

La publicación de este número contó con el apoyo financiero
del Comité para el Desarrollo de la Investigación –CODI–
Universidad de Antioquia

RECTOR

Mauricio Alviar Ramírez

VICERRECTORA DE INVESTIGACIONES

Maria Patricia Arbeláez Montoya

DECANO

Juan Carlos Alarcón Pérez

DIRECTOR

Jaime Andrés Pereañez Jiménez

jaime.pereanez@udea.edu.co

La Revista Vitae es el órgano difusor de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias de la Universidad de Antioquia. Está dirigida a profesionales y estudiantes interesados en la ciencia y tecnología farmacéutica y alimentaria. Contempla información derivada de investigaciones y revisiones relacionadas con los medicamentos, los cosméticos, los alimentos y los productos naturales.

La responsabilidad por los juicios, opiniones y puntos de vista expresados en los artículos publicados corresponde exclusivamente a sus autores.

COMITÉ EDITORIAL

EDITORES DE SECCIÓN

ALIMENTOS CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA: Misael Cortés Rodríguez. Universidad Nacional de Colombia, Colombia. Diana María Granda Restrepo. Universidad de Antioquia, Colombia

ATENCIÓN FARMACÉUTICA: Pedro Amariles Muñoz. Universidad de Antioquia, Colombia.

BIOTECNOLOGÍA: Edison Javier Osorio Durango. Universidad de Antioquia, Colombia.

FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA: Dora Benjumea Gutiérrez. Universidad de Antioquia, Colombia.

INDUSTRIAL FARMACÉUTICA: John Rojas. Universidad de Antioquia, Colombia.

PRODUCTOS NATURALES: Alejandro Martínez Martínez. Universidad de Antioquia, Colombia.

MIEMBROS INTERNACIONALES

Blanca Cecilia Martínez Isaza. University of Minnesota, E.U.A.

Agustín García Asuero. Universidad de Sevilla, España.

Carles Codina Mahrer. Universidad de Barcelona, España.

Olivier Thomas. University of Nice, Francia.

Jesús Ofelia Angulo Guerreo. Instituto Tecnológico de Veracruz, México.

Ricardo Reyes Chilpa. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

COMITÉ CIENTÍFICO

Micha Peleg. Universidad de Massachusetts, E.U.A.

Bernard Weniger. Universidad de Strasbourg, Francia.

Jaume Bastida Armengol. Universidad de Barcelona, España.

Raquel Rodríguez Raposo. Universidad de La Laguna, España.

José Luis Pedráz Muñoz. Universidad del País Vasco, España.

Edda Sonia Costa Castro. Universidad de Chile, Chile.

Elio Jiménez González. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba.

Eduardo Enrique Chamorro Jiménez. Universidad Andrés Bello, Chile.

Germán Antonio Giraldo Giraldo. Universidad del Quindío, Colombia.

Luz Marina Carvajal de Pabón. Universidad de Antioquia, Colombia.

Gabriel Jaime Arango Acosta. Universidad de Antioquia, Colombia.

Ricardo D. Andrade P. Universidad de Córdoba, Colombia.

Silvia Luz Jiménez Ramírez. Universidad de Antioquia, Colombia.

ASISTENTE EDITORIAL

Claudia Patricia Bedoya Palacio

PERIODICIDAD

Tres números al año

PRECIO DE SUSCRIPCIÓN ANUAL

Colombia: \$ 120.000

Estudiantes: \$ 65.000

Exterior: US \$ 70

EUR \$ 55

PRECIO PUBLICACIÓN ARTÍCULO

Colombia \$440.000

Exterior: US \$ 220

EUR \$ 180

TIRAJE

300 ejemplares

revistavitae@udea.edu.co

<http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae>

<http://www.udea.edu.co/vitae>

Indexada en:

- **SciVerse SCOPUS/Elsevier B.V.**
- **EMBASE:** Biomedical Answers.
- **PUBLINDEX:** Índice Nacional de Publicaciones Seriadadas, Científicas y Tecnológicas de Colombia. Colciencias. Categoría A1.
- **LILACS:** Índice de la Literatura Latinoamericana en Ciencias de la Salud.
- **LATINDEX:** Índice Latinoamericano de Revistas Científicas y Tecnológicas.
- **CUIDEN:** Base de datos, Granada (España).
- **CAS:** Chemical Abstracts.
- **SciELO:** Scientific Electronic Library Online.
- **OJS:** Open Journal System.
- **DOAJ:** Directory of Open Access Journals.
- **e-revistas:** Plataforma Open Access de Revistas Electrónicas Españolas y Latinoamericanas.
- **REDALYC:** Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal.
- **SIIC Data Bases:** Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC).
- **EBSCO Host.**

CANJE

Universidad de Antioquia.

Departamento de Bibliotecas Sección Canje

canjebc@biblioteca.udea.edu.co

Apartado Aéreo 1226 Medellín – Colombia.

Telefax 57(4) 219 59 92 6 219 59 93

CORRESPONDENCIA Y SUSCRIPCIÓN

Ciudad Universitaria

Calle 67 No. 53-108 Bl. 2 Of. 127

Teléfono: 57(4) 219 84 55

Vitae

MISIÓN

La Revista Vitae tiene como misión la difusión del conocimiento derivado de la investigación y de las revisiones bibliográficas relativas a los medicamentos, los cosméticos, los alimentos y los productos naturales, mediante publicaciones que tienen cobertura tanto a nivel nacional como internacional.

MISSION

Journal Vitae's mission is the diffusion of the knowledge derived from researches and bibliographic reviews related to medicines, cosmetics, food and natural products, through publications of both national and international coverage.

OBJETIVO

Divulgar los resultados de investigaciones relativas a los medicamentos, los cosméticos, los alimentos, los productos fitoterapéuticos y demás insumos sanitarios; obtenidos con una adecuada rigurosidad científica, tecnológica y académica, evaluados por pares académicos expertos en los diferentes temas, y que contribuyan al avance y desarrollo de las ciencias farmacéuticas y de los alimentos.

OBJECTIVE

Journal Vitae's objective is to disclose the results of researches related to medicines, cosmetics, food, phytotherapeutic products and other sanitary supplies, obtained with adequate scientific, technological and academic rigor. These results are evaluated by academic partners who are experts in the different subjects, and contribute to the advance and development of the pharmaceutical and food sciences.

CONTENIDO

Págs

Editorial

- Desarrollo y aplicación de recubrimientos comestibles en frutas mínimamente procesadas. 9-10
Ricardo D. Andrade Pizarro, Carmen E. Pérez Cervera, Deivis E. Luján

PRODUCTOS NATURALES

- Actividad apoptótica de derivados semisintéticos del isopentanol en células polimorfonucleares humanas. 11-17
Martín Dade, Paula G. Galeano, José Ríos, Benjamín Rojano, Guillermo Schinella
- Propuesta para seleccionar aceites esenciales de plantas de Colombia para investigación con base en su citotoxicidad. 18-29
Sindi Alejandra Velandia, María Camila Flechas, Elena E. Stashenko, Raquel E. Ocazonez
- Búsqueda de bacterias marinas como fuente de inhibidores de *quorum sensing* (iqs): primer estudio químico de *oceanobacillus profundus* (rkhc-62b). 30-47
Diana Martínez-Matamoros, Melisa Laiton Fonseca, Carmenza Duque, Freddy A. Ramos, Leonardo Castellanos

ALIMENTOS: CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA

- Variación en contenido de minerales en frutos de variedades autóctonas de Chile (*capsicum annuum* L.), cultivadas en invernadero. 48-57
José L. Chávez-Servia, Araceli M. Vera-Guzmán, José C. Carrillo-Rodríguez, Elena Heredia-García
- Comportamiento de los consumidores durante la compra, almacenamiento y preparación de carne de ave y huevos en países seleccionados de norte y sur América: un estudio piloto. 58-64
Kadri Koppel, Miriam Sosa, Nelson G. Gutierrez, Paula Cardinal, Sandria L. Godwin, Sheryl C. Cates, Edgar Chambers IV
- Conservación de mango Tommy Atkins mínimamente procesado mediante la aplicación de un recubrimiento de aloe vera (*aloe barbandensis* Miller). 65-77
Andrés F. Pérez T., Iván D. Aristizábal T., Jorge I. Restrepo F.

ATENCIÓN FARMACÉUTICA

- Evaluación de la farmacoterapia en población geriátrica de una institución de régimen especial con los criterios the screening tool of older persons' potentially inappropriate prescriptions (STOPP). 78-84
Ana María Herrera E., José Julián López G.

Evaluadores

85

Instrucciones a los autores

86

Cupón de suscripción

91

CONTENT	Pages
Editorial	
<ul style="list-style-type: none"> • Development and application of edible coatings in minimally processed fruit Ricardo D. Andrade Pizarro, Carmen E. Pérez Cervera, Devis E. Luján 	9-10
PHARMACEUTICAL INDUSTRY	
<ul style="list-style-type: none"> • Apoptotic activity of isoespintanol derivatives in human polymorphonuclear cells Martín Dade, Paula G. Galeano, José Ríos, Benjamín Rojano, Guillermo Schinella 	11-17
<ul style="list-style-type: none"> • Proposal to select essential oils from colombian plants for research based on its cytotoxicity Sindi Alejandra Velandia, María Camila Flechas, Elena E. Stashenko, Raquel E. Ocazionez 	18-29
<ul style="list-style-type: none"> • Screening of marine bacterial strains as source of quorum sensing inhibitors (QSI): first chemical study of <i>Oceanobacillus profundus</i> (RKHC-62B) Diana Martínez-Matamoros, Melisa Laiton Fonseca, Carmenza Duque, Freddy A. Ramos, Leonardo Castellanos 	30-47
FOOD: SCIENCE, TECHNOLOGY AND ENGINEERING	
<ul style="list-style-type: none"> • Variation in minerals content in fruits of pepper (<i>capsicum annuum</i> l.) landraces, grown in greenhouse José L. Chávez-Servia, Araceli M. Vera-Guzmán, José C. Cruz-Rodríguez, Elena Heredia-García 	48-57
<ul style="list-style-type: none"> • Consumer practices for purchase, storage, and preparation of poultry and eggs in selected north and south american countries: a pilot study Kadri Koppel, Miriam Sosa, Nelson G. Gutierrez, Paula Cardinal, Sandria L. Godwin, Sheryl C. Cates, Edgar Chambers IV 	58-64
<ul style="list-style-type: none"> • Conservation of minimally processed mango tomy atkins by applying an aloe vera (<i>aloe barbandensis</i> miller) coating Andrés F. Pérez T., Iván D. Aristizábal T., Jorge I. Restrepo F. 	65-77
PHARMACEUTICAL CARE	
<ul style="list-style-type: none"> • Evaluation of pharmacotherapy used on geriatric population in an institution of special regime with the screening tool of older persons' potentially inappropriate prescriptions (STOPP) criteria Ana María Herrera E., José Julián López G. 	78-84
REVIEWERS	85
INSTRUCTIONS TO AUTHORS	87
SUBSCRIPTION COUPON	91

EDITORIAL

Development and application of edible coatings in minimally processed fruit

Desarrollo y aplicación de recubrimientos comestibles en frutas mínimamente procesadas

The consumer's interest to purchase safe, nutritious, minimally processed, and healthy food has increased consumption of various fruits and vegetables. Generally, the quality of fruits depends on nutritional, microbiological and organoleptic properties, all of which are exposed to dynamic changes during harvesting, storage, and marketing. These changes are mainly due to the interactions between the fruits and its surroundings or migration among different inner components, which can result in loss of moisture and some volatile compounds (1, 2).

The edible coatings technique is a good alternative to control some of these factors, it includes thin layers of edible materials formed directly onto the surface of the food that can be eaten as part of the whole product. Although edible coatings have been used for centuries to prevent moisture migration or to create a shiny surface for esthetic purposes; recently, there is considerable interest and more research on this application, driven to minimize the environmental impact of non-biodegradable materials and the increasing demand for minimally-processed foods (3, 4).

Edible coatings are made from various materials, such as polysaccharides (starch, cellulose, pectin, alginate), proteins (gelatin, casein, albumins), and lipids (beeswax, fatty acids). Usually, mixtures of these materials are used to take advantage of each constituent. Polysaccharides and proteins based edible coatings could form cohesive molecular networks by strong interactions between molecules, which provide good mechanical properties and barrier to gases, O₂ and CO₂ (5). However; generally, these are polar polymers, resulting in a matrix with low cohesion and high water vapor permeability. Different alternatives have been used to improve this property, including the addition of hydrophobic compounds as lipids, modifying the polymer network and addition of nanocomposites (6).

New matrices have been evaluated for coating fruit and minimally processed products; for instance, aloe vera mucilage has important biological, antimicrobial and antiviral properties. Aloe vera coatings have shown the capacity of reducing moisture loss, respiration rates, growth of microorganisms and oxidative browning in various fruits, such as strawberries, papaya and mango (7). Applying aloe vera coating on minimally processed mango (Tommy Atkins) has shown outstanding results, increasing shelf-life up to three days (8). Likewise, in Kiwi it has proved more efficient than other coating-forming matrices (alginate and chitosan), maintaining the sensory attributes, especially texture (7).

The coating process involves a humectation (wettability) of the fruit coated by the suspension, a possible penetration of the suspension into the fruit, followed by a possible adhesion between the suspension and the fruit. Wettability stage is important, because it is a measure of compatibility between the suspension and the fruit; it affects the coating's time and film thickness on the food surface (9). In order to develop and to apply edible coatings in fresh and minimally-processed fruits is very important to evaluate the physical properties of suspensions (density, viscosity and surface tension), because the mechanical, thermal, optical and barrier properties of the coatings are directly related to their microstructure developed.

To evaluate the efficacy and quality of edible coatings, different parameters of the storage-coated fruits can be determined, such as water loss, respiration rate, texture, color, concentration of microorganisms, pH, total acidity and content of soluble solids. Furthermore, these parameters should not affect flavor

and surface appearance must be attractive in order to improve consumer acceptance (4). Edible coatings can be applied using various techniques such as dipping, panning, fluidized-bed coating and spraying. Spray coating is one of the most common methods applied to coat fruits at industrial levels, it has many advantages, such as control of thickness, uniform coating, no pollution and controlled temperature of the coating solution; furthermore, automation is facilitated in continuous processes (10). However, other methods of coatings used at industrial level should be examined, such as electro-sprays, micro-sprays and atomic layer deposition (2).

Finally; even though the great potential of fruit coatings, the progress of industrial applications is relatively limited. One of the factors limiting the development and implementation of this technology is the high number of variables that determine its effectiveness, which will have to be considered when selecting edible coating formulation. Additionally, edible coatings are developed and formulated for specific needs applied on food, which may limit their versatility and implementation in the industry.

Ricardo D. Andrade Pizarro

Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Grupo de Investigación GIPPAL, Facultad de Ingeniería, Universidad de Córdoba, Montería- Colombia. rdandrade@correo.unicordoba.edu.co

Carmen E. Pérez Cervera

Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Grupo de Investigación DANM/ Desarrollo y Aplicación de Nuevos Materiales, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Pontificia Bolivariana, Montería, Colombia

Deivis E. Luján Rhenals

Doctor en Ingeniería de Alimentos, Grupo Investigaciones en Procesos Agroindustriales, Facultad de Ingeniería, Universidad de Córdoba, Montería-Colombia

REFERENCES

1. Debeaufort F, Voilley A. Lipid-based edible films and coatings. In: Embuscado ME, Huber KC, editors. Edible films and coatings for food applications. New York: Springer. 2009, 135-164p.
2. Andrade RD, Skurtys O, Osorio FA. Atomizing spray systems for application of edible coatings. *Comprehen. Rev. Food Sci. Food Safe.* 2012 Apr; 11(3): 323-337.
3. Janjarasskul T, Krochta JM. Edible packaging materials. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2010 Apr; 1: 415-448.
4. Lin D, Zhao Y. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2007 Jun; 6(3): 60-75.
5. Vargas M, Pastor C, Chiralt A, McClements DJ, González-Martínez C. Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2008 Jun; 48(6): 496-511.
6. Andrade-Pizarro RD, Skurtys O, Osorio-Lira F. Effect of cellulose nanofibers concentration on mechanical, optical, and barrier properties of gelatin-based edible films. *Dyna.* 2015 Jun; 82(191): 219-226.
7. Benítez S, Achaerandio I, Pujolà M, Sepulcre F. Aloe vera as an alternative to traditional edible coatings used in fresh-cut fruits: A case of study with kiwifruit slices. *LWT - Food Sci. Technol.* 2015 Apr; 61(1): 184-193.
8. Conservación de Mango Tommy Atkins mínimamente procesado mediante la aplicación de un recubrimiento de Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller). *Vitae.* 2016 ; *Rev. Vitae* 2016; 23(1): 65-77.
9. Andrade R, Skurtys O, Osorio F, Zuluaga R, Gañán P, Castro C. Wettability of gelatin coating formulations containing cellulose nanofibers on banana and eggplant epicarps. *LWT – Food Sci. Technol.* 2014 Sept; 58(1): 158-165.
10. Zhao Y. Application of commercial coatings. In: Baldwin EA, Hagenmaier R, Bai J, editors. Edible coatings and films to improve food quality. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group. 2012, 319-332 p.

APOPTOTIC ACTIVITY OF ISOESPINTANOL DERIVATIVES IN HUMAN POLYMORPHONUCLEAR CELLS

ACTIVIDAD APOPTÓTICA DE DERIVADOS SEMISINTÉTICOS DEL ISOPENTANOL EN CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES HUMANAS

Martín DADE, BSc¹, Paula GALEANO, MSc², José-Luis RÍOS, PhD.^{2,3},
 Benjamín ROJANO, PhD.⁴, Guillermo SCHINELLA, MSc^{1,2,5}

Recibido: May 05 de 2015. Aceptado: Abril 03 de 2016.

ABSTRACT

Background: Inflammation is a complex physiopathologic response to different stimuli. Recently, some pharmacological strategies have been proposed that could be used for resolution of inflammation by enhancing apoptosis of inflammatory cells. **Objectives:** To study in vitro apoptotic activity of isoespintanol [ISO] and of two semi-synthetic derivatives, bromide isoespintanol [BrI] and demethylated isoespintanol [DMI], in human polymorphonuclear (PMN) cells. **Methods:** PMN were exposed to the different concentrations of ISO, BrI and DMI for 30 min in phosphate-buffered saline pH 7.4 containing 1 mg/mL glucose, 0.4 mM Mg²⁺, and 1.20 mM Ca²⁺. Viability was assessed by dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (MTT). To distinguish between the two modes of cell death, apoptosis and necrosis, we examined differences in morphological and biochemical changes of cells stained with annexin V- FITC (An) and/or propidium iodide (PI) using two different assays based on flow cytometry. **Results:** The MTT assay revealed the ability of cells to reduce MTT salt to formazan. In the presence of BrI and DMI a significant concentration-dependent decrease of cell viability was observed. The annexin V- FITC binding assay showed a high proportion of apoptotic cells for those treated with BrI (An⁺/PI⁻: 62.3 ± 8.2% vs. 2.1 ± 0.5% of control, P<0.05). The population of PMN treated with DMI produced the highest percentage (An⁺/IP⁺: 43.4 ± 5.2 % vs. 0.4 ± 0.3 % of control, P<0.05) of necrotic cells. Apoptotic nuclei were analyzed by PI staining. The cell population in the sub G₀/G₁ region represents cells with hypodiploidal DNA, an indicator of apoptosis. When cells were incubated with 50 and 100 μM of BrI, the cell population in the sub G₀/G₁ region increased, suggesting a dose-dependent increase in the population of apoptotic cells. The presence of the pan-inhibitor of caspases (Z-VAD-fmk) showed a significant reduction in cell population in the sub G₀/G₁ region, indicating less degradation of DNA. **Conclusions:** Bromide isoespintanol [BrI] induces an apoptotic process in PMN, mediated –at least in part– by activation of caspases, although this compound may probably act through other caspase-independent mechanisms as well.

Keywords: Isoespintanol, inflammation, neutrophils, apoptosis

¹ Cátedra de Farmacología Básica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

² Programa de Bioprospección de los Productos Naturales Amazónicos, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de la Amazonia, Florencia, Colombia.

³ Departament de Farmacologia, Universitat de València, Burjassot (València), España.

⁴ Laboratorio de Ciencias de los Alimentos, Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín), Colombia.

⁵ Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, La Plata, Argentina.

* Autor a quien se le debe dirigir la correspondencia : schinell@uv.es

RESUMEN

Antecedentes: La inflamación es una respuesta fisiopatológica compleja generada por diferentes estímulos. Recientemente, se han propuesto nuevas estrategias farmacológicas que podrían ser utilizadas para conducir a la resolución de la inflamación mediante el aumento de la apoptosis de células inflamatorias. **Objetivo:** Estudiar la actividad apoptótica *in vitro* del isospintanol [ISO] y dos derivados semisintéticos –bromuro de isoespintanol [BrI] e isoespintanol desmetilado [DMI] – en células polimorfonucleares humanas (PMN). **Métodos:** Las PMN fueron expuestas a diferentes concentraciones de los compuestos durante 30 min en una disolución salina tamponada con fosfato (pH 7,4). La viabilidad celular se evaluó utilizando el ensayo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Para distinguir entre los dos modos de muerte celular, la apoptosis y la necrosis, se examinaron las diferencias en los cambios morfológicos y bioquímicos de las células teñidas con anexina V (An) y/o yoduro de propidio (PI) usando dos técnicas de citometría de flujo. **Resultados:** Mediante el ensayo con MTT, se demostró que los compuestos BrI y DMI disminuyeron significativamente y de manera concentración-dependiente la viabilidad celular. El ensayo de unión con la anexina V-FITC mostró una alta proporción de células apoptóticas en las células tratadas con BrI (An⁺/PI⁺: 62,3 ± 8,2% versus 2,1 ± 0,5% del control, P <0,05). La población de células tratadas con DMI mostraron el porcentaje más alto de células necróticas (A⁺/PI⁺: 43,4 ± 5,2% versus 0,4 ± 0,3% del control, P <0,05). El análisis de núcleos apoptóticos se llevó a cabo a través de tinción con PI. La población de células en la región sub G₀/G₁ representa células con ADN hipodiploidal, que es un indicador de apoptosis. Cuando las células se incubaron con BrI, la población de células en la región sub G₀/G₁ aumentó, confirmando su mecanismo citotóxico. En presencia de un inhibidor de caspasas (Z-VAD-FMK), se observó una reducción significativa en la población celular en la región sub G₀/G₁, indicando una menor degradación del ADN. **Conclusiones:** El bromuro de isoespintanol [BrI], induce un proceso apoptótico en PMN que está mediado –al menos en parte– por la activación de las caspasas, aunque este compuesto probablemente podría actuar también a través de otros mecanismos independientes de las caspasas.

Palabras clave: Isoespintanol, inflamación, neutrófilos, apoptosis

INTRODUCTION

Mature human neutrophils have the shortest life span of all leukocytes; their spontaneous apoptosis is therefore fundamental for maintaining a normal level of circulating neutrophils and ensuring rapid resolution of inflammatory responses (1). Not surprisingly, a reduction in neutrophil apoptosis has already been linked to several inflammatory conditions including rheumatoid arthritis and acute respiratory distress syndrome (2, 3).

The occurrence of isoespintanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol) was reported in the chloroform extract of aerial parts of *Eupatorium saltense* (4) and has also been synthesized as part of the structure elucidation of the natural product

isoespintanol (5). Recently, we demonstrated that isoespintanol, isolated from the leaves of *Oxandra cf. xylopioides*, reduces paw edema induced by carrageenan. Moreover, it reduces IL-1b production and decreases IL-1b mRNA synthesis in murine macrophages RAW264.7, both mechanisms possibly responsible for its anti-inflammatory action (6). We also studied and demonstrated its antioxidant activity in both theoretical and experimental protocols (7, 8).

In this work, we study *in vitro* apoptotic activity of isoespintanol [ISO] and two semisynthetic derivatives, bromide isoespintanol [BrI] and demethylated isoespintanol [DMI] Figure 1, on human polymorphonuclear (PMN) cells.

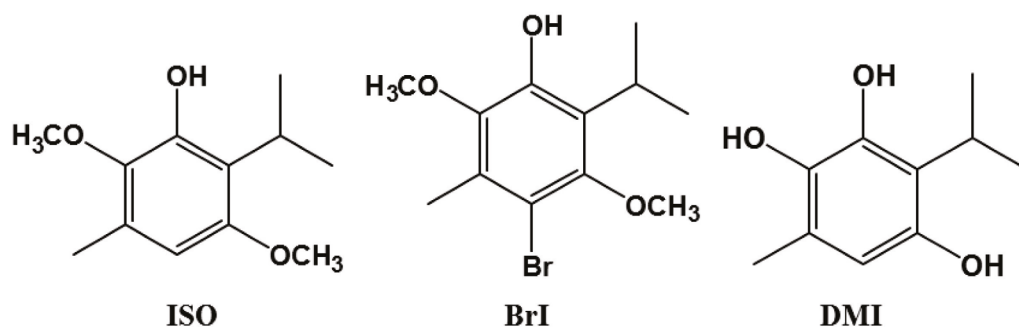


Figure 1. Chemical structures of isoespiantanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol, ISO), isoespiantanol 4-bromide (BrI) and 3,6-demethylated isoespiantanol (DMI).

MATERIALS AND METHODS

Test compounds and chemicals

Isoespiantanol [ISO, purity >99%, $^1\text{H-NMR}$] was previously isolated from leaves of *Oxandra cf. xylopioides*. BrI and DMI (purity of both >99%, $^1\text{H-NMR}$) were obtained from isoespiantanol as previously reported by Galeano et al. (9). All other chemicals were the highest analytic grade available and were purchased from Sigma-Aldrich (USA) or from Merck (Germany).

Cell isolation and culturing

Neutrophils were isolated from fresh anti-coagulated peripheral blood obtained from healthy volunteers, then purified using a standard protocol. Briefly, erythrocytes were sedimented by adding an equal volume of dextran/saline solution (3% dextran T-500 in 0.9% NaCl) at room temperature for 30 min. The leukocyte-rich upper layer of the suspension was then collected and centrifuged on a density gradient with Histopaque[®]-1077 (Sigma-Aldrich) according to manufacturer's instructions.

Residual erythrocytes were removed by hypotonic lysis (cold water). Neutrophils were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4, then resuspended in the same buffer containing 1 mg/mL glucose, 0.4 mM Mg^{2+} , and 1.20 mM Ca^{2+} . Cell viability was determined by the trypan blue dye exclusion method.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

The MTT assay (10) was used to determine the cytotoxicity of the compounds. Briefly, human PMN cells (2.5×10^6) were incubated at 37 °C for 3 h with PBS (pH 7.4) containing the compounds (1 –

100 μM). Controls were treated with the vehicle and correspond to 100% viability. Formazan deposits produced by the cells in each tube were dissolved in a solution of 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) in 0.01 M HCl and tubes were incubated overnight. The soluble product was quantified, measured at 570 nm (with background subtraction at 630 nm) in a Beckman DU 640.

