHUA

Esta obra está bajo la Licencia Creative Commons Atribución No Comercial 4.0 Internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Artículo Científico

Inhibitory effects of *Buddleja scordioides* (salvilla) leaves on digestive enzymes and carbohydrate absorption *in vivo*

Efectos inhibidores de las hojas de *Buddleja scordioides* (salvilla) sobre las enzimas digestivas y la absorción de carbohidratos *in vivo*

Laura J. Barragan-Zuñiga², Luis E. Simental-Mendía², Mayra Denise Herrera³, Rubén F. González-Laredo¹, J. Alberto Gallegos-Infante¹, José Salas-Pacheco⁴, Martha R. Moreno-Jiménez¹, Nuria E. Rocha-Guzmán^{1*}, Claudia I. Gamboa-Gómez² *

¹ Instituto Tecnológico de Durango. Blvd. Felipe Pescador 1830, Nueva Vizcaya, 34080 Durango, Dgo.

² Unidad de Investigación Biomédica del Instituto Mexicano del Seguro Social. Predio Canoas, 34077 Durango, Durango.

³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Zacatecas Kilómetro 24.5, Zacatecas - Fresnillo, Zacatecas.

⁴ Instituto de Investigación Científica, Universidad Juárez del Estado de Durango. Universidad y Fanny Anitua SN, Zona Centro, 34000 Durango, Durango.

*Correspondencia: nrocha@itdurango.edu.mx (Nuria E. Rocha-Guzmán), clau140382@hotmail.com (Claudia I. Gamboa-Gómez2)

DOI: <https://doi.org/10.54167/tch.v17i2.1221>

Recibido: 31 de mayo de 2023; Aceptado: 15 de agosto de 2023

Publicado por la Universidad Autónoma de Chihuahua, a través de la Dirección de Investigación y Posgrado

Abstract

The effects of *Buddleja scordioides* (BsLI) leaf infusions on digestive enzymes and carbohydrate absorption were evaluated. The BsLI yield was 21.64 %. In addition, a chemical characterization was carried out identifying hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, flavonols, flavanones and flavones. *In vitro* studies were performed to determine the inhibitory action of BsLI on lipase, α -amylase, and α -glucosidase. Then, in rats, oral starch tolerance tests (OSTT) were carried out using BsLI at a dose of 9.5 mg/kg body weight. Results showed moderate inhibition of lipase and α -glucosidase, but greater inhibition of α -amylase compared to positive controls. During the OSTT trial, the group receiving BsLI showed a significant reduction in glucose levels compared to the negative control group. Bioactive compounds, such as naringenin, luteolin, quercetin, and coumaric acid, were identified after BsLI administration. Furthermore, the consumption of BsLI was safe and showed antioxidant activity like Trolox. In conclusion, BsLI may have an enhanced effect on glucose metabolism by inhibiting carbohydrate absorption.

Keywords: medicinal plant, carbohydrate absorption, antioxidant, *Buddleja scordioides*

Resumen

Se evaluaron los efectos de las infusiones de hojas de *Buddleja scordioides* (BsLI) sobre enzimas digestivas y la absorción de carbohidratos. El rendimiento de BsLI fue del 21.64 %. Además, se caracterizaron componentes químicos: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles, flavanonas y flavonas. En estudios *in vitro*, se examinó cómo BsLI inhibe la lipasa, α -amilasa y α -glucosidasa. Luego, en ratas, se probó su efecto en la tolerancia oral al almidón (OSTT) a dosis de 9.5 mg/kg de peso corporal. Resultados indicaron moderada inhibición de lipasa y α -glucosidasa, y mayor inhibición de α -amilasa comparado con controles. Durante la OSTT, el grupo con BsLI tuvo menor glucosa que el control negativo. Tras administrar BsLI, se detectaron compuestos bioactivos: naringenina, luteolina, quercetina y ácido cumárico. Además, BsLI fue seguro, con actividad antioxidante similar al Trolox. En conclusión, BsLI puede tener un efecto beneficioso sobre el metabolismo de la glucosa al inhibir la absorción de carbohidratos.

Palabras clave: planta medicinal, absorción de carbohidratos, antioxidante, *Buddleja scordioides*

1. Introduction

The western lifestyle is characterized by a lack of physical activity and hypercaloric diets. These are the main contributing factors to the development of metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes (Kopp, 2019). A therapeutic target of these diseases is the inhibition of digestive enzymes such as pancreatic lipase, α -amylase, and α -glucosidase (Patil *et al.*, 2015; Irondi *et al.*, 2018).

These digestive enzymes break down dietary lipids and carbohydrates to produce absorbable molecules such as free fatty acids and monosaccharides. Thus, the inhibition of these enzymes reduces the amounts of calories absorbed into the body and postprandial glucose (Awosika *et al.*, 2019). Pharmacological drugs such as acarbose and orlistat inhibit digestive enzymes involved in glucose and lipid metabolism. However, they often exhibit side effects ranging from diarrhea to hepatotoxicity, which limit their use in the clinical setting (Lunagariya *et al.*, 2014). In this regard, previous studies reported that different bioactive compounds (e.g. polyphenols) present in medicinal plants inhibit one or more digestive enzymes with lesser adverse effects than the drugs (Ardeshirlarijani *et al.*, 2019; Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2019).

Several species of *Buddleja* spp. are recognized to treat ills related to inflammatory processes (Estrada-Zúñiga *et al.*, 2019). Additionally, Hwang *et al.*, (2009) found that *B. officinalis* improves hyperglycemia, endothelium-dependent vascular relaxation, and inflammation in a diabetic atherosclerotic mouse model. Previous experimental studies have revealed the diverse biological activities of *Buddleja scordioides*, commonly known as salvilla. In a study published in 2002, Vanderjagt *et al.* demonstrated the anti-inflammatory potential of salvilla. Their findings indicated that the plant extract could effectively inhibit the production of inflammatory cytokines in rats, suggesting its potential for reducing inflammation in conditions like arthritis, asthma, and inflammatory bowel disease. Rocha-Guzmán *et al.* conducted research in 2018 to explore the gastroprotective effects of salvilla. Their study revealed that the extract provided protective benefits to the stomach lining. Furthermore, a study by Villegas-Novoa *et al.* in 2020 reported the antioxidant

effects of *Buddleja scordioides* extract in rats. The research demonstrated that the plant's extract exhibited antioxidant properties, protecting cells from damage caused by free radicals. These observed benefits have been associated with the bioactive compounds found of this herbal product, which include iridoids, phenylpropanoids, sesquiterpenes, saponins, verbascosides, and flavonoids. These compounds have shown a variety of beneficial effects, including antioxidant and anti-inflammatory properties, as reported by Santos-Cruz *et al.* (2012) and Gutiérrez-Rebolledo *et al.* (2019).

However, to the best of our knowledge, there is no evidence investigating the impact of *B. scordioides* on digestive enzymes and carbohydrate absorption *in vivo*. Therefore, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* inhibitory effects of BsLI on digestive enzymes and carbohydrate absorption *in vivo*. In addition, the oral BsLI-bioactive-compounds absorption (OBCA), antioxidant activity, and safety of this medicinal plant were investigated.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Samples of *Buddleja scordioides* Kunth (salvilla) were collected at Ignacio Ramirez road in Durango, México (coordinates 24°30'17.41" N, length 104°4'51.23" W, elevation 2030 m average). The botanist Dr. Socorro González-Elizondo taxonomically identified leaves and the voucher specimens (47538) were deposited at the Herbarium of the Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Durango, México.

The leaves were air dried in the shade at 25 °C followed by milling to a particle size of 0.7-1.0 mm.

2.2 Preparation of *Buddleja scordioides* leaves infusions (BsLI)

The infusion concentration was commonly used by the general population (1 % m/v). The dried leaves sample (2 g) was added to 200 mL boiling water and kept stirring for 10 min. Infusions were obtained by subsequent filtration and lyophilized (FreeZone 18 Liter Console Freeze Dry System, Kansas USA). Samples were stored in amber vessels until use.

2.3 Yields of extractable solids

Infusion yield was determined as follows:

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Lyophilized infusion (g)}}{\text{Dried plant material (g)}} \times 100 \quad \text{Eq (1)}$$

Results are reported as means of two independent infusion preparation.

2.4 Chemical characterization of BsL

Sample analysis was carried out with an Acquity UPLC system (Waters Corp., Milford) coupled with a tandem Xevo TQ-S triple quadrupole mass spectrometer (Waters Corp., Wexford). The LC system consisted of a sample manager (5 °C) and a quaternary solvent manager. The column used to determine the phenolic profile was an Acquity UPLC BEH C8, 1.7 µm, 2.1 mm x 100 mm (Waters Corp., Wexford), operated at 30 °C. The mobile phase included two solvents: acidified Milli Q water with 7.5 mM formic acid (Solvent A) and acetonitrile LC-MS (Solvent B): Initial – 5 % B, 0.8 min isocratic to 5 % B, 1.2 min gradient to 10 % B; 1.9 min isocratic 10 % B; 2.4 min gradient to 15 % B; 3.7 min isocratic 15 % B; 4.0 min gradient to 21 % B; 5.2 min isocratic 21 % B; 5.7 min gradient to reach 27 % B; 8.0 min gradient to reach 50 % B; 9.0 (linear gradient) for column washing 100 % B; subsequent at 11.5 min linear gradient 5 % B since 13.5 min for column stabilization at a flow rate of 250 µL/min. Electron spray ionization (ESI) in negative mode was as follows: capillary voltage 2.5 kV, desolvation temperature 300 °C, source temperature 150 °C, desolvation gas flow 500 L/h, and cone gas flow 150 L/h, collision gas flow was 0.14 mL/min, MS mode collision energy 5.0 and MS/MS mode collision energy 20.0. For identification and quantification of the phenolic profile, a mixture of standards (20 ng/µL) was used for monitoring retention times, *m/z* values, and MS/MS transitions. Samples and standards were monitoring at multiple modes. The UPLC and Tandem Xevo TQ-S triple quadrupole mass spectrometer control and data processing was using MassLynx v. 4.1 Software (Waters Corp.).

2.5 Inhibitory effects of BsLI on digestive enzymes

2.5.1 Pancreatic lipase inhibition assay

The assay was performed following the methodology reported by McDougall *et al.* (2009), with some modifications. In brief, 150 µL of a solution (10 mg/mL) of porcine pancreatic lipase type II (Sigma- Aldrich, Cat. No. L3126) was mixed with BsLI (at 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800, and 1000 µg/µL), 400 µL of Tris buffer (100 mM, pH 8.2), 400 µL of *p*-nitrophenyl laurate (SIGMA Co., St. Louis, USA), and substrate solution (0.08 % w/v dissolved in 5 mM sodium acetate at pH 5.0 containing 1 % Triton X-100). Samples were incubated at 37 °C for 2 h and centrifuged at 16,000 RPM, for 3 min. Finally, the supernatant was read at 400 nm using a microplate reader (MultiScan Go, Thermo Scientific, USA). The positive control was Orlistat (Redustat® Laboratorios Liomont S.A. DE C.V.).

The lipase inhibitory activity was expressed as a percentage of inhibition:

$$\text{Inhibition \%} = 100[S_0 - S_1]/S_0 \quad \text{Eq (2)}$$

Where S_0 is the absorbance of the blank and S_1 is the absorbance of BsLI.

Additionally, BsLI concentration that provided 50 % inhibition (IC_{50}) was calculated by plotting the inhibition percentage versus the log concentration curve (Coruh *et al.*, 2007).

2.5.2 α -Amylase inhibition assay

The assay was performed following the methodology reported by Tamil *et al.* (2010) with several modifications. Substrate solution was prepared using starch (4 %), CaCl₂ 0.01 M, and distilled water (5 mL) for 5 min at 96 °C. The BsLI (at 10, 50, 100, 200, 400, 600, 800, and 1000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) were incubated for 1 h at 37 °C with 100 μL of porcine pancreas α -amylase solution (2.5 mU/ μL in sodium phosphate buffer (0.02 M, pH 6.9) and sodium chloride (6 mM)) (SIGMA Co., St. Louis, USA). Afterward, to stop the reaction, NaOH (4 mL, 0.1 M) was added, and a centrifugation step was performed (700 xg for 5 min). Glucose concentration in the supernatant was determined using an enzymatic kit (Biosystems Instruments Reagents, Barcelona, Spain). Acarbose (Laboratorios Alfarma, CDMX, México) was used as a positive control. Results were expressed as inhibition percentage (equation 2) and IC₅₀.

2.5.3 α -Glycosidase inhibition assessment

The assay was performed following the methodology reported by Apostolidis *et al.* (2007). Sample of BsLI (25 μL at 20, 40, 60, 80, and 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 100 μL of glucosidase enzyme (SIGMA Co., St. Louis, USA) (0.19 mU/ μL), and 50 μL of phosphate buffer (0.1 M, pH 6.9) were mixed and incubated for 10 min at 37 °C. Then, 25 μL of *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside solution (5 mM/L prepared in a 0.1 M/L of citrate-phosphate buffer, pH 7) (SIGMA Co., St. Louis, USA) was added and incubated 30 min at 37 °C. The reaction was stopped by adding 1 mL of a 0.05 mol/L NaOH solution. Samples were read at 410 nm with the Synergy HT Microplate Reader (Biotek Instruments, Winooski, Vermont, USA.). Acarbose (Laboratorios Alfarma, CDMX, México) was used as a positive control. Results were expressed as inhibition percentage (equation 2) and IC₅₀.

2.6 Antioxidant activity of BsLI *in vitro*.

2.6.1 Determination of radical scavenging activity using the ABTS assay

The ABTS assay was performed following the methodology reported by Re *et al.* (1999). In brief, potassium persulfate (2.5 mM) was mixed and incubated in dark for 16 h at 25±1 °C with ABTS (7 mM) to produce the radical cations. The BsLI (2.5 μL at 10, 50, 150, 200, 250, 300, 350, and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were added to the ABTS solution (200 μL). Trolox was the positive control. Afterward, the absorbance was recorded, and the results were expressed as the inhibition percentage (equation 2) and as IC₅₀.

2.6.2 Radical scavenging assay: Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH)

The DPPH assay was performed following the methodology reported by Brand-Williams *et al.* (1995). One mL of the stable free radical DPPH solution (20 mg/L) was mixed with 200 μL of BsLI (at concentration of 10, 50, 100, 200, 400, 500, 600, 700 and 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Samples were incubated for 30 min in dark at room temperature (26 °C). The absorbance was registered at 515 nm. Trolox was the positive control. The results were expressed as the inhibition percentage (equation 2) and as IC₅₀.

2.7 Effect of BsLI on carbohydrate absorption *in vivo*.

2.7.1 Animals/ethics approval

Animal experiments were carried out in accordance with the Mexican guidelines (NOM-062-ZOO-1999) and the National Institutes of Health (2002) recommendations for research with animals.

Animals used in the experiments were male Wistar rats (ten weeks old, $n = 8$, 180 ± 20 g of body weight) and male CD-1 mice (eight weeks old, $n=28$, 25 ± 5 g of body weight), as well as non-pregnant female CD-1 mice (eight weeks old, $n=6$, 25 ± 5 g of body weight). All animals were obtained from the same source, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), campus Juriquilla, Querétaro, México.

They were housed in a controlled environment with a 12–12 h light–dark cycle and maintained at a temperature of 27 ± 1 °C. Water and food (Rodent Lab Chow 5001, Purina®, Québec, Canada) were provided *ad libitum* for all the animals during the experiments.

2.7.2 Oral starch tolerance test (OSTT)

Effects of BsLI on carbohydrate absorption were assessed with an oral starch tolerance test (OSTT). Starch was the negative control, whereas the positive control was acarbose.

In fasting conditions, male Wistar rats (ten weeks old, $n = 8$, 180 ± 20 g of body weight) were given a starch load at a dose of 3 g/kg of body weight (equivalent to 519.26 mg contained in an infusion cup of 240 mL consumed by an adult of 70 kg by a meal). Additionally, 5.12 mg/Kg of body weight of acarbose was used as a positive control (equivalent to 50 mg by a meal in humans). Blood glucose levels were determined in blood samples collected from the tail vein using a glucometer (Stat Strip® Glucose, Nova Biomedical, Waltham, MA, US) at 0, 30, 60, and 120 min. The variations in serum glucose onset time, peak, and AUC were considered to the determination of the relative rate of carbohydrate digestion and absorption.

The human dose extrapolation (HED) to the animal was estimated according to the following formula:

$$\text{HED} = \text{animal dose (mg/kg)} [\text{animal weight (kg/human weight in kg)}]^{0.33}$$

Reagan-Shaw *et al.* (2008)

Eq (3)

2.8 Oral absorption assay of BsLI bioactive compounds (OABC)

The oral absorption assay was conducted on male CD-1 mice (eight weeks old, $n=28$, 25 ± 5 g of body weight). The mice were placed in metabolic cages and fasted for 12 hours before the experiment. Treatments ($n=4$ per time point) were administered through gavage at a dose of 2500 mg/kg of body weight to the intervention groups at various time intervals (0, 0.5, 2, 4, 8, 12, and 24 hours). The negative control group received water as the vehicle. After each treatment, the mice were anesthetized and euthanized by cardiac puncture. Serum was separated from the blood and immediately frozen at -80 °C for later analysis.

The analysis of the serum samples involved adding 100 μL of serum to a mixture containing 37 μL of water with 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of ascorbic acid and 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ of EDTA. The mixture was then centrifuged at 14000 g for 10 minutes, and 250 μL of ethyl acetate was added for liquid-liquid micro-extraction. The suspension was mixed using a vortex for 1 minute. The collected volumes were dried using a vacuum centrifugal console, reconstituted in methanol (200 μL), and filtered through 0.45 μm syringe filters. The identification and quantification of BsLI bioactive compounds present in mouse serum were performed following the methodology previously described in section 2.4 on "the chemical characterization of BsLI".

2.9 Toxicity assessment of BsLI

2.9.1 Acute toxicity

The acute toxicity assay was carried out on non-pregnant female CD-1 mice (eight weeks old, $n=6$, 25 ± 5 g of body weight) (Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, Querétaro, México). The guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development for testing of chemicals 420 (OECD, 2001) were followed. The Mice were divided into two groups of three animals each. A single dose of BsLI (5000 mg/kg of body weight) was administered via gavage (in distilled water). Mice were observed for signs of possible toxicity (convulsions, tremors, lethargy, salivation, diarrhea, sleepiness, and coma) every hour for the first four hours, and then the animals were fed. Thereafter, mice were monitored for any signs of toxicity (changes in the eyes, skin, fur, mucous membranes, and the respiratory, circulatory, and autonomic nervous and central nervous systems) and mortality for 14 days. Measurements of body weight and food and water intake were performed daily. On the last day, animals were sacrificed under deep ether anesthesia and the median lethal dose (LD50) values were estimated. Vital organs such as the heart, kidney, liver, spleen, and lung were isolated and weighted to assess histopathological changes. The organs were fixed in 10 % buffered neutral formalin, embedded in paraffin wax, cut (5 μm) on glass slides, and stained with hematoxylin and eosin. The slides were examined under a light microscope.

2.9.2 Sub-chronic toxicity

For the sub-chronic toxicity assessment, both female and male mice aged eight weeks and weighing 25 ± 5 g of body weight (UNAM, Campus Juriquilla, Querétaro, México) were used. The assay was performed according to the methodology described by the Organization for Economic Co-operation and Development-407 (OECD, 2008). Animals were divided into four groups of 10 each (five males and five females). The control group received distilled water (vehicle), while the three intervention groups received BsLI by gavage at doses of 250, 750, and 2500 mg/kg of body weight, respectively, for 28 days. Mice were observed for signs of abnormalities during the treatment period. Measurements of body weight and food and water intake were performed daily.

Before sacrifice, urine was collected and analyzed using urinalysis strips (Bio-Uridiag-A10) for the measurement of leucocytes, nitrite, urobilinogen, protein, blood, specific gravity, ketone, bilirubin, and glucose. At the end of the treatment period, mice were sacrificed, and blood samples were obtained via cardiac puncture into non-heparinized and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) containing tubes for biochemical and hematological analyses.

Heart, kidney, liver, spleen, and lung were isolated to assess histopathological changes. These organs were excised, weighed (Scout PRO Ohaus, Mississauga, Ontario, Canada), examined macroscopically, and fixed in 10 % buffered neutral formalin. Fixed organs were processed for paraffin embedding and cuts of 5 mm thick were obtained by microtome and then processed using an alcohol xylene series for being later stained with hematoxylin and eosin.

Hematological parameters such as red blood cell (RBC), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), and white blood cell (WBC) were analyzed using an automatic hematology analyzer (Hemat Technology, Newton, Massachusetts, USA).

Serum biochemical parameters such as glucose, total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), albumin, total protein, and total bilirubin were analyzed using Biosystem commercial test kits with an automated A15 spectrophotometer (Biosystems Instruments Reagents, Barcelona, Spain). The concentrations of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) were estimated using the formula by Friedewald *et al.*, (1972):

$$\text{LDL-c (mg/dL)} = [\text{total cholesterol (TC) (mg/dL)} - \text{HDL (mg/dL)} - (\text{triglycerides (TG) (mg/dL)/5})] \quad \text{Eq (4)}$$

2.10 Statistical analysis

Data were expressed as mean values \pm standard error (SE). Statistical significance was determined by one-way variance analysis (ANOVA) ($p < 0.05$) followed by Tukey's test, Statistical analysis was conducted using the Sigma Plot software version 13.0 (Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA).

3. Results and discussion

3.1 Yield and chemical characterization

The yield of BsLI was 21.64 %. Regarding chemical characterization results, hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, flavonols, flavanones, and flavones were identified and quantified. The protocatechuic acid, salicylic acid, vanillic acid, and quinic acid were the phenolic acids with the highest concentration; whereas, quercetin, quercetin 3-*O*-glucoside, and luteolin were the main flavonol compounds detected (Table 1).

Table 1. Chemical characterization of *Buddleja scordioides* leaves infusion (BsLI)(1 %).**Tabla 1.** Caracterización química de la infusión de hojas de *Buddleja scordioides* (BsLI)(1 %).

No.	Compound	Rt (min)	[M-H] ⁻ m/z	Transitions	Content [ng/mg of crude extract]
<i>Hydroxybenzoic acids</i>					
1.	Gallic acid	1.64	169	125, 79	8.529 ± 0.73
2.	Protocatechuic acid	3.13	153	109, 91	258.914 ± 9.73
3.	2,5-dihydroxybenzoic acid	4.21	153	109, 81	183.945 ± 0.27
4.	4-hydroxybenzoic acid	4.41	137	93, 65	106.790 ± 2.60
5.	Vanillic acid	4.85	167	152, 123	138.336 ± 1.13
6.	Tri-hydroxybenzaldehyde	6.21	153	83	16.584 ± 1.33
7.	Salicylic acid	7.70	137	93, 65	401.480 ± 43.62
<i>Hydroxycinnamic acids</i>					
8.	Quinic acid	1.01	191	93, 85	210.486 ± 24.05
9.	Chlorogenic acid	4.32	353	191, 85	27.11 ± 2.95
10.	4-O-caffeoylquinic acid	4.51	353	353, 179	13.717 ± 0.48
11.	Caffeic acid	4.85	179	135	93.348 ± 6.94
12.	Coumaric acid	6.19	163	119, 98	47.224 ± 10.48
13.	Ferulic acid	6.54	193	178, 134	51.178 ± 1.08
14.	4,5-dicaffeoylquinic acid	7.14	515	353, 179	3.446 ± 0.47
15.	Rosmarinic acid	7.73	359	197, 161	36.189 ± 0.02
<i>Flavonols</i>					
16.	Rutin	6.25	609	300, 271	69.162 ± 1.15
17.	Quercetin 3-O-glucoside	6.48	463	300, 271	433.894 ± 1.48
18.	Quercetin 3-O-β-glucuronide	6.54	477	301, 151	164.200 ± 9.09
19.	Quercetin	8.41	301	179, 151	466.554 ± 2.06
<i>Flavanones</i>					
20.	Neohesperidin	7.77	609	301, 164	48.328 ± 1.00
21.	Eriodictyol	8.42	287	151, 135	5.225 ± 0.90
<i>Flavones</i>					
22.	Luteolin	8.40	285	151, 133	231.853 ± 4.55
23.	Apigenin	8.80	269	148, 117	13.022 ± 1.36
24.		9.80	283	268, 211	21.021 ± 1.30

Values are means of duplicate determinations ± standard error.

3.2 Inhibition of digestive enzymes

3.2.1 Lipase inhibition

Results of lipase assessment are depicted in Fig. 1. The BsLI showed a lower percentage of lipase inhibition (~44%) than orlistat (~92%). Additionally, the IC_{50} values were significantly higher as compared with the positive control (16-fold) (Table 2).

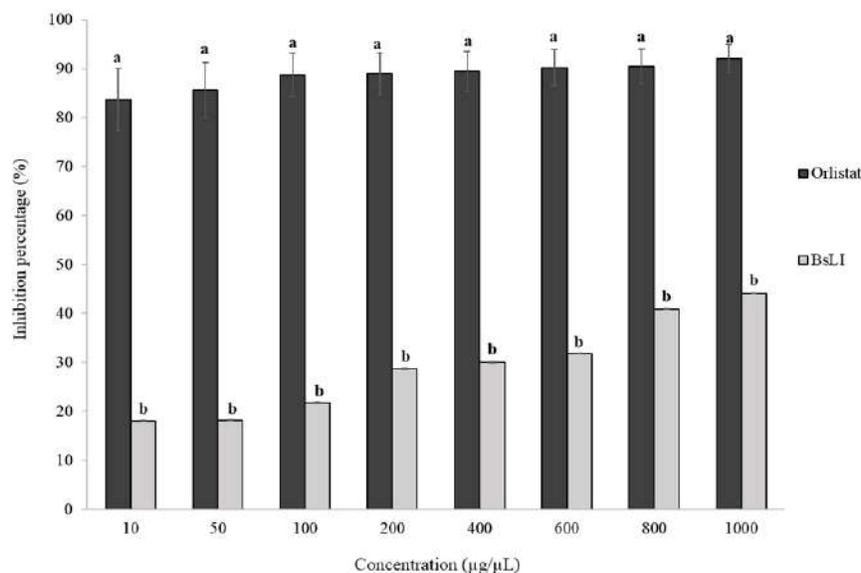


Figure 1. Lipase inhibition of *Buddleja scordioides* leaves infusion (BsLI). Orlistat was the positive control. Different letters in the graph indicate significant differences in the percentage of lipase inhibition. Values are means of duplicate determinations \pm standard error. ($p < 0.05$) by Tukey's test.

Figura 1. Inhibición de la lipasa de la infusión de hojas de *Buddleja scordioides* (BsLI). Orlistat fue el control positivo. Las letras diferentes en el gráfico indican diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la lipasa. Los valores son medias de determinaciones duplicadas \pm error estándar. ($p < 0.05$) mediante la prueba de Tukey.

3.2.2 α -amylase inhibition

The amylase results are shown in Fig. 2. The BsLI had a higher percentage of α -amylase inhibition than acarbose, achieving a ~96% while acarbose had a ~78% inhibition. On other hand, no differences were observed for the IC_{50} values between BsLI and positive control (acarbose) (Table 2).

Table 2. Inhibitory digestive enzymes and antioxidant assessment of *Buddleja scordioides* leaves infusion (BsLI) IC₅₀ values.**Tabla 2.** Inhibición de enzimas digestivas y evaluación antioxidante de la infusión de hojas de *Buddleja scordioides* (BsLI) Valores IC₅₀.

	Orlistat ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Acarbose ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Trolox ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	BsLI ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Lipase	0.34 ± 0.01^a	---	---	5.50 ± 0.01^b
α -amylase	---	1.69 ± 0.81^a	---	1.83 ± 0.01^a
α -glucosidase	---	1.64 ± 0.04^a	---	7.60 ± 0.10^b
ABTS	---	---	1.93 ± 0.01^a	1.48 ± 0.01^a
DPPH	---	---	2.11 ± 0.01^a	2.05 ± 0.01^a

Results are expressed as inhibitory median concentration (IC₅₀) values. Values are means of duplicate determinations \pm standard error. a-c Different letters indicate statistical differences ($p < 0.05$) by Tukey's test.

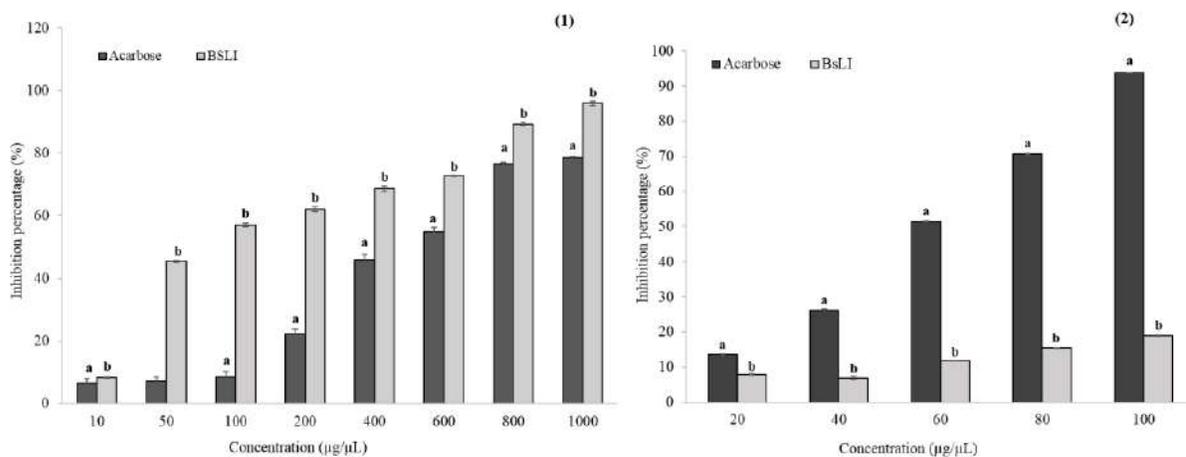
**Figure 2.** α -amylase inhibition (1) and α -glucosidase inhibition (2) of *Buddleja scordioides* leaves infusion (BsLI). Acarbose was the positive control. Values are means of duplicate determinations \pm standard error. a,b Different letters indicate statistical differences between BsLI and positive control ($p < 0.05$) by Tukey's test.

Figura 2. Inhibición de α -amilasa (1) e inhibición de α -glucosidasa (2) de la infusión de hojas de *Buddleja scordioides* (BsLI). La acarbose fue el control positivo. Los valores son medias de determinaciones duplicadas \pm error estándar. a,b Las letras distintas indican diferencias estadísticas entre BsLI y el control positivo ($p < 0.05$) mediante la prueba de Tukey.

3.2.3 α -glucosidase inhibition

Fig. 2 shows the results of α -glucosidase inhibition. The BsLI had a lower percentage of α -glucosidase inhibition (~19 %) than acarbose (~94 %). Regarding IC_{50} values, BsLI was 4-fold higher than the positive control (Table 2).

3.4 Oral starch tolerance test (OSTT)

Variations in serum-TG onset time and area-under-time-curve (AUC) are depicted in Fig. 3. Both groups treated with acarbose and BsLI showed significantly reduced glucose levels at 60 (above 12 %) and 120 min (above 14 %) in comparison with the control group.

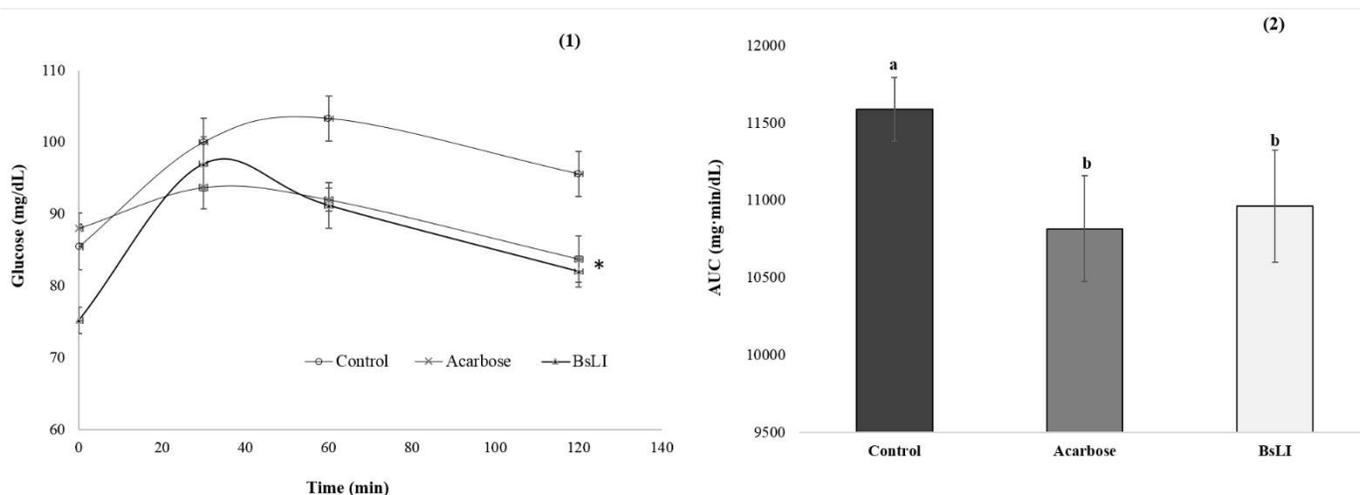


Figure 3. Oral starch tolerance test (OSTT) (1) and Area-under-time-curve (AUC) (2) in rats treated with *Buddleja scordioides* leaves infusion (BsLI). Acarbose was used as a positive control. Values are means of duplicate determinations \pm standard error. (*) indicates statistical differences between study groups, whereas for AUC a,b different letters indicate statistical differences between groups ($p < 0.05$) by Tukey's test.

Figura 3. Prueba de tolerancia oral al almidón (OSTT) Prueba oral de tolerancia al almidón (OSTT) (1) y área bajo la curva de tiempo (AUC) (2) en ratas tratadas con infusión de hojas de *Buddleja scordioides* (BsLI). La acarbosa se utilizó como control positivo. Los valores son medias de determinaciones duplicadas \pm error estándar. (*) indica diferencias estadísticas entre los grupos de estudio, mientras que para AUC a,b letras diferentes indican diferencias estadísticas entre los grupos ($p < 0,05$) por la prueba de Tukey.

3.5 Oral BsLI-bioactive-compounds absorption evaluation (OBAC)

Polyphenols detected in the serum of mice are shown in Fig. 4. Bioactive compounds such as 4-hydroxybenzoic acid, naringenin, eriodictyol, luteolin, quercetin, and coumaric acid were identified in serum mice at different times after BsLI administration. The coumaric acid (13.84 ng/ μ L) and luteolin (16.01 ng/ μ L) exhibited the highest concentration; nevertheless, these levels declined rapidly.

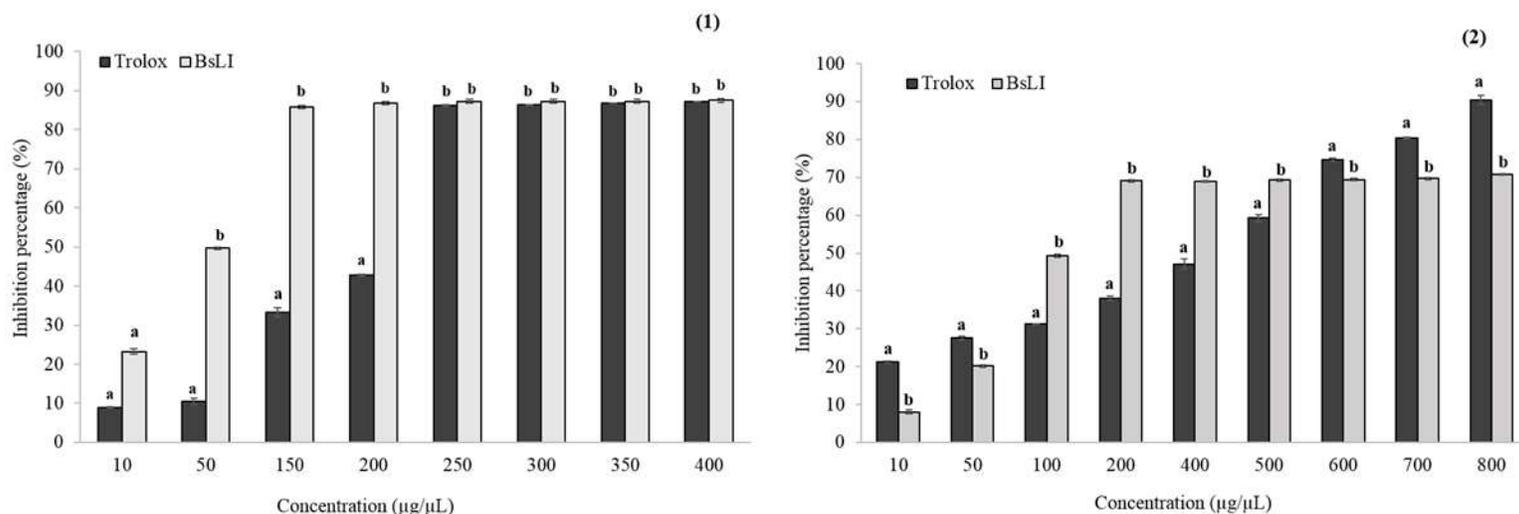


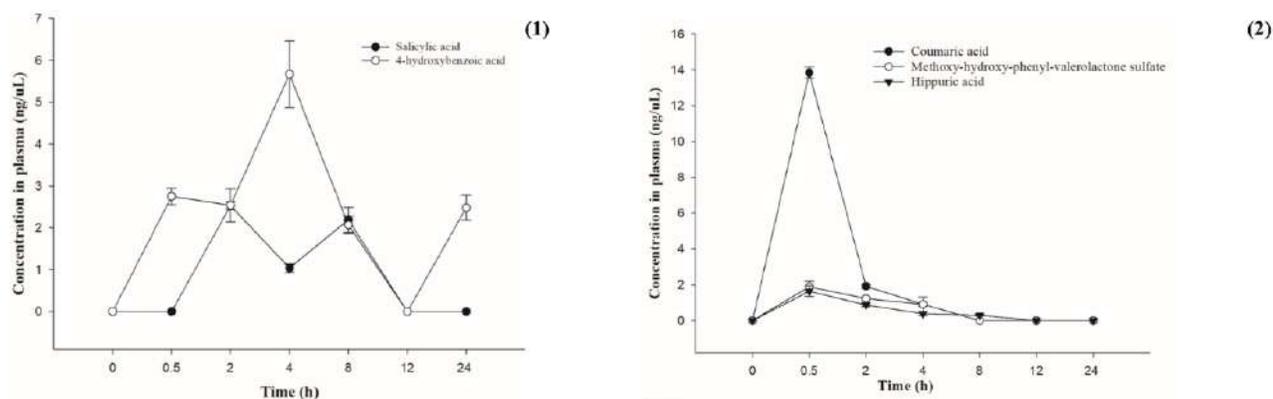
Figure 4. Inhibition percentage of *Buddleja scordioides* leaves infusion (BsLI) on ABTS (1) and DPPH (2) assessment. Trolox was the positive control. Values are means of duplicate determinations \pm standard error. a,b Different letters indicate statistical differences between BsLI and positive control ($p < 0.05$) by Tukey's test.