Analysis of apoptotic (hypodiploid) nuclei

Apoptotic nuclei were analyzed by propidium iodide staining, based on the protocol described by Nicoletti et al. (11) with slight modifications. Briefly, cells were incubated under the same conditions previously described, then centrifuged ($500 \times g$). The resulting pellet was suspended in ice-cold ethanol (70%) and stored at –20 °C for at least 30 min. Cells were then washed twice in PBS at 4 °C and resuspended in 500 mL of DNA staining solution (20 mg/mL PI plus 0.2 mg/mL RNAse A in PBS). Resuspended cells were incubated in the dark at room temperature for 30 min, after which fluorescence of individual nuclei was measured with a Becton Dickinson FACSScan flow cytometer (USA). A minimum of 20,000 events were counted per sample. The percentage of apoptotic cell nuclei (hypodiploid DNA peak) was then calculated. Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD-fmk), a pan-inhibitor of caspases, was added to the cell suspension just before application of each compound.

Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC) in apoptotic cells

Phosphatidylserine exposure was measured by annexin V-FITC binding (12). After appropriate incubations with the compounds (100 mM), cells

(2.5×10^6) were washed twice with cold PBS and resuspended in a binding buffer solution (10 mM Hepes/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) at a concentration of 1×10^6 cells/mL. Then, 1×10^5 cells were transferred to a 5 mL culture tube to which 5 mL of Annexin V-FITC and 10 mL of propidium iodide solution (50 mg/mL in PBS) were added. Tubes were then incubated for 15 min at room temperature in the dark. After incubation, 400 μL of binding buffer were added to each tube and flow cytometry analyses were run.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SD for the indicated number of observations or illustrated by an observation representative of results from several different experiments. Statistical analysis used ANOVA followed by Dunnett's *t*-test for multiple comparisons using the Prism analysis program (GraphPad). Differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Our research included an assessment of the cytotoxicity of the extracts on human PMN cells. The MTT assay revealed that the ability of cells to reduce the MTT salt to formazan decreased significantly in the presence of BrI and DMI (Figure 2). The results were expressed as a percentage of the control (cells treated with 0.5% DMSO). No cytotoxic activity was detected in selected concentrations of ISO.

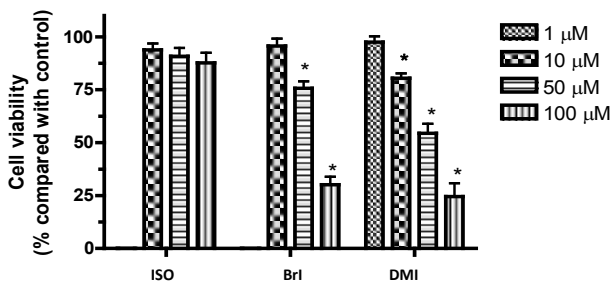


Figure 2. Effects of isoespintanol [ISO] and related compounds [BrI and DMI] in four concentrations (1, 10, 50 and 100 μM) on cell viability of PMN cells. Values represent percentages of live cells compared to the control group treated with vehicle only (culture medium with 0.5% dimethyl sulfoxide). Data represent the mean and standard deviation of five different experiments. The symbol * indicates the significant difference ($P < 0.05$).

The nature of the cytotoxicity was evaluated with different flow cytometry methods, including the exposure of membrane phosphatidylserine through Annexin V-FITC binding and the development of hypodiploid nuclei by propidium iodide.

While only a small proportion of PMN untreated or treated with ISO underwent apoptosis [Annexin V-FITC positive, propidium iodide negative (An^+/PI^-)], the proportion was significantly greater for the cells treated with BrI (An^+/PI^- : $62.3 \pm 8.2\%$ vs. $2.1 \pm 0.5\%$ of control, $P < 0.05$). The population of PMN cells treated with DMI produced the highest percentage (An^+/PI^+ : $43.4 \pm 5.2\%$ vs. $0.4 \pm 0.3\%$ of control, $P < 0.05$) with a typical distribution indicative of the necrotic process (Figure 3).

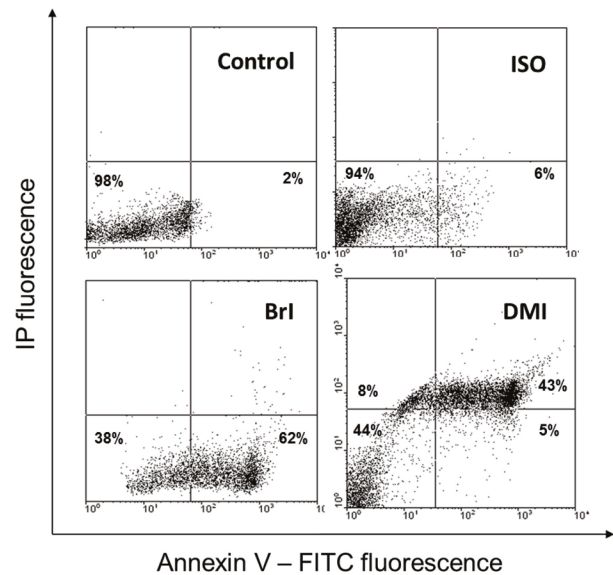


Figure 3. Promotion of apoptosis in neutrophils by isoespintanol and related compounds. Representative dot plots of annexin V-FITC (An)/propidium iodide (PI) staining. The lower left quadrant shows the vital (double negative) population. The lower right quadrant shows the apoptotic (An^+/PI^-) population. Finally, cells in the top right quadrant (An^+/PI^+) are in later stages of apoptosis and necrosis. Graph shows the experiment of the compounds at 100 μM . Data are representative of three experiments.

The relative distribution of DNA in the cells incubated with 50 and 100 μM of BrI is shown in Figure 4A and 4B. The line in the sub G_0/G_1 region of the histogram indicates the range of cells with hypodiploid DNA, an indicator of apoptosis. The results showed that BrI-induced concentration-dependent changes in the percentage population of cells with hypodiploid DNA.

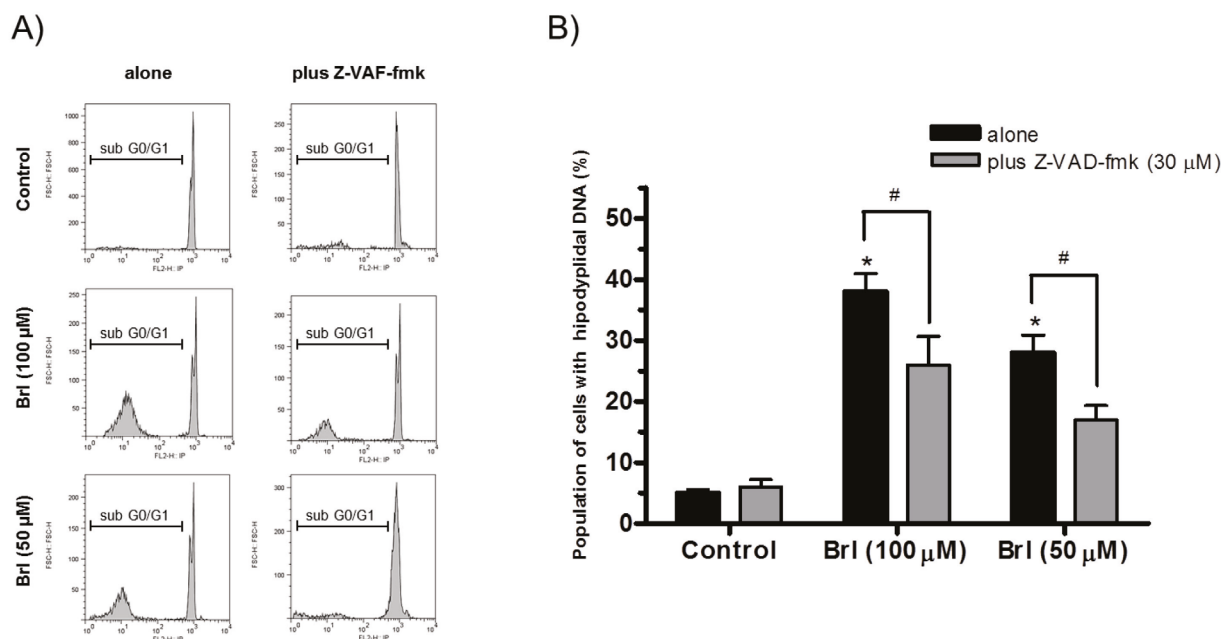


Figure 4 (A and B). Effects of Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD-fmk) on BrI-induced changes in the percentage population of cells with hypodiploidal DNA. A) The histogram of propidium iodide fluorescence monitored from 20,000 cells. The line in the sub G_0/G_1 region of the histogram indicates the range of cells with hypodiploidal DNA; B) BrI-induced concentration-dependent changes in the percentage population of cells with hypodiploidal DNA. The column and bar indicate the mean and standard deviation of 4–6 experiments. The symbol * indicates the significant difference ($P < 0.05$) between the control group and the BrI-treated group. The symbol # indicates a significant difference ($P < 0.05$) between groups with and without 30 μM Z-VAD-fmk treatment.

In order to investigate involvement of caspase activation in BrI-induced cell death, the effect of the pan-inhibitor of caspases (Z-VAD-fmk) was examined (Figure 4A and 4B). The increase in the population of cells with hypodiploidal DNA induced by BrI was suppressed by 30 μM Z-VAD-fmk, showed a significant reduction in the cell population in the sub G_0/G_1 region (Figure 4B).

DISCUSSION

Inflammation is a complex physiopathologic response to different stimuli. It can be treated and resolved by acting on different mediators, enzymes, and pathways involved in the process. This may include influencing arachidonate metabolism by inhibiting either certain transcription factors or production and/or scavenging of free radicals produced during the process, and by acting on cells involved in the process. New cellular and molecular circuits involved in resolution of inflammation are being found at a rapid pace. In some experimental models, a causal relationship has been detected between neutrophil apoptosis and the outcome of

acute tissue injury (13). Recently, several publications have proposed pharmacological strategies that could be used for resolution of inflammation by enhancing apoptosis of inflammatory cells (1, 14). Consequently, our research included assessment of the cytotoxicity of monoterpene isoespintanol [ISO] and two related compounds, BrI and DMI, on human PMN cells.

In the presence of BrI and DMI a significant and concentration-dependent decrease of cell viability was observed. No cytotoxic activity was detected in the assay of compound ISO (Figure 2).

To distinguish between the two modes of cell death, apoptosis and necrosis, we examined differences in morphological and biochemical changes of dying cells by two different assays based on flow cytometry techniques.

As shown by the annexin V-FITC binding assay (Figure 3), the proportion of apoptotic cells was much greater for those treated with BrI (An^+/PI^- : $62.3 \pm 8.2\%$ vs. $2.1 \pm 0.5\%$ of control, $P < 0.05$). The population of PMN cells treated with DMI produced a typical distribution indicative of the

necrotic process (Figure 3), for this reason, it was not selected for the following studies.

The relative distribution of DNA in the cells incubated with BrI is shown in Figure 4A and 4B. The cell population in the sub G_0/G_1 region as shown in Figure 4A represents cells with hypodiploid DNA, an indicator of apoptosis. When cells were incubated with 50 and 100 μM of BrI, the cell population in the sub G_0/G_1 region increased, suggesting that BrI induced a dose-dependent increase in the population of apoptotic cells Figure 4A.

Apoptosis of granulocytes is a sensitive, responsive and highly regulated process. Various signaling pathways confer these features. Each pathway is responsive to specific endogenous stimuli and mediates pro- or anti-apoptotic effects; some are dependent on the intervention of caspases and other independent (1, 13-17).

Caspases are a family of cysteine proteases that play essential roles in apoptosis, necrosis, and inflammation (18). These proteases are essential in cells for apoptosis, or programmed cell death, and their role in the mechanism of active compounds can be investigated using Z-VAD-fmk, a pan-inhibitor of caspases (19). For studying the possible effects of our compounds on this way of programmed cell death, we applied the inhibitor to cell culture in order to know the possible inhibition of caspases can be related with the mechanism of isoespintanol and its derivatives. The presence of Z-VAD-fmk showed a significant reduction in the cell population in the sub G_0/G_1 region, indicating less DNA degradation Figure 4B, whereas the presence of the inhibitor suppressed the increase in the cell population with hypodiploid DNA induced by BrI.

In this paper, we intend to contribute to evidence of the ability of some compounds to induce apoptosis in PMN. We conclude that BrI induce an apoptotic process in human PMN cells partially mediated by activation of caspases, although this compound may also probably act through other caspase-independent mechanisms.

We agree that extrapolation in vivo of results obtained in cultured cells with a compound is problematic and that is why commentaries on such potential extrapolation in the text of the manuscript are very cautious. Further studies should focus on studying possible mechanisms of action of this compound, which contributes to neutrophil apoptosis, as well as its potential anti-inflammatory activity in *in vivo* models.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

GS thanks the Universitat de Valencia for its economic support (Convocatòria d'Estades Temporals per a Investigadors Convidats, 2011). This work was partially supported by a grant from Universidad Nacional de La Plata (11/M162). PG and BR thank Colciencias for co-financing the project.

REFERENCES

- Hallett JM, Leitch AE, Riley NA, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2008 May; 29(5):250-257.
- Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Relevance of granulocyte apoptosis to resolution of inflammation at the respiratory mucosa. *Mucosal Immunol*. 2008 Sep; 1(2):350-363.
- Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun*. 2010 Feb; 2(3):216-227.
- Morales I, De La Fuente JR, Sosa VE. Componentes de *Eupatorium saltense*. *An Asoc Quim Argent*. 1991 Mar-Apr; 79(3):141-144.
- Hocquemiller R, Cortes D, Arango G J, Myint SH, Cavé A, Angelo A, Muñoz V, Fournet A. Isolement et synthèse de l'espintanol, nouveau monoterpène antiparasitaire. *J Nat Prod* 1991. Mar-Apr; 54(2):445-452.
- Rojano B, Pérez E, Figadère B, Martin MT, Recio MC, Giner R, Ríos JL, Schinella G, Sáez J. Constituents of *Oxandra cf. xylopioides* with anti-inflammatory activity. *J Nat Prod*. 2007 May; 70(5):835-838.
- Rojano B, Sáez J, Schinella GR, Quijano J, Vélez E, Gil A, Notario R. Experimental and theoretical determination of the antioxidant properties of isoespintanol (2-isopropyl-3,6-dimethoxy-5-methylphenol). *J Mol Struct*. 2008 Apr; 877(1-3):1-6.
- Rojano BA, Gavidia CA, Gil MA, Sáez JA, Schinella GR, Tournier HA. Antioxidant activity of the isoespintanol in different media. *Vitae*. 2008 Jan-Jun; 5(1):173-181.
- Galeano PL, Gil MA, Gil JH, Otálvaro LF, Saéz JA, Rojano BA. Síntesis y actividad antioxidante de dos derivados de isoespintanol. *Rev Colomb Quim*. 2010 May-Jun; 39(2):173-180.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec; 65(1-2):55-63.
- Nicoletti I, Megliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocytes apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991 Jun; 139(2):271-279.
- Homburg CHE, De Haas M, von dem Borne AEG, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CPM, Roos D. Human neutrophils lose their surface Fc γ R and acquire annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*. 1995 Jan; 85(2):532-540.
- El Kebir D, Filep JG. Role of neutrophil apoptosis in the resolution of inflammation. *ScientificWorldJournal*. 2010 Sep; 10:1731-1748.
- Ilmarinen P, Kankaanranta H. Eosinophil apoptosis as a therapeutic target in allergic asthma. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014 Jan; 114(1):109-117.

15. Xu Y, Loison F, Luo HR. Neutrophil spontaneous death is mediated by down-regulation of autocrine signaling through GPCR, PI3K α , ROS, and actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb; 107(7):2950-2955.
16. Simon HU. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol Rev*. 2003 Jun; 193:101-110.
17. Atallah M, Krispin A, Trahtemberg U, Ben-Hamron S, Grau A, Verbovetski I, Mevorach D. Constitutive neutrophil apoptosis: regulation by cell concentration via S100 A8/9 and the MEK-ERK pathway. *PLoS One*. 2012 Feb; 7(2):e29333.
18. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Apr; 5(4):a008656.
19. Vandenabeele P, Vanden Berghe T, Festjens N. Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci STKE*. 2006 Oct; 2006(358):pe44.

PROPUESTA PARA SELECCIONAR ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS DE COLOMBIA PARA INVESTIGACIÓN CON BASE EN SU CITOTOXICIDAD

PROPOSAL TO SELECT ESSENTIAL OILS FROM COLOMBIAN PLANTS FOR RESEARCH BASED ON ITS CYTOTOXICITY

Sindi Alejandra VELANDIA¹ BSc, María Camila FLECHAS¹ MSc., Elena E. STASHENKO² Ph.D.,
Raquel E OCAZIONEZ^{1*} Ph.D.

Recibido: Enero 21 de 2016. Aceptado: Abril 08 de 2016.

RESUMEN

Antecedentes: Conocer la tendencia de productos de plantas a causar toxicidad en humanos es parte de la investigación orientada al descubrimiento de un medicamento natural. Las pruebas en animales son relativamente costosas, de bajo rendimiento, asociadas a sufrimiento del animal y diferencias relativas a la especie hacen difícil inferir efectos en humanos. Las pruebas en célula viva son recomendadas. **Objetivo:** Estudiar la tendencia a toxicidad de aceites esenciales (AE) de plantas de Colombia usando un ensayo basado en célula. **Método:** Los AE de 18 especies distintas de plantas fueron estudiados. Se usó el ensayo del MTT en seis líneas celulares de humano y animal derivadas de tejido normal y canceroso, las cuales se trataron antes y después de la proliferación. Los AE se organizaron en el orden de una agrupación jerárquica con base en los valores de CC_{50} y la sumatoria de la jerarquía ponderada en el panel de células ($\sum JPi$) se usó como indicador de similitud. Cuanto mayor fue el valor de $\sum JPi$ menor fue la tendencia a toxicidad. **Resultados:** Los AE con valores de $CC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ en al menos cinco condiciones experimentales presentaron valores de $\sum JPi > 6,0$ sugiriendo baja tendencia a toxicidad y fueron en orden descendente ($\sum JPi$ en paréntesis): *Calycolpus moritzianus* (O.Berg) Burret (9,7) < *Psidium sartinianum* (O. Berg) Nied. (8,9) < *Wedelia calycina* (6,5) < *Lippia micromera* Schauer (6,2) \approx *Piper haltonii* (6,2). AE con valores de $CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ en cuatro o más condiciones experimentales presentaron valores $\sum JPi < 4,0$ sugiriendo alta tendencia a toxicidad y fueron en orden ascendente: *Tagetes caracasana* Kunth (2,7 – 2,8) > *Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob. (3,0) > *Ageratina aff. popayanensis* (Hieron.) R.M.King & H.Rob. (3,1) > *Lantana colombiana* López-Pal. (3,3) > *Turnera diffusa*. (3,4). AE de *Tagetes caracasana* presentó actividad antiproliferante (CI_{50} : 42,2 y 47,9 $\mu\text{g/mL}$) sobre células humanas de cáncer de cérvix. **Conclusión:** El abordaje metodológico permitió identificar AE con baja y alta tendencia a toxicidad. Los resultados podrían tener valor para predecir actividad *in vivo* y priorizar muestras para futuras investigaciones.

Palabras clave: Toxicidad, aceite esencial, MTT, planta, fitoterapia.

¹ Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales (CENIVAM).
1Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP), UIS, Parque Tecnológico Guatiguará, CINTROP, Av Los Bambues,
km 2 Autopista, Piedecuesta.

² Centro de investigación en Biomoléculas (CIBIMOL), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: relocaz@uis.edu.co

ABSTRACT

Background: Part of the research process focused on discovering natural medicines is the study of products derived from plants, which may be toxic to humans. Animal-based test methods can be relatively expensive, low-throughput and associated with animal suffering, and differences in animal species may be difficult to infer human health effects. Methods based on living cells are recommended. **Objectives:** To study the tendency to toxicity of essential oils (EOs) from plants of Colombia using a cell-based assay. **Methods:** EOs from different species ($n = 18$) of plants were included. The MTT assay was used on six human and animal cell lines derived from normal and cancerous organs, which were treated before and after proliferation. The EOs were arranged in the order of a hierarchical clustering based on their CC_{50} values, and the sum of weighted hierarchy across cell panel ($\sum_i WH$) was used as the similarity metric. The greater the value of $\sum_i WH$ lesser tendency to toxicity. **Results:** The EOs, which showed CC_{50} values $> 200 \mu\text{g/mL}$ in at least five experimental conditions presented $\sum_i WH$ values $> 5,0$ suggesting lower tendency to toxicity, and they were in descending order ($\sum_i WH$ in parentheses), as follows: *Calycolpus moritzianus* (O.Berg) Burret (9,7) $<$ *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied. 1893 (8,9) $<$ *Wedelia calcycina* (6,5) $<$ *Lippia micromera* Schauer (6,2) \approx *Piper haltonii* Jacq. (6,2) The EOs, which showed $CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ in four or more experimental conditions presented $\sum_i WH$ values < 4.0 suggesting higher tendency to toxicity, and they were in ascending order, as follows: *Tagetes caracasana* Kunth (2,7 – 2,8) $>$ *Chromolaena odorata* (L.) R.M.King & H.Rob. (3,0) $>$ *Ageratina aff. popayanensis* (Hieron.) R.M.King & H.Rob. (3,1) $>$ *Lantana colombiana* López-Pal. (3,3) $>$ *Turnera diffusa* (3,4). EO from *Tagetes caracasana* Kunth presented relevant antiproliferative activity (CI_{50} : $< 50.0 \mu\text{g/mL}$) on cells from human cervical carcinoma. **Conclusions:** The methodological approach allows identifying EOs with lower and higher tendency to toxicity. Data generated may be valuable for predicting *in vivo* toxicity and for prioritizing samples for further studies.

Keywords: Toxicity, essential oils, MTT, plant, phytomedicine.

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de compuestos volátiles producidos como metabolitos secundarios de plantas. Al menos 3000 se han identificado y 300 están comercialmente disponibles para diversos usos como la fabricación de perfumes, cosméticos, productos de limpieza, insecticidas, conservantes y aditivos de alimentos (1-5). Los AE también están presentes en formulaciones de medicamentos homeopáticos, por ejemplo, la aplicación tópica se usa para tratar el acné, dermatomicosis y otras afectaciones de la piel, la aromaterapia para infecciones del tracto respiratorio y afecciones del sistema nervioso y el efecto anticancerígeno están bien documentado (6-9). Varios estudios sugieren que estas propiedades medicinales se deben en gran parte a fortalecimiento del sistema inmune (7, 10).

En términos generales, la práctica medicinal con AE se considera segura para la salud humana. No obstante, el uso inadecuado puede resultar en efectos adversos como irritación o cambios malignos en la piel por aplicación tópica excesiva y convulsiones,

hepato-toxicidad y daño renal cuando la absorción sistémica es alta (2, 7). Se ha demostrado que los AE generan especies reactivas de oxígeno resultando en fragmentación del ADN (10,11).

La evaluación inicial del potencial tóxico de productos de plantas se requiere para seleccionar muestras líderes para la fase de descubrimiento de un producto para uso humano. La experimentación animal se recomienda ya que permite inferir con cierta confiabilidad el grado de afectación sobre diversos órganos humanos en el humano, en especial hígado, riñón y cerebro (12), aunque tiene tres limitaciones mayores: i) alto costo en infraestructura para cumplir con parámetros de buenas prácticas; ii) bajo rendimiento debido a que un limitado número de muestras se puede analizar en corto tiempo; iii) el análisis está restringido a muestras que no causen dolor intenso o sufrimiento permanente al animal según normas éticas actuales (12,13). Por estas dificultades viene aumentado el uso de ensayos basados en célula (citotoxicidad *in vitro*) y el interés de la comunidad científica para que los resultados se tengan en cuenta en la regulación de productos recién descubiertos (14).

Citotoxicidad se define como el efecto acumulativo sobre el número de células debido a apoptosis, necrosis o reducción de la tasa de replicación celular. Existen ensayos *in vitro* para evaluar cada alteración celular y se recomienda realizarlos en varios tipos de células (15-20). Rezk *et al.* (21) compararon y jerarquizaron la actividad citotóxica de extractos de plantas usando diversos ensayos, el abordaje permitió identificar las muestras líderes para investigación en antimicrobianos de origen natural. El perfil de citotoxicidad en un panel de células y la jerarquización de la actividad también se usaron para identificar compuestos sintéticos líderes (22).

En Colombia el uso medicinal de AE es muy limitado debido en gran parte a falta de información sobre efectos adversos. En este trabajo se presenta un abordaje metodológico para evaluar y comparar

la citotoxicidad de muestras de AE usando el ensayo del MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio], el cual permitió identificar muestras líderes para investigaciones futuras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las plantas se colectaron en áreas rurales y semiurbanas de los departamentos de Santander, Valle del Cauca y Arauca (Tabla 1). La identificación taxonómica fue realizada por el Dr. José Luis Fernández de la Universidad Nacional (Bogotá), una muestra codificada de cada planta se depositó para referencia en el Herbario Nacional de esta Universidad con su respectivo número de *voucher*.

Tabla 1. Plantas usadas en el estudio.

Familia	Nombre científico	Voucher
Asteraceae	<i>Ageratina aff. popayanensis</i> (Hieron.) R.M.King & H.Rob.	COL 579422
Asteraceae	<i>Baccharis decussata</i> (Klatt) Hieron	COL 582606
Myrtaceae	<i>Calycolpus moritzianus</i> (O.Berg) Burret	COL 578360
Asteraceae	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M.King & H.Rob.	COL 583919
Boraginaceae	<i>Cordia curassavica</i> (Jacq.) Roem. & Schult.	COL 559446
Lamiaceae	<i>Hyptis brachiata</i> Briq.	COL 582531
Verbenaceae	<i>Lantana colombiana</i> López-Pal.	COL 582328
Verbenaceae	<i>Lippia micromera</i> Schauer	COL 578971
Verbenaceae	<i>Lippia organoides</i> H.B.K	COL 582599
Piperaceae	<i>Piper dilatatifolium</i> Trel. & Yunck,	COL 578975
Piperaceae	<i>Piper holtonii</i> C.DC.	COL 582357
Piperaceae	<i>Piper marginatum</i> Jacq.	COL 578365
Piperaceae	<i>Piper médium</i> Jacq.	COL 583968
Myrtaceae	<i>Psidium sartorianum</i> (O. Berg) Nied.	COL 578359
Asteraceae	<i>Tagetes caracasana</i> Kunth	COL 579244
Asteraceae	<i>Tagetes caracasana</i> Kunth	COL 559441
Turneraceae	<i>Turnera diffusa</i> Willd. ex Schult.	COL 578361
Asteraceae	<i>Wedelia calycina</i> Rich.	COL 583911
Asteraceae	<i>Wedelia calycina</i> Rich.	COL 578353
Fabiaceae	<i>Zornia brasiliensis</i> Vogel	COL 582604

Muestras

Se analizaron 20 muestras de AE de 18 especies distintas de plantas. La extracción del AE se hizo mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas o mediante extracción por arrastre con

vapor. Detalles de los procedimientos han sido publicados (23,24). De cada AE se hizo una preparación concentrada en dimetilsulfóxido (DMSO: 1%) como solvente y se almacenaron alícuotas a -20 °C. La misma muestra se usó para todos los experimentos.