Figura 4. Porcentaje de inhibición de la infusión de hojas de *Buddleja scordioides* (BsLI) en la evaluación ABTS (1) y DPPH (2). Trolox fue el control positivo. Los valores son medias de determinaciones duplicadas \pm error estándar. a,b Las letras distintas indican diferencias estadísticas entre BsLI y el control positivo ($p < 0.05$) mediante la prueba de Tukey.

3.6 Antioxidant activity of BsLI *in vitro*.

3.6.1 ABTS and DPPH

Antioxidant evaluation of the BsLI by ABTS and DPPH assays is shown in Fig. 5. On one hand, ABTS results, showed that the BsLI had inhibition percentage like Trolox. On other hand, BsLI exhibited a lower inhibition percentage (~70 %) of DPPH radical compared with Trolox (~91 %). There were no significant differences for IC_{50} between the treatments for both, ABTS and DPPH assessment (Table 2).



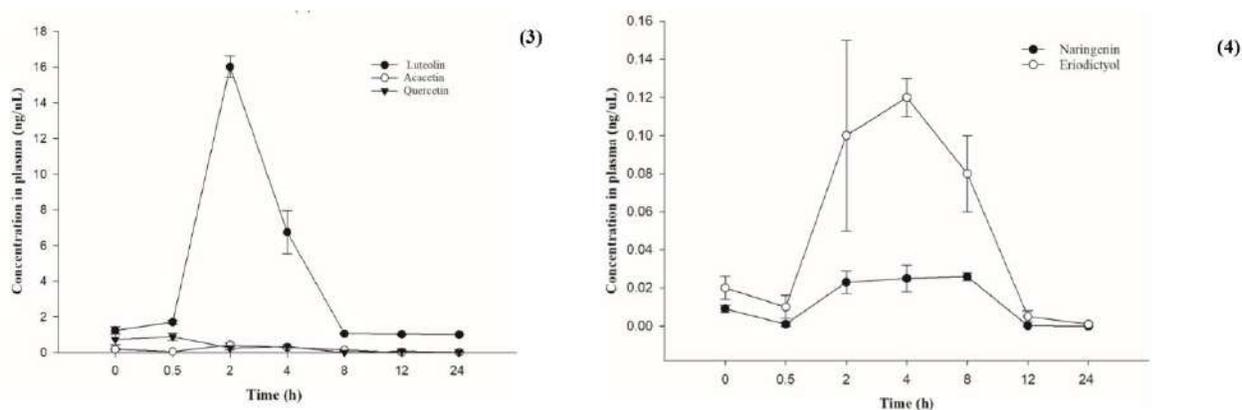


Figure 5. Means of total polyphenols of *Buddleja scordioides* leaves infusion (BsLI) in mice serum: (1) hydroxybenzoic acids, (2) hydroxycinnamic acids, (3) flavones y flavonols, and (4) flavanones. Values are expressed as mean \pm standard error.

Figura 5. Medias de polifenoles totales de la infusión de hojas de *Buddleja scordioides* (BsLI) en suero de ratones: (1) ácidos hidroxibenzoicos, (2) ácidos hidroxicinámicos, (3) flavonas y flavonoles, y (4) flavanonas. Los valores se expresan como media \pm error estándar.

3.7 Acute and sub-chronic toxicity evaluation

A single oral dose of infusion of BsLI (5000 mg/kg of body weight) produced no signs of toxicity (tremors, convulsions, salivation, diarrhea, lethargy, sleepiness, or coma) or mortality after 14 days. No significant difference in body weight gain was observed. No gross pathological abnormalities were observed in both groups. Furthermore, histological analysis of isolated organs showed no abnormal changes (data not shown). Thus, the LD50 value was found to be greater than 5000 mg/kg.

Regarding sub-chronic toxicity evaluation, there were no significant differences between the study groups for body weight, water, and food consumption (data not shown).

Macroscopic analysis of liver, lung, spleen, kidney, and heart exhibited no significant changes in color and texture compared with the control group. Additionally, intervention with BsLI samples at different doses did not affect the weight of organs.

Sub-chronic oral administration BsLI samples at different doses had no significant differences in the urinary biochemical parameters compared with the control group (data not shown). Moreover, treatment with BsLI showed no significant changes in serum concentrations of glucose, liver enzymes, total bilirubin, total protein content, albumin, total cholesterol, HDL-c, LDL-c, and triglycerides in comparison with the controls (Table 3).

Sub-chronic oral administration BsLI samples at different doses exhibited no significant changes on hematological profile compared with the control group (Table 4).

Histological analysis of heart, kidney, liver, spleen, and lung of intervention groups treated with different doses of BsLI (250, 750 y 2500 mg/kg of body weight) revealed no abnormal changes compared with the control group (data not shown).

Our results showed that BsLI decreases carbohydrate absorption *in vivo*, which could be explained by the inhibition of digestive enzymes involved in glucose metabolism. Also, we found an antioxidant activity in these herbal infusions.

Although the BsLI exhibited a lower percentage of lipase inhibition than orlistat, this effect could reduce the absorption of lipids *in vivo*. However further studies to examine the impact of BsLI on lipid metabolism are required.

Regarding carbohydrate digestive enzymes, BsLI showed higher inhibition of α -amylase than acarbose. This effect could be attributed to bioactive compounds present in BsLI such as polyphenols. It has been reported that the hydroxyl groups of these compounds interact with the enzyme active site, allowing the formation of ligands with the catalytic residues of the binding site and, consequently the generation of a conjugated system, resulting in the inactivation of the enzyme (Narita and Inouye, 2009).

On other hand, BsLI had a minimal inhibitory effect on α -glucosidase. This lack of effect could be because we employed *p*-nitrophenyl glucoside as substrate and α -glucosidase from a yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. This test only indicates a general glucosidase activity (Williamson, 2013); therefore, further investigation to determine the effect of BsLI on α -glucosidase inhibition using other substrates such as sucrose and enzyme from other sources (e.g. porcine small intestine) is mandatory.

Our results showed that the BsLI decreases the absorption of starch similarly to acarbose. We attribute this effect to the inhibitory activity of BsLI on α -amylase. Given that the hydrolysis of the polysaccharide to produce limited dextrans, maltose, and maltotriose is catalyzed by α -amylase, inhibition of both salivary and pancreatic α -amylase decreases meal-derived carbohydrate absorption (Robyt *et al.*, 2008).

In the present study, we detected phenolic compounds (quercetin, rutin, luteolin, and phenolic acids) with well-established biological activity (Deng *et al.*, 2020; Sok *et al.*, 2021), which could be responsible for the beneficial effects of BsLI. However, it is important to consider that the biological action of polyphenols depends on their absorption and interaction with target tissues (Silberberg *et al.*, 2006). In this regard, we analyzed the absorption of bioactive compounds of BsLI in serum mice. The main metabolites identified in BsLI were phenolic acids and flavonoids. Additionally, the plasma levels of these compounds suggest relatively rapid absorption, which is partly consistent with previous studies (Liu *et al.*, 2002).

Also, it has been reported that the bioactive compounds contained in this herbal infusion have antioxidant effects (Moretti *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2021). In this line, the results of our study demonstrated that BsLI exhibits antioxidant properties by scavenging free radicals (ABTS and DPPH). It has been suggested that an ideal antidiabetic agent should have antioxidant activity (Mai *et al.*, 2007); thus, in addition to the hypoglycemic action, the BsLI could emerge as a therapeutic alternative for diabetes management.

The toxicological activity of medicinal plants is an important aspect that must be assessed before being recommended as alternative therapies (Nasri, 2013). In this context, we evaluate the acute and chronic toxicological effects of BsLI and our results revealed no signs of toxicity, macroscopic abnormalities, or mortality, suggesting non-toxic effects of these herbal infusions. Usually, the consumption of infusions in Mexican communities is one cup per day at 1 % (m/v) concentration (equivalent to 33 mg/kg of body weight). Interestingly, although we used higher doses (7.5 [250 mg/kg], 22.7 [750 mg/kg] and 75 [2500 mg/kg] times), none of these caused signs of toxicity, damage symptoms or mortality. Additionally, all hematological and biochemical parameters remained within the reference range for CD1 mice (Titlow, 2013) and no significant differences were observed between the study groups. Particularly, it is noteworthy that after treatment with BsLI we found no significant differences in transaminase levels or abnormal changes in liver tissue by histological examination, suggesting that this natural agent does not induce hepatocellular damage. Also, macroscopic and microscopic evaluation of the organs from mice receiving oral administration of BsLI for 28 days at different doses (250, 750, and 2500 mg/kg) revealed normal architecture indicating no detrimental changes or morphological disorders in the sub-chronic toxicity assessment. Hence, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) may be considered for this herbal product. The BsLI could be considered a promising and attractive strategy in the treatment of chronic diseases such as obesity and type II diabetes; however, future clinical studies investigating the effects of these herbal infusions are needed to confirm our findings.

Table 3. Liver function indices of CD-1 mice administrated orally with *Buddleja scordioides* leaves infusion (BsLI) for 28 consecutive days.

Tabla 3. Índices de función hepática de ratones CD-1 administrados por vía oral con infusión de hojas de *Buddleja scordioides* (BsLI) durante 28 días consecutivos.

	Control group	250 (mg/kg)	750 (mg/kg)	2500 (mg/kg)
AST (IU/L)	193.00 ± 6.20 ^a	184.55 ± 11.46 ^a	180.78 ± 13.87 ^a	193.52 ± 19.53 ^a
ALT (IU/L)	65.47 ± 1.85 ^a	59.75 ± 4.17 ^a	49.56 ± 3.16 ^a	49.05 ± 5.70 ^a
Total Protein (g/dL)	4.99 ± 0.06 ^a	5.05 ± 0.06 ^a	5.31 ± 0.05 ^a	5.07 ± 0.10 ^a
Albumin (g/dL)	2.53 ± 0.28 ^a	1.61 ± 0.07 ^a	1.96 ± 0.07 ^a	1.86 ± 0.08 ^a
Total bilirubin (mg/dL)	0.14 ± 0.09 ^a	0.12 ± 0.09 ^a	0.15 ± 0.35 ^a	0.28 ± 0.18 ^a
Total cholesterol (mg/dL)	104.12 ± 1.89 ^a	99.14 ± 3.25 ^a	101.71 ± 2.87 ^a	98.43 ± 1.47 ^a

HDL-c (mg/dL)	58.16 ± 1.64 ^a	62.18 ± 2.23 ^b	59.03 ± 3.29 ^a	58.26 ± 1.53 ^a
LDL-c (mg/dL)	38.85 ± 2.31 ^a	24.22 ± 2.20 ^b	31.46 ± 1.82 ^a	30.73 ± 2.09 ^a
Triglyceride (mg/dL)	59.86 ± 3.13 ^a	69.86 ± 2.68 ^a	68.50 ± 3.83 ^a	77.2 ± 3.23 ^b

ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, HDL-c: high density lipoprotein, and LDL-c: low density lipoprotein. Values are expressed as mean ± standard error. Different letters indicate statistically significant differences between groups * $p \leq 0.05$ significantly different from the control were determined by using one way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests.

Table 4. Effect on hematological parameters of oral administration with infusions of *Buddleja scordioides* leaves infusion (BsLI) for 28 consecutive days.

Tabla 4. Efecto sobre los parámetros hematológicos de la administración oral con infusión de hojas de *Buddleja scordioides* (BsLI) durante 28 días consecutivos.

	Control group	250 (mg/kg)	750 (mg/kg)	2500 (mg/kg)
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9.02 ± 0.19 ^a	8.31 ± 0.26 ^b	9.56 ± 0.14 ^a	8.67 ± 0.17 ^b
Hemoglobin (g/dL)	17.24 ± 0.37 ^b	16.51 ± 3.28 ^a	18.45 ± 0.34 ^a	16.88 ± 0.29 ^a
Hematocrit (%)	46.52 ± 0.98 ^b	44.13 ± 1.26 ^a	49.62 ± 0.90 ^a	44.77 ± 0.79 ^a
MCV (fL)	51.56 ± 0.07 ^a	53.26 ± 0.29 ^a	51.73 ± 0.33 ^a	51.671 ± 0.29 ^a
MCH (pg)	19.10 ± 0.04 ^a	19.93 ± 0.08 ^a	19.24 ± 0.15 ^a	19.50 ± 0.11 ^a
MCHC (g/dL)	37.03 ± 0.06 ^a	37.44 ± 0.13 ^a	37.18 ± 0.08 ^a	37.73 ± 0.13 ^a
Platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1171.66 ± 4.77 ^a	727.85 ± 4.91 ^b	1047.33 ± 3.97 ^a	978.28 ± 4.41 ^a
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	8.26 ± 2.91 ^a	5.68 ± 2.71 ^a	6.26 ± 3.03 ^a	5.20 ± 2.54 ^a
Neutrophils (%)	11.00 ± 0.51 ^b	9.71 ± 0.75 ^b	14.11 ± 0.58 ^a	11.86 ± 0.57 ^a
Eosinophils (%)	0.55 ± 0.11 ^a	0.57 ± 0.16 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.57 ± 0.16 ^a
Basophils (%)	0.00 ± 0.00 ^c	0.14 ± 0.05 ^a	0.11 ± 0.04 ^b	0.14 ± 0.05 ^a
Lymphocytes (%)	87.22 ± 0.49 ^a	86.71 ± 0.93 ^a	83.56 ± 0.59 ^b	85.71 ± 0.43 ^a
Monocytes (%)	1.22 ± 0.12 ^c	2.86 ± 0.30 ^a	2.22 ± 0.90 ^a	1.71 ± 0.15 ^a

RBC: red blood cell, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, WBC: white blood cell. Values are expressed as mean ± standard

error. Different letters indicate statistically significant differences between groups * $p \leq 0.05$ significantly different from the control were determined by using one way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests.

4. Conclusion

The study demonstrates that the infusion of *Buddleja scordioides* (BsLI) exerts inhibitory effects on carbohydrate absorption *in vivo* by targeting digestive enzymes involved in glucose metabolism. Moreover, BsLI exhibits antioxidant properties and contains bioactive compounds, including phenolic acids and flavonoids. The infusion proves to be safe, with no indications of toxicity or adverse effects on organ histology. These findings suggest that BsLI holds promise as a potential therapeutic alternative for managing conditions such as obesity and type II diabetes. However, further clinical studies are necessary to validate these results and explore the full potential of BsLI as a treatment option.

Acknowledgments

This project received support from two grants: TecNM-5557.15-P and Conacyt-INFR, 2015-253333. The author LJBZ is grateful for the graduate scholarship 1165903777 provided by the National Council of Humanities, Sciences and Technologies (CONAHCYT). Additionally, we would like to express our gratitude to Alejo Macías-Salas for his valuable technical support in the histopathologic analysis.

Conflict of Interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

5. References

- Apostolidis, E., Kwon, Y. I. & Shetty, K. 2007. Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8(1): 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.06.001>
- Ardeshirlarijani, E., Namazi, N., B Jalili, R., Saeedi, M., Imanparast, S., Adhami, H. R., Faramarzi, M.A., Ayati, M.H., Mahdavi, M. & Larijani, B. 2019. Potential Anti-obesity effects of some medicinal herb: *In vitro* α -amylase, α -glucosidase and lipase inhibitory activity. *Int. J. Biol. Biomed.* 5(2): 2-8. <http://ibbj.org/article-1-228-en.html>
- Awosika, T. O. & Aluko, R.E. 2019. Inhibition of the *in vitro* activities of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase by yellow field pea (*Pisum sativum L.*) protein hydrolysates. *Int. J. Food Sci.* 54(6): 2021-2034. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14087>

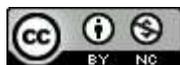
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28(1): 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Coruh, N., Celep, A.S. & Özgökçe, F. 2007. Antioxidant properties of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl., *Chaerophyllum macropodium* Boiss. and *Heracleum persicum* Desf. from *Apiaceae* family used as food in Eastern Anatolia and their inhibitory effects on glutathione-S-transferase. *Food Chem.* 100(3): 1237-1242. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.006>
- Deng, N., Zheng, B., Li, T. & Liu, R.H. 2020. Assessment of the phenolic profiles, hypoglycemic activity, and molecular mechanism of different highland barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Int. J. Mol. Sci.* 21(4): 1175. <https://doi.org/10.3390/ijms21041175>
- Estrada-Zúñiga, M.E., Gutiérrez-Rebolledo, G.A., Nieto-Trujillo, A., Bernabé-Antonio, A. & Sosa, F.C. 2019. *Buddleja* species distributed in Mexico against inflammatory diseases, their therapeutic activities, secondary metabolites and biotechnology. *Adv. Biol. Res.* 5: 78-98. <https://stm1.bookpi.org/index.php/rabr-v5/article/view/375>
- Friedewald, W. T., Levy, R.I. & Fredrickson, D.S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18(6): 499-502. <https://doi.org/10.1093/clinchem/18.6.499>
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., Antunes-Ricardo, M., Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Uribe, J.A. & Heredia, J.B. 2019. Cellular antioxidant activity and *in vitro* inhibition of α -glucosidase, α -amylase and pancreatic lipase of oregano polyphenols under simulated gastrointestinal digestion. *Int. Food Res. J.* 116: 676-686. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.096>
- Gutiérrez-Rebolledo, G.A., Estrada-Zúñiga, M. E., Garduño-Siciliano, L., García-Gutiérrez, G. E., Mora, C.A.R., Calderón-Amador, J. & Cruz-Sosa, F. 2019. *In vivo* anti-arthritis effect and repeated dose toxicity of standardized methanolic extracts of *Buddleja cordata* Kunth (*Scrophulariaceae*) wild plant leaves and cell culture. *J. Ethnopharmacol.* 240: 111875. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111875>
- Hwang, S.M., Lee, Y.J., Kim, E.J., Kim, H.Y., Li, X., Choi, Y.J., Cho, N.G., Lee, H.S. & Kang, D.G. 2009. Effect of *Buddleja officinalis* in Diabetic Atherosclerotic Mouse Model Using High Fat Diet. *Korea J. Herbol.* 24(4): 55-62. <https://doi.org/10.6116/kjh.2009.24.4.055>
- Ironi, E.A., Angola, S.O. & Obligor, I.E. 2018. Inhibitory effects of tropical almond leaf extract on xanthenes oxidase, pancreatic lipase, and angiotensin 1-converting enzyme, *in vitro*. *J. Food Biochem.* 42(4): e12481. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12481>
- Kopp, W. 2019. How western diet and lifestyle drive the pandemic of obesity and civilization diseases. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.: Targets Ther.* 12: 2221-2236. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S216791>
- Liu, Y. & Hu, M. 2002. Absorption and metabolism of flavonoids in the caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model. *Drug Metabolism and Disposition* 30(4): 370-377. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.4.370>
- Lunagariya, N.A., Patel, N.K., Jagtap, S.C. & Bhutani, K.K. 2014. Inhibitors of pancreatic lipase: state of the art and clinical perspectives. *EXCLI J.* 13: 897 -921. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464291/>