Células

Se usaron seis líneas celulares de las cuales dos son de tejido normal y las otras de canceroso. De origen humano: HEK293 (ATCC® CRL-1573™) de riñón embrionario; HEPG2 (ATCC® CRL-11997™) de carcinoma de hígado; MCF-7 (ATCC® HTB-22™) de carcinoma de glándula mamaria y HELA (ATCC® CCL-2™) de carcinoma cervical. Las tres primeras se cultivaron en medio DMEM-F12 [GIBCO Co.] suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF [GIBCO, Co.]) y antibiótico (P/E: Penicilina/Estreptomicina [Invitrogen Carlsbad, CA.]) y la otra, en medio MEM (GIBCO) suplementado con 8% de SBF y P/E. Las líneas celulares de origen animal fueron: VERO (ATCC® CCL-81™), riñón de mono, que fueron cultivadas en medio MEM suplementado como se mencionó; y B16F10 (ATCC® CRL-6475™) de melanoma de ratón cultivadas en medio RPMI-1640 [GIBCO Co.] suplementado con 10% de SBF y P/E. Para cada línea celular se estableció previamente el tiempo de duplicación en 24 h como tiempo mínimo para formación de monocapa viable y confluyente 50 – 80%.

Ensayo de citotoxicidad

Se usó el ensayo colorimétrico basado en la reducción del MTT a formazán por enzimas oxidoreductasas en células vivas. Se siguió el protocolo previamente descrito (16,17). Brevemente, las células se sembraron en placas de 96 pozos en medio que contenía o no AE a variada concentración (50, 100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y las placas se incubaron durante 72 h a 37 °C. El medio se removió y luego se adicionaron 20 μL de MTT (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a concentración de 5 mg/mL. Las placas se incubaron nuevamente 4 h a 37°C, se retiró el MTT y enseguida se adicionaron 100 μL de DMSO para solubilizar los cristales de formazán. La intensidad del color (absorbancia) en cada pozo se cuantificó en un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) a 580 nm y se consideró proporcional a la viabilidad celular. Las células se expusieron al AE en el momento de la siembra que aquí se denomina tratamiento **a** (antes de la proliferación) y 24 h después o tratamiento **d** (después de la proliferación). Con cada línea celular y cada tratamiento se realizaron tres ensayos independientes por duplicado y células no-tratadas o tratadas con DMSO se incluyeron como controles. El número

de células sembradas en cada pozo se determinó en ensayos previos y se seleccionó aquel con el cual la absorbancia de las no-tratadas a las 72 h fue $> 0,9$.

Análisis de datos

Los valores promedio de absorbancia de experimentos con células tratadas con AE se corrigieron usando el valor promedio de células tratadas con DMSO. Las curvas dosis-respuesta se construyeron, ajustaron y validaron usando el paquete estadístico R (R Development Core Team [2013]. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>). El porcentaje de viabilidad de las células AE-tratadas se calculó referente a 100% de las no-tratadas y la actividad se expresó en $\mu\text{g}/\text{mL}$ como concentración citotóxica 50 (CC_{50}) o que causó reducción de la viabilidad en 50%. Se construyó una matriz con los valores de la CC_{50} de ocho condiciones experimentales (cuatro líneas celulares con dos tratamientos) que se usó para jerarquizar la actividad. Para cada AE, se calculó la jerarquía ponderada individual (JPi) en cada condición experimental así: $\text{JPi} = (\text{CC}_{50} \times r / \text{C}_{\text{mc}}) \times \text{P}$, donde: $r = 5$ o valor referente común; C_{mc} = concentración máxima usada en el ensayo; P = valor ponderado de la línea celular como se detalla adelante. La sumatoria de las jerarquías individuales ($\sum \text{JPi}$) se usó como indicador de similitud y las muestras se organizaron en orden descendente con base en este valor.

RESULTADOS

Las curvas dosis-respuesta generadas en los ensayos se agruparon en cuatro categorías dependiendo del ajuste a un modelo de regresión logística simple (Figura 1): curvas con buen ajuste ($P_{[\text{Wald}]}$: < 0.01) se denominaron clase 1a, con ajuste aceptable ($P_{[\text{Wald}]}$: 0.02 – 0.04) clase 1b y sin ajuste clase 2 ($P_{[\text{Wald}]}$: > 0.05). Las clase 2 se denominaron 2a cuando se observó reducción de la viabilidad en 90 - 100% a las menores concentraciones de AE y clase 2b cuando la reducción fue $< 50\%$ con cualquier concentración. La curva clase 2b se usó como indicador de susceptibilidad de la línea celular al tratamiento con el AE ya que cuanto mayor la proporción de muestras con este tipo de respuesta, menor fue la susceptibilidad.

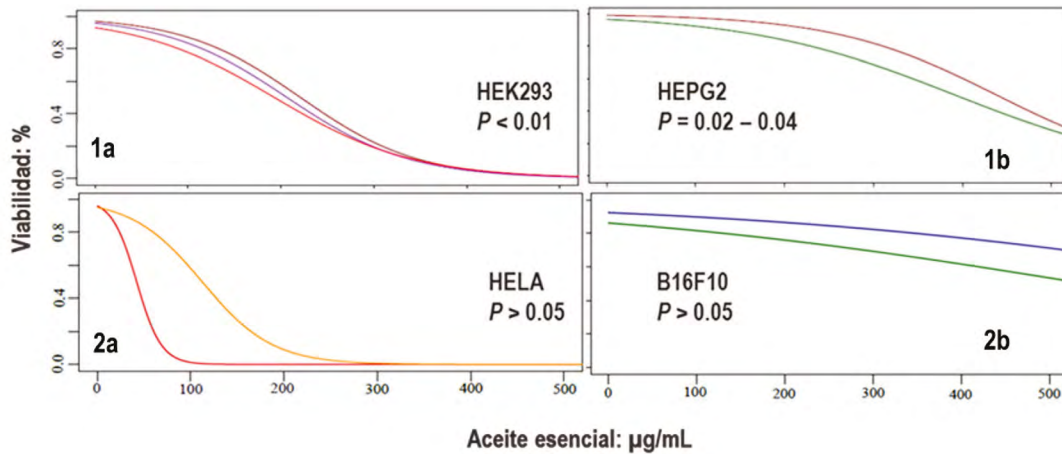


Figura 1. Curvas dosis-respuesta representativas. Las células se trataron con variadas concentraciones de aceite esencial y a las 72 h se determinó la viabilidad con respecto al control (no-tratado). HEK293: riñón humano embrionario. HEPG2: hígado humano. HELA: cérvix humano. B16F10: piel (melanocitos) de ratón. El valor P se calculó con la prueba de Wald y refleja el ajuste a un modelo de regresión logística simple. 1a, 1b, 2a y 2b se refiere a la clase de curva y cada color de la línea corresponde a un aceite esencial.

La proporción de AE según curva dosis-respuesta en cada línea celular, se presenta en la Figura 2. Se observó que curvas clase 1a y 1b (buen ajuste) fueron más frecuentes cuando las células se trataron antes (tratamiento **a**) que después (tratamiento **d**) de la proliferación (65,3% vs. 53,3%). Con respecto a la susceptibilidad, el rango por línea celular fue en el siguiente orden (frecuencia de curvas 2b en paréntesis): tratamiento a, VERO (0%) > HELA (5%) ≈

MCF7 (5%) > B16F10 (10%) > ≈ HEK293 (10%) > HEPG2 (15%); tratamiento d, HEK293 (0%) > VERO (5%) ≈ B16F10 (5%) ≈ HEPG2 (50). Los resultados muestran que células de riñón de mono (VERO) expuestas a los dos tratamientos fueron las más susceptibles y al contrario las de hígado humano (HEPG2). Se observó que las células de riñón humano (HEK293) fueron notoriamente más susceptibles después de la proliferación que antes de esta.

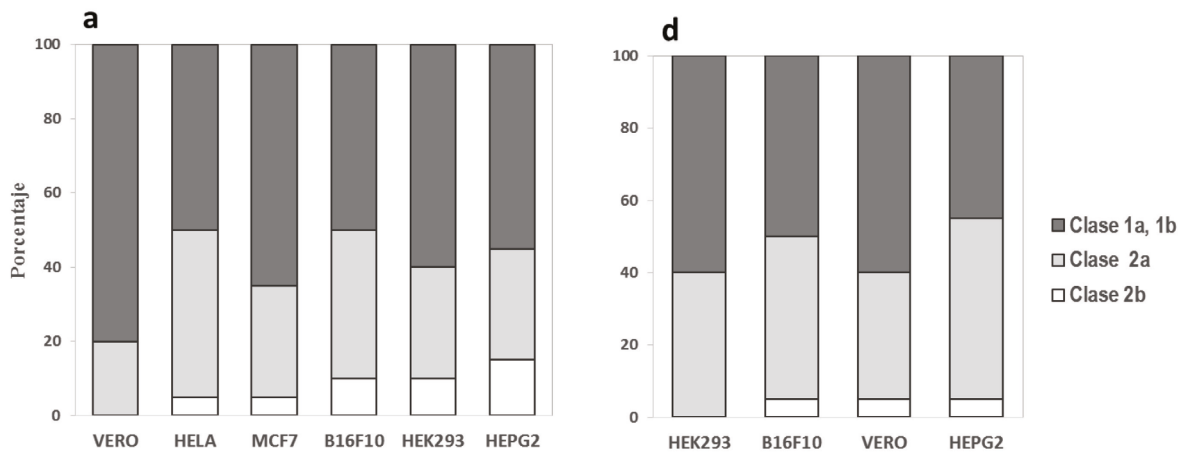


Figura 2. Proporción de aceites esenciales según curva dosis-respuesta en cada línea celular. Cuanto mayor la clase 2b menor la susceptibilidad de la célula. Tratamiento (a) antes y (d) después de la proliferación celular. Células humanas: HEPG2-hígado, HEK293-riñón, MCF7-glándula mamaria, HELA-cuello uterino. Células de animal: B16F10-piel de ratón, VERO-riñón de mono.

De las curvas dosis – respuesta se derivaron los valores de la CC_{50} en cada línea celular. Cuando esto no fue posible (curvas clase 2) se asignó la mínima ($50 \mu\text{g/mL}$) o máxima ($500 \mu\text{g/mL}$) concentración usada en el ensayo que redujo en $> 50\%$ la viabilidad (Tablas 1 y 2, Suplementarias). Los valores CC_{50} se agruparon en rangos que sirvieron para valorar la citotoxicidad (Figura 3), así: 351 – 500, 201 – 350, 100 – 200 y 20 – 99 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, como baja, media, alta y muy alta citotoxicidad adoptando criterios de Cos *et al.* (23) y Ferraz *et al.* (24), y la proporción de muestras con valores CC_{50} entre 20 – 99 $\mu\text{g/mL}$ se consideró grado de susceptibilidad. Con tratamiento **a**, el rango

de mayor a menor susceptibilidad (porcentaje de AE con CC_{50} de 20 – 99 $\mu\text{g/mL}$ en paréntesis) fue como sigue: HELA (25,0%) \approx B16F10 (25,0%) $>$ VERO (10,0%) $>$ MCF7 (0%) \approx HEK293 (0%) \approx HEPG2 (0%); con tratamiento **d**, fue: VERO (30,0%) $>$ B16F10 (25,0%) \approx HEPG2 (25,0%) $>$ HEK293 (20,0%). Los resultados sugieren que las células de riñón de mono (VERO) fueron más sensibles a los dos tratamientos con AE comparadas con las de riñón (HEK293) e hígado humano (HEPG2). De las células cancerosas, las de cérvix (HELA) y piel (B16F10) fueron más susceptibles que las de glándula mamaria (MCF7) y hepatoma (HEPG2).

Tabla 1 – Suplementaria. Valores de la concentración citotóxica 50 (CC_{50}) de aceites esenciales en células tratadas antes de la proliferación celular

Voucher: COL_	Línea celular					
	HEK293	HEPG2	HELA	MCF7	B16F10	VERO
579422	217,9 \pm 70.4	199.3 \pm 57.5	112.4 \pm 53,6	207.0 \pm 73.3	112.7 \pm 62.0	238.7 \pm 54.9
582606	216.8 \pm 47.6	267.9 \pm 51.5	121.2 \pm 63.7	192.6 \pm 54.2	161.6 \pm 49.0	183.4 \pm 48.9
578360	>500.0	>300.0	>300.0	>300.0	40.2 \pm 34.9	117.1 \pm 49.4
583919	147.1 \pm 48.3	209.8 \pm 40.6	82.2 \pm 47.1	188.3 \pm 49.8	154.6 \pm 39.9	<50.0
559446	280.8 \pm 89.3	>300.0	193.2 \pm 77.4	153.2 \pm 78.1	184.1 \pm 81.1	132.0 \pm 553.4
582531	156.2 \pm 43.8	175.9 \pm 43.7	98.8 \pm 46.3	153.8 \pm 49.9	>500.0	107.4 \pm 45.9
582328	221.2 \pm 44.5	250.5 \pm 50.5	136.3 \pm 65.2	175.9 \pm 48.7	159.3 \pm 46.7	157.2 \pm 56.9
578971	409.0 \pm 77.4	>300	237.4 \pm 66.5	300.0	459.7 \pm 400	233.8 \pm 51.4
582599	186.0 \pm 46.7	192.6 \pm 45.4	156.6 \pm 44.7	164.7 \pm 40.5	162.2 \pm 50.9	173.2 \pm 42.3
578975	294.1 \pm 75.0	167.7 \pm 59.6	89.1 \pm 24	112.1 \pm 51.2	88.3 \pm 37.5	180.4 \pm 50.3
582357	212.7 \pm 58.6	478.3 \pm 73.3	187.1 \pm 55.5	204.4 \pm 53.2	256.8 \pm 59.2	159.8 \pm 67.5
578353	>500	>300.0	283.2 \pm 85.0	>300.0	173.8 \pm 61.4	168.2 \pm 47.9
578359	>500	>300.0	342.4 \pm 218	>300.0	151.7 \pm 100	187.5 \pm 47.5
583911	194.3 \pm 40.2	271.6 \pm 47.6	174.9 \pm 37.6	233.0 \pm 52.6	234.8 \pm 41.7	139.4 \pm 40.2
578365	277.8 \pm 84.1	298.1 \pm 78.4	163.8 \pm 72.2	169.5 \pm 73.0	125.0 \pm 384	209.1 \pm 48.4
583968	221.4 \pm 52.5	376.7 \pm 62.6	205.5 \pm 46.8	284.7 \pm 61.3	251.5 \pm 70.7	199.5 \pm 49.6
579244	212.8 \pm 78.6	>300.0	42.2 \pm 22.3	233.1 \pm 59.3	26.9 \pm 13.3	<50.0
559441	198.1 \pm 76.2	300.0	<50.0	226.7 \pm 74.7	<50.0	<50.0
578361	143.2 \pm 60.9	199.3 \pm 42.6	109.5 \pm 44.4	139.9 \pm 47.9	161.3 \pm 41.2	135.0 \pm 54.6
582604	222.3 \pm 45.6	208.2 \pm 51.5	125.8 \pm 45.5	179.2 \pm 49.1	234.2 \pm 61.6	125.3 \pm 4

Células humanas de riñón embrionario (HEK293), carcinoma hepático (HEPG2), cáncer cervical (HELA) y cáncer de mama (MCF7). Células de piel de ratón (B16F10) y células de riñón de mono (VERO).

Tabla 2 – Suplementaria. Valores de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) de aceites esenciales en células tratadas después de la proliferación celular

Voucher: COL	Línea celular			
	HEK293	HEPG2	VERO	B16F10
579422	98.7 ± 38.2	88.2 ± 45.7	151.8 ± 54.3	811 ± 34.6
582606	212.8 ± 44.5	220.8 ± 45.6	114.3 ± 50.8	151.3 ± 62.6
578360	485.2 ± 122.8	491.9 ± 112.6	>500.0	>300.0
583919	135.2 ± 56.8	166.2 ± 48.8	125.6 ± 56.1	102.8 ± 60.9
559446	99.1 ± 47.3	106.2 ± 46.0	155.1 ± 55.6	78.9 ± 46.6
582531	213.1 ± 55.9	224.4 ± 55.2	40.6 ± 99.3	127.5 ± 45.5
582328	169.3 ± 46.9	170.8 ± 50.1	68.3 ± 63.7	146.2 ± 64.6
578971	185.4 ± 56.8	98.2 ± 57.1	481.1 ± 77.2	160.7 ± 70.2
582599	363.7 ± 96.5	383.3 ± 56.4	127.8 ± 65.5	144.9 ± 45.0
578975	157.7 ± 55.3	102.9 ± 60.5	349.3 ± 60.9	172.9 ± 71.5
582357	345.7 ± 68.1	>500.0	116.6 ± 67.5	207.8 ± 62.9
578353	229.1 ± 57.4	224.6 ± 75.9	432.9 ± 94.8	195.5 ± 70.7
578359	380.9 ± 103.4	>500.0	488.6 ± 97.1	286.7 ± 147.7
583911	253.9 ± 224.5	284.3 ± 49.0	224.5 ± 51.1	173.8 ± 47.6
578365	136.6 ± 52.2	66.1 ± 56.0	282.4 ± 67.4	153.6 ± 69.4
583968	364.9 ± 82.7	365.4 ± 63.2	122.0 ± 55.0	284.6 ± 59.4
579244	98.9 ± 38.2	98.3 ± 38.2	55.6 ± 19.4	73.6 ± 27.8
559441	122.3 ± 57.0	88.1 ± 35.9	63.2 ± 30.8	45.5 ± 26.0
578361	152.5 ± 46.2	186.5 ± 58.4	90.5 ± 56.7	83.9 ± 55.3
582604	378.2 ± 81.3	422.9 ± 110.8	104.7 ± 66.9	188.0 ± 51.9

Células humanas de riñón embrionario (HEK293) y carcinoma hepático (HEPG2). Células de riñón de mono (VERO) y células de piel de ratón (B16F10). NC: no calculado, sin reducción de viabilidad $\geq 50\%$ a las concentraciones usadas en el ensayo.

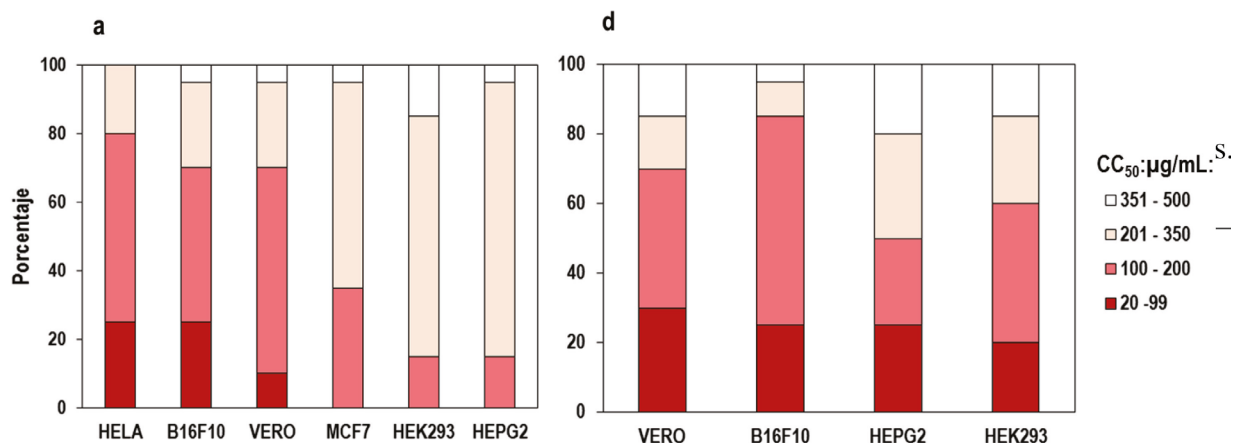


Figura 3. Proporción de aceites esenciales en cada línea celular, según rango de la concentración citotóxica 50 (CC_{50}), cuanto menor el rango mayor la susceptibilidad de la célula. Tratamiento (a) antes y (d) después de la proliferación celular. Células humanas: HEPG2-hígado, HEK293-riñón, MCF7-glándula mamaria, HELA-cuello uterino. Células de animal: B16F10-piel de ratón, VERO-riñón de mono.

Los valores de la CC_{50} en las líneas celulares de hígado (HEPG2), riñón (HEK293 y VERO) y piel (B16F10) con cada tratamiento se usaron para jerarquizar la actividad de los AE. El total de datos se derivó de ocho condiciones experimentales, esto es, cuatro líneas celulares cada una con dos tratamientos. En consideración a que células de origen

humano son de mayor interés y que el tratamiento **d** causó mayor afectación se asignó la siguiente ponderación (% por tratamiento d / % por tratamiento a) de 40/20 para HEPG2/HEK293 y 30/10 para B16F10/VERO. Se estableció la jerarquía en cada condición experimental calculando el valor JPi y $\sum JPi$ (Tabla 3 Suplementaria).

Tabla 3 – Suplementaria. Calculos de la jerarquización de citotoxicidad de los aceites esenciales. Valores de CC_{50} y jerarquía en cada condición experimental (JPi) y en el panel (\sum JPi).

Voucher COL_	HEK293	JPi	HEPG2	JPi	B16F10	JPi	VERO	JPi	HEK293	JPi	HEPG2	JPi	B16F10	JPi	VERO	JPi	\sum JPi
578360	500,0	1,0	300,0	1,0	40,2	0,1	117,1	0,1	485,2	1,9	491,9	2,0	412,7	2,1	500,0	1,5	9,7
578359	500,0	1,0	300,0	1,0	151,7	0,3	187,5	0,2	380,9	1,5	500,0	2,0	286,6	1,4	488,6	1,5	8,9
578353	500,0	1,0	300,0	1,0	173,8	0,3	168,1	0,2	229,1	0,9	224,6	0,9	195,5	1,0	432,9	1,3	6,5
578971	409,0	0,8	300,0	1,0	459,6	0,8	233,8	0,2	185,3	0,7	98,2	0,4	160,7	0,8	481,1	1,4	6,2
582357	212,7	0,4	478,3	1,0	256,8	0,3	159,8	0,2	345,7	1,4	500,0	2,0	207,8	0,6	116,6	0,3	6,2
583968	221,4	0,4	376,7	0,8	251,5	0,3	199,5	0,2	364,8	1,5	365,4	1,5	284,7	0,9	122,0	0,4	5,8
582604	222,3	0,4	208,2	0,4	234,2	0,2	125,4	0,1	378,3	1,5	422,9	1,7	188,0	0,6	104,7	0,3	5,3
582599	186,1	0,4	192,6	0,4	162,2	0,2	173,2	0,2	363,7	1,5	383,3	1,5	144,9	0,4	127,8	0,4	4,9
583911	253,9	0,5	271,6	0,9	234,8	0,4	224,5	0,2	194,3	0,8	284,3	1,1	173,8	0,5	139,4	0,4	4,9
578975	294,1	0,6	167,7	0,6	88,3	0,1	180,4	0,2	157,8	0,6	102,9	0,4	172,9	0,9	349,3	1,0	4,4
578365	277,8	0,6	298,1	1,0	125,0	0,2	209,1	0,2	136,7	0,5	66,1	0,3	153,6	0,8	282,5	0,8	4,4
559446	280,8	0,6	300,0	1,0	184,1	0,3	132,0	0,1	99,1	0,4	106,2	0,7	78,9	0,4	155,1	0,5	4,0
582606	216,9	0,4	267,9	0,5	161,6	0,2	183,4	0,2	212,9	0,9	220,9	0,9	151,4	0,5	114,3	0,3	3,8
582531	156,2	0,3	175,9	0,4	500,0	0,5	107,4	0,1	213,1	0,9	224,5	0,9	127,5	0,4	40,6	0,1	3,5
578361	143,2	0,3	199,3	0,4	161,3	0,2	135,0	0,1	152,5	0,6	186,5	1,2	83,9	0,3	90,5	0,3	3,4
582328	221,2	0,4	250,5	0,5	159,3	0,2	157,2	0,2	169,3	0,7	170,8	0,7	146,3	0,4	68,3	0,2	3,3
579422	217,9	0,4	199,3	0,7	112,7	0,2	238,7	0,2	98,7	0,4	88,2	0,4	81,1	0,4	151,8	0,5	3,1
583919	135,2	0,3	209,8	0,4	154,6	0,2	125,6	0,1	147,1	0,6	166,2	1,1	102,8	0,3	23,4	0,1	3,0
579244	212,8	0,4	300,0	1,0	26,9	0,0	50,0	0,1	98,9	0,4	98,4	0,4	73,6	0,4	55,6	0,2	2,8
559441	198,1	0,4	300,0	1,0	22,9	0,0	50,0	0,1	122,3	0,5	88,0	0,4	45,5	0,2	63,2	0,2	2,7

La Figura 4 compara los perfiles de citotoxicidad y presenta la ubicación de cada AE en la agrupación jerárquica. En los primeros lugares se ubicaron los AE con CC_{50} entre 201 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el mayor número de condiciones experimentales y valores de \sum JPi > 6.0, los primeros se consideraron los menos citotóxicos y en orden descendente fueron en el siguiente rango (\sum JPi en paréntesis): *Calycolpus moritzianus* (9,7) < *Psidium sartorianum* (8,9) < *Wedelia calycina* (6,5) < *Lippia micromera* (6,2) \approx *Piper haltonii* (6,2). En últimos lugares se ubicaron las muestras con CC_{50} de 20 - 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en al menos cuatro de las condiciones experimentales y por lo mismo con valores de \sum JPi < 4.0. Los cinco AE más citotóxicos en orden ascendente fueron en el siguiente rango: *Tagetes caracasana* (2,7 - 2,8) > *Chromolaena odorata* (3,0) > *Ageratina popayanensis* (3,1) > *Lantana colombiana* (3,3) > *Turnera diffusa* (3,4).