- Mai, T.T., Thu, N.N., Tien, P.G. & Van Chuyen, N. 2007. Alpha-glucosidase inhibitory and antioxidant activities of Vietnamese edible plants and their relationships with polyphenol contents. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 53(3): 267-276. <https://doi.org/10.3177/jnsv.53.267>
- McDougall, G.J., Kulkarni, N.N. & Stewart, D. 2009. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity *in vitro*. *Food Chemistry* 115(1): 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.093>
- Moretti, E., Mazzi, L., Terzuoli, G., Bonechi, C., Iacoponi, F., Martini, S., Rossi, C. & Collodel, G. 2012. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reprod. Toxicol.* 34, 651-657. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.10.002>
- Narita, Y. & Inouye, K. 2009. Kinetic analysis and mechanism on the inhibition of chlorogenic acid and its components against porcine pancreas α -amylase isozymes I and II. *J. Agric. Food Chem.* 57(19): 9218-9225. <https://doi.org/10.1021/jf9017383>
- Nasri H. & Shirzad H. 2013. Toxicity and safety of medicinal plants. *J HerbMed. Plarmacol.* 2(2): 21-22. https://www.researchgate.net/publication/285306673_Toxicity_and_safety_of_medicinal_plants
- National Institutes of Health (US). 2002. Office of Laboratory Animal Welfare, United States. Public Health Service. Public Health Service policy on humane care and use of laboratory animals. Office of Laboratory Animal Welfare, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services. <https://grants.nih.gov/grants/olaw/references/phspolicylabanimals.pdf>
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf
- OECD. 2001. Guidelines for Acute Toxicity of Chemicals. Organization for Economic Co-operation and Development No. 420. Published online Paris, France.
- OECD. 2008. Guidelines for Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents Organization for Economic Co-operation and Development No. 407. Published online Paris, France.
- Patil, P., Mandal, S., Tomar, S.K. Anand, S. 2015. Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. *Eur. J. Nutr.* 54, 863-880. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0974-2>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N. 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22, 659-661. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9574LSF>
- Robytt, J.F. 2008. in: Fraser-Ried, B. O., Tatsuta, K., Thiem, J., Cote', G.L., (Eds.), *Glycoscience*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany; 1437-1472.
- Rocha-Guzmán, N. E., Simental-Mendía, L. E., Barragán-Zúñiga, L. J., Ramírez-España, J. C., Gallegos-Infante, J. A., Lujan-Mendoza, C. I., Gamboa-Gómez, C. I. (2018). Effect of *Buddleja*

- scordioides* K. leaves infusion on lipid peroxidation in mice with ultraviolet light-induced oxidative stress. J. Med. Chem. 27, 2379-2385. <https://doi.org/10.1007/s00044-018-2243-4>
- Santos-Cruz, L.F., Ávila-Acevedo, J.G., Ortega-Capitaine, D., Ojeda-Duplancher, J.C., Perdigón-Moya, J.L., Hernández-Portilla, L.B., López-Dionicio, H., Drán-Díaz, A., Dueñas-Gracia, I. E., Castañeda-Partida, L., García-Bores, A. M., Heres-Pulido, M. E. 2012. Verbascoside is not genotoxic in the ST and HB crosses of the *Drosophila* wing spot test, and its constituent, caffeic acid, decreases the spontaneous mutation rate in the ST cross. Food Chem. Toxicol., 50(3-4), 1082-1090. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.006>
- Silberberg, M., Besson, C., Manach, C., Remesy, C., Morand, C. 2006. Influence of dietary antioxidants on polyphenol intestinal absorption and metabolism in rats. J. Agric. Food Chem. 54, 3541-3546. <https://doi.org/10.1021/jf060104e>
- Sok Yen, F., Shu Qin, C., Tan Shi Xuan, S., Jia Ying, P., Yi Le, H., Darmarajan, T., Gunasekaran, B., Salvamani, S. 2021. Hypoglycemic Effects of Plant Flavonoids: A Review. Evid. Based Complement. Alternat Med. 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/2057333>
- Tamil, I.G., Dineshkumar, B., Nandhakumar, M., Senthilkumar, M., Mitra, A. 2010. In vitro study on α -amylase inhibitory activity of an Indian medicinal plant, *Phyllanthus amarus*. Indian J. Pharmacol. 42, 280. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.70107>
- Tian, C., Liu, X., Chang, Y., Wang, R., Lv, T., Cui, C., Liu, M. 2021. Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. S. Afr. J. Bot. 137, 257-264. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.10.022>
- Titlow WB. 2013. Characterization of Toxicological Properties of L-Lysine Polymers in CD-1 Mice. J. Microbiol. Biotechnol. 23, 1015-1022. <https://doi.org/10.4014/jmb.1302.02055>
- VanderJagt, T.J., Ghattas, R., VanderJagt, D.J., Crossey, M., Glew, R.H. 2002, Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. Life Sci. 70, 1035-1040. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01481-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01481-3)
- Villegas-Novoa, C., Moreno-Jiménez, M.R., Rocha-Guzmán, N.E. 2020. Infusión de la planta medicinal *Buddleja scordioides* Kunth utilizada para tratar la inflamación intestinal. CienciaUAT. 14, 21. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v14i2.1287>
- Williamson, G. 2013. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. Mol. Nutr. Food Res. 57, 48-57. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200511>

2023 TECNOCENCIA CHIHUAHUA

Esta obra está bajo la Licencia Creative Commons Atribución No Comercial 4.0 Internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Artículo Científico

Actividad antifúngica de accesiones de maíz (*Zea mays* L.) de grano con presencia de fenoles coloridos

Antifungal activity of corn (*Zea mays* L.) accessions of grain with presence of colored phenols

Yolanda Salinas-Moreno¹, J. Ricardo Resendiz-Valencia², Ramón I. Arteaga-Garibay³, Norma Y. Zacamo-Velázquez^{4*}

¹ Programa de Maíz, Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jal.

² Pasante de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo.

³ Centro Nacional de Recursos Genéticos, Tepatitlán de Morelos, Jal.

⁴ Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de los Altos. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México

*Correspondencia: normita_zave@hotmail.com (Norma Y. Zacamo Velázquez)

DOI: <https://doi.org/10.54167/tch.v17i2.1172>

Recibido: 28 de febrero de 2023; Aceptado: 26 de mayo de 2023

Publicado por la Universidad Autónoma de Chihuahua, a través de la Dirección de Investigación y Posgrado

Resumen

El grano de maíz contiene una elevada cantidad de compuestos fenólicos los cuales poseen diversas actividades biológicas, entre las que se encuentra la actividad antifúngica (AAF). El objetivo del estudio fue determinar la AAF del extracto acetónico del grano de maíz de accesiones con diferentes coloraciones de grano. En el estudio se emplearon 60 accesiones de grano azul morado (AZM), 34 accesiones de grano rojo cereza (RC) y 26 accesiones de grano rojo ladrillo (RL). Se utilizaron las técnicas de microdilución en placa y la prueba de porcentaje de inhibición fúngica para evaluar la AAF de los granos de maíz. Como agente patogénico se empleó una cepa de *Fusarium oxysporum* y el antifúngico comercial Itraconazol como testigo negativo. La prueba de microdilución en placa funcionó como filtro para los extractos de las accesiones, al reducir en 50 % las muestras que se sometieron a la prueba de porcentaje de inhibición, considerada cuantitativa de la AAF. Los extractos de las accesiones de grano AZM presentaron menor AAF que los de los granos RC y RL. Con la prueba de porcentaje de inhibición se comprobó la mayor AAF de los extractos de maíz con grano RC. Ninguno de los extractos superó la AAF del antifúngico comercial Itraconazol. La AAF del grano de maíz está asociada con su color.

Palabras clave: *Zea mays* L., micotoxinas, compuestos fenólicos, prueba de microdilución, prueba de inhibición.

Abstract

The maize grain contains high amounts of phenolic compounds which have various biological activities, including antifungal activity (AFA). The objective of the study was to determine the AFA of the acetone extract of the maize grain from accessions with different grain colors. In the study, 60 accessions of blue purple maize grain (BP), 34 accessions of cherry red grain (CR) and 26 accessions of brick red grain (BR) were used. Microplate dilution techniques and the percentage of fungal inhibition test were applied to assess the AFA of maize grains. A strain of *Fusarium oxysporum* was used as a pathogenic agent and the commercial antifungal Itraconazole was employed as negative control. The plate microdilution test worked as a "sieve" to filter the extracts of the accessions, by reducing by 50 % the samples that were analyzed with the inhibition percentage test, considered quantitative by the AFA. The extracts from the BP grain accessions presented lower AFA than those from the CR and BR grains. With the inhibition percentage test, the highest AFA of the maize extracts with CR grain was verified. None of the extracts outperformed the AFA of commercial antifungal Itraconazole. The AFA of maize grain is associated with its color.

Keywords: *Zea mays* L., micotoxins, phenolic compounds, microdilution test, inhibition test.

1. Introducción

El cultivo de maíz (*Zea mays* L.) es afectado por diferentes enfermedades causadas por hongos. De estos microorganismos, los del género *Fusarium* reciben especial atención, ya que ocasionan daños en raíz, tallo y mazorca, lo que origina pérdidas considerables a los productores de este cereal en diferentes zonas del mundo donde se cultiva (Rivas-Valencia *et al.*, 2011; Gromazdka *et al.*, 2019; Carbas *et al.*, 2021). La pudrición de la mazorca de maíz debido a especies de *Fusarium* ocasiona no solo reducción en la calidad del grano, y pérdidas de rendimiento, sino que las micotoxinas producidas por el hongo representan un problema de salud para el hombre y animales que lo consumen (Ji *et al.*, 2019).

Las plantas producen compuestos fenólicos en sus diferentes estructuras como mecanismo de defensa a factores bióticos y abióticos (Kumar *et al.*, 2020). El maíz es de los cereales que mayor cantidad de compuestos fenólicos (CF) acumulan en sus granos (Adom y Liu, 2002). Los CF presentes en el grano de maíz se integran principalmente por dos grupos que son ácidos fenólicos y flavonoides. El grupo predominante en el grano de maíz es el de los ácidos fenólicos (Salinas-Moreno *et al.*, 2017), con los ácidos ferúlico y p-cumárico como los más abundantes, concentrados particularmente en el pericarpio, aunque el germen alberga también una cantidad relevante de estos compuestos (Das y Singh, 2016; Razgonova *et al.*, 2022).

Los CF poseen múltiples actividades biológicas, de entre las cuales, las más estudiadas son la antioxidante, anticancerígena y anti-infecciosa, por estar implicadas en beneficios a la salud humana. Sin embargo, se ha documentado la actividad de los CF del grano de maíz en la tolerancia a las plagas de almacén (Arnasson *et al.*, 1992), y en trabajos recientes se ha señalado su importancia en la tolerancia a la infestación de los granos por hongos del género *Fusarium* (Pilu *et al.*, 2011; Schöneberg *et al.*, 2018).

México se considera uno de los principales centros de origen y domesticación del maíz, y posee una gran diversidad de esta especie que se halla clasificada en razas, de las que han sido descritas más de

60 (Kato *et al.*, 2009). Al interior de estas razas, se encuentra una gran cantidad de poblaciones de maíz que difieren en distintos aspectos, entre los que se encuentra el color de sus granos. La variación de color desde rosa hasta morado intenso del grano de maíz se debe a la presencia de compuestos tipo antociano (Salinas *et al.*, 1999; Magaña *et al.*, 2020).

Hasta ahora, el grano blanco de maíz es el que más se ha usado en los diferentes estudios sobre participación de los CF en la tolerancia a infecciones por hongos, y poco se sabe sobre el desempeño de los maíces con granos de otros colores sobre estos aspectos. El objetivo del estudio fue determinar la actividad antifúngica de accesiones de maíz con diferentes colores de grano.

2. Materiales y Métodos

2.1 Material vegetal

Se utilizó el grano de accesiones de maíz de colores azul morado (AZM), rojo cereza (RC) y rojo ladrillo (RL) obtenidas de los bancos de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y del Centro de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Los detalles de las razas de las cuales provinieron las accesiones empleadas se muestran en el Cuadro 1.

2.2 Preparación de los extractos del grano de maíz

Se emplearon entre 30 y 35 granos de maíz de cada accesión, los cuales se trituraron ligeramente con ayuda de un martillo, con el cuidado de no aplastar el germen, el cual se cortó en trozos pequeños con ayuda de una navaja. Las muestras trituradas se depositaron en cartuchos de papel que fueron puestos en un extractor Soxhlet para retirar la grasa. Se utilizó éter de petróleo (J.T. Baker; Xalostoc, Estado de México, México) como solvente, y la extracción se realizó por 8 h. Las muestras desengrasadas se dejaron secar durante 15 h en un horno (GRIEVE, modelo LW-201 C; Illinois, EUA) a 37 ± 2 °C para posteriormente molerlas en un molino tipo ciclónico (UDY Corporation, modelo 3010-080p. USA) con malla 0.5 mm. La harina se colocó en viales ámbar y se le midió su contenido de humedad mediante el método 44-15.02 (AACC, 11a edición).

Se pesó 1.0 g de harina base seca, que se depositó en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se agregaron 20 mL del solvente, que fue una solución de acetona /agua /ácido acético 75:24.5:0.5 (v/v/v). Se eligió este solvente porque es el que permite extraer la mayor cantidad de compuestos fenólicos del tipo proantocianidinas (Prior *et al.*, 2010). Las proantocianidinas son de los compuestos fenólicos, los de mayor actividad antifúngica (Ullah *et al.*, 2019). La mezcla se agitó y la boca del matraz se cubrió con Parafilm y se llevó a un baño sonicador (BRANSON, modelo 2510R-MT, EUA) por 15 min. Posteriormente se colocó en un agitador horizontal (New Brunswick, modelo G10; New Brunswick, N.J., EUA) durante 60 min, para luego centrifugarse a 2660 g por 10 min (Hettich Zentrifugen Universal 32, Al). El sobrenadante se recuperó, se filtró con papel Whatman No. 4, se ajustó a un volumen de 20 mL con el solvente de extracción, y se colocó en tubo de vidrio, en congelación hasta su análisis. Los extractos obtenidos de esta manera se emplearon para evaluar la actividad antifúngica.

Como referencias para la actividad antifúngica de los maíces con fenoles coloridos, se utilizaron extractos de dos maíces de grano blanco. Una cruz experimental del programa de maíz del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (cruza 200x201) y una variedad de maíz nativo blanco de la raza Tuxpeño proveniente de Veracruz, cuyos extractos se prepararon de la misma manera que los maíces con pigmentos. La incorporación de estas referencias se realizó para determinar la actividad antifúngica de los compuestos fenólicos no coloridos y se utilizaron únicamente en la prueba de porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico de los extractos.

Cuadro 1. Acciones de razas de maíz con diferente tipo de pigmentación utilizadas en la evaluación de actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum*.

Table 1. Accessions of maize races with different pigmentation used in the evaluation of antifungal activity against *Fusarium oxysporum*.

Color de grano	No. de accesiones	Razas de maíz	
Azul morado	60	Arrocillo amarillo (2), azul (4), Bolita (4), Celaya (2), Chalqueño (1), Conejo (2), Cónico (2), Cónico norteño (2), Elotero de Sinaloa (2), Elotes cónicos (9), Elotes occidentales (9), Mushito (1), Nal-Tel (1), Nal-Tel de altura (1), Negro de Tierra Caliente (1), Olotillo (4), Olotón (2), Reventador (1), Tabloncillo (1), Tepecintle (4), Tuxpeño (5)	
Rojo cereza	34	Bofo (1), Bolita (2), Celaya (1), Cónico (4), Cónico norteño (3), Dulcillo del noroeste (1), Elotes cónicos (6), Elotes occidentales (5), Mushito (1), Olotillo (1), Pepitilla (2), Ratón (1), Tabloncillo (1), Tabloncillo perla (1), Tuxpeño (4)	
Rojo ladrillo	26	Ancho (1), Celaya (1), Complejo serrano de Jalisco (1), Cónico (3), Cónico norteño (1), Dulcillo (2), Dzit Bacal (1), Elotes cónicos (5), Elotes occidentales (3), Nal-Tel (2), Olotillo (1), Olotón (3), Pepitilla (1), Tepecintle (1)	

2.3 Actividad antifúngica

La actividad antifúngica (AAF) de los extractos se evaluó mediante la prueba de microdilución en placa. Esta prueba fue presuntiva de esta actividad. Se aplicó de acuerdo al método de microdilución en placa (Chadha y Kale, 2015) con la adición del compuesto resazurina o Azul de Alamar (AA). El AA es un colorante que, al oxidarse, cambia de color azul a rosa, por efecto del crecimiento del microorganismo. Esta característica se aprovecha para medir de manera indirecta, por el cambio de color que se registra con un espectrofotómetro, el crecimiento del hongo que se utiliza en la evaluación. En este caso se empleó una cepa del hongo *Fusarium oxysporum*.

De cada extracto obtenido en la sección 2.2 se tomaron 5 mL que se evaporaron en un rotavapor (Buchi modelo R-215, Suiza) hasta un volumen aproximado de 1.5 mL. Lo anterior se realizó para remover compuestos del solvente que pudieran tener efectos antimicrobianos como la acetona. Previamente se realizó una prueba con el solvente puro para asegurar que al reducir a 1.5 el volumen inicial de 5 mL de extracto, se eliminaran los residuos tóxicos que pudieran haber quedado. Esta prueba se realizó con el hongo a emplear en el estudio y se comprobó la no inhibición del desarrollo del hongo. El extracto evaporado se ajustó a un volumen de 2 mL con agua destilada, se colocó en tubos eppendorf y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

Se utilizó una cepa del hongo filamentoso *Fusarium oxysporum*, proveniente de la colección de microorganismos del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del INIFAP, cuya identidad es CMCNRG1007, y que está catalogada como virulenta.

2.3.1 Activación de la cepa

Para la activación de la cepa del hongo se utilizó como medio de cultivo caldo papa-dextrosa (CPD) (Dibico) en relación de 20 mL/caja Petri, en la cual se colocó un disco de *F. oxysporum*, conservado a -80 °C en ultracongelador (Thermo, modelo 8607, EUA) donde son resguardados estos microorganismos, y su posterior descongelamiento utilizando baño de agua a 37 °C. Se sembró por medio de impronta para mantener contacto con el medio de cultivo en todo momento. Las cajas se colocaron en incubadora a 30 °C ± 2° por una semana.

2.3.2 Preparación del inóculo fúngico

La preparación del inóculo se basó en el método del documento M38-P del Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS, 2002), donde se describen los parámetros para ensayar las actividades antifúngica y fungistáticas (MIC'S, por sus siglas en inglés) en hongos filamentosos. De la cepa de *F. oxysporum* activada se tomó con asa micológica un explante cuadrado de 5 cm del hongo desarrollado y se colocó en un matraz Erlenmeyer con 150 mL de CPD estéril. En el matraz se instaló un tapón de algodón para el ingreso de oxígeno y se incubó a 30 °C en una estufa (Techne, modelo TSI500, RU) durante dos días y con movimientos circulares suaves (120 rpm).

Luego se cribó sobre un vaso de precipitado utilizando una gasa estéril lo que propició una suspensión de conidios libre de hifas. La concentración final de conidios se ajustó a 2×10^5 UFC/mL,

con el empleo de una cámara Neubauer, de acuerdo con la metodología para conteo celular de Bastidas (2013).

2.3.3 Inhibición del crecimiento fúngico mediante el ensayo de microdilución con azul de alamar

Se empleó el compuesto resazurina o AA como indicador indirecto del crecimiento fúngico, al ocurrir una reacción de óxido-reducción entre este compuesto y las células del hongo. La resazurina es un compuesto inocuo permeable a las células y de color azul. Al entrar en las células, la resazurina se reduce a resorufina, que funciona como un aceptor artificial de electrones en la cadena de transporte electrónico, que produce fluorescencia roja muy brillante o rosa. Las células viables realizan esta reacción, generando así una medida cuantitativa de la viabilidad o citotoxicidad (Chadha y Kale, 2015).