Existe suficiente evidencia para concluir que el AE de variadas especies de plantas inhibe la proliferación *in vitro* de células cancerosas (6,26). La tendencia de los AE de este estudio a inhibir

células de cánceres humanos, se infirió con base en la concentración que redujo la viabilidad en 50% (CI_{50}) con el tratamiento a (las células se sembraron en medio de cultivo que contenía AE). Los valores de la CI_{50} se agruparon en rangos adoptando criterios de otros estudios (25, 27) y la actividad antiproliferante se categorizó como sigue (valores de CI_{50} en paréntesis): relevante (< 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), probable (51 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incierta (101 - 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y ausente (> 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 5). Sobre células humanas de cáncer cervical (HELA), se observó actividad antiproliferante relevante con AE de *Tagetes caracasana* (CI_{50} de 42,2 y 47,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y actividad probable con tres AE en el siguiente rango (CI_{50} : $\mu\text{g}/\text{mL}$, en paréntesis): *Chromolaena odorata* (82,2) > *Piper dilatatifolium* (89,1) > *Hyptis brachiata* (98,8). Sobre células de cáncer de mama (MCF7) y hepatoma (HEPG2), los 20 AE fueron inactivos ya que presentaron valores de CI_{50} entre 101 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sobre células de melanoma murino, se observó actividad relevante también con AE de *Tagetes caracasana*, y además, de *Calycolpus moritzianus*.

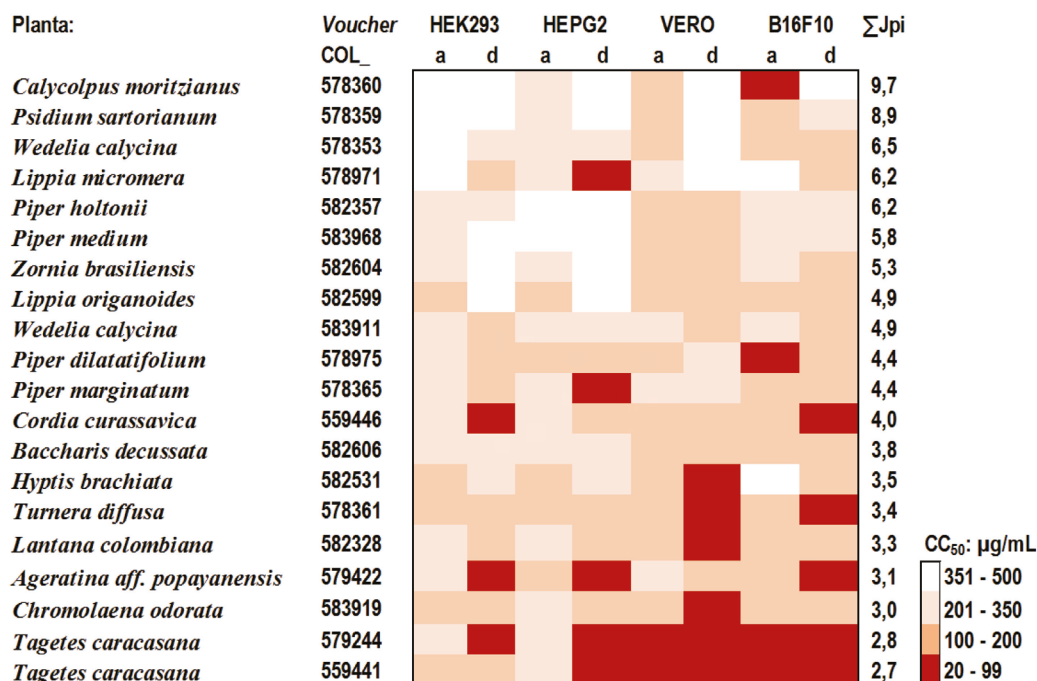


Figura 4. Agrupación jerárquica con base en perfiles de citotoxicidad. Los aceites esenciales se organizaron en orden descendente con respecto al valor de ΣJ_{Pi} . La tendencia a toxicidad es menor cuanto menor la intensidad del color y en consecuencia mayor el valor de ΣJ_{Pi} . Líneas celulares de riñón (HEK293 y VERO), hígado (HEPG2) y piel (B16F10) tratadas (a) antes y (d) después de la proliferación.

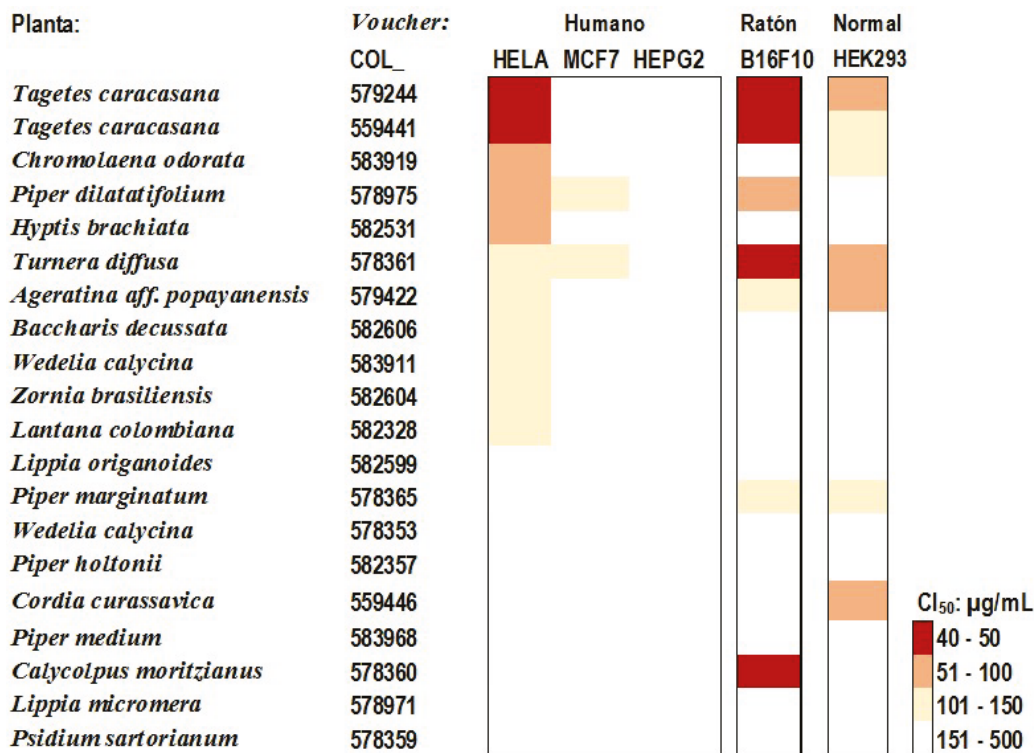


Figura 5. Tendencia a actividad antiproliferante de los aceites esenciales. Las muestras se organizaron en orden descendente con respecto al rango de la CI₅₀ en células HELA. La tendencia a actividad antiproliferante es mayor cuanto mayor la intensidad del color. Células de origen humano: HELA, cáncer de cérvix; MCF7, glándula mamaria; HEPG2, hepatoma. (B16F10, melanoma de ratón. HEK293, células humanas de riñón embrionario tratadas después de la proliferación (tratamiento b) como referente de actividad citotóxica de cada aceite esencial.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran la variación de la citotoxicidad entre AE de especies de plantas de Colombia y con respecto a la célula y tratamiento usados en el ensayo. La jerarquización de la actividad permitió identificar muestras con perfiles de baja y alta tendencia a toxicidad con base en valores de CC_{50} mayores y menores que $100 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, en la mayoría de líneas celulares. No se encontraron trabajos similares sobre citotoxicidad de AE luego de una revisión exhaustiva de sistema de búsqueda de artículos científicos. Rezk *et al.* (21) compararon la citotoxicidad del extracto de especies del género *Rhododendron*, analizando cada muestra simultáneamente en dos líneas celulares mediante ensayos que miden distinto parámetro de muerte celular. Usando un abordaje distinto de jerarquización, los autores lograron identificar la especie más promisoría para incluir en futuros estudios sobre antimicrobianos.

El ensayo del MTT es ampliamente utilizado para evaluar citotoxicidad de muestras de plantas y moléculas sintéticas (29,30) y en consideración a la facilidad técnica y bajo costo se seleccionó para este estudio. En un intento de robustecer el ensayo minimizando la variación con respecto al tipo y estado fisiológico de la célula, se incluyeron seis líneas celulares derivadas de órganos recomendados para análisis toxicológicos, como riñón, hígado y piel (28), las cuales se trataron en el momento de la siembra y 24 h después dado que el MTT puede evaluar estado quiescente de la célula (30). No se incluyó AE de referencia debido a que el propósito del estudio fue comparar entre sí los AE para identificar los de menor tendencia a citotoxicidad y no comparar la actividad con respecto a un referente. No existe un parámetro único de toxicidad *in vitro* debido, en buena parte a la diversidad de ensayos, por lo que algunos autores han propuesto valores de $CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ como indicador de actividad de muestras vegetales y estudios demuestran relación directa con toxicidad *in vivo* (6, 23, 24).

La agrupación de los AE analizados, según la curva dosis-respuesta y rango de la CC_{50} , permitió identificar la variación de la citotoxicidad con respecto a la línea celular, la de riñón de mono (VERO) resultó más susceptibles que las de riñón (HEK293) e hígado (HEPG2) humano (Figuras 2 y 3). La variación de citotoxicidad dependiendo del tipo de línea celular ha sido demostrada en otros

trabajos (13,21,28). La actividad varió también con respecto al tratamiento, siendo mayor después de la proliferación, que es resultado de esperar, ya que a las 24 h la división celular disminuye porque la monocapa celular ha alcanzado 75 – 80%. Además con este tratamiento, la concentración de suero bovino fetal en el medio de cultivo disminuyó de 10% a 2%) y con esto la señalización para progreso del ciclo celular (27,28).

La variación con respecto a la célula y tratamiento se tuvo en cuenta para jerarquizar los AE con respecto a citotoxicidad y de esta manera se identificaron los menos y más activos (Figura 4). El abordaje metodológico usado permite seleccionar AE para investigaciones futuras en medicamentos naturales o fármacos para patologías humanas. Los AE con baja tendencia a toxicidad pueden contener inhibidores de patógenos y metabolitos que modulen la respuesta inmune hacia un perfil más de protección contra la infección que inflamatorio. El AE de *Lippia organoides*, de mediana toxicidad en este estudio, presentó actividad antiviral *in vitro* promisoría ($CC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ e $IS > 4.0$) sobre el virus dengue y virus de la fiebre amarilla (17,18). AE de *Piper medium* y *Zornia brasiliensis*, con baja tendencia a toxicidad en este estudio (seis y siete en la jerarquización), presentaron actividad antidengue promisoría ($CC_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$ e $IS > 10$) en un estudio en progreso.

La estrategia de jerarquización también permitió identificar AE para estudios de actividad anticancerígena, por ejemplo, el de *Hyptis brachiata* podría ser seleccionado para estudios futuros sobre medicamentos naturales para cáncer cervical debido a que presentó $CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ en células HELA y $CC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ en células HEK293 (riñón) y HEPG2 (hígado), resultados que sugieren actividad promisoría. Aunque el AE de *Tagetes caracasana* presentó actividad antiproliferante relevante sobre células HELA ($CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$), no se recomienda para futuros estudios debido a su notada toxicidad ($\sum J_{pi} < 3,0$, último lugar en la jerarquización).

Es conocido que la actividad biológica de los AE depende de su composición química (5,10), aunque en este estudio no se pretendió establecer la relación entre el perfil citotóxico y químico. En estudios previos (23,24,31) y en progreso, se identificaron carvacrol, limoneno, timol, β -felandreno y α -humuleno, dependiendo de la planta, como componentes mayoritarios del AE de *Lippia organoides*, *Lippia micromera*, *Piper medium* y *Zornia brasiliensis*

los cuales resultaron de baja toxicidad en este estudio; y *cis*- y *trans*-tagenonas, *cis*- y *trans*-ocimenonas, óxido de cadineno, carvacrol y germacreno del AE de *Tagetes caracasana*, *Ageratina aff. popayanensis*, *Lantana colombiana* y *Hyptis brachiata* que fueron los más citotóxicos. De algunos terpenos constituyentes de los AE hemos evaluado la citotoxicidad en ensayos del MTT, el tratamiento de células de riñón humano (HEK293), riñón de mono (VERO) y célula humana (HELA) con limoneno a concentración tan alta como 1600 µg/mL no afectó la viabilidad (16) y recientemente encontramos valores de $CC_{50} > 200 \mu M$ sobre las mismas células con carvacrol, timol y β-felandreno.

El presente estudio tiene limitaciones relacionadas con el abordaje metodológico y la naturaleza de la muestra que dificultan concluir inequívocamente la tendencia a toxicidad de los AE. El MTT es una prueba colorimétrica que evalúa reducción de la actividad de enzimas como único parámetro de citotoxicidad (29,30); así, un AE con baja tendencia a toxicidad, según el MTT, puede resultar tóxico en un ensayo que evalúe otro parámetro. El MTT puede además generar falsos-positivos con muestras no-tóxicas pero que contienen inhibidores de las enzimas y falsos-negativos con muestras tóxicas que contienen componentes que señalizan la célula para apoptosis sin alterar la actividad enzimática (28-30). Con respecto a la naturaleza de la muestra, el resultado entre ensayos puede haber variado teniendo en cuenta que los AE son mezclas volátiles y, por lo mismo, la composición química se puede alterar durante el almacenamiento y la manipulación.

En futuros trabajos deberán ser considerados varios aspectos para lograr un abordaje metodológico que permita inferir con cierto grado de confiabilidad la toxicidad *in vivo* de muestras de AE. Entre estos: i) caracterizar la muestra para explicar su ubicación en la agrupación jerárquica dado que la toxicidad depende de su composición química; ii) evaluar la citotoxicidad simultáneamente en varias líneas celulares de origen humano de órganos relevantes en toxicología; iii) usar en cada ensayo AE de baja y alta toxicidad demostrada en ensayos *in vivo* como muestras de referencia; iv) evaluar simultáneamente varios parámetros de citotoxicidad.

CONCLUSIÓN

El abordaje metodológico usado en el estudio puede ser útil para seleccionar muestras de AE

para futuros trabajos orientados al descubrimiento de productos para uso humano. Se demostró la variabilidad de resultados del MTT dependiendo del tipo de célula y en consecuencia la necesidad de usar un panel para evaluar la actividad citotóxica. Dadas las limitaciones de los ensayos basados en célula, se recomienda usar protocolos robustos y reproducibles que permitan inferir con cierto grado de confiabilidad la tendencia de muestras vegetales que pueden ser tóxicas en humanos.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen al Dr. Marcos López de la Fundación Cardiovascular, Bucaramanga, Colombia, Dra. Patricia Escobar y a Henry Bautista por la contribución con las líneas celulares MCF-7, B16F10, HEK293 y HEPG2. Este trabajo está anidado al Programa Bioprospección y desarrollo de ingredientes naturales para las industrias cosmética, farmacéutica y de productos de aseo con base en la biodiversidad colombiana de la UT-BioRed-CO-CENIVAM. El programa es financiado con recursos del Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, contrato RC-0572-2012. El material que se utilizó para este trabajo fue proveído por el Estado Colombiano a través del Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. Fue colectado bajo el *Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y Productos Derivados No. 101 del 3 de junio de 2014*, suscrito entre el Ministerio del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM.

CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras manifiestan que no existe ningún conflicto de interés con los resultados publicados

REFERENCIAS

1. Baser K.H.C, Buchbauer G (Ed.). Handbook of essential oils: science, technology, and application. USA: Taylor & Francis Group, Boca Raton. 2010.
2. Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, Bergonzi MC. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evid Based Complement Alternat Med* 651593. 2014.
3. Dweck AC. Formulating Natural Cosmetics: An Encyclopedia of Ingredients: Natural preservatives - An update. Allured Pub Corp. ISBN-13: 978-1932633757. 2010;107-130 p.
4. Antonioti S. Tuning of essential oil properties by enzymatic treatment: towards sustainable processes for the generation of new fragrance ingredients. *Molecules*. 2014; 19(7):9203-9214.

5. Adorjan B, Buchbauer G. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragr.* 2010; 25: 407-426.
6. Bayala B, Bassole IH, Scifo R, Gnoula C, Morel L, Lobaccaro J, *et al.* Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *Am J Cancer Res.* 2014; 4(6): 591-607.
7. Sienkiewicz M, Kowalczyk E, Wasieła M. Recent patents regarding essential oils and the significance of their constituents in human health and treatment. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2012;7(2):133-140.
8. Lang G. and Buchbauer G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr. J.* 2010; 27:13-39.
9. Ben-Arye E, Dudai N, Eini A, Torem M, Schiff E, Rakover Y. Treatment of upper respiratory tract infections in primary care: a randomized study using aromatic herbs. *Evid Based Complement Alternat Med* 690346. 2011.
10. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(2):446-475.
11. Sperotto AR1, Moura DJ, Péres VF, Damasceno FC, Caramão EB, Henriques JA, Saffi J. Cytotoxic mechanism of *Piper gaudichaudianum* Kunth essential oil and its major compound nerolidol. *Food Chem Toxicol.* 2013;57: 57-68.
12. Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C. Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Program: an overview. *Int J Hyg Environ Health.* 2003; 206 (4-5):437-445.
13. Tweats DJ, Scott AD, Westmoreland C, Carmichael PL. Determination of genetic toxicity and potential carcinogenicity *in vitro*—challenges post the Seventh Amendment to the European Cosmetics Directive. *Mutagenesis.* 2006; 22(1):5-13.
14. Ahuja V, Sharma S. Drug safety testing paradigm, current progress and future challenges: an overview. *J. Appl. Toxicol.* 2014; 34:576-594.
15. Bueno J, Escobar P, Martínez JR, Leal SM, Stashenko EE. Composition of three essential oils, and their mammalian cell toxicity and antimycobacterial activity against drug resistant-tuberculosis and nontuberculous mycobacteria strains. *Nat Prod Commun.* 2011; 6(11):1743-1748.
16. Gómez LA, Stashenko E, Ocazone RE. Comparative study on *in vitro* activities of citral, limonene and essential oils from *Lippia citriodora* and *L. alba* on yellow fever virus. *Nat Prod Commun.* 2013; 8(2):249-252.
17. Meneses R, Ocazone RE, Martínez JR, Stashenko EE. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication *in vitro*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009; 6:8:8.
18. Ocazone RE, Meneses R, Torres FA, Stashenko E. Virucidal activity of Colombian *Lippia* essential oils on dengue virus replication *in vitro*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105(3):304-309.
19. Sarrazin SL, da Silva LA, de Assunção AP, Oliveira RB, Calao VY, da Silva R, *et al.* Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. *Molecules.* 2015; 20(2):1860-1871.
20. Vera SS, Zambrano DF, Méndez-Sánchez SC, Rodríguez-Sanabria F, Stashenko E, Duque Luna JE. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2014; 113(7):2647-2654.
21. Rezk A, Al-Hashimi A, John W, Schepker H, Ullrich M-S, Brix K. Assessment of cytotoxicity exerted by leaf extracts from plants of the genus *Rhododendron* towards epidermal keratinocytes and intestine epithelial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* DOI 10.1186/s12906-015-0860-8. 2015; 15:364
22. Xia M, Huang R, Witt K, Southall N, Fostel J, Cho M-H, *et al.* Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environ Health Perspect.* 2008; 116(3): 284-291.
23. Stashenko EE, Jaramillo BE, Martínez JR. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. *J Chromatogr A.* 2004; 1025(1):93-103.
24. Stashenko E, Martínez JR, Cala MP, Durán DC, Caballero D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. *J Sep Sci.* 2013; 36(1):192-202.
25. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.* 2006; 106(3):290-302.
26. Ferraz R, Bomfim D, Carvalho N, Soares M, da Silva T, Machado W, *et al.* Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). *Phytomed.* 2013; 20:615-621.
27. Suffness M, Pezzuto JM. 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity.* Academic Press, London, pp. 71 -133.
28. Yoon M, Campbell JL, Andersen ME, Clewell H. Quantitative *in vitro* to *in vivo* extrapolation of cell-based toxicity assay results. *Crit Rev Toxicol.* 2012; 42(8):633-652.
29. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm.* 2005; 288(2):369-376.
30. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1):55-63.
31. Leal SM, Pino N, Stashenko EE, Martínez JR, Patricia E. Escobar. Antiprotozoal activity of essential oils derived from *Piper spp.* grown in Colombia. *J Essential Oil Res.*

BÚSQUEDA DE BACTERIAS MARINAS COMO FUENTE DE INHIBIDORES DE QUORUM SENSING (IQS): PRIMER ESTUDIO QUIMICO DE *Oceanobacillus profundus* (RKHC-62B)

SCREENING OF MARINE BACTERIAL STRAINS AS SOURCE OF QUORUM SENSING INHIBITORS (QSI): FIRST CHEMICAL STUDY OF *Oceanobacillus profundus* (RKHC-62B)

Diana MARTÍNEZ-MATAMOROS¹MsC, Melisa LAITON FONSECA¹, PhD,
Carmenza DUQUE¹ PhD, Freddy A. RAMOS^{1*} PhD, Leonardo CASTELLANOS¹ PhD

Recibido: Noviembre 23 de 2015. Aceptado: Febrero 03 de 2016

ABSTRACT

Background: Natural products isolated from marine microorganisms have demonstrated a wide range of biological activities included quorum sensing inhibitors. **Objectives:** We study fifteen marine *Firmicutes* bacterial strains isolated from the Caribbean soft coral *Antillologorgia elisabethae* that were evaluated as a novel and sustainable source of quorum sensing inhibitor compounds. **Methods:** Cultures were made in four different culture media and further extracted using a non-ionic resin. All these extracts were tested in order to establish its quorum sensing inhibition (QSI) activity using *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. The active extracts were fractionated by RP-18 cartridge. Each fraction was tested and evaluated for its composition by HPLC-PDA. **Results:** Methanol fractions of *Jeotgalicoccus halophilus* and *Oceanobacillus profundus* were the most active ones, suggesting that non-polar compounds could be the responsible for the QSI activity of the bacterial extracts here tested. **Conclusions:** The chemical study of the organic extract of *Oceanobacillus profundus* cultured in LBS, yielded the compounds tyrosol (1) and tyrosol acetate (2) as responsible of QSI activity showed by the organic extract.

Keywords: Marine natural products, Marine microorganisms, *Jeotgalicoccus halophilus*, *Oceanobacillus profundus*, Quorum sensing inhibitor compounds.

RESUMEN

Antecedentes: Los productos naturales aislados de microorganismos marinos han demostrado tener un amplio rango de actividades biológicas incluyendo inhibidores de *quorum sensing*. **Objetivos:** Estudiamos quince cepas bacterianas del phylum *Firmicutes* aisladas del coral blando *Antillologorgia elisabethae* que fueron evaluadas como una nueva fuente sostenible de compuestos inhibidores de *quorum sensing* (IQS). **Métodos:** Se prepararon cultivos en cuatro medios diferentes y extraídos usando una resina no iónica. Todos los extractos fueron probados con el fin de establecer su actividad inhibitoria de *quorum sensing* (IQS) usando *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 como biosensor. Los extractos activos fueron fraccionados mediante cartuchos RP-18. Cada fracción fue evaluada mediante bioensayo y analizada por HPLC. **Resultados:** Las fracciones metanólicas de *Jeotgalicoccus halophilus* y *Oceanobacillus profundus* fueron las más activas, lo cual sugiere que los compuestos no polares pueden ser los responsables de esta activi-

¹ Laboratorio de Productos Naturales Marinos, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Carrera 30 N° 45-03, 111321, Bogotá- Colombia.

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia: faramosr@unal.edu.co

dad. **Conclusiones:** El estudio químico del extracto orgánico de *O. profundus* cultivado en medio LBS permitió aislar los compuestos tirosol (1) y acetato de tirosol (2) como los responsables de la actividad IQS.

Palabras clave: Productos naturales marinos, Microorganismos marinos, *Jeotgalicoccus halophilus*, *Oceanobacillus profundus*, Compuestos inhibidores de *quorum sensing*.

INTRODUCCIÓN

La aparición de cepas de bacterias resistentes al uso de antibióticos, como consecuencia del uso indiscriminado de estos, representa un enorme reto para industrias como la agropecuaria y la industria médica, pues las consecuencias sobre la salud pueden ser muy graves (1-5). El *quorum sensing* (QS) es un mecanismo en el cual las bacterias regulan o sincronizan cambios en su expresión genética en función de su densidad poblacional, como por ejemplo la producción de antibióticos, toxinas, pigmentos, exopolisacáridos (formación de biopelículas), motilidad y otros factores de virulencia(6). En este marco, los inhibidores del *quorum sensing* (IQS) han emergido como una estrategia novedosa para controlar infecciones, y evitar el desarrollo de mecanismos de resistencia causados por el uso de los antimicrobianos (7), lo anterior debido a que muchos de los factores de virulencia son regulados por *quorum sensing* (QS), el cual además está involucrado en la resistencia a antibióticos por parte de las cepas bacterianas (2,3). También, se ha logrado establecer que el uso de compuestos IQS permite que las cepas bacterianas causantes de infecciones se tornen nuevamente susceptibles a los agentes antimicrobianos, lo cual, acompañado de la activación innata del sistema inmune del hospedero permite el control de la infección (8).

Para el caso del ambiente marino los IQS han encontrado otras aplicaciones, particularmente en la industria de los recubrimientos o *antifoulants*; pues, las superficies naturales y artificiales son rápidamente colonizadas por micro- y macroorganismos en un proceso conocido como *biofouling*, que genera grandes pérdidas económicas por el rápido deterioro de las superficies inmersas (9). Este proceso de colonización es muy complejo, pero es sabido que si se impide la formación de biopelículas por parte de los microorganismos, se podría retrasar e incluso impedir la llegada de macroorganismos, disminuyendo el *fouling* de gran manera. Lo anterior sin generar daños al ecosistema, por lo que la identificación de compuestos de origen natural con actividad IQS parece ser una de las aproximaciones más prometedoras para el desarrollo de *antifoulants* industriales (10–12).

De otro lado, los compuestos IQS han sido obtenidos tradicionalmente a partir de plantas, y más recientemente a partir de organismos marinos (11). No obstante los microorganismos también son una fuente de este tipo de compuestos, sobre todo teniendo en cuenta que la vida de las bacterias en comunidad las obliga a desarrollar relaciones inter- e intraespecies, permitiéndoles generar diferentes mecanismos para interferir en los sistemas de QS de los otros miembros de la comunidad bacteriana (11,13). Como resultado de estas investigaciones, se ha establecido que bacterias Gram positivas como Actinobacterias y Firmicutes producen moléculas inhibitoras del *quorum sensing*. Un ejemplo de esto es la dicetopiperazina ciclo-*L*-prolina-*L*-tirosina y la *N*-(2'-feniletil)-isobutiramida, aisladas de cepas de *Bacillus cereus* y *Halobacillus salinus*, respectivamente (13). Adicionalmente, los microorganismos representan una fuente sostenible de moléculas, resolviendo así el problema del suministro de materia prima con miras a una posible aplicación industrial (14).

Así, y como parte de nuestra búsqueda de compuestos IQS a partir de diferentes fuentes de origen natural (15), en este trabajo se estableció una metodología rápida para el cultivo, extracción y evaluación de la actividad IQS de extractos de cultivos de bacterias marinas. Para esto, 15 aislamientos de bacterias pertenecientes al phylum *Firmicutes*, obtenidas del octocoral *Antillologorgia elisabethae* (anteriormente conocido como *Pseudopeterogorgia elisabethae*) (16), se cultivaron en cuatro medios diferentes; posteriormente el sobrenadante fue extraído y los extractos obtenidos fueron evaluados en búsqueda de actividad IQS, usando el ensayo de inhibición de la expresión de violaceína en *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. Los extractos más activos se analizaron por HPLC-DAD y RMN, para escoger el más prometedor y llevar a cabo su estudio químico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Individuos del octocoral *Antillologorgia elisabethae* fueron recolectados en El planchon (13°24'0"N y 81°23'0"W"), Isla de Providencia (Caribe Sur-Oc-

cidental, Colombiano), mediante buceo autónomo SCUBA a una profundidad entre 20 y 30 m, e identificados por la Profesora Dra. Mónica Puyana, de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, el voucher del espécimen se codificó como INV CNI 1612–1614, y fue depositado en la colección de invertebrados del Museo de Historia Natural Marina Colombiana (MHNMC) en el Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín (INVEMAR).(17)

Materiales y Equipos Generales

Las cepas bacterianas fueron cultivadas en agar marino preparado con sales calidad R.A. (Merck) y agar bacteriológico (OXOID). El agua empleada para los medios de cultivo fue destilada, y desionizada a través de un equipo Simplicity (MILLIPORE). Para los ensayos de actividad IQS se empleó como medio de cultivo tripticasa de soya (SCHARLAU) para microbiología, y agar bacteriológico (OXOID). Todos los medios e instrumentos empleados en microbiología fueron esterilizados con vapor de agua en un autoclave AllAmerican 75X de 32 L a 20 psi y 120°C durante 30 min. Los inóculos fueron preparados en cabina de flujo laminar AVE-402 (ESCO). Para el cultivo a mayor escala de *Oceanobacillus profundus* se empleó el medio LB suplementado con sales (LBS, *vide supra*)

La incubación de las cepas de estudio en caja de Petri se llevó a cabo en una incubadora (MEMMERT) a 28°C. Los cultivos en medio líquido de las cepas se agitaron en un shaker orbital HD-3000 (DIMAQ) a temperatura ambiente (19°C) a 100 rpm. La biomasa fue separada por centrifugación a 5000 rpm y eliminada por filtración al vacío empleando membranas estériles de nitrato de celulosa de tamaño de poro 0.80, 0.65 y 0.45 μm (SARTORIUS).

La extracción de los cultivos en medio líquido se llevó a cabo empleando la resina no iónica Diaion® HP-20 (Supelco), y para el fraccionamiento fueron empleados cartuchos de extracción en fase sólida Hypersep RP-18 de 200 mg (Thermo) y un equipo de extracción en fase sólida con vacío de 16 puestos (TeknoKroma). Los solventes empleados para las extracciones y procesos cromatográficos fueron calidad R.A. (Panreac y Merck).

Los análisis por HPLC-DAD fueron realizados en un equipo Merck-Hitachi equipado con detector DAD L-4250 y UV L-4200, bomba L-6000A, auto muestreador 6200A, y una columna LichroCart

Merck RP-18 (125x4 mm, 5 μm). La detección en el UV fue a 210 y 270 nm. Se empleó acetonitrilo grado cromatográfico (Honeywell) y agua desionizada a través de un equipo Simplicity Millipore

Los espectros RMN ^1H y ^{13}C fueron registrados en un espectrómetro Bruker Avance 400 (400 MHz para RMN ^1H y 100 MHz RMN ^{13}C) empleando como solvente cloroformo- d_1 (Merck) grado de deuteración 99.8% y metanol- d_4 (Merck) grado de deuteración 99.8%.

Con el ánimo de evaluar el efecto del medio de cultivo sobre el potencial de producir compuestos inhibidores del *quorum sensing* a partir de cepas aisladas de ambientes marinos, se realizaron los cultivos de 15 cepas de *Firmicutes* (3x10 mL) en cuatro medios de cultivo. Dos de estos son considerados medios ricos en nutrientes (LBS y TAK), los cuales emplean como fuente de carbono el extracto de levadura (LBS) y almidón y dextrosa (TAK) y como fuente de nitrógeno la triptona (LBS) y peptona (TAK). Los otros dos medios son considerados medios ricos en sales y deficientes en nutrientes BM y MM; el medio BM emplea como fuente de carbono los ácidos benzoico y cítrico, y como fuente de nitrógeno $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$; mientras el medio MM emplea como fuente de carbono y nitrógeno al glutamato de sodio. Los cultivos fueron realizados a temperatura ambiente y con agitación (100 rpm). Adicionalmente, se hicieron los respectivos controles de los medios sin inocular. Cada uno de los experimentos fue extraído con resina Diaion® HP-20, la cual fue lavada con agua hasta fin de cloruros para remover la mayor cantidad posible de compuestos del medio de cultivo, y posteriormente eluída con MeOH y AcOEt para obtener el extracto HP-20, que se espera sea enriquecido en compuestos orgánicos producidos por las bacterias. Estos extractos fueron evaluados en cuanto a su actividad IQS a concentraciones de 1 y 2 mg/disco, y en cuanto a su rendimiento. Es importante notar que la resina empleada al ser una resina no iónica, tiene la capacidad de retener compuestos de naturaleza orgánica desde polares hasta no polares, y permite eliminar sales y otros compuestos altamente hidrofílicos (ejemplo azúcares, aminoácidos, etc.), de esta manera se puede obtener un extracto enriquecido en una gran diversidad de compuestos orgánicos a partir de disoluciones acuosas ricas en electrolitos (18) como es el caso de los medios de cultivo de microorganismos.

Ensayo de Inhibición de *quorum sensing* (IQS)

Para la evaluación de la actividad inhibitoria del *quorum sensing* se empleó el biosensor *Cromobacterium violaceum* ATCC 31532 utilizando la técnica de difusión en agar con sensidiscos juzgando como resultado positivo la inhibición de la producción de violaceína, sin efectos bactericidas (15). El biosensor *C. violaceum* fue cultivado en caldo tripticasa de soya (CTS) a 27 °C durante toda la noche, hasta alcanzar una densidad óptica (OD) cercana al patrón 0.5 McFarland. Posteriormente, se realizó un sembrado masivo con 400 μ L de inóculo sobre cajas de agar tripticasa de soya (ATS). En las cajas de Petri se colocaron por duplicado los sensidiscos de prueba previamente impregnados con los extractos (1.0 y 2.0 mg/disco) y fracciones a ensayar (0.3 mg/disco). Finalmente, las cajas con los sensidiscos fueron incubadas a 27° C, y los halos de inhibición de la producción de violaceína fueron medidos visualmente con la ayuda de un calibrador a las 24 h y 48 h. Los halos se reportan en mm sin restar el diámetro de disco (4.7 mm). Adicionalmente, se observó si hubo o no inhibición del crecimiento del biosensor, en caso de que se diese la inhibición del crecimiento de *C. violaceum* ATCC 31532, el extracto o fracción se clasificó como inhibidor de crecimiento y no como inhibidor de *quorum sensing*. Así, la actividad IQS fue detectada cuando hubo inhibición en la producción de violaceína sin que hubiera inhibición del crecimiento bacteriano. Como controles positivos se emplearon: a) ácido kojico (90 μ g/disco) b) un extracto de *Cecropia pachystachya* (10 μ g/disco) (19). Como controles negativos se emplearon los sensidiscos impregnados con los disolventes en que se aplicaron las muestras, es decir MeOH y DCM, y su posterior evaporación. Los extractos de los medios de cultivo sin inocular fueron evaluados en las mismas condiciones que los extractos de los cultivos de cada cepa.

Cepas Bacterianas

Las 15 cepas bacterianas marinas objeto de este estudio fueron obtenidas del holobionte del octocoral *Antillologorgia elisabethae*, utilizando métodos tradicionales de cultivo (17). Las bacterias fueron caracterizadas e identificadas usando tanto sus características morfológicas como métodos moleculares (secuenciación del gen 16S rRNA)(17). A continuación se presenta la lista de las cepas bacterianas usadas en este trabajo: *Paenibacillus glucanolyticus* (RKHC-8), *Bacillus cereus* (RKHC-9), *Bacillus*

horti (RKHC-13), cepa no identificada RKHC-15, *Bacillus licheniformis* (RKHC-21), *Bacillus mojavensis* (RKHC-37), *Bacillus pumillus* (RKHC-57A), *Bacillus horneckiae* (RKHC-68A), *Bacillus anthracis* (RKHC-69A), *Oceanobacillus profundus* (RKHC-62B), *Oceanobacillus iheyensis* (RKHC-82A), *Jeotgalicoccus halophilus* (RKHC-28), *Staphylococcus auricularis* (RKHC-48), *Staphylococcus equorum* (RKHC-54), y *Staphylococcus warneri* (RKHC-78B).

Condiciones de crecimiento

Los 15 aislamientos bacterianos se preservaron en medio marino Difco® 2216 semisólido a 4 °C hasta que fueron utilizados para su cultivo. Cada una de las cepas fue cultivada en volúmenes de 10 mL por triplicado, durante 96 h, a temperatura ambiente y con una agitación de 100 rpm, en cuatro medios diferentes, que son descritos a continuación: LB con sales (Medio Luria Bertani modificado por nosotros con la adición de sales de medio marino, **LBS**) cantidades por litro de agua: NaCl 20.8 g, KCl 0.56 g, MgCl₂ 4.00 g, MgSO₄·7H₂O 4.80 g, Tris 0.36 g, sal marina Rila® 1.5 g, extracto de levadura 5 g y triptona 10.0 g. Medio Marino Mínimo (**MM**) cantidades por litro de agua: Glutamato de sodio 2.0 g, NaCl 20.0 g, MgSO₄·7H₂O 7.0 g, MgCl₂ 5.3 g, CaCl₂ 1.25 g, K₂HPO₄ 0.075 g, FeSO₄ 0.025 g, CuSO₄ 0.005 g y Tris 6.1 g (20). Benzoato mínimo (**BM**) cantidades por litro de agua: Benzoato de sodio 2.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, K₂HPO₄ 10.0 g, NaNH₄HPO₄ 3.5 g, ácido cítrico 0.2 g, y sal marina Rila® 18.0 g (21). Takahashi (**TAK**) cantidades por litro de agua: Almidón 30.0 g, dextrosa 5.0 g, peptona 10.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, Na₂HPO₄·12H₂O 0.5 g, y KH₂PO₄ 0.2 g (22).

Extracción

Culminado el tiempo de crecimiento, las tres réplicas del cultivo fueron reunidas y centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min, con el fin de eliminar la biomasa. Posteriormente, el sobrenadante fue filtrado secuencialmente a través de tres membranas con diferente tamaño de poro: 0.80, 0.65 y 0.45 μ m, para así obtener el medio de cultivo agotado para cada cepa en cada medio. Estos fueron sometidos a dos técnicas de extracción: Extracción con resina no ionica Diaion® HP-20 en relación resina/medio del cultivo agotado (1/10) y empleando como eluyentes 100 mL MeOH y 100 mL de AcOEt. Los dos eluidos fueron reunidos en un solo extracto que se denominó extracto HP-20; la otra metodología

de extracción fue Líquido-Líquido y se describe a continuación.

Las cepas *J. halophilus* (RKHC-28) y *O. profundus* (RKHC-62B) fueron cultivadas en los medios LBS, TAK y BM, en volúmenes de 100 mL con 10 réplicas por cada medio de cultivo, a temperatura ambiente, y con agitación de 100 rpm durante 96 h. Los sobrenadantes de estos cultivos se extrajeron por medio de extracción líquido-líquido continua usando diclorometano. Se extrajeron 500 mL del medio de cultivo agotado con 500 mL de DCM, por duplicado. Este extracto se denominó DCM. La fase acuosa residual se extrajo con resina Diaion® HP-20 (relación 1:10 resina:medio agotado extraído), eluyéndola con metanol para obtener el extracto acuoso residual (EAR). Posteriormente, cada uno de los tres extractos resultantes (HP-20, DCM, EAR) fue evaluado en el ensayo de IQS (*vide infra*). Como blancos fueron empleados los extractos de los medios de cultivo sin inocular obtenidos por extracción con la resina Diaion® HP-20.

Fraccionamiento

Los extractos que resultaron activos en el ensayo de IQS fueron fraccionados por cromatografía en columna RP-18 (200 mg), en cantidades que oscilaron entre 2 y 50 mg de extracto dependiendo de la cantidad de extracto obtenida. Para esto se usaron mezclas de MeOH-H₂O (1:9) y (1:1), y MeOH (100%). Cada una de estas fracciones fue concentrada, y posteriormente evaluada en el ensayo de IQS.

Análisis por HPLC

Para el análisis por HPLC-DAD de extractos y fracciones se empleó el equipo Merck-Hitachi antes descrito y con el siguiente gradiente de solventes: ACN-H₂O 1:9 0-10 min; ACN-H₂O de 1:9 a ACN 100 % de 10 a 30 min; ACN 100% de 30 a 40 min; y de ACN 100 % a ACN-H₂O 1:9 de 40 a 50 min a un flujo de 1 mL/min. La detección se hizo a 210 nm, mientras el detector DAD registró entre 210 a 650 nm con el fin de tener el espectro UV de cada pico eluido. Se inyectaron 50 µL de cada solución a una concentración de 1.0 mg de extracto por mL. Adicionalmente, los extractos activos (Fracción DCM del cultivo de *J. halophilus* y *O. profundus*) fueron analizados por RMN-¹H.

Estudio químico de *Oceanobacillus profundus*

La cepa bioactiva *Oceanobacillus profundus* fue cultivada durante 96 h en medio LBS. Para esto se usaron fias de 500mL, con un volumen de 100 mL, por 114 veces para completar un volumen total de 11,4 L. Posteriormente, el medio se centrifugó a 5000 rpm y el sobrenadante se sometió a extracción líquido-líquido continua con DCM destilado. La fracción orgánica se concentró para obtener 850 mg de extracto crudo. El extracto se sometió a purificación por cromatografía en columna sobre sílica gel, usando un gradiente discontinuo de hexano, acetato de etilo y metanol, para obtener 12 fracciones F1-F12. Todas las fracciones fueron ensayadas contra *C. violaceum* a 100, 200 y 300 µg/sensidisco. Las fracciones activas F5 (10 mg), y F7 (19 mg), eluidas con hexano:acetato de etilo (1:1) y acetato de etilo, respectivamente, fueron purificadas por CC sobre sephadex LH-20 usando metanol como eluyente, para rendir los compuestos **1** y **2**. Estos compuestos puros fueron ensayados contra *C. violaceum* a 100, 200 y 300 µg/sensidisco, observándose actividad IQS en todos los ensayos.

Compuesto 1: (-)-ESI-EM: 137 [M-H]⁻.

RMN (300 MHz, CDCl₃) 7,06 (d, *J*= 9,0 Hz, 2H); 6,77 (d, *J*=9,0 Hz, 2H); 3,82 (t, *J*=6,0 Hz, 2H); y 2,77 (t, *J*=6,0 Hz, 2H) ppm

Compuesto 2: (-)-ESI-EM: 179 [M-H]⁻.

RMN (300 MHz, CDCl₃) 7,09 (d, *J*= 8,0 Hz, 2H); 6,78 (d, *J*=8,0 Hz, 2H); 4,24 (t, *J*=2,7 Hz, 2H); 2,87 (t, *J*=2,7 Hz, 2H), y 2,06 (s, 3H) ppm

RESULTADOS

Evaluación de la producción de extractos inhibidores del quorum sensing

Las cepas bacterianas más promisorias como fuente de compuestos IQS se resumen en la tabla 1, y corresponden a: *O. profundus*, cuyos cuatro extractos fueron activos; seguido de *B. licheniformis*, *B. horneckiae* y *J. halophilus*, en cuyos casos tres de los cuatro extractos resultaron activos (cultivos en LBS, BM y TAK); y con actividad moderada los extractos de las cepas *S. warneri* (BM y TAK), *B. anthracis* (BM, MM), *B. horti* (TAK y MM) y *B. mojavensis* (BM, TAK y MM) que resultaron activos en dos de los cuatro medios ensayados.

Tabla 1. Extractos de bacterias marinas que mostraron actividad IQS usando como biosensor *C. violaceum* ATCC 31532 según medio de cultivo empleado D1 corresponde a 2.0 mg/sensidisco; D2 a 1.0 mg/sensidisco. La actividad está expresada con respecto al diámetro del halo de inhibición de la pigmentación: - no hay inhibición de QS, + < 5mm, ++ 5-7 mm, +++ 7-9 mm, ++++ 9-12 mm

Cepa	LBS		BM		TAK		MM	
	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2
<i>Oceanobacillus profundus</i> (RKHC-62B)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus licheniformis</i> (RKHC-21)	++	++	++	+	+	-	-	-
<i>Bacillus horneckiae</i> (RKHC-68A)	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Jeotgalicoccus halophilus</i> (RKHC-28)	+	+	++	+	+	+	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i> (RKHC-78B)	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>Bacillus anthracis</i> (RKHC-69A)	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>Bacillus horti</i> (RKHC-13)	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Bacillus mojavensis</i> (RKHC-37)	-	-	++	+	+	-	-	+
Medio de cultivo estéril	-	-	-	-	-	-	-	-

Fraccionamiento de los extractos activos

Los extractos obtenidos de las cepas *O. profundus*, *B. licheniformis*, *B. horneckiae* y *J. halophilus*, las cuales mostraron la mayor actividad, fueron fraccionados a través de cartuchos para extracción en fase sólida (EFS) RP-18, eluyendo con tres mezclas de solventes: MeOH:H₂O (1:9), MeOH:H₂O (1:1) y MeOH (100%), para así obtener fracciones orgánicas de polaridad alta, media y baja, respectivamente. Luego, cada una de estas fracciones fue evaluada en el ensayo de actividad IQS (tabla 1S, material suplementario) con el fin de establecer en cuál de ellas se tienen los compuestos bioactivos.

En todos los casos la actividad IQS se encontró únicamente en la fracción de menor polaridad: la metanólica, mientras las fracciones más polares (eluidas con MeOH:H₂O 1:9) no presentaron dicha actividad, sugiriendo que los compuestos responsables de la actividad inhibitoria del QS son de polaridad moderada o baja. Las fracciones más activas fueron las de *B. licheniformis* (cultivada en LBS), *J. halophilus* (cultivada en BM) y *O. profundus* (cultivada en MM); mientras que las fracciones de *J. halophilus* (cultivada en MM) y *B. horneckiae* (cultivada en BM) presentaron actividad moderada; y finalmente *J. halophilus* (cultivada en LBS) presentó baja actividad (Tabla 1S, material suplementario).

Análisis cromatográfico de los extractos activos

Los extractos HP-20 de las cuatro cepas bioactivas preseleccionadas (*O. profundus*, *B. licheniformis*,

B. horneckiae y *J. halophilus*) cultivadas en medio TAK, MM, BM y LBS, y sus respectivos blancos de medio fueron analizados por HPLC-DAD. Los cromatogramas, aunque muestran la presencia de compuestos diferentes al medio de cultivo, presentaron poca resolución cromatográfica (Figuras 1S - 4S, material suplementario) haciendo evidente la necesidad de incluir estrategias de limpieza de los extractos para facilitar el análisis, aislamiento y elucidación estructural de los compuestos responsables de la actividad. El análisis por HPLC de las fracciones metanólicas no fue posible dado el bajo rendimiento de estas aunque fueron las que presentaron la mayor actividad (Tabla 1S, material suplementario). Las cepas *B. horneckiae* y *B. licheniformis* fueron descartadas para esta parte del estudio, ya que aunque sus extractos presentan una buena actividad IQS, en la literatura se encuentran múltiples reportes de su composición química (23,24). Mientras que para *J. halophilus* y *O. profundus* no hay reportes de los compuestos producidos por ellas por lo que se continuó con su estudio.

Con lo anterior resulta claro que las cepas *J. halophilus* y *O. profundus*, cultivadas en los medios LBS, BM y TAK, tienen compuestos activos como IQS de baja a mediana polaridad, por lo que se decidió obtener extractos enriquecidos en compuestos de estas polaridades usando una extracción líquido-líquido continua (L-L) con diclorometano (48 horas). Posteriormente, la fase acuosa remanente fue extraída empleando resina Diaion® HP-20 para

obtener el extracto acuoso residual (EAR) con el fin de recuperar los compuestos de polaridad mayor que no fueron extraídos con el DCM. Los resultados en

cuanto al rendimiento de los extractos DCM y EAR, así como el de actividad IQS evaluada por el método de difusión en agar se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Rendimiento de los extractos DCM y EAR de las cepas *J. halophilus* y *O. profundus*, y su actividad IQS. Actividad relacionada con el diámetro del halo de inhibición < 5mm +, 5-7 mm ++, 7-9 mm +++, 9-12 mm ++++ y - ausencia de actividad. Extractos DCM evaluados con 300 µg/sensidisco y extractos HP-20 evaluados a 2 mg/sensidisco. Extractos obtenidos de 1 L de cultivo (10x100 mL). **NE:** No ensayado.

CEPA	MEDIO	DCM		EAR	
		Rendimiento (mg)/0,5L cultivo	Actividad	Rendimiento (g) /0,5L cultivo	Actividad
<i>Jeotgalicoccus halophilus</i>	LBS	10	+++	0.33	-
	BM	3	+++	0.11	-
	TAK	163	+	1.22	-
<i>Oceanobacillus profundus</i>	LBS	5	++	0.58	-
	BM	260	NE	0.10	-
	TAK	100	-	0.90	++
Medios sin inocular	LBS	78	-	1.00	-
	BM	3	-	0.02	-
	TAK	92	-	0.55	-

La Tabla 2 muestra que la actividad IQS para *J. halophilus* cultivado en los tres medios de cultivo se concentró en el extracto DCM, logrando inhibiciones mayores a las presentadas por los fraccionamientos sobre RP-18 (Tabla 1). Es de notar, que para el caso de *O. profundus* cultivado en LBS mostró que la actividad IQS se centraba en el extracto DCM (compuestos de baja polaridad), mientras que cuando se cultivaba en el medio TAK la actividad estaba en EAR (compuestos de alta polaridad), evidenciado la gran influencia que tiene el medio de cultivo en la producción de compuestos IQS para esta cepa. De otro lado el extracto DCM de *O. profundus* cultivado en BM resultó estar enriquecido con el ácido benzoico propio del medio de cultivo, por lo cual no se realizó el bioensayo.

Para conocer la complejidad de los extractos activos obtenidos por extracción L-L, estos se analizaron por HPLC-DAD comparándolos con los perfiles obtenidos para los extractos de los medios sin inocular (Figuras 1, 5S y 6S, material suplementario), donde se muestra que con la extracción L-L se obtienen perfiles cromatográficos más sencillos que los obtenidos para los extractos HP-20 correspondientes, lo cual facilitaría la recuperación de los compuestos activos.

En la figura 1 se pueden observar los perfiles cromatográficos para los extractos DCM de los medios agotados de *J. halophilus* y *O. profundus* cultivados en LBS, además del perfil del medio sin inocular. Para *J. halophilus* se observan un pico intenso entre 15 y 16 min, que si bien presenta un tiempo de retención similar al pico mayoritario del medio LBS sin inocular (blanco), los espectros UV de estos picos (ver recuadros de la figura 1) muestran que se tratan de compuestos diferentes a los presentes en el medio de cultivo. Las absorciones en $\lambda = 244, 262$ y 300 nm para el pico mayoritario de *J. halophilus* son características de compuestos indólicos(28). De manera similar, el extracto de *O. profundus* presentó picos cromatográficos en diferentes tiempos de retención, al compararlo con el medio de cultivo sin inocular, sin embargo, el espectro UV del pico que aparece en un tiempo de retención de 15 min es idéntico al mismo pico en el perfil del medio de cultivo, por lo cual podemos afirmar que *O. profundus* produce compuestos de otra naturaleza. Lo anterior permitió evidenciar la producción de compuestos por parte de las bacterias, haciendo uso de un sistema de HPLC-UV y un proceso de extracción más selectivo.

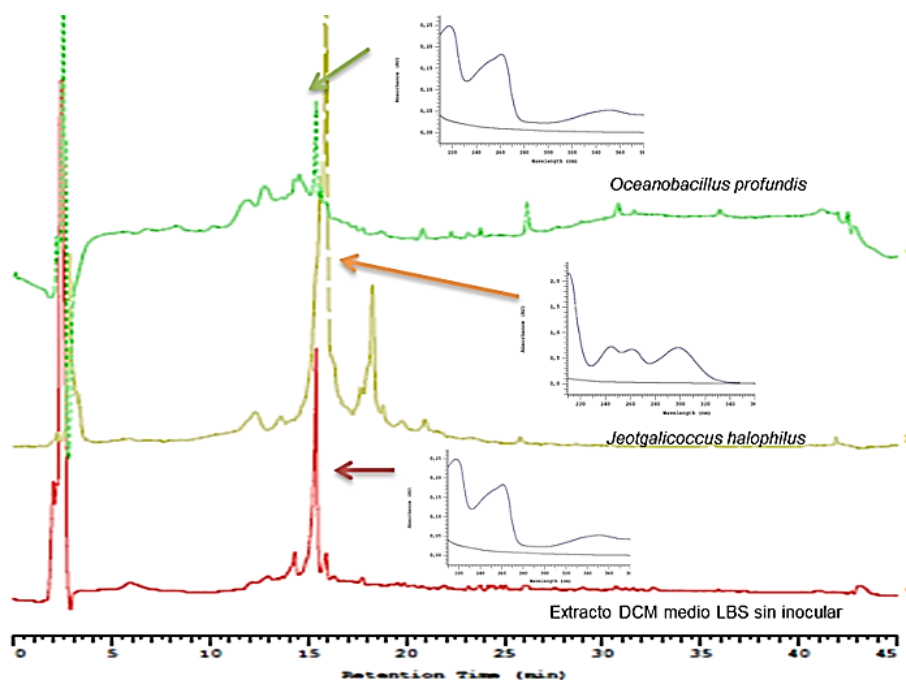


Figura 1. Cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD (210 nm) del extracto DCM del medio LBS sin inocular, y los extractos DCM de las cepas *J. halophilus* y *O. profundus* y espectros UV de los picos en tr 15 min (ver Figura 8S).

Este mismo análisis se realizó para los extractos de *J. halophilus* y *O. profundus* en los medios BM y TAK encontrando diferencias importantes entre los extractos DCM de los medios agotados y extractos DCM de los blancos (Figuras 5S y 6S, material suplementario). Estos resultados evidenciaron que esta técnica de extracción facilitó la recuperación de los compuestos bioactivos.