El ensayo se llevó a cabo colocando 50 μL de la suspensión de conidios en cada pocillo de la microplaca, para luego añadir 50 μL del extracto a evaluar. En el caso del testigo positivo se utilizaron 50 μL de la suspensión de conidios. Para el testigo negativo, se utilizaron 50 μL de concentraciones del antifúngico comercial Itraconazol (5, 10, 20, 40, 80 y 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$), disuelto en CPD, con el fin de establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos probados frente al hongo. El itraconazol es un antifúngico usado contra hongos filamentosos (Chadha y Kale, 2015). Cada muestra, incluyendo los testigos positivo y negativo se evaluaron por triplicado. Se realizó una prueba de control de esterilidad de la placa, para lo cual se colocaron 100 μL de CPD en 4 pocillos de la placa. Tanto la placa de control de esterilidad como la que contenía los ensayos de los extractos se sellaron con Parafilm y se colocaron en una incubadora (Binde, modelo BF115, aronTuttlingen, Alemania) a 30°C durante 24 h. Ya que el ensayo es rápido, se logró analizar un elevado número de muestras por día. La Fig. 1 ilustra la forma de preparación de ensayos y testigos, así como la prueba de esterilidad.

Después de la primera incubación, se añadieron 10 μL del reactivo Azul de Alamar (Thermofisher, EUA), en cada pocillo de la placa. Se realizó una segunda incubación a 37 °C durante 4 h al interior de un espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO (Thermofisher modelo 1510, Finlandia). Al concluir esta segunda incubación, se realizó la lectura de la absorbancia de los pocillos de la placa a una longitud de onda de 570 nm.

Se calculó el promedio de las tres lecturas de absorbancia de cada extracto, así como el promedio de todos los extractos para obtener la media poblacional. Como punto de corte positivo o superior se definió la absorbancia media de la fila de pocillos con la solución de conidios y CPD (testigo positivo). La absorbancia promedio a la cual ya no se observó crecimiento del hongo o cambio en el color del pocillo, fue definida como punto de corte inferior o control negativo.

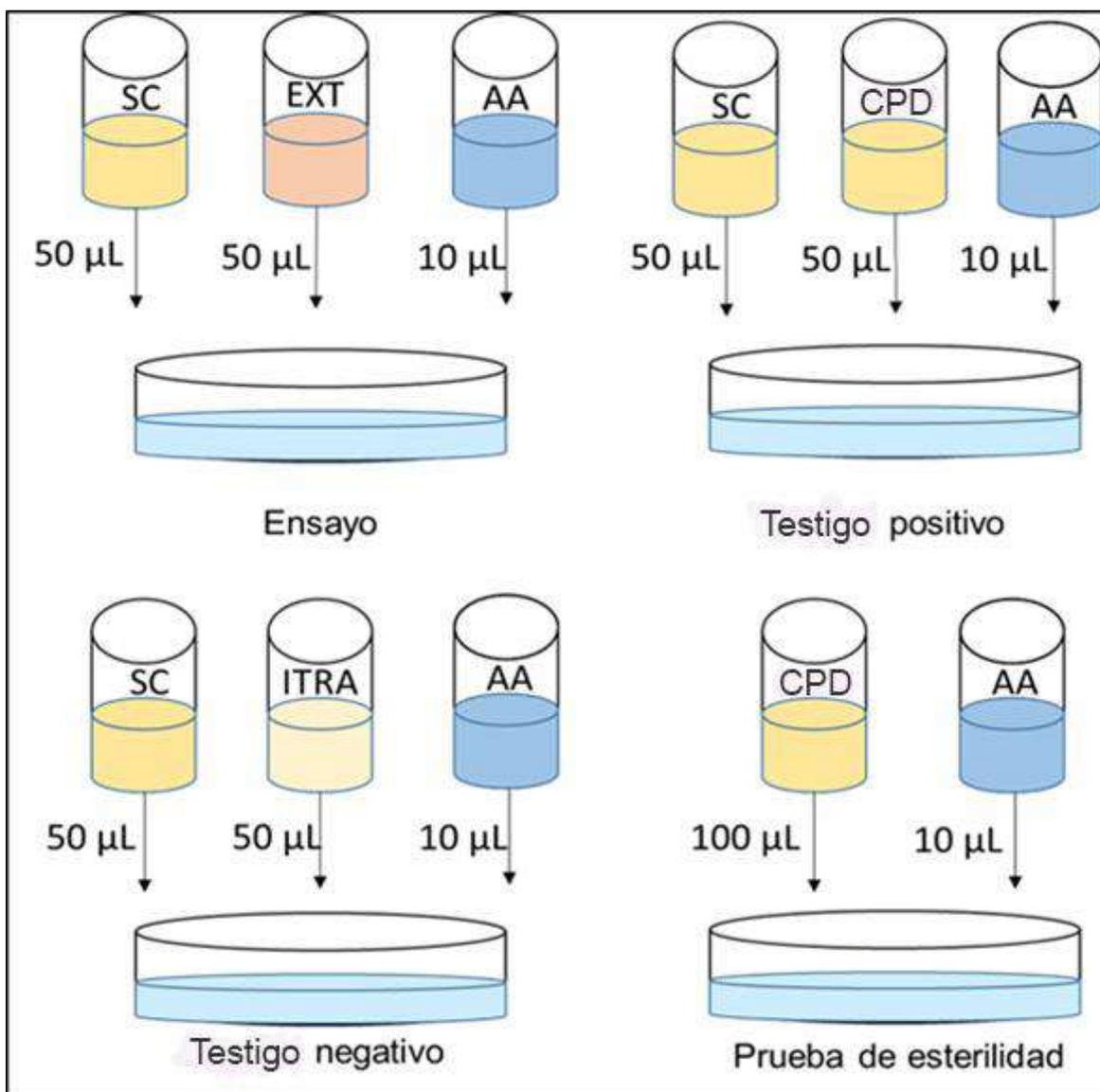


Figura 1. Esquema de preparación de muestras y testigos, así como de la prueba de esterilidad en la implementación de la técnica de microdilución en placa. SC: Suspensión de conidios (2×10^5 UFC/mL); EXT: Extracto del grano de maíz; AA: Azul de alamar; CPD: caldo papa-dextrosa; ITRA: Itraconazol diluido en CPD ($20 \mu\text{g/mL}$).

Figure 1. Scheme of the preparation of samples and controls as well as the sterility test in the implementation of the microdilution plate technique for each of the tested forms SC: Conidia suspension (2×10^5 CFU/mL); EXT: Acetone extract of corn grain; AA: Alamar blue; CPD: potato-dextrose broth; ITRA: Itraconazole diluted in CPD ($20 \mu\text{g/mL}$).

2.4 Prueba de porcentaje de inhibición fúngica

Esta prueba se basa en la evaluación del crecimiento micelial radial del hongo en CPD en cajas Petri. Al medio esterilizado y antes de que solidifique, se le agrega una alícuota conocida del extracto

a evaluar. Volúmenes de 10 mL de CPD se depositaron en tubos de ensayo de 13X16 mm y se esterilizaron en autoclave.

Una vez enfriados los tubos (35-40°C) y bajo condiciones asépticas (en campana de flujo laminar), se agregó una alícuota de 500 µL del extracto a evaluar, se agitó y se vertió en caja Petri para su solidificación. Luego, se colocó un explante cuadrangular (0.5x0.5 cm) del crecimiento del hongo realizado previamente en caja Petri por siete días, en el centro de ésta. De manera paralela se prepararon los testigos positivo y negativo. Como testigo positivo se consideró al tubo con CPD sin la agregación del extracto, y el negativo consistió en agregar al tubo 500 µL del Itraconazol a una concentración de 20 µg/mL (ppm), que fue la concentración mínima inhibitoria determinada para el hongo previamente. Las cajas con los explantes del hongo se incubaron a 30 °C ± 2 en oscuridad. La incubación se prolongó hasta que el testigo positivo mostró un crecimiento del hongo tal que cubrió toda la superficie de la caja, condición que se alcanzó aproximadamente a los siete días. Cada extracto se evaluó por duplicado.

Se midió el diámetro de crecimiento en dos direcciones opuestas del desarrollo micelial con un vernier. El valor promedio de estas lecturas se relacionó con el diámetro de la caja del testigo positivo (Ochoa *et al.*, 2012).

Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo por medio de la Ecuación (1).

$$\text{Porcentaje de inhibición (PI)} = \left(\frac{CMP - CMT}{CMP} \right) (100) \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde: CMP= crecimiento micelial del testigo positivo; CMT= crecimiento micelial del tratamiento

3. Resultados y discusión

3.1 Inhibición del crecimiento fúngico mediante el ensayo de microdilución con Azul de alamar

En la Fig. 2 se muestra el desarrollo de los conidios con los extractos del grano de tres accesiones una vez concluida la prueba de microdilución, así como la diferencia en el color de cada pocillo. La actividad antifúngica del extracto de la accesión 156 fue elevada al impedir el crecimiento del hongo y con ello disminuir la oxidación del colorante. El extracto 114 permitió el desarrollo del hongo, el cual oxidó el colorante cambiando el color del pocillo de azul a rosa.

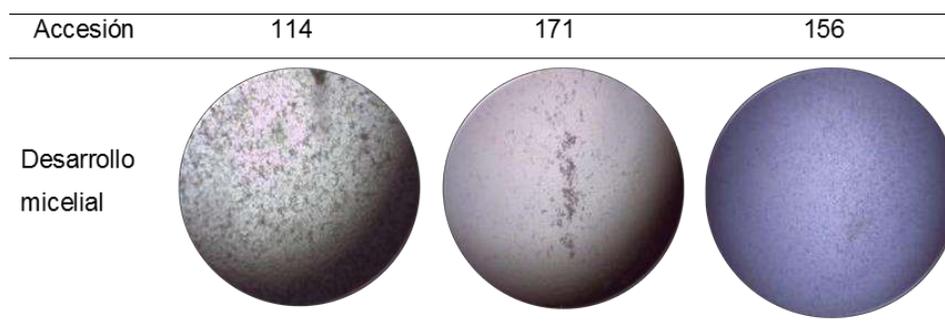


Figura 2. Desarrollo micelial del hongo *F. oxysporum* en los pocillos de la microplaca para diferentes accesiones de grano azul morado, durante el desarrollo de la prueba de microdilución en placa con Azul de alamar.

Figure 2. Mycelial development of the fungus *F. oxysporum* in the wells of the microplate for different accessions of purple blue grain, during the development of the microdilution plate test with Alamar blue.

3.1.1 Accesiones de grano azul morado

De las 60 accesiones con color de grano azul morado evaluadas con la técnica de microdilución en placa para el hongo *F. oxysporum*, solamente 30 presentaron absorbancias por debajo del punto de corte (Figs. 3 A y B) que se estableció en 0.142; las muestras que mostraron valores menores de absorbancia, se consideraron como candidatas para someterlas a la prueba de inhibición. El testigo negativo (Itraconazol), a su concentración mínima inhibitoria (20 µg/mL) obtuvo una absorbancia de 0.135; el testigo positivo de la cepa de *F. oxysporum* mostró una absorbancia de 0.189. Los valores de absorbancia obtenidos para las accesiones variaron en un intervalo de 0.130 a 0.166. EL extracto de la accesión 102, perteneciente a la raza Olotillo fue la que obtuvo el menor valor de absorbancia. Esto significa que mostró un elevado efecto inhibitorio sobre el desarrollo de los conidios del hongo, lo que provocó menor oxidación de la resazurina al haber menos células para oxidar al compuesto. Así mismo, la accesión 31, de la raza Elotes Occidentales, con un valor de absorbancia de 0.166 fue la de menor efecto inhibitorio sobre el desarrollo de los conidios.

La respuesta diferencial del crecimiento del hongo a los extractos denota diferencias en la composición química de éstos. El grano de maíz posee compuestos fenólicos diversos, entre los cuales los más abundantes son los ácidos fenólicos (Salinas-Moreno *et al.*, 2017), con predominancia de ferúlico, p-coumárico y gálico (Libron *et al.*, 2021). La toxicidad de cada ácido fenólico difiere según la especie de *Fusarium* de que se trate, pero en general, los ácidos ferúlico y p-coumárico exhiben alta actividad antifúngica (Ferruz *et al.*, 2016).

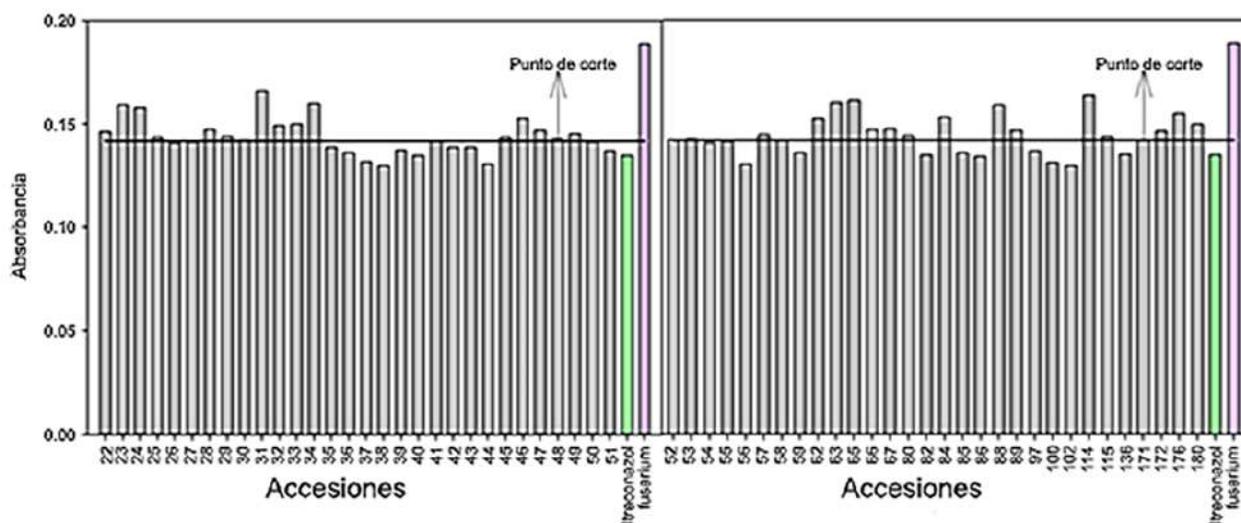


Figura 3. Valores de absorbancia y punto de corte de las accesiones de maíz con grano azul morado de la prueba de inhibición del crecimiento mediante ensayo de microdilución en placa.

Figure 3. Absorbance values and cut-off point of maize accessions with blue-purple kernels from the growth inhibition test using the microdilution plate assay.

Otros compuestos fenólicos presentes en maíces con pigmentos antociano son las antocianinas y flavonoides del tipo flavanoles y flavan 3-ols. Estos últimos cuando se presentan en forma de oligómeros se denominan proantocianinas (Hümmer y Schreier, 2008).

Las proantocianidinas (PAs) derivan de la catálisis de la antocianidin reductasa, y se consideran metabolitos secundarios que regulan la síntesis río abajo de los flavonoides, particularmente antocianinas, por lo que en tejidos que acumulan gran cantidad de estos pigmentos se encuentran en menor proporción (Han *et al.*, 2012). Estos flavonoides (PAs) tienen una participación definitiva en la tolerancia de cultivares de algodón (*Gossypium spp.*) a *Fusarium oxysporum* Schlecht. (Su *et al.*, 2022), o de pepino (*Cucumis sativus* L.) a *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (Li *et al.*, 2022).

3.1.2 Accesiones de grano rojo cereza

De las accesiones con color de grano rojo cereza, 70.6 % presentaron valores de absorbancia por debajo del punto de corte. Las que mostraron valores extremos en absorbancia fueron la 21 perteneciente a la raza Cónico, con 0.130, y la accesión 208 de la raza Elotes Occidentales la cual tuvo un valor de absorbancia de 0.161 (Fig. 4A). Los maíces de grano rojo cereza presentan menor contenido de antocianinas que los de grano azul morado (Salinas *et al.*, 1999), pero es posible que posean mayor contenido de proantocianidinas (PAs), lo que explicaría su mayor AAF

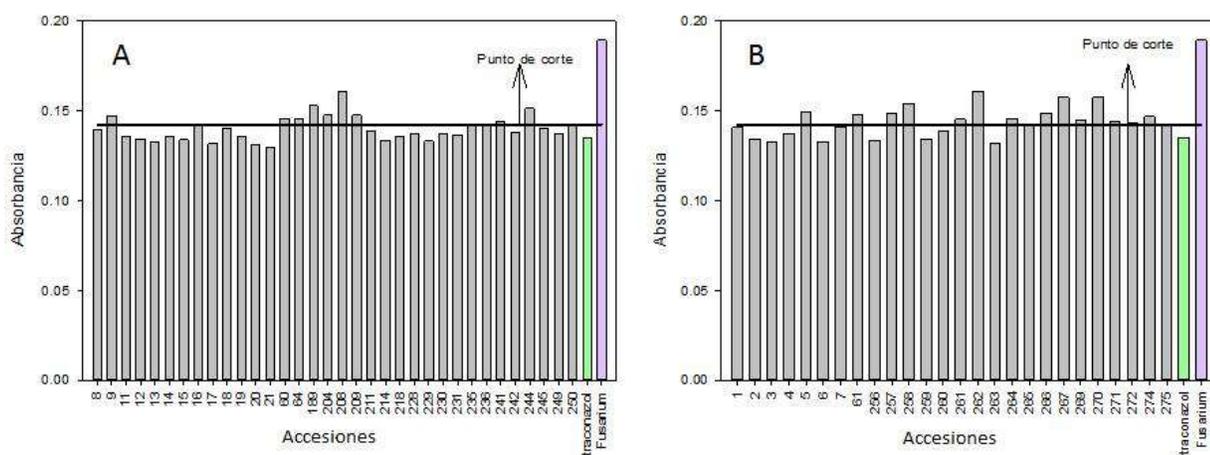


Figura 4. Valores de absorbancia y punto de corte de las accesiones de maíz con grano rojo cereza (A) y rojo ladrillo (B) de la prueba de microdilución en placa.

Figure 4. Absorbance values and cut-off point of cherry red (A) and brick red (B) maize accessions from the microdilution plate test.

3.1.3 Accesiones de grano rojo ladrillo

El porcentaje de accesiones con grano rojo ladrillo cuyos extractos mostraron valores de absorbancia por debajo del punto de corte fue 34.6, que es un valor inferior al de las accesiones con grano azul morado (Fig. 3) y rojo cereza (Fig. 4A).

3.2 Prueba de porcentaje de inhibición fúngica

Las pruebas de microdilución en placa y prueba de inhibición están relacionadas de manera negativa. Un bajo valor de absorbancia en la prueba de microdilución debería asociarse con un elevado porcentaje de inhibición. Sin embargo, esta relación no fue contundente entre las muestras analizadas, debido a que la prueba de microdilución es presuntiva. De acuerdo con la Fig. 5, la accesión 8, con un valor de absorbancia muy cercano al punto de corte (0.141) mostró un valor de inhibición de 22 %, en tanto que la accesión 218 con una absorbancia de 0.131 presentó un porcentaje de inhibición de 41.3. Es posible también que la lectura de absorbancia a 570 nm usada como indicador del crecimiento celular no haya sido lo suficientemente sensible para esta actividad biológica. Lo ideal es medir en lugar de absorbancia, la fluorescencia del pocillo. Sin embargo, disponer de un fluorómetro es mucho menos factible que disponer de un espectrofotómetro, por cuestiones del costo de un equipo y otro.