Identificación de los compuestos responsables de la actividad IQS

Por último, se registraron los espectros de RMN ^1H (CDCl_3) del extracto DCM del cultivo agotado de las cepas *J. halophilus* y *O. profundus* en medio LBS, y del extracto del mismo sin inocular (Figura 2A, 2B y 2C). Esto con el fin de identificar señales en los extractos DCM de las cepas, diferentes a las del extracto DCM del medio sin inocular. Así, para el caso de *J. halophilus* se observó la presencia de compuestos tipo aldehído a juzgar por la aparición de señales entre δ_{H} 9,5 y δ_{H} 10,0, así

mismo se observa la aparición de nuevas señales de protones aromáticos (δ_{H} 6,8 y 8,5) características de anillos indólicos, confirmando lo previamente visto en los espectros UV; además, se presentan diferencias en la zona de los metilos alifáticos y entre δ_{H} 3,5 y δ_{H} 4,0 que sugiere la producción de péptidos. Las señales más representativas en el extracto de *J. halophilus* que no están presentes en el medio de cultivo se pueden observar en la figura 7S de la información de soporte, donde se presenta la resta de los espectros.

En el caso de *O. profundus* las diferencias son menos evidentes (Figuras 2B y 2C), aunque es posible observar la aparición de señales anchas entre δ_{H} 6,7 y δ_{H} 7,3, indicando la producción de compuestos aromáticos; sí mismo se observan señales alrededor de δ_{H} 2,1 indicando la producción de compuestos acetilados. La resta de los espectros se presentan en la figura 9S, y muestra además de lo antes dicho señales entorno de δ_{H} 3,5 y en la región de metilos.

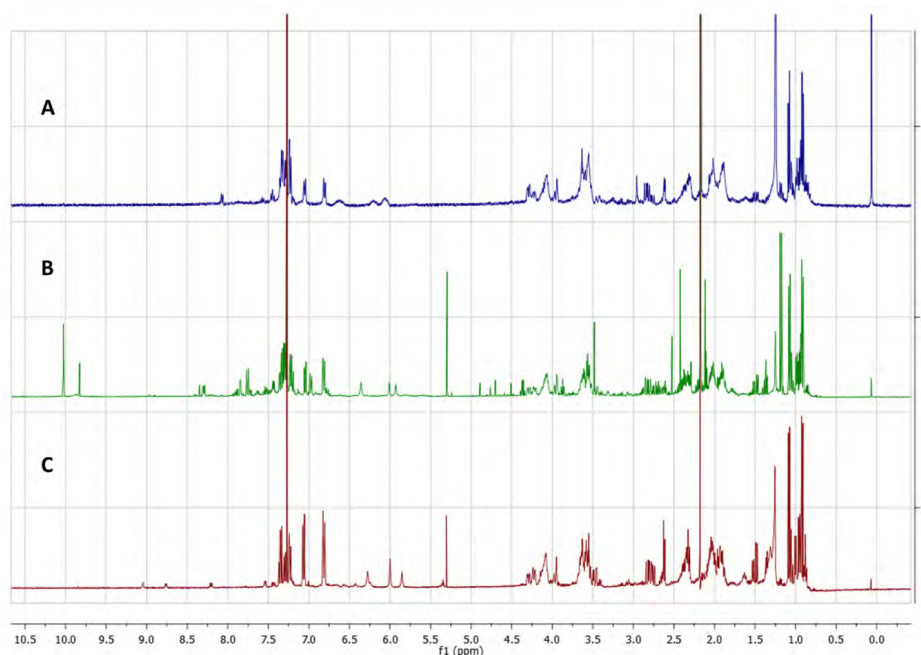


Figura 2. Espectros RMN ^1H (CDCl_3 a 400 MHz) para los extractos DCM del cultivo de las cepas *O. profundus* (A), *J. halophilus* en medio LBS (B) y medio LBS sin inocular (C).

Para continuar se seleccionó la cepa *O. profundus*, que fue descrita originalmente en 2007 a partir de sedimentos de alta mar (2247 m) (25), y que no presenta ningún estudio químico. La cepa fue cultivada en LBS, centrifugada, y el sobrenadante extraído con DCM. El extracto orgánico del cultivo fue separado por cromatografía sobre sílica gel de manera bioguiada usando el biosensor *C. violaceum*. De esta manera a partir de las fracciones bioactivas figura 5 y figura 7 se aislaron los compuestos 1 y 2, respectivamente, por medio de CC sobre Sephadex® LH-20. Los espectros de RMN ^1H del compuesto 1 muestra la presencia de un anillo aromático para disustituido (δ_{H} 7,06 (d, $J=9,0$ Hz, 2H); 6,77 (d, $J=9,0$ Hz, 2H)) y un residuo hidroxietilo (δ_{H} 3,82 (t, $J=6,0$ Hz, 2H); y 2,77 (t, $J=6,0$ Hz, 2H)). En ESI(-) se observa un ion en m/z 137 $[\text{M}-\text{H}]^-$ es congruente con la fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$. El análisis anterior y una búsqueda en la literatura permitió identificar a 1 como 4-(2-hidroxietil) fenol (26), también conocido como tirosol (figura 3). El espectro de RMN ^1H de 2 es similar al de 1, teniendo una señal adicional para un grupo acetilo (δ_{H} 2,06, s, 3H) que es congruente con el ion en m/z 179 en ESI(-) (Fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$), lo que permitió su identificación como acetato de

4-hidroxifenetilo (acetato de tirosol) de acuerdo a lo reportado (27) (figura 3). Ambos compuestos mostraron actividad inhibitoria de *quorum sensing* aún a la mínima cantidad ensayada (100 mg/sensidisco), presentado una actividad similar al ácido kojico un compuesto reconocido como IQS empleado como patrón positivo(28)

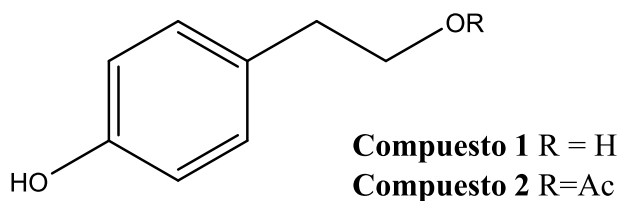


Figura 3. Compuestos bioactivos como inhibidores de QS aislados del extracto orgánico del cultivo de *O. profundus*

DISCUSIÓN

La importancia de esta propuesta radica en la capacidad de evaluar el potencial de una colección de microorganismos como productores de compuestos y realizar una selección bioguiada, en nuestro caso actividad IQS. Por otra parte una de las limitantes es el empleo de un solo bioensayo, pues aunque

un extracto no presentara actividad en el ensayo escogido podría tener otra, por lo que además de varios métodos de extracción podrían evaluarse diferentes tipo de bioactividad (antibiótica, antifúngica, citotóxica, etc.), en la práctica siguiendo este esquema el investigador tiene la libertad de probar simultáneamente diferentes técnicas dependiendo de sus objetivos.

Los microorganismos marinos han sido reconocidos como una fuente novedosa de compuestos con actividad biológica (14), dentro de las cuales la búsqueda de inhibidores de *quorum sensing* es un campo de investigación nuevo (11, 28). Actualmente, es ampliamente aceptado que un buen número de los compuestos obtenidos de los extractos de invertebrados marinos, particularmente los de organismos sésiles, son en realidad producidos por microorganismos asociados al invertebrado (29). Uno de los ejemplos más relevantes por su importancia biomédica y económica es la producción de la cianosafracina B por parte de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*, simbiote del tunicado *Ecteinascidia turbinata*, el cual se emplea como precursor en la obtención de la ecteinascidina 743 (E-743), medicamento usado para el tratamiento del cáncer y que fue inicialmente obtenido a partir del extracto del tunicado (30). Actualmente es comercializado por Pharmamar con el nombre comercial de Yondelis® (14). En la bibliografía especializada, también se encuentran ejemplos de compuestos aislados de microorganismos cultivados, sin contraparte en invertebrados, y con aplicación farmacológica. Este es el caso de la salinosporamida A producida por actinomicetes del género *Salinospora*, la cual actualmente se encuentra en la primera fase de estudios clínicos por su actividad citotóxica como inhibidor de proteosoma en células cancerosas. En general, las bacterias de género *Salinospora* producen en condiciones *in vitro* compuestos con estructuras novedosas y potente actividad citotóxica (31).

El metabolismo y la producción de compuestos de un microorganismo están condicionados por el medio donde se cultiva; así como por otros parámetros como la agitación, pH, aireación, etc. No obstante, estos medios del cultivo, por su complejidad, generan matrices que dificultan la separación e identificación de los metabolitos producidos por el microorganismo. Así, la selección del medio y de la metodología de extracción tiene un gran impacto en el éxito del estudio de los productos naturales a partir de microorganismos (32). Lo an-

terior hace necesario tener apuestas metodológicas que minimicen estas dificultades, y que permitan tomar decisiones en cuanto a la cepa a estudiar y las condiciones de cultivo. Estas metodologías deben ser fácilmente automatizables.

En la tabla 2S (ver material suplementario) se presentan los resultados de la evaluación IQS de los extractos HP-20 obtenidos del cultivo de las 15 cepas y del rendimiento de la extracción. En esta tabla se puede ver que el medio deficiente en nutrientes BM estimuló la producción de compuestos IQS en la mayoría de las cepas (87 %); sin embargo, el rendimiento de los extractos también fue muy bajo en la mayoría de los casos. En el medio rico en nutrientes LBS el 26 % de los extractos de los cultivos de las cepas mostraron actividad a todas las dosis empleadas, lo cual podría indicar que produce compuestos con potente actividad IQS o en alta concentración. En el medio rico en nutrientes TAK el 80 % de las cepas presentaron una actividad, al igual que en el medio LBS, donde además los extractos presentaron un buen rendimiento. Finalmente, el medio deficiente en nutrientes MM permitió obtener cerca del 33 % de los extractos con buena actividad, pero con rendimientos más bajos que los obtenidos incluso en BM. Con todo lo anterior los medios TAK y LBS fueron seleccionados como los mejores medios para la obtención de extractos inhibidores del QS. Sin embargo, es claro que un buen rendimiento en el extracto no significa, necesariamente, una alta producción de metabolitos, pues la resina puede retener también componentes del medio de cultivo dando extractos de matrices muy complejas, que en los pasos posteriores de purificación serían descartados por esta razón.

En todos los casos se observó que la cantidad de extracto obtenido del cultivo de las cepas es mayor al extracto del medio sin inocular correspondiente. Así mismo, en general los extractos obtenidos a partir de los medios mínimos tienen rendimientos más bajos que los obtenidos en los medios enriquecidos; no obstante, algunos de los extractos obtenidos a partir del cultivo en los medios mínimos (BM y MM) presentan actividad IQS superior a la obtenida para los cultivos en los medios enriquecidos LBS y TAK (Tabla 1). Este hecho puede verse como una ventaja pues los medios mínimos representan una matriz menos compleja, esperando que los compuestos IQS se encuentren en una mayor concentración en estos extractos o que sean más fáciles de separar de la matriz.

A partir de la respuesta del biosensor *C. violaceum* ATCC 31532 frente a los extractos (Tabla 2S, material suplementario) también se pudo observar actividad inhibitoria de crecimiento de los extractos de *S. equorum* (cultivada en BM y TAK), *S. auricularis*, (cultivadas en BM, TAK y MM), y de la cepa no identificada RKHC-15 (cultivada en LBS), lo cual sugiere que estas cepas podrían ser fuentes de compuestos con actividad antimicrobiana. Adicionalmente, se pudo establecer que en los extractos de algunas cepas como *O. iheyensis* en el medio LBS producen inductores del *quorum sensing* al inducir la producción de la violaceína en el biosensor (Tabla 2S, material suplementario). Esta inducción no parecería deberse a la producción de homoserinlactonas, autoinductores del biosensor, porque las bacterias gram positivas como *O. iheyensis* no producen esta clase de compuestos (13). Este efecto inductor podría sugerir que en este extracto se encuentran compuestos IQS, o antibióticos, pero en cantidades subinhibitorias lo cual desencadena -como mecanismo de defensa- la producción de moléculas señalizadoras en el biosensor e inducción la expresión de los genes responsables de la producción de violaceína (33).

Los compuestos 1 y 2 han sido obtenidos de múltiple fuentes incluyendo una cepa marina de *Streptomyces* sp. KMM210; la levadura marina *Pichia membranifaciens*, especies de hongos del género *Fusarium* spp. PSU-F14 y PSU-F135, y *Nigrospora sphaerica* (34-36). Múltiples actividades biológicas se les han atribuido incluyendo antioxidante e inhibidores de citoquinina (37-39). El tirosol es una molécula de comunicación utilizada por el hongo *Candida albicans* favoreciendo por medio de QS el inicio de la filamentación (40-42) pero no se había descrito actividad inhibitoria del *quorum sensing* en bacterias aunque si su producción, como es el caso de *Bacillus subtilis* KMM 3427 (43), aunque compuestos similares (orto-dihidroxilados) han sido patentados recientemente con este fin (44). Lo que pone de manifiesto el potencial de esta especie como biocontrolador o como fuente de compuestos con actividad IQS.

CONCLUSIONES

En este trabajo se estudiaron 15 cepas bacterianas pertenecientes al phylum *Firmicutes* aisladas del coral blando *Antillogorgia elisabethae* como fuente de compuestos con actividad IQS. Las bacterias fueron cultivadas en los medios LBS, TAK, BM y MM. Los extractos realizados con la resina Diaion® HP-20

permitieron seleccionar a las cepas *J. halophilus*, *O. profundus*, *B. horneckiae* y *B. licheniformis* como productoras de los extractos más activos. Estas cepas bacterianas representan una fuente novedosa de inhibidores del QS. Por medio de análisis HPLC-DAD se determinó una alta complejidad de los extractos, incluso luego de un fraccionamiento cromatográfico en fase reversa sobre cartuchos reutilizables. Por otra parte, y gracias a que la actividad IQS se centró en la fracción menos polar del fraccionamiento cromatográfico, se pudo proponer que el uso de extracciones L-L con solventes de media polaridad (Ej. DCM) debería permitir la recuperación de los compuestos bioactivos con menor contaminación del medio de cultivo. Así, se obtuvieron extractos más activos y menos complejos, para las cepas *J. halophilus* y *O. profundus*, mostrando las ventajas de esta extracción enfocada hacia los compuestos bioactivos. La caracterización preliminar de estos extractos por CLAE y RMN ¹H, permitió observar la producción de compuestos diferentes a los medios de cultivo, identificando núcleos tipo indol así como la presencia de grupos formilo en las moléculas producidas por *J. halophilus*, mientras que para *O. profundus* se lograron aislar el tirosol (1) y su acetato (2), para los que no se había reportado actividad QSI.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por Colciencias, la Universidad Nacional de Colombia y la International Foundation for Science IFS Uppsala - Suecia (Grant F/5023-1). El Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial otorgó el Permiso (Permiso No. 4 of 10/02/2010, contrato de acceso a recurso genético No 107 y 108) para la recolección de las muestras y la investigación en *Antillogorgia elisabethae* en el archipiélago de San Andrés y Providencia, en el Caribe colombiano.

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses con los resultados del presente trabajo.

REFERENCIAS

1. CIOFU O, GIWERCMAN B, HØIBY N, PEDERSEN SS. Development of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* during two decades of antipseudomonal treatment at the Danish CF Center. *APMIS* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 1994;102(7-12):674-80.
2. Rumbaugh KP, Griswold J a, Iglewski BH, Hamood A N. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun* [Internet]. 1999 Nov;67(11):5854-62.
3. Collier DN, Anderson L, McKnight SL, Noah TL, Knowles M, Boucher R, et al. A bacterial cell to cell signal in the lungs of

- cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2002 Sep 24;215(1):41–6.
4. Schultz MP, Bendick J a, Holm ER, Hertel WM. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* [Internet]. 2011 Jan;27(1):87–98.
 5. Skandamis PN, Nychas G-JE. Quorum sensing in the context of food microbiology. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2012 Aug;78(16):5473–82.
 6. Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. REGULATION OF GENE EXPRESSION BY CELL-TO-CELL COMMUNICATION : Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing. *Annu Rev Genet*. 2001;35:439–68.
 7. Bhardwaj AK, Vinothkumar K, Rajpara N. Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* [Internet]. 2013 Apr;8(1):68–83.
 8. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Rasmussen TB, Christophersen L, Calum H, Hentzer M, et al. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology* [Internet]. 2005 Dec;151(Pt 12):3873–80.
 9. Fusetani N. Antifouling marine natural products. *Nat Prod Rep* [Internet]. The Royal Society of Chemistry; 2011;28(2):400–10.
 10. Dobretsov S, Teplitski M, Paul V. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling* [Internet]. 2009 Jan;25(5):413–27.
 11. Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnol Adv* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;31(2):224–45.
 12. Qian P-Y, Xu Y, Fusetani N. Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. *Biofouling* [Internet]. 2010 Jan;26(2):223–34.
 13. Teasdale ME, Donovan K a, Forscher-Dancause SR, Rowley DC. Gram-positive marine bacteria as a potential resource for the discovery of quorum sensing inhibitors. *Mar Biotechnol (NY)* [Internet]. 2011 Aug;13(4):722–32.
 14. Gerwick WH, Moore BS. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Jan 27;19(1):85–98.
 15. Tello E, Castellanos L, Duque C. Synthesis of cembranoid analogues and evaluation of their potential as quorum sensing inhibitors. *Bioorg Med Chem* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Jan 1;21(1):242–56.
 16. Williams GC, Chen J. Resurrection of the octocorallian genus *Antillogorgia* for Caribbean species previously assigned to *Pseudopterogorgia*, and a taxonomic assessment of the relationship of these genera with *Leptogorgia* (Cnidaria, Anthozoa, Gorgoniidae). 2012;52:5326.
 17. Correa H, Haltli B, Duque C, Kerr R. Bacterial Communities of the Gorgonian Octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Microb Ecol* [Internet]. Springer US; 2013;66(4):972–85.
 18. Li J, Chase H a. Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources. *Nat Prod Rep* [Internet]. 2010 Oct;27(10):1493–510.
 19. Brango-Vanegas J, Costa GM, Ortman CF, Schenkel EP, Reginato FH, Ramos FA, et al. Glycosylflavonoids from *Cecropia pachystachya* Trécul are quorum sensing inhibitors [Internet]. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. Urban & Fischer Verlag; 2014. p. 670–5.
 20. Hasan F, Khan S, Shah AALI, Hameed A. Production of antibacterial compounds by free and immobilized *Bacillus pumilus* SAF1. *Pak J Bot*. 2009;41(3):1499–510.
 21. Al-zereini W, Schuhmann I, Laatsch H, Helmke E. New Aromatic Nitro Compounds from *Salegentibacter* sp. T436 , an Arctic Sea Ice Bacterium : Taxonomy , Fermentation , Isolation and Biological Activities. *J Antibiot (Tokyo)*. 2007;60(5):301–8.
 22. Sugiura K. Note Isolation of Tunicamycin Produced by *Bacillus cereus* K-279 Takashi Kamogashira , Setsuko Takegata. 1988;52(3):859–61.
 23. Gutiérrez-Mañero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi J, R. Tadeo F, Talon M, et al. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol Plant* [Internet]. Munksgaard International Publishers; 2001;111(2):206–11.
 24. Hamdache A, Lamarti A, Aleu J, Collado IG. Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*. *J Nat Prod* [Internet]. 2011 Apr 25;74(4):893–9.
 25. Nam JH, Bae W, Lee DH. *Oceanobacillus caeni* sp. nov., isolated from a *Bacillus*-dominated wastewater treatment system in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58(5):1109–13.
 26. Rukachaisirikul V, Khamthong N, Sukpondma Y, Phongpachit S, Hutadilok-Towatana N, Graidit P, et al. Cyclohexene, diketopiperazine, lactone and phenol derivatives from the sea fan-derived fungi *nigrospora* sp. PSU-F11 and PSU-F12. *Arch Pharm Res*. 2010;33(3):375–80.
 27. Aissa I, Bouaziz M, Ghamgui H, Kamoun A, Miled N, Sayadi S, et al. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of acetylated tyrosol by response surface methodology. *J Agric Food Chem*. 2007;55(25):10298–305.
 28. Dobretsov S, Teplitski M, Bayer M, Gunasekera S, Proksch P, Paul VJ. Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling* [Internet]. 2011 Sep;27(8):893–905.
 29. Bhatnagar I, Kim S-K. Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. *Mar Drugs* [Internet]. 2010 Jan;8(10):2673–701.
 30. Cuevas C, Pérez M, Martín MJ, Chicharro JL, Fernández-Rivas C, Flores M, et al. Synthesis of Ecteinaescidin ET-743 and Phthalascidin Pt-650 from *Cyanosfracin B*. *Org Lett* [Internet]. American Chemical Society; 2000 Jul 19;2(16):2545–8.
 31. Feling RH, Buchanan GO, Mincer TJ, Kauffman CA, Jensen PR, Fencal W, et al. A Cytotoxic Proteasome Inhibitor 10. 2003;355–7.
 32. Knight V, Sanglier J-J, DiTullio D, Braccili S, Bonner P, Waters J, et al. Diversifying microbial natural products for drug discovery. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2003 Oct;62(5-6):446–58.
 33. Romero D, Traxler MF, López D, Kolter R. Antibiotics as signal molecules. *Chem Rev* [Internet]. 2011 Sep 14;111(9):5492–505.
 34. Sobolevskaia MP, Denisenko VA, Moiseenko AS, Shevchenko LS, Menzorova NI, Sibirtsev YT, et al. Bioactive metabolites of the marine actinobacterium. *Russ Chem Bull*. 2007;56(4):838–40.
 35. Elbandy M, Shinde PB, Dang HT, Hong J, Bae KS, Jung JH. Furan metabolites from the sponge-derived yeast *Pichia membranifaciens*. *J Nat Prod*. 2008;71(5):869–72.
 36. Trisuwan K, Khamthong N, Rukachaisirikul V, Phongpachit S, Preadanon S, Sakayaroj J. Anthraquinone, cyclopentanone, and naphthoquinone derivatives from the sea fan-derived fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135. *J Nat Prod*. 2010;73(9):1507–11.
 37. Serdyuk OP, Smolygina LD, Muzafarov EN, Adanin VM, Arinbasarov MU. 4-Hydroxyphenethyl alcohol a new cytokinin-like substance from the phototropic purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* 1R. *FEBS Lett*. 2000;365(1995):10–2.
 38. Hung CY, Tsai YC, Li KY. Phenolic antioxidants isolated from the flowers of *Osmanthus fragrans*. *Molecules*. 2012;17(9):10724–37.
 39. Zhang Q-H, Tian L, Zhou L-D, Zhang Y, Li Z-F, Hua H-M, et al. Two new compounds from the marine *Nigrospora sphaerica*. *J Asian Nat Prod Res*. 2009;11(11):962–6.
 40. Kalia VC. Quorum Sensing vs Quorum Quenching : A Battle with No End in Sight. New Delhi . Springer; 2015. 383 p.
 41. Alem M a S, Oteef MDY, Flowers TH, Douglas LJ. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryot Cell*. 2006;5(10):1770–9.
 42. ALBUQUERQUE P, CASADEVALL A. Quorum sensing in fungi – a review. *Med Mycol*. 2012;29(6):997–1003.
 43. Ivanova EP, Kuznetsova T a, Mikhailov V V. Antifungal compounds produced by bacterial populations of the sea sponge *Verongia* sp. *Biol Morya (Vladivostok, Russ Fed)*. 2000;26(2):116–8.
 44. Auñon CD, Allende PA, Fábregas CJ, Gómez-Acebo GE. Use of hydroxytyrosol and derivatives thereof as quorum quenchers [Internet]. World Intellectual Property Organization International Bureau; PCT/EP2013/071845, 2014.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla 1S Resultados de la actividad IQS frente a *C. violaceum* ATCC 31532 de los extractos y fracciones obtenidas a partir del cultivo de las cuatro cepas bacterianas preseleccionadas.

Cepa	Medio	EXTRACTO		FRACCIÓN MeOH:H ₂ O (1:9)		FRACCIÓN MeOH:H ₂ O (1:1)		FRACCIÓN MeOH	
		Cantidad (mg)	Actividad	Cantidad (mg)	Actividad	Cantidad (mg)	Actividad	Cantidad (mg)	Actividad
<i>Bacillus licheniformis</i>	LBS	55.9	+	34.4	-	9.7	-	2.1	++++
	BM	11.2	++	7.4	-	1.7	-	MB	NE
	MM	6.2	-	MB	NE	MB	NE	MB	NE
	TAK	39.5	+	22.3	-	8.6	-	MB	NE
<i>Jeotgalicoccus halophilus</i>	LBS	51.0	-	23.6	-	10.7	-	2.4	+
	BM	7.4	++	2.4	-	0.4	-	<0.2	++++
	MM	13.6	-	5.0	-	1.2	-	<0.1	++
	TAK	60.3	+	48.5	-	7.5	-	MB	NE
<i>Oceanobacillus profundus</i>	LBS	69.6	++	35.2	-	14.3	-	2.0	-
	BM	5.5	+	3.0	-	0.3	-	<0.1	-
	MM	10.9	+	4.6	-	2.7	-	<0.1	++++
	TAK	51.4	+	33.4	-	6.8	-	MB	NE
<i>Bacillus horneckiae</i>	LBS	37.1	-	21.6	-	5.4	-	MB	NE
	BM	7.9	+	1.3	-	0.7	-	<0.1	++
	MM	5.6	-	MB	NE	MB	NE	MB	NE
	TAK	68.7	+	53.6	-	10.2	-	MB	NE

Las fracciones fueron evaluadas a 300 µg/sensidisco y los extractos 2 /sensidisco (por duplicado). Actividad relacionada con el diámetro del halo de inhibición < 5mm +, 5-7 mm ++, 7-9 mm +++, 9-12 mm +++. MB: rendimiento muy bajo. NE: No ensayado por falta de material.