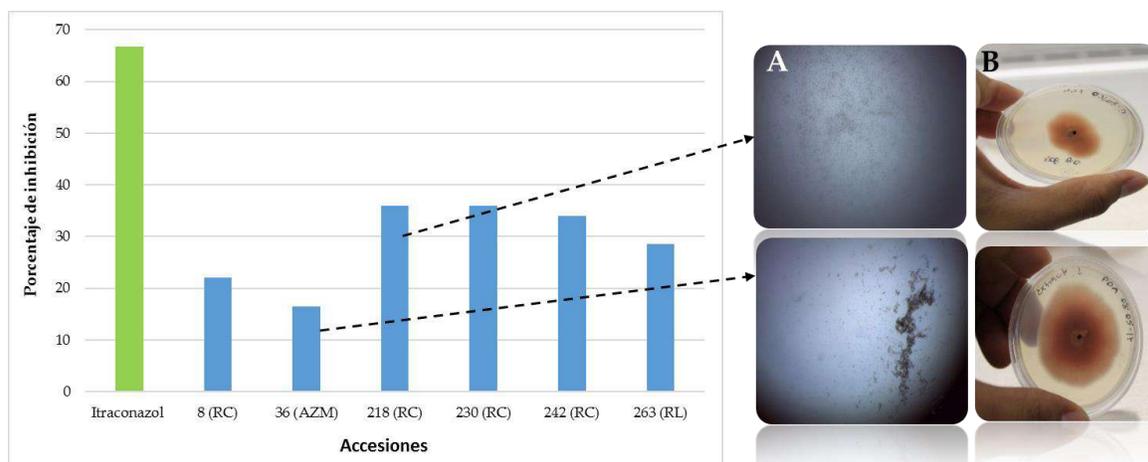


Figura 5. Relación entre las pruebas de microdilución en placa (A) y % de inhibición de crecimiento del hongo (B) en extractos de accesiones de grano de maíz con diferentes colores. RC: rojo cereza, AZM: azul morado, RL: rojo ladrillo.

Figure 5. Relationship between plate microdilution tests (A) and and percentage of fungal growth inhibition (B) in extracts from accessions of maize grains with different colors. colors. CR: cherry red, BP: blue purple, BR: brick red.

3.2.1 Accesiones de grano azul morado

En las 30 accesiones de maíz con grano de color azul morado evaluadas mediante la prueba de PI, se observó una variación de 16.5 a 49.0 %. El tratamiento con el Itraconazol mostró valores de PI arriba de 60 % (Fig. 6A). Los maíces de grano blanco presentaron valores de PI entre 5 y 8 %, que se ubican muy por debajo de los observados en los maíces de grano azul morado, lo que demuestra que el grano de maíz con esta coloración posee compuestos fenólicos con mayor AAF.

La accesión que presentó el mayor PI fue la 50, que pertenece a la raza Elotes Occidentales. Esta accesión se ubicó 14 puntos porcentuales debajo del antifúngico comercial Itraconazol empleado a 20µg/mL que fue la concentración mínima inhibitoria; la accesión 36, de la raza Bolita presentó el menor porcentaje de inhibición de todas las accesiones con este color de grano. Las accesiones de grano azul morado presentaron un porcentaje promedio de inhibición de 27.8 % y un coeficiente de variación de 30.21 %.

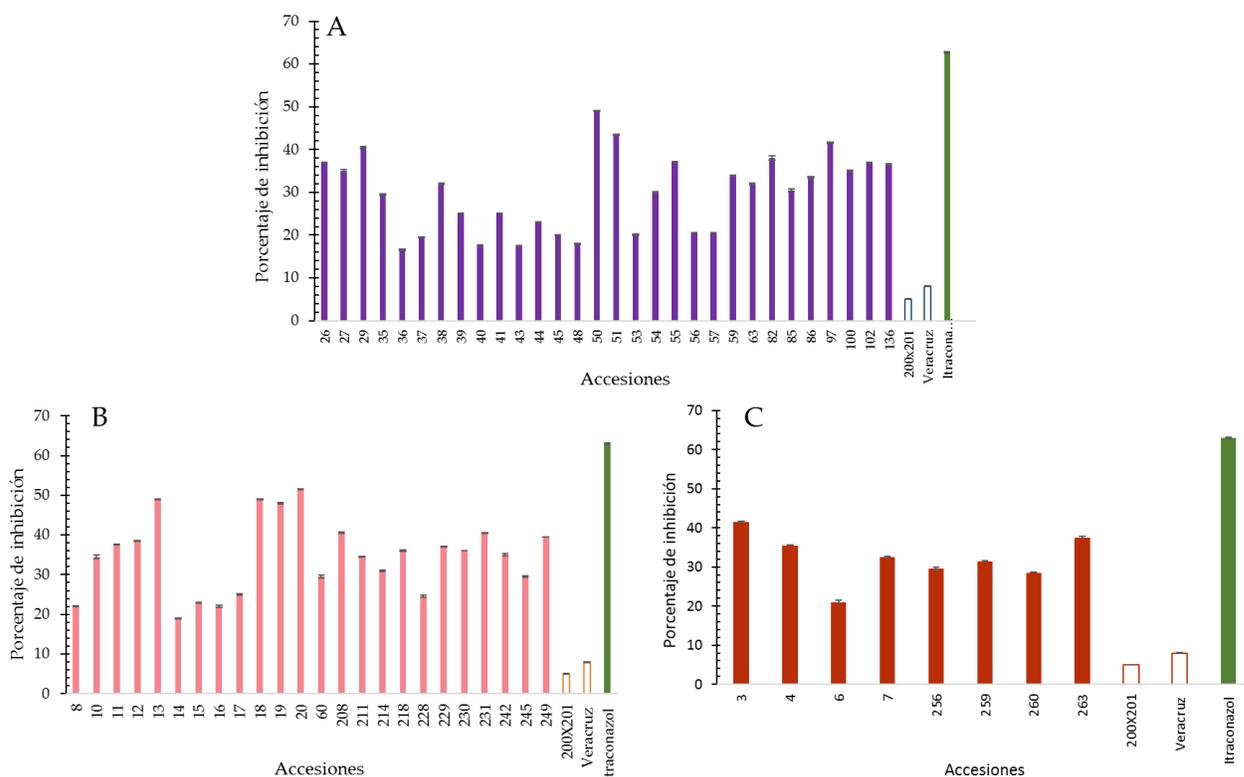


Figura 6. Porcentaje de inhibición de las accesiones de maíz con color de grano azul morado (A), rojo cereza (B) y rojo ladrillo (C) seleccionadas mediante la prueba de microdilución en placa.

Figure 6. Percentage inhibition of maize accessions with purple blue (A), cherry red (B) and brick red (C) kernel color selected by the microdilution plate test.

3.2.2 Accesiones de grano rojo cereza

El porcentaje de inhibición de las accesiones de grano de maíz color rojo cereza varió de 19 a 51.5 % (Fig. 6B), la accesión 20, de la raza Cónico fue la que mayor PI mostró (51.5 %), por lo que puede decirse que fue la de mayor AAF; el PI de esta accesión se ubicó 11.5 puntos porcentuales por debajo del antifúngico comercial (Itraconazol). La accesión 14, de la raza Elotes Cónicos fue la que presentó menor AAF, con un PI de 19 %.

El valor medio del PI para este color de grano fue de 34.69 %, con un coeficiente de variación de 26.62. Este valor promedio de PI fue mayor que el observado en las accesiones de grano color azul morado.

3.2.3 Accesiones de grano rojo ladrillo

Los resultados de PI entre las accesiones con esta coloración de grano variaron entre 21 y 41.5 %. La accesión 3 presentó el mayor PI y pertenece a la raza Olotón; el menor PI lo presentó la accesión 6 que proviene de la raza Dulce (Fig. 6C). El valor medio de PI entre las accesiones de grano RL fue 31.17 %, valor que resulta mayor que el promedio de las accesiones AZM, pero menor al observado en las accesiones con grano RC.

4. Conclusiones

El grano de las accesiones de maíz con coloraciones azul morado, rojo cereza y rojo ladrillo posee actividad antifúngica asociada con el color del grano. De los tres colores de grano analizados, las accesiones que presentaron el mayor porcentaje de inhibición fueron las de grano color rojo cereza, seguidas por las de grano rojo ladrillo y por último las de grano azul morado. Aunque en la prueba de microdilución algunos de los extractos evaluados presentaron valores de absorbancia menores que el Itraconazol, lo que podría significar una elevada actividad antifúngica, en la prueba de inhibición ninguna de las accesiones igualó el porcentaje de inhibición mostrado por el Itraconazol. Son necesarios estudios sobre la composición fenólica de los extractos analizados para determinar los compuestos fenólicos involucrados en la actividad antifúngica del grano de maíz.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) por el apoyo parcial para realizar el presente estudio a través del proyecto de clave NE014.

Conflicto de intereses

Los autores reportan no tener conflicto de intereses para la publicación de estos resultados

5. Referencias

- Adom, K. K. & Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(21): 6182-6187. <https://doi.org/10.1021/jf0205099>
- Arnason, J. T., Gale, J., Conilh De Beyssac, B., Sen, A., Miller, S. S., Philogene, B. J. R., Lambert, J. D. H., Fulcher, R. G., Serratos, A. & Mihm, J. (1992). Role of phenolics in resistance of maize grain to the stored grain insects, *Prostephanus truncatus* (Horn) and *Sitophilus zeamais* (Motsch). *Journal of Stored Products Research* 28(2), 119-126. [https://doi.org/10.1016/0022-474X\(92\)90019-M](https://doi.org/10.1016/0022-474X(92)90019-M)
- Bastidas, O. (2013). Cell counting with Neubauer chamber, basic hemocytometer usage. *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*, 1-6
- Carbas, B., Simões, D., Soares, A., Freitas, A., Ferreira, B., Carvalho, A. R. F., Sanches-Silva, A., Pinto, T., Diogo, E., Andrade, E. & Brites, C. (2021). Occurrence of *Fusarium* spp. in maize grain harvested in Portugal and accumulation of related mycotoxins during storage. *Foods*, 10(2): 375. <https://doi.org/10.3390/foods10020375>
- Chadha, S. & Kale, S. P. (2015). Simple fluorescence-based high throughput cell viability assay for filamentous fungi. *Letters in applied microbiology* 61(3);, 238-244. <https://doi.org/10.1111/lam.12460>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009) Zone diameter interpretive standards and corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretive breakpoints, and quality

- control limits for antifungal disk susceptibility testing of yeasts; *Informational supplement. CLSI document M44-S2*
- Das, A. K. & Singh, V. (2016). Antioxidative free and bound phenolic constituents in botanical fractions of Indian specialty maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Food Chemistry* 201: 298-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.099>
- Ferruz, E., Loran, S., Herrera, M., Gimenez, I., Bervis, N., Barcena, C., Carramiñana, J. J., Juan, T., Herrera, A. & Ariño, A. (2016). Inhibition of *Fusarium* growth and mycotoxin production in culture medium and in maize kernels by natural phenolic acids. *Journal of food protection* 79(10): 1753-1758. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-563>
- Gromadzka, K., Błaszczuk, L., Chełkowski, J. & Waśkiewicz, A. (2019). Occurrence of mycotoxigenic *Fusarium* species and competitive fungi on preharvest maize ear rot in Poland. *Toxins* 11(4): 224. <https://doi.org/10.3390/toxins11040224>
- Han, Y., Vimolmangkang, S., Soria-Guerra, R. E. & Korban, S. S. (2012). Introduction of apple ANR genes into tobacco inhibits expression of both CHI and DFR genes in flowers, leading to loss of anthocyanin. *Journal of Experimental Botany* 63(7): 2437-2447. <https://doi.org/10.1093/jxb/err415>
- Hümmer, W. & Schreier, P. (2008). Analysis of proanthocyanidins. *Molecular Nutrition & Food Research* 52(12): 1381-1398. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700463>
- Ji, F., He, D., Olaniran, A. O., Mokoena, M. P., Xu, J. & Shi, J. (2019). Occurrence, toxicity, production and detection of *Fusarium* mycotoxin: A review. *Food Production, Processing and Nutrition* 1(6): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s43014-019-0007-2>
- Kato, T. A., Mapes, C., Mera, L. M., Serratos, J. A. & Bye, R. A. (2009). Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. *Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, DF*, 116. https://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/versiones_digitales/Origen_deMaiz.pdf
- Kumar, S., Abedin, M., Singh, A. K. & Das, S. (2020). Role of phenolic compounds in plant-defensive mechanisms. In: Lone, R., Shuab, R., Kamili, A. (Eds). *Plant phenolics in sustainable agriculture* pp. 517-532. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4890-1_22
- Li, J., Luan, Q., Han, J., Chen, C. & Ren, Z. (2022). CsMYB60 Confers Enhanced Resistance to *Fusarium solani* by Increasing Proanthocyanidin Biosynthesis in Cucumber. *Phytopathology*® 112(3): 588-594. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-21-0223-R>
- Libron, J. A. M. A., Cardona, D. E. M., Mateo, J. M. C., Beltran, A. K. M., Tuaño, A. P. P. & Laude, T. P. (2021). Nutritional properties and phenolic acid profile of selected Philippine pigmented maize with high antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis* 101: 103954. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103954>
- Magaña, J. M., Peniche, H. A., Tiessen, A. & Gurrola, C. M. (2020). Pigmented maize (*Zea mays* L.) contains anthocyanins with potential therapeutic action against oxidative stress-A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 70(2): 85-99. <https://doi.org/10.31883/pjfn/113272>
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard document M38-A. *Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa*
- Ochoa, Y. M., Cerna, E., Landeros, J., Hernández, S. & Delgado, J. C. (2012). Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. *Phyton (Buenos Aires)* 81(1): 69-73. <https://bit.ly/3WI2cOB>

- Pilu, R., Cassani, E., Sirizzotti, A., Petroni, K. & Tonelli, C. (2011). Effect of flavonoid pigments on the accumulation of fumonisin B1 in the maize kernel. *Journal of Applied Genetics* 52: 145–52. <https://doi.org/10.1007/s13353-010-0014-0>
- Prior, L. R, Fan, E., Ji, H., Howell, A., Nio, C., Payne, M.J. & Reed, J. (2010). Multi-Laboratory validation of a standard method for quantifying pranthocyanidins in cranberry powders. *J Sci Food Agric.* 90(9): 1473-1478. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3966>
- Razgonova, M., Zinchenko, Y., Pikula, K., Tekutyeva, L., Son, O., Zakharenko, A., Kalenik, T. & Golokhvast, K. (2022). Spatial Distribution of Polyphenolic Compounds in Corn Grains (*Zea mays* L. var. Pioneer) Studied by Laser Confocal Microscopy and High-Resolution Mass Spectrometry. *Plants* 11(5): 630. <https://doi.org/10.3390/plants11050630>
- Rivas-Valencia, P., Virgen-Vargas, J., Rojas Martínez, I., Cano Salgado, A. & Ayala Escobar, V. (2011). Evaluación de pudrición de mazorca de híbridos de maíz en Valles Altos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(6): 845-854. <https://doi.org/10.29312/remexca.v2i6.1565>
- Salinas, M. Y., Soto, H. M., Martínez, B. F., González, H. V., & Ortega, P. R. (1999). Análisis de antocianinas en maíces de grano azul y rojo provenientes de cuatro razas. *Rev. Fitotecnia Mexicana* 22(2), 161-174. <https://bit.ly/3oCcT8X>
- Salinas-Moreno, Y., García-Salinas, C., Ramírez-Díaz, J. L. & Alemán-de la Torre, I. (2017). Phenolic compounds in maize grains and its nixtamalized products. In: *Marcos Soto-Hernandez, Mariana Palma-Tenango and Maria del Rosario Garcia-Mateos (Eds.) Phenolic compounds - Natural Sources, Importance and Applications.* pp. 215-232. IntechOpen <https://doi.org/10.5772/66893>
- Schöneberg, T., Kibler, K., Sulyok, M., Musa, T., Bucheli, T. D., Mascher, F., Bertossa, M., Voegelé, R. T. & Vogelgsang, S. (2018). Can plant phenolic compounds reduce *Fusarium* growth and mycotoxin production in cereals? *Food Additives & Contaminants: Part A*,35(12): 2455-2470. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1538570>
- Su, X., Zhao, J., Gao, W., Zu, Q., Chen, Q., Li, C., & Qu, Y. (2022). Gb_ANR-47 Enhances the Resistance of *Gossypium barbadense* to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (FOV) by Regulating the Content of Proanthocyanidins. *Plants* 11(15): 1902. <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/15/1902#>
- Ullah, C., Unsicker, S.B., Reichelt, M., Gershenzon, J. & Hammerbacher, A. (2019). Accumulation of catechin and proanthocyanidins in black poplar stems after infection by *Plectosphaerella populi*: Hormonal regulation, biosynthesis and antifungal activity. *Front Plant Sci.*, 10: 1441. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01441>

2023 TECNOCENCIA CHIHUAHUA

Esta obra está bajo la Licencia Creative Commons Atribución No Comercial 4.0 Internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Artículo de Divulgación

Valorización de la biomasa por medio de catálisis homogénea

Biomass valorization by homogeneous catalysis

Diego Roa¹, Alma Arévalo¹ y Juventino J. García^{1*}

¹ Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito interior, Ciudad Universitaria. CDMX, 04510. México.

*Correspondencia: juvent@unam.mx (Juventino J. García)

DOI: <https://doi.org/10.54167/tch.v17i2.1200>

Recibido: 19 de abril de 2023; Aceptado: 30 de agosto de 2023

Publicado por la Universidad Autónoma de Chihuahua, a través de la Dirección de Investigación y Posgrado

Resumen

Genéricamente podemos considerar a la biomasa como todo aquel material proveniente del crecimiento de microorganismos, plantas o animales, dicho material representa una fuente de residuos y en consecuencia de diversas moléculas de interés, las cuales pueden ser transformadas a otros productos de valor añadido y potencialmente útiles. Uno de los propósitos para su aprovechamiento sería el uso preferente de biomasa de desecho o en desuso, con lo cual se logra la disminución de residuos y el costo de las materias primas. De la hidrólisis de la biomasa se puede llegar a diversas moléculas o bloques de construcción entre los que se destacan, pero no se limitan al furfural y sus derivados, hasta llegar al ácido levulínico (AL). El AL es considerado como una plataforma química a partir de la cual se pueden realizar diversas transformaciones químicas y con ello preparar una gran variedad de productos útiles a nivel industrial y en la academia. Para lo anterior, el uso de metodologías catalíticas es otro aspecto deseable, ya que con ello se logra la disminución de subproductos, tiempos de reacción y consumo de energía. En este trabajo se resalta el uso de metales abundantes en la naturaleza para efectuar dichas transformaciones catalíticas.

Palabras clave: biomasa, catálisis, homogénea, sustentable, metales, ácido levulínico.

Abstract

Biomass can be considered any material from microorganisms, plants, or animals growing; such material represents a source of a variety of molecules of interest that can be transformed into new value-added useful products. A target for this is the use of waste or final-use biomass, aiming to reduce the production of residues and lower the cost of raw materials. Several molecules and building blocks of interest can be derived from biomass hydrolysis, including furfural and closely

related derivatives to yield Levulinic Acid (LA). LA is considered a chemical platform from which it is possible to prepare a variety of valuable products for industry and academia. To achieve that, using catalytic methodologies is a desirable aspect to achieve fewer byproducts, shorter reaction times, and low energy consumption. This work focuses on using earth-abundant metals to make these catalytic transformations.

Keywords: biomass, catalysis, homogeneous, sustainable, metals, levulinic acid.