Tabla 2S. Resultados de la evaluación de la actividad IQS usando como biosensor *C. violaceum* ATCC 31532 de los extractos obtenidos mediante resina HP-20 a partir de la quince cepas cultivadas en los medios LBS, BM, TAK y MM

Cepa	Extracto (mg) LBS	Medio LBS			Extracto (mg) BM	Medio Benzoato mínimo		Extracto (mg) TAK	Medio Takahashi		Extracto (mg) MM	Medio Marino mínimo	
		D1	D2	D3		D1	D2		D1	D2		D1	D2
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> (RKHC-8)	36.2	-	-	-	7.6	+	+	56.6	-	-	7.6	-	-
<i>Bacillus cereus</i> (RKHC-9)	63.0	+	-	-	20.8	-	-	---	-	-	---	-	-
<i>Bacillus horti</i> (RKHC-13)	47.0	-	-	-	7.3	-	-	60.6	+	+	7.0	+	++
RKHC-15	17.6	I.C.	I.C.	I.C.	12.7	++	+++	66.9	++	+	8.1	+	+
<i>Bacillus licheniformis</i> (RKHC-21)	55.9	++	++	+	7.2	++	+	39.5	+	-	6.2	-	-
<i>Bacillus mojavensis</i> (RKHC-37)	55.3	-	-	-	8.8	++	+	52.2	+	-	12.3	-	++
<i>Bacillus pumillus</i> (RKHC-57A)	26.0	-	-	-	11.1	++	+	35.7	-	-	9.9	-	-
<i>Bacillus horneckiae</i> (RKHC-68A)	46.7	+	+	-	7.9	+	+	68.7	+	+	5.6	-	-
<i>Bacillus anthracis</i> (RKHC-69A)	25.6	-	-	-	10.7	+	+	53.7	-	-	8.4	+	-
<i>Oceanobacillus profundus</i> (RKHC-62B)	52.5	+	+	+	5.5	+	+	51.4	+	+	10.9	+	+
<i>Oceanobacillus iheyensis</i> (RKHC-82A)	38.9	Induce QS	Induce QS	Induce QS	2.3	+	-	55.4	+	+	10.6	+	-

Cepa	Extracto (mg) LBS	Medio LBS			Extracto (mg) BM	Medio Benzoato mínimo		Extracto (mg) TAK	Medio Takahashi		Extracto (mg) MM	Medio Marino mínimo	
		D1	D2	D3		D1	D2		D1	D2		D1	D2
<i>Jeotgalicoccus halophilus</i> (RKHC-28)	39.9	+	+	+	7.4	++	+	60.3	+	+	13.6	-	-
<i>Staphylococcus auricularis</i> (RKHC-48)	55.2	-	-	-	9.7	I.C.	-	57.6	I.C.	I.C.	7.1	I.C.	I.C.
<i>Staphylococcus equorum</i> (RKHC.54)	24.2	-	-	-	11.9	I.C	I.C	70.3	I.C	I.C	8.8	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i> (RKHC-78B)	42.3	-	-	-	13.5	+	+	48.0	+	+	2.2	-	-
Medio de cultivo estéril	81.6	-	-	-	5.2	-	-	52.8	-	-	3.2	-	-
Control positivo Extracto de <i>Cecropia pachystachya</i> (10µg/disco)		++++											
Blanco de solvente MeOH		-											

D1 corresponde a 2.0 mg/sensidisco; D2 a 1.0 mg/sensidisco y D3 a 0,2 mg/sensidisco. La actividad está expresada con respecto al diámetro del halo de inhibición de la pigmentación: - no hay inhibición de QS, + < 5mm, ++ 5-7 mm, +++ 7-9 mm, ++++ 9-12 mm. I.C. Inhibición del crecimiento. (La cepa RKHC-15 no ha sido identificada)

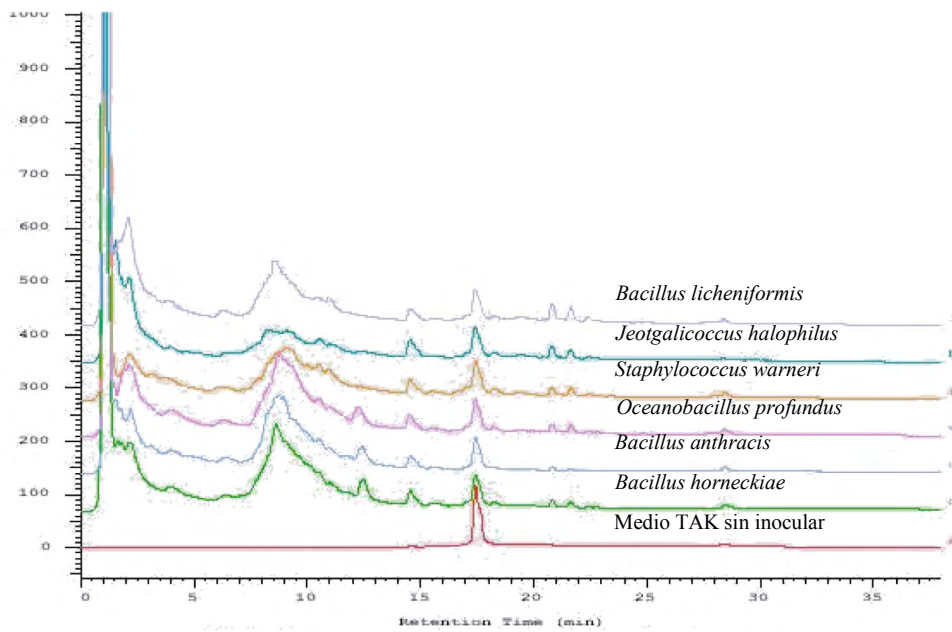


Figura 1S. Cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD (210 nm) del extracto del medio estéril takahashi (TAK), y los extractos de las cepas *J. halophilus*, *B. licheniformis*, *S. warneri*, *O. profundus*, *B. anthracis* y *B. horneckiae* cultivadas en medio TAK

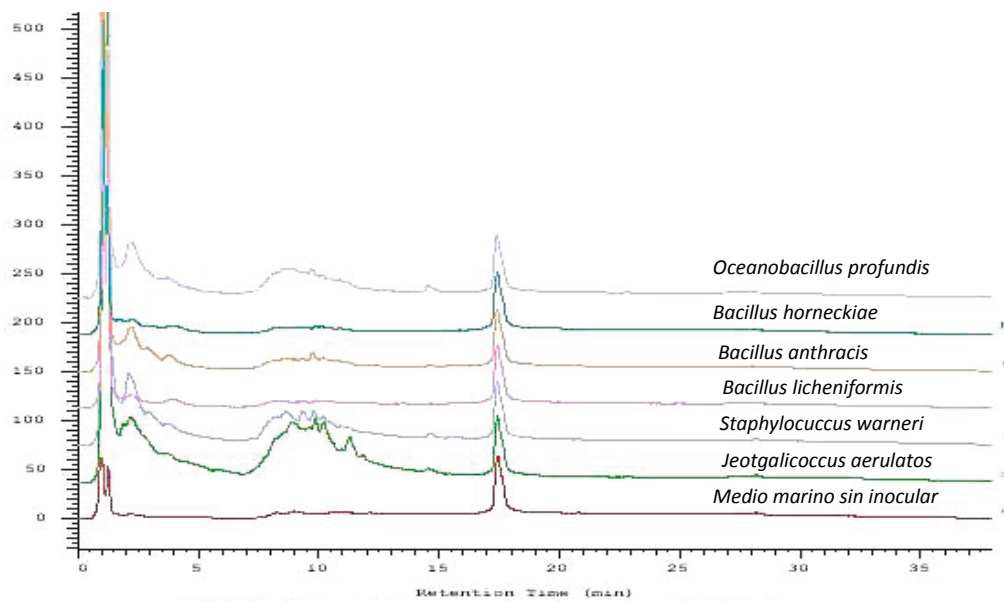


Figura 2S. Cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD (210 nm) del extracto del medio estéril marino mínimo (MM), y los extractos de las cepas *J. halophilus*, *B. licheniformis*, *S. warneri*, *O. profundus*, *B. anthracis* y *B. horneckiae*, cultivadas en medio MM

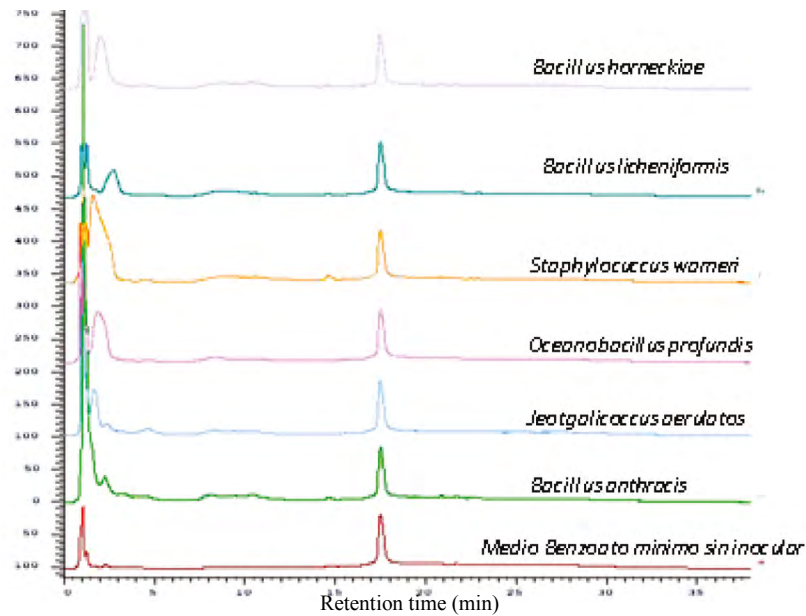


Figura 3S. Cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD (210 nm) del extracto del medio estéril benzoato mínimo (BM), y los extractos de las cepas *J. halophilus*, *B. licheniformis*, *S. warneri*, *O. profundus*, *B. anthracis* y *B. horneckiae*, cultivadas en medio BM

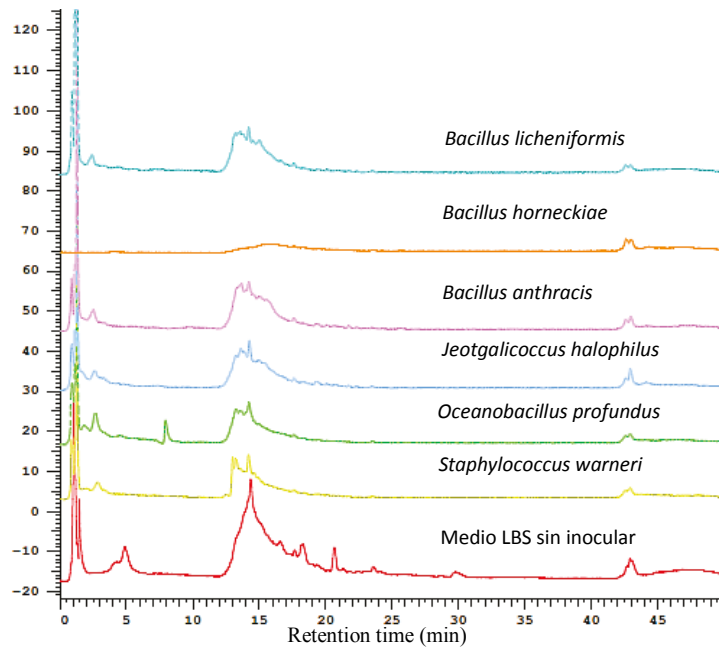


Figura 4S. Cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD (210 nm) del extracto del medio estéril LBS, y los extractos de las cepas *J. halophilus*, *B. licheniformis*, *S. warneri*, *O. profundus*, *B. anthracis* y *B. horneckiae*. Cultivadas en medio LBS.

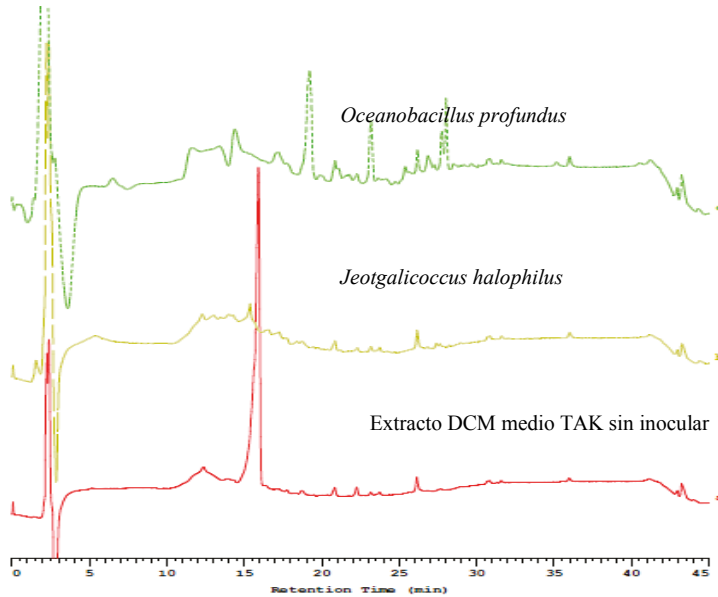


Figura 5S. Cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD (210 nm) del extracto DCM del medio TAK sin inocular, y los extractos DCM de las cepas *J. halophilus* y *O. profundus* cultivadas en medio TAK.

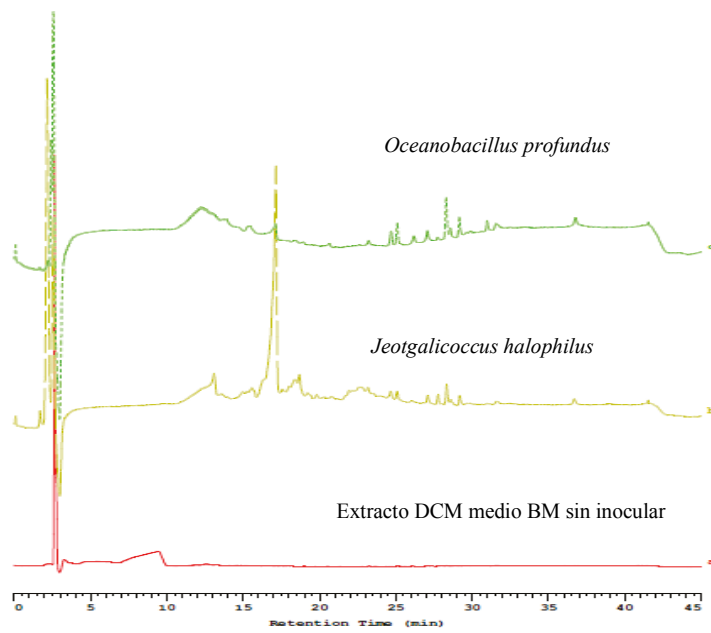


Figura 6S. Cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD (210 nm) del extracto DCM del medio BM sin inocular, y los extractos DCM de las cepas *J. halophilus* y *O. profundus*

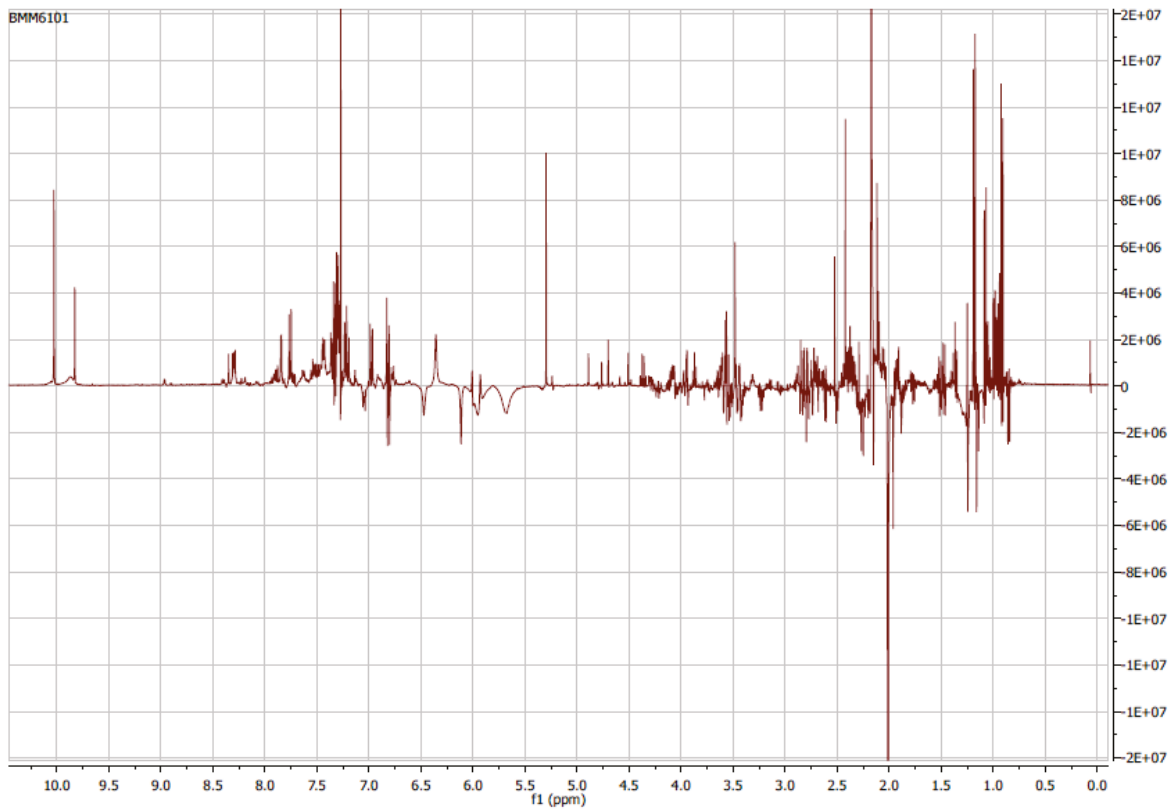


Figura 7S. Espectro de RMN ¹H del extracto de *J. halophilus* menos el espectro de RMN ¹H del medio de cultivo.

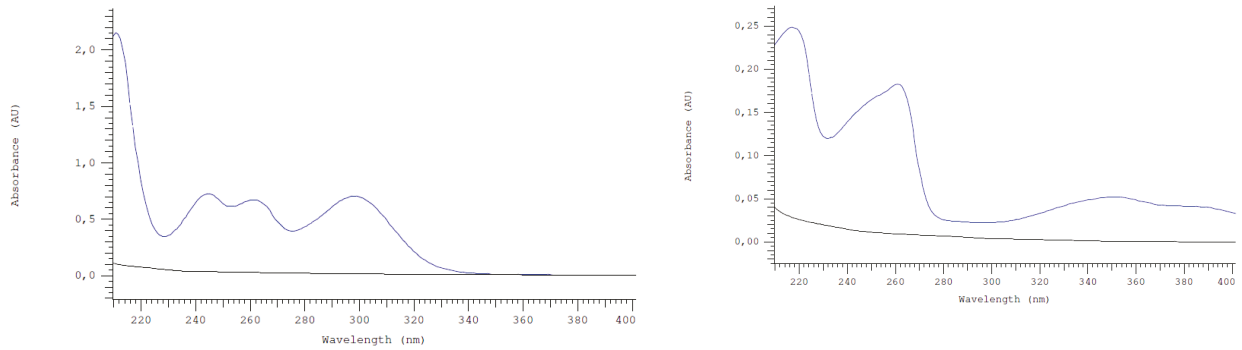


Figura 8S. Espectro UV del pico de 15 min de los extractos DCM de la cepas *J. halophilus* y *O. profundus*.

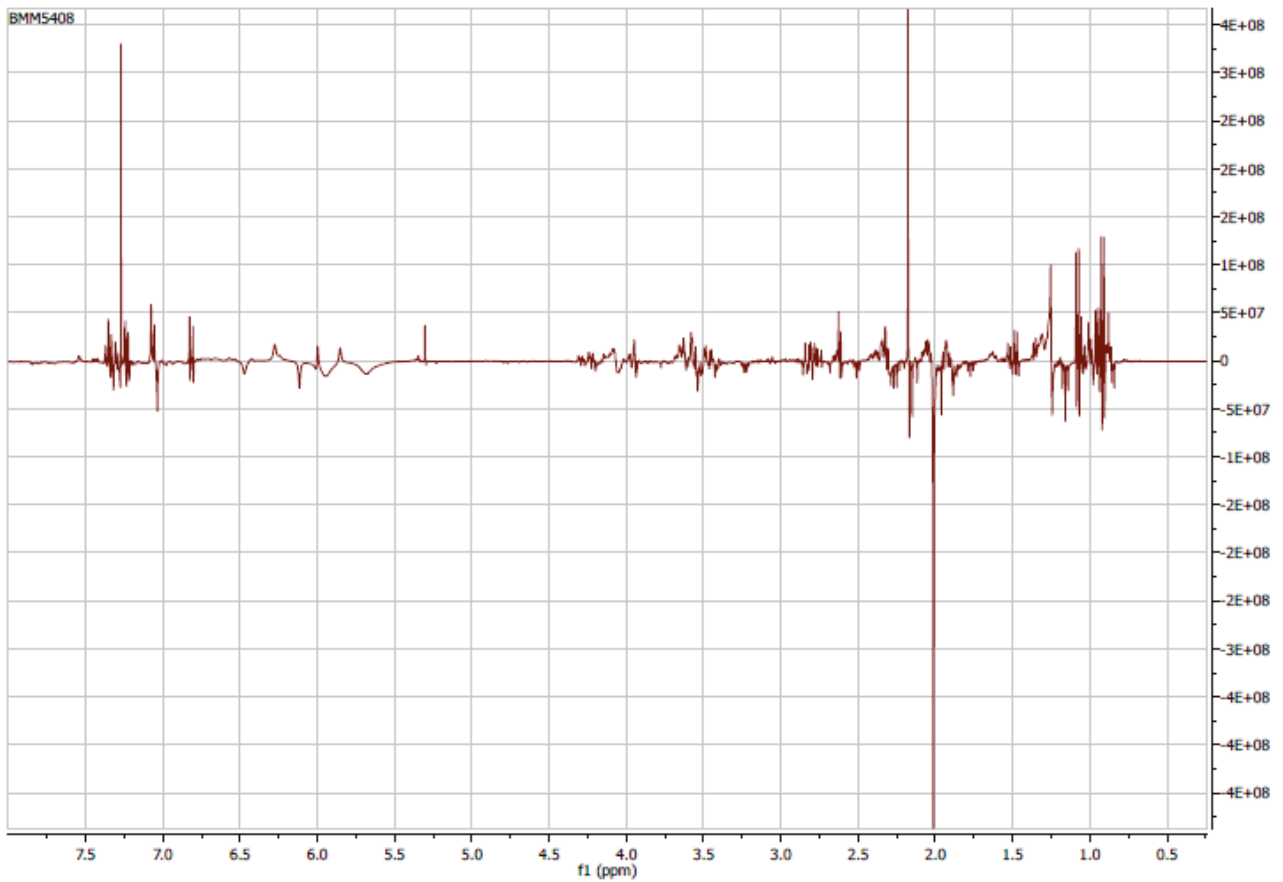


Figura 9S. Espectro de RMN ¹H del extracto de *O. profundus* menos el espectro de RMN ¹H del medio de cultivo.

VARIACIÓN EN CONTENIDO DE MINERALES EN FRUTOS DE VARIEDADES AUTÓCTONAS DE CHILE (*CAPSICUM ANNUUM* L.), CULTIVADAS EN INVERNADERO

VARIATION IN MINERALS CONTENT IN FRUITS OF PEPPER (*CAPSICUM ANNUUM* L.) LANDRACES, GROWN IN GREENHOUSE

José L. CHÁVEZ-SERVIA^{1*}, Araceli M. VERA-GUZMÁN¹,
José C. Carrillo-RODRÍGUEZ², Elena HEREDIA-GARCÍA³

Recibido: Agosto 12 de 2015. Aceptado: Mayo 05 de 2016

RESUMEN

Antecedentes: La malnutrición es un problema tanto en países desarrollados como en desarrollo, y en Latinoamérica, una opción viable es reconsiderar las dietas precolombinas tradicionales basadas en las especies endémicas. En Mesoamérica el chile o *chilli* (*Capsicum annuum* L.) desempeñó una función esencial, y perdura en la gastronomía mexicana. **Objetivo:** evaluar la variación entre y dentro de cinco morfotipos de chile (*C. annuum* L.) nativo de Oaxaca, México, en relación al contenido de minerales en fruto. **Métodos:** Una colección de 45 muestras poblacionales de chile, agrupadas en cinco morfotipos, nominados como chile de Agua, Tabiche, Piquín, Solterito y Nanche, fueron sembradas en invernadero bajo un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. A la cosecha se obtuvo una muestra de 300 a 500 g de frutos por población, a partir de la que se obtuvieron cenizas solubilizadas en medio ácido, y la determinación de Cu, Fe, Mg, Zn, Na, K, y Ca se hizo por espectrofotometría de absorción atómica, y S y P se cuantificó mediante un espectrofotómetro UV-visible. **Resultados:** En el análisis de varianza se determinaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre y dentro de morfotipos de *C. annuum* para todos los macro y microelementos evaluados. Solterito sobresalió en ocho elementos minerales, le siguen Piquín y de Agua. En contenido de Fe sobresalieron Piquín y Solterito con 8,0 y 8,5 mg/100 g de pesos seco de muestra. Dentro de cada morfotipo sobresalen diferentes poblaciones: CAG03 y CAG10 en chile de Agua; CNA02 de Nanche; CPI02 y CPI09 de Piquín; CSO01, CSO02 y CSO03 de Solterito; y CTA02 y CTA05 del tipo Tabiche. Las diferencias entre morfotipos se confirmaron mediante un análisis discriminante múltiple y las distancias de Mahalanobis. **Conclusiones:** Los resultados muestran diferencias entre y dentro de morfotipos de *C. annuum*, y los valores del contenido de minerales reportados muestran que, el chile es un alimento con alto valor nutricional porque 100 g de peso seco potencialmente pueden suplir las necesidad diarias de Cu, Mg, P, y una proporción importante de Fe, Zn y K, entre otros elementos.

Palabras clave: *Capsicum*, macrominerales, elementos traza, espectrofotometría atómica, calidad nutricional.

ABSTRACT

Background: Malnutrition is a major health problem in developed and developing countries, and in Latino American, a viable option is reconsider the pre-Columbian and traditional diets based on ende-

¹ Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-Oaxaca, México.

² Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, Ex-hacienda de Nazareno, Oaxaca, México.

³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental El Bajío, Celaya, Guanajuato, México.

* Autor para correspondencia: jchavez@ipn.mx

mic species. In Mesoamerica, the chilli or pepper (*Capsicum annuum* L.) played an important role, and its contribution remain until today in the Mexican gastronomy. **Objective:** the aim of the present work was to evaluate the variation among and within five morphotypes of pepper (*C. annuum* L.) native of Oaxaca, Mexico, in relation to minerals content in fruits. **Methods:** a collection of 45 population samples of chilli pepper, which were grouped in five morphotypes named as chile de Agua, Tabiche, Piquin, Solterito and Nanche, and later planted in greenhouse conditions under a complete blocks randomized design with three replications. At harvest time a fruit samples from 300 to 500 g per population were obtained, and later the samples were incinerated to obtain ashes, which were solubilized in acid medium. The determinations of Cu, Fe, Mg, Zn, Na, K, and Ca were done by atomic absorption spectrometry, and the S and P elements were quantified by an UV-vis spectrometer. **Results:** in the analysis of variance, significant differences ($P < 0.05$) were determined among and within morphotypes of *C. annuum* over all macro and trace elements. Solterito presented the highest values in eight mineral elements, after Piquin and chile de Agua were the second more important. In Fe content, Piquin and Solterito showed high values between 8.0 and 8.5 mg/100 g of dry sample weight. Into each morphotype, the outstanding populations were: CAG03 and CAG10 from chile de Agua; CNA02 of Nanche; CPI02 and CPI09 of Piquin type; CSO01, CSO02 and CSO03 from Solterito; and CTA02 and CTA05 from Tabiche type. The differences among morphotypes were confirmed in the multiple discriminant analysis and the Mahalanobis' distances. **Conclusions:** The results showed differences among and within morfotypes of *C. annuum*, and the minerals content reported indicate that, the chilli pepper is a food with high nutritional values. In fact 100 g of dry weight, potentially can supply the dairy needs of Cu, Mg, P and an important proportion of the needs of Fe, Zn and K, among other nutritional elements.