1. Introducción

Históricamente la biomasa ha sido una fuente de alimentación y energía, así como una fuente de medicamentos, fragancias y condimentos. No obstante, fue hasta la segunda mitad del siglo XIX que inició la conversión industrial de la biomasa a productos químicos y materiales útiles, con la producción de ésteres de celulosa y de linóleoum. Desde inicios del siglo XXI ha ido en aumento el número de productos obtenidos a partir de la biomasa a saber, diversos sabores y fragancias son producidos por la conversión catalítica de terpenos; así como surfactantes y lubricantes fabricados por la industria de aceites vegetales y un gran número de materias primas son obtenidas por la conversión de carbohidratos procedentes de diferentes cultivos. Sin embargo, los productos derivados de la biomasa sufrieron una fuerte competencia económica por los productos menos costosos obtenidos a partir de hidrocarburos por medio de rutas convencionales las cuales han sido constantemente optimizadas en los últimos cien años (Gallezot, 2012; Ravelli y Samori, 2021).

La sociedad utiliza en la actualidad mucha energía y productos de consumo provenientes de la industria química, desde combustibles hasta productos farmacéuticos. Los combustibles fósiles eran usados ocasionalmente hasta la revolución industrial, pero en tiempos recientes el mantenimiento de altos niveles de producción y consumo al menor costo ha implicado una fuerte dependencia de dichos combustibles a nivel global (Gallezot, 2012).

Hoy en día se busca reducir las emisiones de CO₂ de acuerdo con el protocolo de Kyoto aunado a la disminución de las reservas de combustibles fósiles, lo cual ha dirigido la atención de la comunidad científica a la búsqueda de soluciones innovadoras para el abatimiento de los niveles de CO₂ y para el reemplazo de las fuentes fósiles por fuentes renovables y sustentables. En este contexto la biomasa ha ganado interés como una fuente de diversas materias primas o plataformas químicas de compuestos basados en carbono (Kamm *et al.*, 2006).

Tanto en la arena académica como en la industrial, se han investigado metodologías para utilizar la biomasa como materia prima en la preparación de compuestos orgánicos debido a su disponibilidad, alta regeneración y facilidad de distribución (Mika *et al.*, 2018). El uso de la biomasa es uno de los temas clave en el desarrollo sustentable debido a que las fuentes biológicas son renovables y neutras en términos del CO₂ producido-reutilizado (huella de CO₂ virtualmente nula), en marcado contraste con los combustibles fósiles generadores de CO₂ (Arakawa *et al.*, 2001). Las moléculas obtenidas de la biomasa contienen en su estructura grupos funcionales que potencialmente requerirían un menor número de etapas en la síntesis de compuestos químicos comparado con los hidrocarburos. Adicionalmente, los productos de la biomasa podrían tener propiedades más atractivas comparadas con los productos derivados de los hidrocarburos, por ejemplo, la biodegradabilidad y la biocompatibilidad, por lo que en algunos países como los Estados Unidos existen programas

gubernamentales del Departamento de Energía para la implementación del uso de biomasa. En Europa la organización SUSCHEM promueve el incremento del uso de materias primas renovables para la producción de derivados químicos y de energía (Gallezot, 2007).

Considerando los principios básicos de los procesos sustentables la biomasa haría posible lograr ciertos objetivos como son: disminución de la contaminación, disminución del uso o fabricación de productos químicos peligrosos, reducción de materiales de desecho por tecnologías de conversión más eficientes y el uso de biomasa como una fuente de energía renovable, bajo el concepto de "biorrefinería" como la integración de diversos procesos de conversión para la generación de combustibles y la obtención de productos químicos de valor agregado, empleando preferentemente todos los átomos de carbono provenientes de las materias primas (economía atómica) (Corma *et al.*, 2007).

Una tendencia encontrada en los sistemas catalíticos para la hidrogenación de derivados de la biomasa ha sido el uso metales nobles (Mika y Horváth, 2021). Los cuales, debido a su poca abundancia y altos costos, limitan sus aplicaciones y la sustentabilidad de la biorrefinería. Considerando lo anterior, una alternativa al uso de catalizadores de metales nobles es emplear catalizadores basados principalmente en metales de la primera serie de transición (por ejemplo, Fe, Ti ó Mn), lo cual ha ganado mucha atención para su uso en la valorización de derivados de la biomasa y se ha convertido en un tema de interés en los últimos años (Dutta *et al.*, 2019).

2. Biomasa y el concepto de Biorrefinería

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) define a la biomasa como "Material producido por el crecimiento de microorganismos, plantas o animales" (IUPAC, 1997). Hoy en día el interés se centra preferentemente en el material de desecho de dicha biomasa, el cual no tiene un uso directo como alimento, intermediario químico o fibras procedentes de ésta. Los desechos antes mencionados pueden provenir de la industria agropecuaria, sargazo y/o biosólidos de desechos urbanos entre muchos otros.

Actualmente la atención académica mundial está enfocada en que a mediano o largo plazo la obtención de energía o de materias primas sea satisfecha con productos provenientes de recursos renovables y que dichas sustancias sean transformadas en nuevos productos útiles. Se busca que las materias primas no sean tóxicas (como las provenientes de la biomasa) y que los productos obtenidos resulten ser biodegradables. Se pretende que la emisión de gases de efecto invernadero, se compense por completo con el consumo de CO₂ como materia prima, logrando una huella de carbono virtualmente neutra, contrario al uso de fuentes fósiles los cuales aumentan la producción de CO₂.

Considerando las premisas anteriores se establecen los principios de una biorrefinería, la cual la define la Agencia Internacional de Energía -Bioenergía (IEA Bioenergy) como "un proceso sostenible para la transformación de la biomasa en una gama de productos de base biológica como los alimentos, piensos, productos químicos, materiales y bio-energía a saber biocombustibles, generación de energía y/o calor" (De Jong *et al.*, 2020). De manera análoga a una refinería tradicional que emplea fuentes fósiles, se requiere el uso de catalizadores para llevar a cabo las transformaciones químicas de la materia prima de manera selectiva y temperaturas de reacción más bajas, para que el

proceso sea sustentable ambiental y energéticamente. En la Fig. 1, se muestra un modelo conceptual simplificado de una biorrefinería, basado en la economía circular (Stegmann *et al.*, 2020).

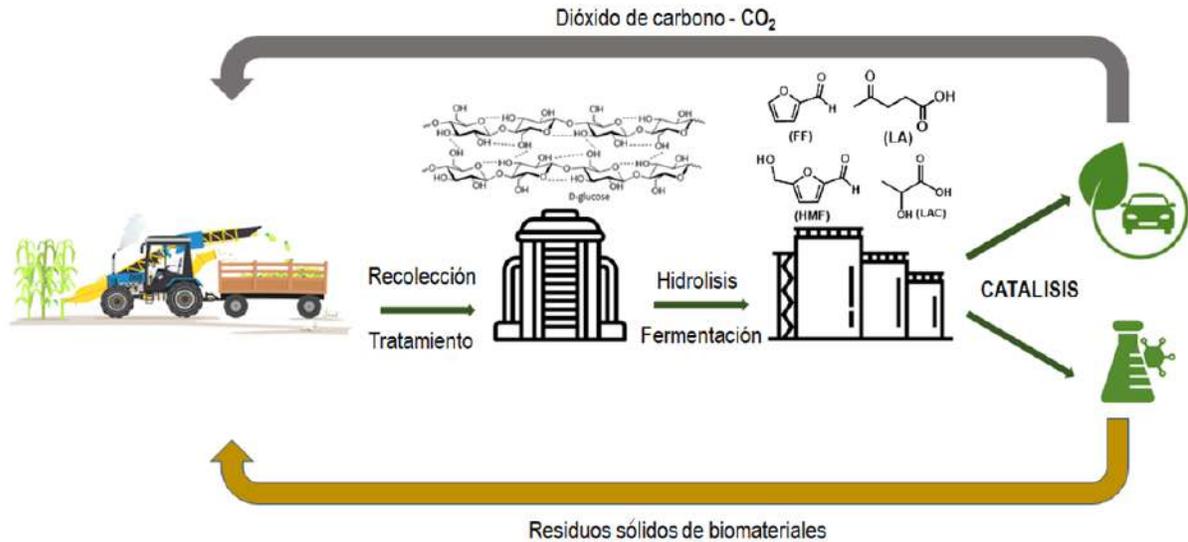


Figura 1. Modelo conceptual simplificado de una biorrefinería
Figure 1. Simplified conceptual model of a biorefinery

De forma general se pueden agrupar tres clases de materias primas derivadas de la biomasa apropiadas para la producción de combustibles renovables: materias primas amiláceas (incluidos los azúcares), triglicéridos y materiales lignocelulósicos. En la Fig. 2 se muestran los diversos biocombustibles que se pueden obtener con cada una de las materias primas antes mencionadas (Alonso *et al.*, 2010). Las amiláceas están compuestas por polisacáridos de glucosa unidos por enlaces glucosídicos α , como la amilasa y la amilopectina, sustancias que se hidrolizan fácilmente a los monómeros de azúcar correspondientes lo que facilita su procesamiento, como ocurre en las instalaciones de bioetanol de primera generación.

Los triglicéridos están compuestos de ácidos grasos y glicerol derivados tanto de fuentes vegetales como animales. Las fuentes de triglicéridos para la producción de biodiesel incluyen varios aceites vegetales, productos derivados del aceite de desecho (p. ej., grasa amarilla) y algas. La lignocelulosa es la clase de biomasa más abundante. Mientras que el almidón y los triglicéridos solo están presentes en algunos cultivos, la lignocelulosa contribuye a la integridad estructural de las plantas y, por lo tanto, resulta omnipresente. La mayoría de los cultivos energéticos y la biomasa residual considerada para la producción de energía son materias primas lignocelulósicas, entre los que se incluyen desechos de pastos y trigo, residuos agrícolas, desechos municipales y residuos del procesamiento de la madera. La lignocelulosa se compone de tres fracciones diferentes: lignina, hemicelulosa y celulosa (Huber y Corma, 2007).

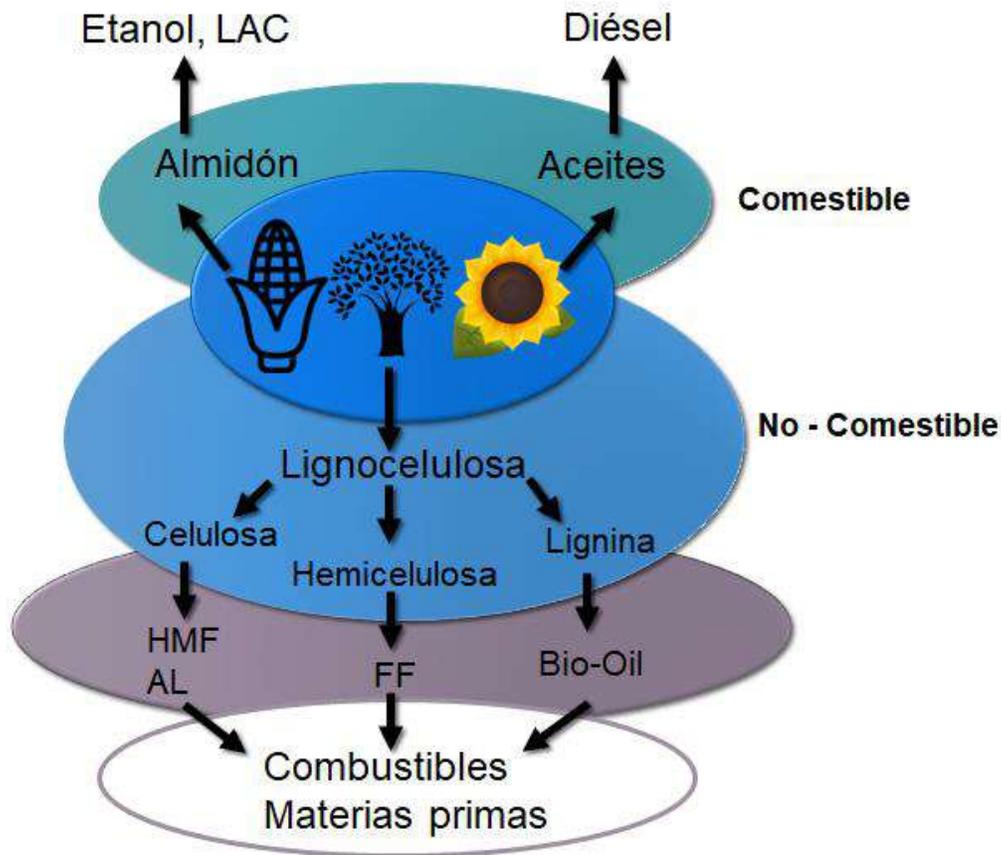


Figura 2. Materias primas derivadas de la biomasa y plataformas para la conversión a biocombustibles.
Figure 2. Biomass-derived feedstocks and platforms for conversion to biofuels.

3. El ácido levulínico como plataforma química

De la ruptura de los tres componentes principales de la lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina; Fig. 2) por vía de la hidrólisis se obtienen moléculas pequeñas, conocidas como bloques de construcción o plataformas químicas iniciales conocidas como IPC's por sus siglas en inglés. Aunado a lo anterior, el departamento de energía de los Estados Unidos, realizó un estudio y proyección económica de cada una de ellas, para establecer su uso potencial en la elaboración de materias primas o productos ya en uso, o nuevos productos de interés, pero de fuerte demanda entre los consumidores. Se determinaron 12 plataformas químicas selectas la de mayor proyección, es el ácido levulínico (AL), que es además el producto principal en la hidrólisis de la hemicelulosa, Fig. 3 (Werpy y Peterson, 2004; Alonso *et al.*, 2013).

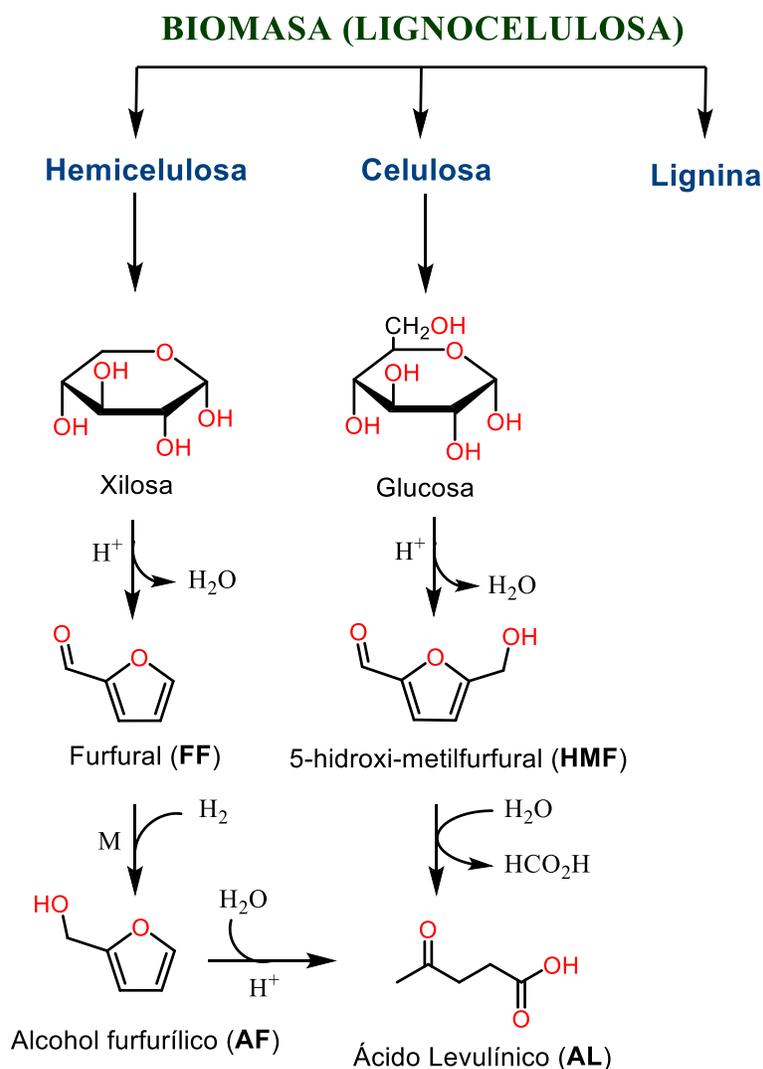


Figura 3. Obtención del ácido levulínico (AL) a partir de la lignocelulosa.
Figure 3. Obtaining levulinic acid (LA) from lignocellulose.

El **AL** es una de las moléculas derivadas de la biomasa más importantes porque tiene dos grupos funcionales reactivos y está disponible comercialmente a bajo costo como residuo de celulosa (Clement, *et al.*, 2014). Entre los productos derivados de su hidrogenación se encuentran el ácido hidrovalérico (**AH**) usado en la industria de pinturas, el 1-4 pentanediol (**1,4-PDO**) usado como monómero para la elaboración de polímeros y en la química fina (es decir en la síntesis de alto valor añadido), la γ -valerolactona (**GVL**) y el 2-metiltetrahidrofurano (**MTHF**) estos dos últimos usados como aditivos para combustibles y disolventes, ver Fig. 4 (Kumaravel *et al.*, 2019).

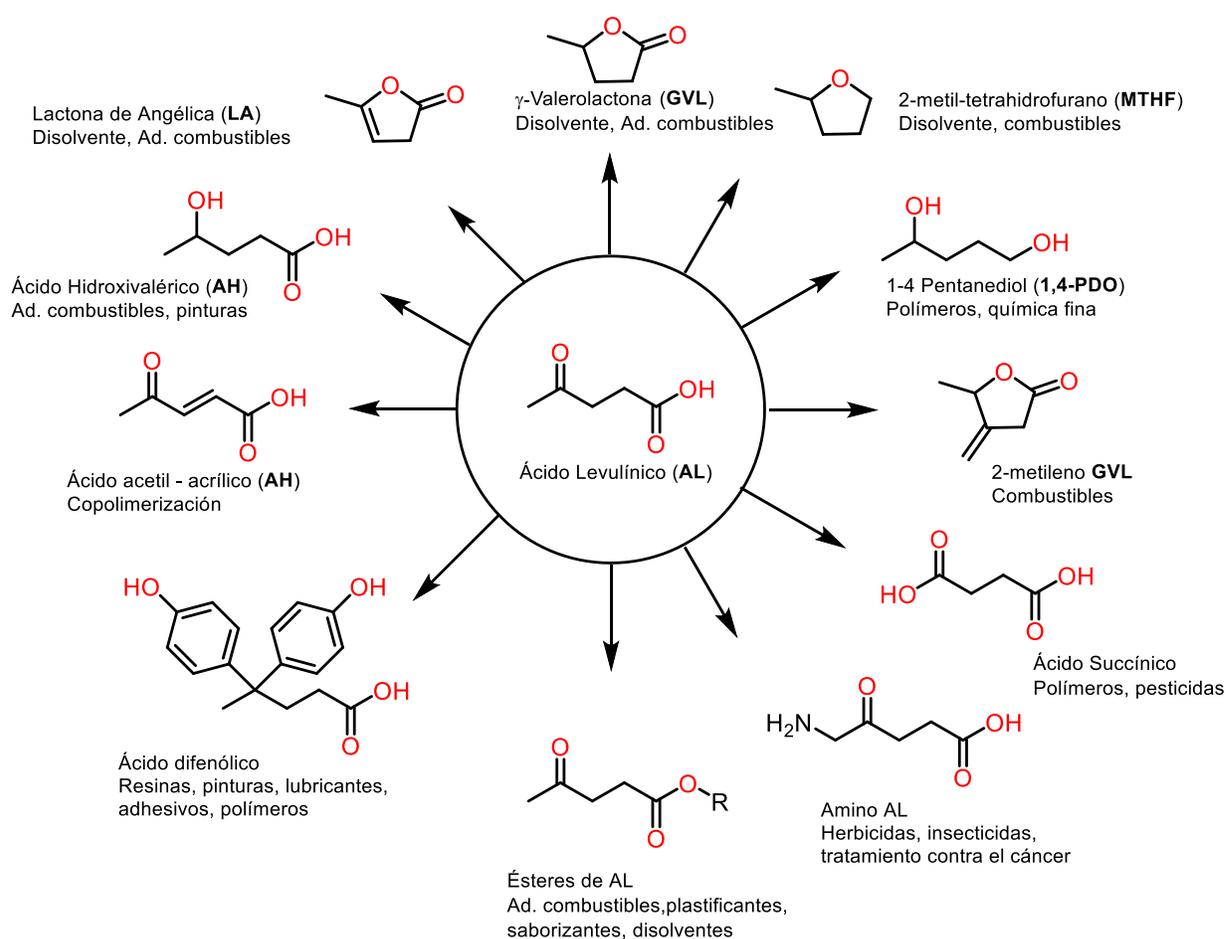


Figura 4. Diversos productos derivados del ácido levulínico.

Figure 4. Various products derived from levulinic acid.

4. En camino a procesos catalíticos sustentables

Hoy en día la mayoría de los sistemas catalíticos para la conversión de **AL** en materiales de valor agregado están basados en metales nobles, especialmente en la hidrogenación del **AL** a **GVL** o **2-MTHF** (Mika y Horváth, 2021). Sin embargo, debido a la baja abundancia de metales nobles en la naturaleza, el uso de estos metales conduce directamente a un aumento en los costos de la biorrefinería y una menor sustentabilidad. Por ello, buscando alternativas al uso de catalizadores de metales nobles, surge el interés del empleo de metales no nobles en dichos sistemas catalíticos, basados principalmente en metales de la primera serie de transición (abundantes), los cuales han atraído mucha atención para ser usados en la valorización de **AL**, proceso que se ha convertido en un tema de interés y actualidad (Dutta *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Jurado-Vázquez *et al.*, 2021).

Para ejemplificar lo anterior cabe mencionar un ejemplo reciente en el área de catálisis homogénea con metales abundantes como el manganeso (Mn). El uso de compuestos organometálicos de Mn desencadenó un gran interés en la última década y aún lo continúa haciendo (Valyaev *et al.*, 2016; Sortais, 2021). Quizás desde el descubrimiento de los primeros sistemas catalíticos eficientes de (des)hidrogenación empleando Mn por Beller y Milstein a principios del 2016 esta área evolucionó explosivamente para convertirse en un objeto de estudio muy competido en el campo de la catálisis (Elangovan *et al.*, 2016; Mukherjee *et al.*, 2016).

Considerando los informes iniciales con manganeso la bibliografía reciente pone en evidencia que las arquitecturas de los complejos originales conteniendo ligantes tridentados (o pinzas, Fig. 5) no son requisitos necesarios para obtener catalizadores de hidrogenación eficientes, ya que los complejos que contienen ligantes bidentados, menos elaborados pueden ser competitivos o incluso superiores en términos de actividad catalítica y/o ámbito de aplicación (Garduño y García, 2018).

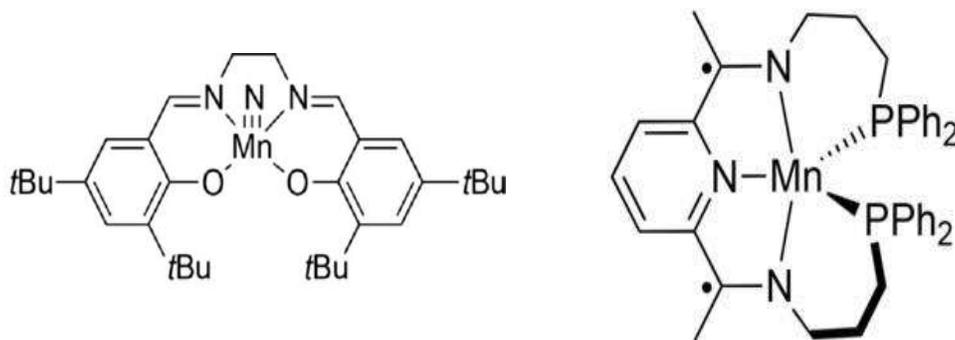


Figura 5. Ejemplos de compuestos de manganeso con ligantes polidentados usados en reducción catalítica.

Figure 5. Examples of manganese compounds with polydentate ligands used in catalytic reduction.

Hoy en día se han documentado varios casos exitosos de sistemas catalíticos de Mn(I) que contienen solo ligantes donadores auxiliares simples o incluso se basan únicamente en precursores del carbonilo metálico, lo que indica la existencia de mecanismos de reacción no convencionales que sin duda surgen de la especificidad de la química de complejos organometálicos de manganeso (Gulyaeva *et al.*, 2022).

Nuestro grupo de trabajo ha hecho algunas contribuciones recientes en el campo antes descrito, entre los cuales se puede mencionar de forma particular las reacciones de reducción y ciclación del ácido levulínico para la formación de 2-metiltetrahidrotiofeno, catalizada por complejos comercialmente disponibles de Mn y fuentes de hidrógeno de bajo costo provenientes de los desechos de la fabricación de siliconas, como es el caso del tetrametildisiloxano (TMDS) el cual se ilustra en la Fig. 6 (Roa y García, 2021).

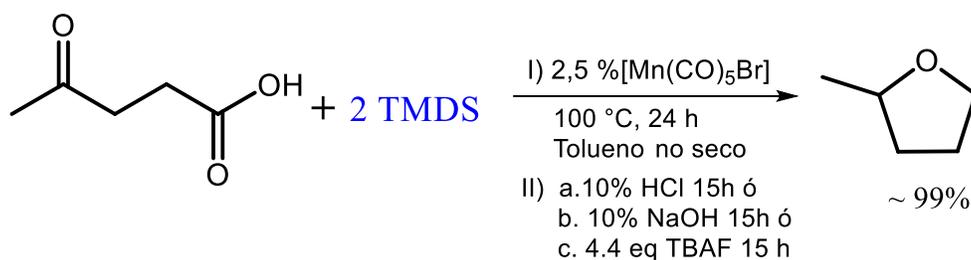


Figura 6. Ejemplo de reducción y ciclación con manganeso.
Figure 6. Example of reduction and cyclization with manganese.

Conclusiones y perspectivas

El uso de materiales provenientes de la biomasa, particularmente de los desperdicios o productos de desecho, en conjunto con procesos catalizados por metales abundantes ofrece la posibilidad de disminuir la contaminación por residuos y el poder producir artículos de valor agregado de interés para la sociedad de manera sostenible. Muchos de esos procesos están en vías de optimización para su uso en el futuro cercano, idealmente en la sustitución gradual de los combustibles y materiales fósiles.

Agradecimientos

Se agradece ampliamente al CONACYT y DGAPA-UNAM el apoyo recibido para la realización de las investigaciones relacionadas con esta temática.

Conflicto de interés

Los autores no tienen conflicto de interés que declarar.

Referencias

- Alonso, D. M., Bond, J. Q. & Dumesic, J. A. (2010). Catalytic conversion of biomass to biofuels. *Green chemistry* 12(9): 1493-1513. <https://doi.org/10.1039/C004654J>
- Alonso, D. M., Wettstein, S. G. & Dumesic, J. A. (2013). Gamma-valerolactone, a sustainable platform molecule derived from lignocellulosic biomass. *Green Chem.* 15(3): 584-595. <https://doi.org/10.1039/C3GC37065H>
- Arakawa, H., Aresta, M., Armor, J. N., Barteau, M. A., Beckman, E. J., Bell, A. T. & Tumas, W. (2001). Catalysis research of relevance to carbon management: progress, challenges, and opportunities. *Chem. Rev.* 101(4): 953-996. <https://doi.org/10.1021/cr000018s>

- Clement, M. J., Corma, A. & Iborra, S. (2014). Conversion of biomass platform molecules into fuel additives and liquid hydrocarbon fuels. *Green Chem.* 16(2): 516-547. <https://doi.org/10.1039/C3GC41492B>
- Corma, A., Iborra, S. & Velty, A. (2007). Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. *Chem. Rev.* 107(6): 2411-2502. <https://doi.org/10.1021/cr050989d>
- De Jong, E., Higson, A., Walsh, P. & Wellisch, M. (2020). Bio-based chemicals. IEA Bioenergy.
- Dutta, S., Iris, K. M., Tsang, D. C., Ng, Y. H., Ok, Y. S., Sherwood, J. & Clark, J. H. (2019). Green synthesis of gamma-valerolactone (GVL) through hydrogenation of biomass-derived levulinic acid using non-noble metal catalysts: A critical review. *Chemical Engineering Journal* 372: 992-1006. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.04.199>
- Elangovan, S., Topf, C., Fischer, S., Jiao, H., Spannenberg, A., Baumann, W. & Beller, M. (2016). Selective catalytic hydrogenations of nitriles, ketones, and aldehydes by well-defined manganese pincer complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 138(28): 8809-8814. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b03709>
- Gallezot, P. (2007). Catalytic routes from renewables to fine chemicals. *Catal. Today* 121(1-2): 76-91. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2006.11.019>
- Gallezot, P. (2012). Conversion of biomass to selected chemical products. *Chem. Soc. Rev.* 41(4): 1538-1558. <https://doi.org/10.1039/C1CS15147A>
- Garduño, J. A. & García, J. J. (2018). Non-pincer Mn (I) organometallics for the selective catalytic hydrogenation of nitriles to primary amines. *ACS Catalysis* 9(1): 392-401. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b03899>
- Gulyaeva, E. S., Osipova, E. S., Buhaibeh, R., Canac, Y., Sortais, J. B., & Valyaev, D. A. (2022). Towards ligand simplification in manganese-catalyzed hydrogenation and hydrosilylation processes. *Coord. Chem. Rev.* 458: 214421. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214421>
- Huber, G. W. & Corma, A. (2007). Synergies between bio-and oil refineries for the production of fuels from biomass. *Angew. Chemie International Edition* 46(38): 7184-7201. <https://doi.org/10.1002/anie.200604504>
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught & A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by Chalk. S. J. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- Jurado-Vázquez, T, Arévalo, A. & García, J. J. (2021). Transfer Hydrogenation of Levulinic Acid to γ -Valerolactone and Pyrrolidones Using a Homogeneous Nickel Catalyst. *Eur. J. Inorg. Chem.* 5: 445-450. <https://doi.org/10.1002/ejic.202001063>
- Kamm, B., Gruber, P. R. & Kamm, M. (2006). Biorefineries. Industrial processes and products. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527619849>
- Kumaravel, S., Thiripuranthagan, S., Radhakrishnan, R., Erusappan, E., Durai, M., Devarajan, A. & Mukannan, A. (2019). Liquid phase esterification of levulinic acid into ethyl levulinate over sulphobenzylated nanoporous Al-SBA-15 catalyst. *J. of Nanoscience and Nanotechnology* 19(11):6965-6977. <https://doi.org/10.1166/jnn.2019.16637>

- Liu, Z., Yang, Z., Wang, P., Yu, X., Wu, Y., Wang, H. & Liu, Z. (2019). Co-catalyzed hydrogenation of levulinic acid to γ -valerolactone under atmospheric pressure. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7(22): 18236-18241. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b04803>
- Mika, L. T. & Horváth, I. T. (2021). Homogeneous transition metal catalyzed conversion of levulinic acid to gamma-valerolactone. In Peter C. Ford & Rudi van Eldik (Eds.) *Advances in Inorganic Chemistry* 77 (pp. 1-25). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.adioch.2021.02.004>
- Mika, L. T., Cséfalvay, E. & Németh, Á. (2018). Catalytic conversion of carbohydrates to initial platform chemicals: chemistry and sustainability. *Chem. Rev.* 118(2): 505-613. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00395>
- Mukherjee, A., Nerush, A., Leitus, G., Shimon, L. J., Ben David, Y., Espinosa Jalapa, N. A. & Milstein, D. (2016). Manganese-catalyzed environmentally benign dehydrogenative coupling of alcohols and amines to form aldimines and H₂: a catalytic and mechanistic study. *J. Am. Chem. Soc.* 138(13): 4298-4301. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b13519>
- Ravelli, D. & Samori, C. (Eds.) (2021). Biomass Valorization: Sustainable Methods for the Production of Chemicals. *John Wiley & Sons.* <https://www.wiley.com/en-au/Biomass+Valorization:+Sustainable+Methods+for+the+Production+of+Chemicals-p-9783527347179>
- Roa, D. A. & García, J. J. (2021) Mild reduction with silanes and reductive amination of levulinic acid using a simple manganese catalyst. *Inorg. Chim. Acta* 516: 120167. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.120167>
- Sortais, Jean-Baptiste (Ed.). (2021). Manganese catalysis in organic synthesis. *John Wiley & Sons.* ISBN: 978-3-527-34730-8. <https://www.wiley-vch.de/en/areas-interest/natural-sciences/chemistry-11ch/catalysis-11ch4/manganese-catalysis-in-organic-synthesis-978-3-527-34730-8>
- Stegmann, P, Londo, M. & Junginger, M., (2020). The circular bioeconomy: Its elements and role in European bioeconomy clusters. *Resources, Conservation & Recycling: X* 6: 100029. <https://doi.org/10.1016/j.rcrx.2019.100029>
- Valyaev, D. A., Lavigne, G. & Lugan, N. (2016). Manganese organometallic compounds in homogeneous catalysis: Past, present, and prospects. *Coord. Chem. Rev.* 308: 191-235. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.06.015>
- Werpy, T. & Petersen, G. (Eds.) (2004). Top value-added chemicals from biomass: volume I--Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas (No. DOE/GO-102004-1992). National Renewable Energy Lab. <https://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>

Notas sobre las figuras.

Se informa lo siguiente para los efectos que proceda con los derechos de autor:

Figura 1. Creación propia

Figura 2. Adaptada de: Alonso, D. M., Bond, J. Q. & Dumesic, J. (2010). Catalytic conversion of biomass to biofuels. *A. Green chem.* 12(9): 1493-1513. <https://doi.org/10.1039/C004654J>

Figura 3. Adaptada de: Alonso, D. M., Wettstein, S. G. & Dumesic, J. A. (2013). Gamma-valerolactone, a sustainable platform molecule derived from lignocellulosic biomass. *Green Chem.* 15(3): 584-595. <https://doi.org/10.1039/C3GC37065H>

Figura 4. Adaptada de: Kumaravel, S., Thiripuranthagan, S., Radhakrishnan, R., Erusappan, E., Durai, M., Devarajan, A. & Mukannan, A. J. (2019). Liquid Phase Esterification of Levulinic Acid into Ethyl Levulinate Over Sulphobenzylated Nanoporous Al-SBA-15 Catalyst. *Nanosci. Nanotechnol.* 19(11): 6965-6977. <https://doi.org/10.1166/jnn.2019.16637>

Figura 5. Creación propia

Figura 6. Creación propia

2023 TECNOCENCIA CHIHUAHUA

Esta obra está bajo la Licencia Creative Commons Atribución No Comercial 4.0 Internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



UACH
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Dirección de
Investigación y Posgrado



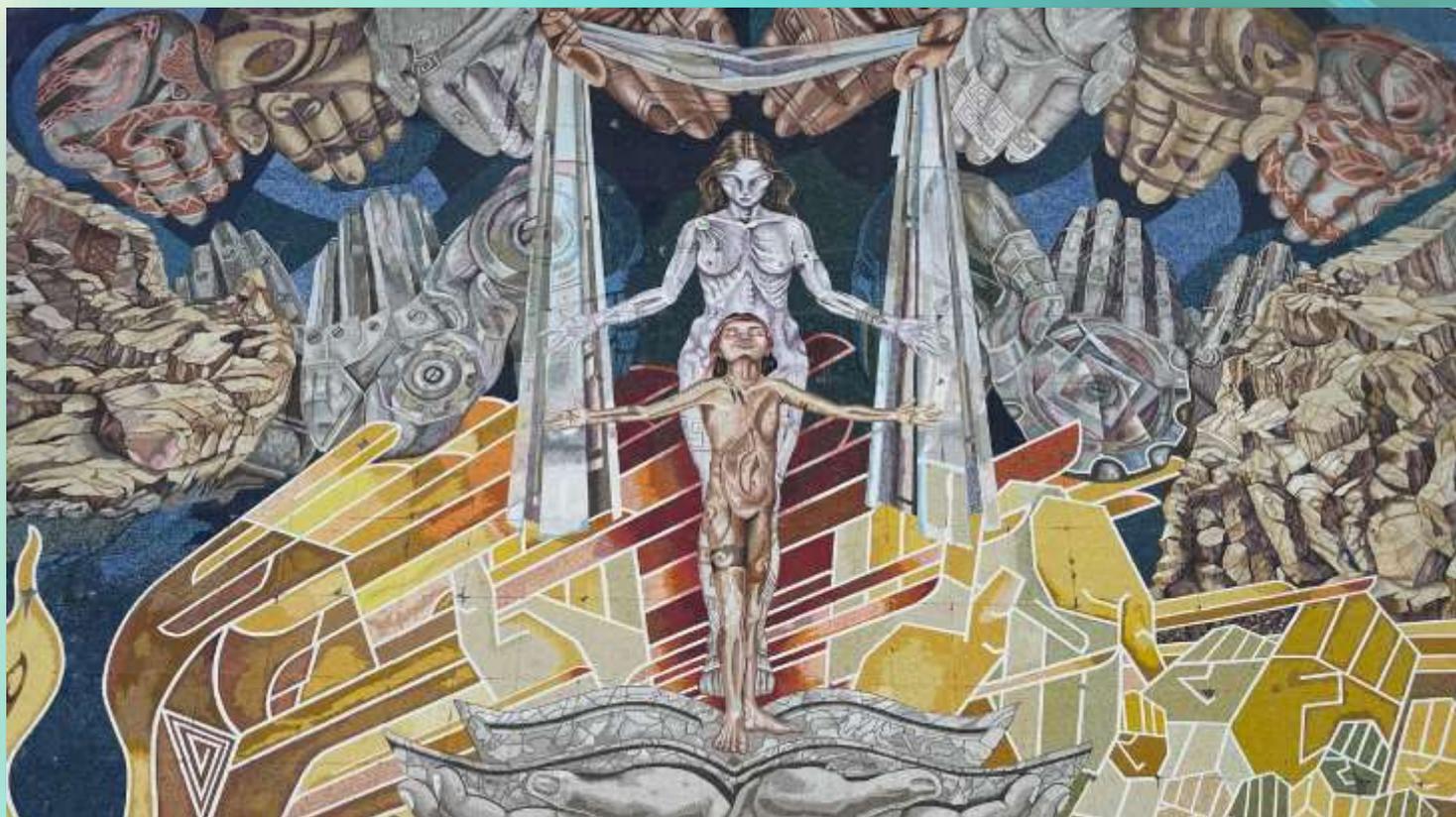
FACULTAD DE INGENIERÍA. UACH
VISTA AÉREA

TECNOCENCIA CHIHUAHUA
Revista de ciencia y tecnología



UACH
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Dirección de
Investigación y Posgrado



LA EDUCACIÓN, CHIHUAHUA Y LA HUMANIDAD
FACULTAD DE INGENIERÍA. UACH
AUTOR: FRANCISCO E. CAMACHO MEZQUITA

TECNOCENCIA CHIHUAHUA
Revista de ciencia y tecnología