Keywords: *Capsicum*, macrominerals, trace elements, atomic spectrophotometry, nutritional quality.

INTRODUCCIÓN

Hasta ahora se han propuesto innumerables iniciativas para resolver el problema de seguridad alimentaria y nutricional en América Latina y el Caribe, mediante la introducción de alimentos procesados y enriquecidos industrialmente, desdeñando el contexto social, cultura, ambiental y económico del problema, y por ello se requiere recuperar y revalorizar la cultural alimentaria de los pueblos originarios. El chile o *chilli* (*Capsicum annuum* L.) en lengua náhuatl, es una especie cultivada, recolectada y consumida en México, desde hace cientos de años. Los restos arqueobotánicos recuperados en diferentes sitios y evidencias filogenéticas, señalan que México tuvo uno o más eventos de domesticación y usos prehispánicos (1-4). En este contexto, se asume que prevalece en la gastronomía y biocultura mexicana desde tiempos precolombinos y hasta nuestros días (5, 6).

En México se reconocen con nombres locales alrededor de 20 formas o morfotipos cultivados de chile (*Capsicum* spp.). Con más de mil hectáreas cultivadas se destacan: Jalapeño, Ancho, Mirasol, Poblano, Serrano, Chilaca, Guajillo, Tabaquero, Colorado, Pasilla, Puya, de Árbol o Cola de Rata, Costeño y Piquín, entre otros, con diferentes formas

y tamaños de frutos (7). Regularmente se consume tanto en fresco o seco (especia) y por tanto la composición química de los frutos cambia, no solo por la forma de consumo sino también por la variedad, sistema de cultivo, épocas de cosecha o madurez fisiológica de frutos y manejo de poscosecha (8-10).

Frecuentemente se asocia a los frutos de *Capsicum* con su variación en contenido de capsaicinoides como los compuestos más abundantes. No obstante, los frutos además aportan vitaminas C y E, provitamina A, proteínas, minerales, polifenoles, carotenoides y una serie de compuestos bioactivos con alta capacidad antioxidante y son evaluados como agentes preventivos contra cáncer, anemia, diabetes y enfermedades cardiovasculares (11-13). En trabajos previos con chiles nativos de México se determinaron diferencias significativas entre morfotipos o variedades autóctonas en relación al contenido de ácido áscorbico, fenoles, flavonoides y capsaicinoides, entre otros compuestos (10, 14, 15). No obstante, poco se ha descrito en términos de divergencias fenotípicas o genéticas, entre poblaciones nativas de chile en referencia a su contenido de minerales en el fruto.

Uno de los fundamentos de la agricultura y producción de alimentos es la de proporcionar, además de carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas y

fibra, todos los nutrientes minerales esenciales para la salud humana, y en promedio se requieren más de 22 elementos: algunos de ellos en alta proporción (macroelementos; Na, K, Ca, Mg, P, Cl y S) y otros en pequeñas proporciones como Fe, Zn, Cu, Mn, Co, Cr, Mo, I y Se, porque su ingesta en altas concentraciones causa efectos tóxicos (16, 17). Los minerales cumplen funciones orgánicas esenciales como desarrollo de tejidos, procesos metabólicos, oxigenación de sangre, constituyentes esenciales de ciertas hormonas, enzimas y protección, y la ingesta requerida está en función de la edad, estatura y peso de la persona; por ejemplo, los infantes y mujeres embarazadas tienen mayor demanda (17, 18). La cantidad requerida de oligoelementos o elemento trazas es mínima pero indispensables desde g (Na, K y Cl) a μg (Fe, Zn, Cr y Mo), y los frutos de chile contienen estos elementos, solo que se desconoce con precisión, de acuerdo al genotipo y prácticas de manejo, la cantidad que pueden aportar a través del consumo en fresco como hortaliza o seco como condimento (19).

Los chiles nativos mexicanos comúnmente se cultivan en pequeñas parcelas con manejo tradicional o bien son recolectados de plantas que crecen de manera ruderal en huertos de traspatio, cercas, áreas de pastoreo, bosques o áreas naturales (20) y por consiguiente su contenido varía entre variedades locales, regiones geográficas y sistemas de producción. En Chile *bell*, Aghili *et al.* (21), documentaron que el contenido de P, K, Fe, Zn, Cu y Mn, difiere significativamente si se cultiva a cielo abierto o invernadero. López *et al.* (22) señalan que la concentración de minerales en frutos de Chile se modifica mediante el sistema de cultivo (orgánico, sin suelo o convencional), tiempo de cosecha y variedad. Pérez-López *et al.* (23) argumentaron que la composición de fruto en contenido de minerales, carotenoides y color son sensibles a las prácticas de cultivo. El contenido de minerales varía según la variedad cultivada, y cada variedad responde de manera diferencial al manejo y condiciones de cultivo (24).

En continuidad al trabajo desarrollado y reportado por Castellón-Martínez *et al.* (25), donde se determinaron divergencias fenotípicas significativas entre cinco morfotipos con diferentes formas de fruto y caracteres biofísicos poscosecha de Chile nativo mexicano, se planteó el objetivo de evaluar la variación entre y dentro de cinco morfotipos de

Chile (*Capsicum annuum* L.), nativos de Oaxaca, México, con base en el contenido de minerales en fruto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y cultivo en invernadero

Se evaluó el contenido de minerales en fruto, en 45 poblaciones de *C. annuum* agrupadas en cinco morfotipos: 'Chile de Agua' (8 poblaciones), 'Tabiche' (8 poblaciones), 'Piquín' (13 poblaciones), 'Solterito' (12 poblaciones) y 'Nanche' (4 poblaciones), los nombres locales son asignados por consumidores y agricultores de los Valles Centrales de Oaxaca, México y están asociados con formas de frutos conocidos. Los morfotipos Agua y Tabiche son cultivados y provienen de plantas de traspatios o de crecimiento ruderal silvestre porque crecen sin ayuda. La colecta de germoplasma (poblaciones) se hizo de abril a septiembre de 2012, en comunidades de 32 municipios de los Valles Centrales de Oaxaca, México, más detalles en Castellón-Martínez *et al.* (25). En este trabajo, solo se incluyeron las poblaciones de mayor representatividad fenotípica del morfotipo, con base en el trabajo previo (25), y por ello el desbalance de poblaciones por tipo y diferencias secuenciales de códigos utilizados. Por tanto, cada morfotipo estuvo representado por diferente número de poblaciones.

Posterior a la integración de representantes fenotípicos por morfotipo, se germinó la semilla de cada población y se trasplantaron las plántulas, una vez que desarrollaron la quinta hoja verdadera, en invernadero bajo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. El invernadero se ubica en el Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca (ITVO), en la Exhacienda de Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca. Para favorecer el crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas, se implementó un sistema de fertirriego por goteo con aplicaciones semanales de las fórmulas comerciales de fertilización: 15-30-15+1.0 MgO+ME y 25-10-10+ME de N, P y K, más aplicaciones semanales de nitrato de calcio cuando inició la fructificación. El cultivo y manejo homogéneo de plantas en invernadero de todas las poblaciones, ayudó a eliminar posibles efectos de manejo y condiciones agroecológicas de producción sobre el contenido de minerales en fruto, con el propósito de obtener el efecto puro de poblaciones, con base en las observaciones de Pérez-López *et al.* (23) quienes señalan que, el manejo influye en el contenido de minerales.

Evaluación del contenido de minerales en frutos

A la cosecha de cada parcela experimental, se obtuvo una muestra de 300 a 500 g de frutos por población sembrada, la que se molió y guardó en congelación a -20°C , hasta su análisis en laboratorio. Se obtuvieron cenizas de cada muestra de frutos de Chile, con base en el método 975.03B(a) de la AOAC (26). Las cenizas se solubilizaron en un medio ácido para favorecer la extracción y evaluación de minerales Cu, Fe, Mg, Zn, Na, K, y Ca (mg/100 g de muestra seca), mediante el método 965.09 (26) con determinaciones en un espectrofotómetro de absorción atómica (Thermo Scientific iCE 3000 Serie AA Spectrometer; Cambridge, United Kingdom) mediante lámparas de cátodo hueco (hollow cathode lamps, HCLs), y con base en curvas de calibración de estándares específicos para cada elemento. El contenido de S se cuantificó por el método turbidimétrico 973.57 (26) y P por el método del ácido vanadomolibdofosfórico 958.01 (26), en ambos casos las lecturas se realizaron mediante un espectrofotómetro UV-visible GBC (modelo CINTRA 303; Melbourne, Australia).

Análisis estadístico

El contenido de minerales en fruto por población de cada morfotipo, se concentraron en un base de datos y se hicieron análisis de varianzas (ANDEVA) para evaluar las diferencias entre morfotipos (=grupos) y entre poblaciones dentro de morfotipos, estadísticamente se consideraron a las poblaciones como efectos anidados en grupos de morfotipos.

Posteriormente, cuando se determinaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre y dentro de morfotipos, se procedió a hacer una comparación de medias por el método de Tukey. Posteriormente, con los promedios estandarizados por el valor máximo de cada variable, se realizó un análisis de discriminante canónico para evaluar las divergencias multivariantes entre morfotipos o grupos poblacionales y certeza de clasificación. Todos los análisis se realizaron en el paquete estadístico SAS (27).

RESULTADOS

En el análisis de varianza se detectaron diferencias significativas entre grupos (= morfotipos) y poblaciones dentro de cada grupo, con coeficientes de variación que oscilan entre 14,3 y 26,8%, los que están dentro de los criterios adecuados de manejo de experimentos de campo e invernadero. Cuando se comparó el contenido de minerales entre morfotipos; Solterito y Piquín fueron los de mayor contenido, y resulta relevante porque, de acuerdo con Castellón-Martínez *et al.* (25), son los morfotipos de tipo silvestres y ruderales, en comparación con los cultivados Agua, Nanche y Tabiche. En contenido de Mg, S, y Mn, sobresalieron Nanche, Piquín y Solterito. En Fe y Zn, oligoelementos asociados con síntomas de malnutrición humana, sobresalieron Piquín y Solterito en el primero y de Agua, Piquín, Solterito y Tabiche en el segundo, respectivamente. Es de remarcar que, los morfotipos de bajo contenido general de minerales fueron de Agua y Nanche (Tabla 1).

Tabla 1. Significancia en valores de F del análisis de varianza y medias del contenido de minerales entre grupos poblaciones de morfotipos de *Capsicum*, cultivados en invernadero.

Mineral	Fuentes de variación			CV (%)	Promedios por grupo (mg/100 g de peso seco)				
	Rep.	Grupo	Poblaciones (Grupos)		Agua (8 pob.)	Nanche (4 pob.)	Piquín (13 pob.)	Solterito (12 pob.)	Tabiche (8 pob.)
Macroelementos esenciales:									
Ca	0,46 ^{NS}	19,6**	2,97**	26,8	169,1 bc ¹	262,4 a	249,2 a	192,4 b	148,0 c
K	0,75 ^{NS}	12,97**	2,09**	15,2	2852,7 a	2232,7 b	2256,2 b	2698,1 a	2636,6 a
Mg	0,01 ^{NS}	20,37**	2,49**	14,3	124,5 c	166,1 a	153,8 ab	171,1 a	140,1 bc
S	1,07 ^{NS}	13,13**	2,67**	16,4	126,8 b	158,7 a	168,5 a	171,0 a	172,5 a
Na	2,18 ^{NS}	19,49**	1,72*	14,8	38,0 a	15,3 d	25,4 c	33,8 ab	30,7 bc
P	1,7 ^{NS}	24,28**	1,96**	17,8	431,0 ab	335,1 c	323,7 c	412,2 b	485,7 a
Oligoelementos esenciales:									
Cu	4,07*	33,16**	2,46**	20,5	0,88 a	0,57 c	0,53 c	0,84 ab	0,76 b
Mn	7,47**	46,35**	4,24**	16,9	0,77 c	2,32 a	2,34 a	2,62 a	1,24 b
Zn	0,26 ^{NS}	3,53*	2,06**	15,0	1,66 ab	1,43 b	1,66 ab	1,98 a	1,82 ab
Fe	2,66 ^{NS}	33,90**	4,29**	19,3	2,24 c	5,56 b	7,97 a	8,47 a	4,36 b

^{NS}No significativo ($P > 0,05$); *significativo a $P < 0,05$; **significativo a $P < 0,01$; ¹en renglón, medias de morfotipos con la misma letra no difieren significativamente (Tukey, $P < 0,05$); CV = coeficiente de variación.

Entre poblaciones de cada grupo poblacional o morfotipo se detectaron diferencias significativas en minerales (esenciales, y oligoelementos); Tabla 2, comparación de medias entre poblaciones. Los resultados muestran que, en cada morfotipo se determinaron poblaciones sobresalientes en Ca con más de 200 mg/100 g de peso seco de muestra; específicamente, en dos poblaciones del morfotipo Piquín (CPI) se detectaron los de mayor valor (>300 mg de Ca/100 g), y en los tipos Tabiche (CTA) se determinó que CTA04 presentó el menor contenido con 75,1 mg de Ca/100 g. En el caso de Na, en los chiles de Agua (CAG), Solterito (CSO) y Tabiche (CTA), se cuantificó más de 40.0 mg/100 g. En contenido de K sobresalieron cinco colectas de Agua, una de Piquín, tres de Solterito y tres de Tabiche con más de 2,8 mg/100 g de peso seco. En concentración de P se destacaron la mayoría de las poblaciones de los morfotipos de Agua, Solterito y Tabiche con más de 400 mg/100 g y la CTA02 con 678,5 mg/100 g; en S también se destacaron los materiales del tipo Piquín, Solterito y Tabiche. Todo esto hace inferir que el mayor contenido de macroelementos en fruto de *Capsicum* nativo de Oaxaca se obtiene regularmente en los morfotipo Tabiche, Solterito y Piquín, y excepcionalmente se puede encontrar en Nanche con mayor cantidad de Ca y en Chile Agua con mayores concentraciones de P. Un patrón semejante se repite, en términos de oligoelementos (Cu, Fe, Mn y Zn), para los morfotipos Nanche, Piquín y Solterito donde se

cuantificaron las mayores concentraciones de Fe, Mn y Zn, principalmente (Tabla 2).

Dentro de cada morfotipo se pueden seleccionar poblaciones con alto contenido de macro y oligoelementos esenciales (Tabla 2). Por ejemplo, en Chile de Agua (CAG) sobresalen CAG03 y CAG10; en Nanche (CNA) fue CNA02; en Piquín (CPI) fueron CPI02 y CPI09; en Solterito (CSO) se destacaron CSO01, CSO02 y CSO03; y CTA02 y CTA05 en Tabiche (CTA). Esto indica, que los diferentes morfotipos de *Capsicum* aquí evaluados, contienen fuentes importantes de minerales, necesarios para la nutrición de sus consumidores, ya que forman parte de los platos típicos de la gastronomía del estado de Oaxaca.

En el análisis de discriminante múltiple se determinaron diferencias significativas entre morfotipos de acuerdo con los estadísticos lambda de Wilks ($F = 0,014$; $gl = 40$; $P < 0,01$) y la traza de Pillai ($F = 2,032$; $gl = 40$; $P < 0,01$). En la Figura 1 se graficó la dispersión de colectas dentro de cada morfotipo en función de las dos primeras funciones discriminantes, y fueron notorios los patrones diferenciales por morfotipo. Por ejemplo, en el cuadrante superior izquierdo se distribuyen poblaciones del tipo Tabiche y algunas de Nanche; en el cuadrante superior derecho se separan ciertas poblaciones de Tabiche, cuadrante inferior derecho una combinación de los tipos Piquín y Nanche, cuadrante inferior izquierdo se distribuye los tipo Nanche y algunas poblaciones de Tabiche. Todo esto en función del contenido de Mn, S, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, P, Na y P en los frutos.

Tabla 2. Comparación entre poblaciones del contenido de minerales en frutos de *C. annuum*.

Código de poblaciones	Ca	Na	K	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn	P	S
	mg/ 100 g de peso seco									
Chile de Agua (CAG):										
CAG02	139,7	36,3	2891,5	125,6	0,81	2,77	0,81	1,95	402,6	124,0
CAG03	165,2	45,2	2964,4	134,0	1,03	1,55	0,73	1,65	485,7	124,8
CAG05	148,6	38,1	2928,6	123,8	0,93	2,13	0,70	1,65	392,8	129,0
CAG06	169,6	41,8	2506,8	111,6	0,80	2,57	0,65	1,37	407,9	115,4
CAG07	180,2	31,6	2604,8	114,6	0,69	1,83	0,75	1,29	387,8	127,0
CAG08	143,5	41,9	2696,7	116,8	0,86	1,80	0,73	1,67	386,5	120,5
CAG09	209,3	32,5	2989,9	133,0	0,79	2,69	0,86	1,22	489,4	127,0
CAG10	196,6	36,1	3239,1	136,4	1,15	2,77	0,97	2,48	495,3	146,4
Chile Nanche (CNA):										
CNA01	283,5	13,1	2104,9	166,5	0,41	5,21	2,04	1,26	307,8	157,7
CNA02	294,3	17,1	2223,5	165,5	0,57	10,85	3,08	1,73	323,5	176,8
CNA03	197,8	18,2	2197,6	167,1	0,64	3,99	1,92	1,37	334,2	179,2
CNA04	273,8	12,9	2404,9	165,4	0,66	2,20	2,23	1,36	375,0	176,4

Código de poblaciones	Ca	Na	K	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn	P	S
	mg/ 100 g de peso seco									
Chile Piquín (CPI):										
CPI01	317,3	22,4	2339,2	165,4	0,19	3,08	2,55	1,55	346,6	153,9
CPI02	369,8	32,1	2258,8	184,0	0,78	14,90	3,69	3,17	397,3	221,9
CPI03	168,0	25,3	2842,5	155,7	0,66	6,75	1,93	1,91	396,4	218,7
CPI04	248,9	35,2	2297,6	154,0	0,54	4,70	1,79	1,20	316,5	143,5
CPI05	186,4	26,0	1433,7	107,9	0,34	3,48	1,56	1,46	330,6	161,7
CPI07	252,8	26,5	2164,7	164,8	0,69	7,16	2,26	1,69	323,6	164,8
CPI08	210,7	22,6	2367,5	148,4	0,54	8,08	1,86	1,16	324,3	169,6
CPI09	360,0	28,2	2894,4	205,9	0,77	14,75	2,38	1,80	289,2	160,7
CPI10	157,4	24,8	1808,9	121,3	0,41	10,92	1,46	1,61	308,6	165,6
CPI11	298,0	23,0	2633,9	178,1	0,50	5,41	3,23	2,20	340,0	160,3
CPI12	213,1	27,5	1882,5	136,6	0,46	8,98	2,38	1,21	345,4	176,6
CPI13	223,2	20,2	2439,9	148,2	0,52	7,63	1,96	1,23	189,1	186,7
CPI14	234,3	15,7	1967,0	129,4	0,46	4,68	3,33	1,44	300,0	139,1
Chile Solterito (CSO):										
CSO01	242,5	30,7	3007,5	198,4	0,90	7,66	5,86	2,56	426,2	190,8
CSO02	226,2	35,7	2618,2	154,0	0,69	12,42	3,91	2,48	426,1	164,7
CSO03	219,6	26,3	2932,9	198,6	0,71	16,94	4,72	2,04	459,6	201,7
CSO05	153,1	39,0	3071,0	184,9	0,94	5,95	1,78	1,86	464,4	183,8
CSO07	166,7	43,6	2696,3	170,4	1,02	5,47	2,29	1,84	433,7	153,4
CSO08	201,6	47,3	2594,6	177,2	0,91	12,44	2,98	2,38	402,9	149,0
CSO09	154,3	32,0	2685,4	153,6	0,71	11,40	1,27	1,24	361,5	119,8
CSO10	114,6	38,9	2637,0	146,8	0,79	3,23	1,04	2,16	420,8	110,9
CSO11	119,8	35,5	2137,7	131,3	0,75	6,01	1,02	1,34	321,7	136,4
CSO12	223,2	25,6	2611,2	170,0	0,93	6,83	2,16	1,59	372,9	176,0
CSO13	208,8	28,8	2607,9	178,6	0,75	6,80	2,09	1,78	422,4	180,5
CSO14	195,3	21,0	2395,4	169,7	0,84	4,70	2,19	1,67	380,6	212,2
Chile Tabiche (CTA):										
CTA01	190,3	29,8	2876,2	147,1	0,84	6,20	1,66	1,93	492,2	171,7
CTA02	109,6	41,2	2896,7	146,0	0,85	2,06	1,06	1,42	678,5	168,3
CTA03	124,0	21,9	2732,5	154,8	0,86	4,02	1,12	1,80	467,2	162,5
CTA04	75,1	27,6	2519,8	129,5	0,76	3,53	1,03	1,93	420,2	139,0
CTA05	106,6	40,9	2913,2	153,1	0,75	5,10	1,17	1,65	452,8	189,5
CTA06	265,2	16,9	2509,2	147,9	0,67	5,29	1,78	2,21	526,6	169,2
CTA07	159,6	43,6	2780,0	134,5	0,73	4,21	1,16	2,26	480,7	132,5
CTA08	161,5	26,2	1833,1	103,4	0,59	4,59	0,98	1,37	367,2	135,3
DSH-Tukey	47,6	8,1	341,8	19,2	0,13	2,55	0,65	0,47	61,9	23,1

La diferenciación entre morfotipos se precisó a través de las distancias de Mahalanobis y la certeza en la clasificación de la colecta dentro de cada tipo (Tabla 3). Las distancias señalan que, en contenido de minerales en el fruto los morfotipos Piquín, Nanche y Solterito, son similares, tanto así que una población de Piquín y otra de Solterito fueron clasificadas como del morfotipo Nanche (distancias menores a 15,1 unidades). Un segundo bloque de semejanzas en contenido de minerales fue Tabiche y

Solterito, y el más cercano al morfotipo de Agua fue Tabiche. Esto indica, que hay una menor variación entre poblaciones dentro de morfotipos, son más semejantes (menor variación), que entre poblaciones de diferente morfotipo. Es decir, menores divergencias entre que dentro de morfotipos, y las poblaciones presentaron más del 91% de certeza en sus clasificaciones de morfotipos, con base en contenido de minerales en frutos.

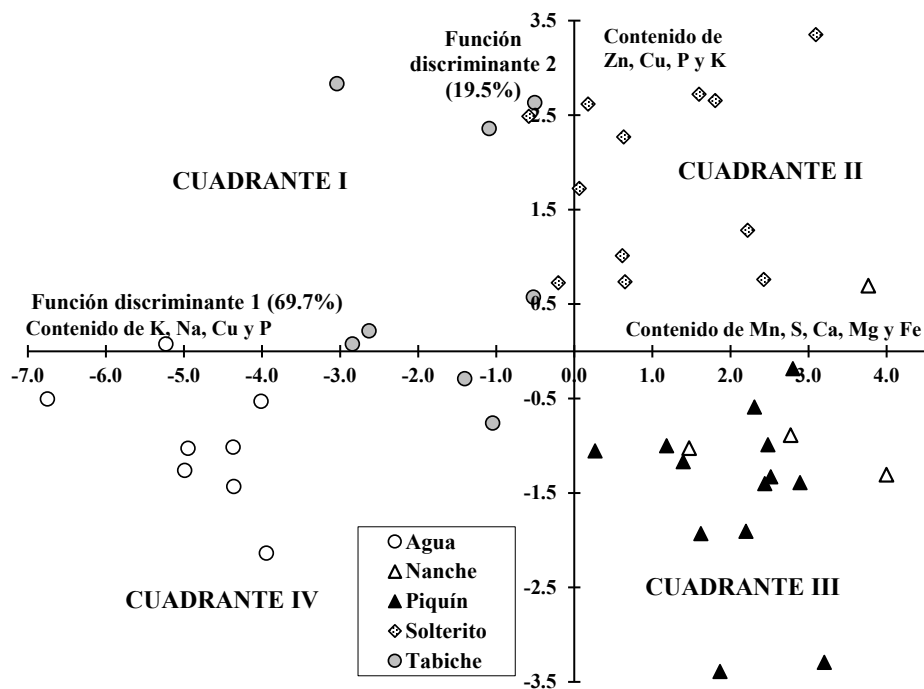


Figura 1. Dispersión de colectas de cada morfotipo de *C. annuum* evaluado, en función de las dos primeras funciones discriminantes, con base en el contenido de minerales en frutos.

Tabla 3. Distancias cuadradas de Mahalanobis y certeza de clasificación de grupos poblacionales, en función del análisis discriminante por contenido de minerales en frutos de *C. annuum*.

Grupos poblacionales de morfotipos (n)	Grupos poblacionales o morfotipos (n = poblaciones)				
	Agua (8 pob.)	Nanche (4 pob.)	Piquín (13 pob.)	Solterito (12 pob.)	Tabiche (8 pob.)
Agua (8 pob.):					
Distancia cuadrada	0,0	65,1	49,0	42,6	19,4
Poblaciones clasificadas	8	0	0	0	0
Porcentaje de certeza	100	0	0	0	0
Nanche (4 pob.):					
Distancia cuadrada	65,1	0,0	6,6	15,0	28,6
Poblaciones clasificadas	0	0	0	0	0
Porcentaje de certeza	0	100	0	0	0
Piquín (13 pob.):					
Distancia cuadrada	49,0	6,6	0,0	13,1	22,9
Poblaciones clasificadas	0	1	12	0	0
Porcentaje de certeza	0	7,7	92,3	0	0
Solterito (12 pob.):					
Distancia cuadrada	42,6	15,0	13,1	0,0	13,9
Poblaciones clasificadas	0	1	0	11	0
Porcentaje de certeza	0	8,3	0	91,7	0
Tabiche (8 pob.):					
Distancia cuadrada	19,4	28,6	22,9	13,9	0,0
Poblaciones clasificadas	0	0	0	0	8
Porcentaje de certeza	0	0	0	0	100

DISCUSIÓN

El contenido de minerales en frutos de *Capsicum* es afectado por factores genéticos relacionados con la especie y variedades o poblaciones nativa, estado de madurez del fruto, y prácticas agrícolas de manejo (p. ej. orgánico o convencional) o ambiente de crecimiento de la planta, incluyendo los métodos de cuantificación de minerales (8, 21-24, 28-31). En nuestras culturas precolombinas el *C. annuum*, originario de Mesoamérica, tuvo y tiene una función gastronómica importante en la dieta familiar y forma parte de la cultura gastronómica Latinoamericana. Aquí se aporta información del contenido de macrominerales y oligoelementos esenciales en frutos *Capsicum* y su potencial de uso nutricional; por ejemplo, puede aportar Cu, Mg y P, para suplir las necesidades básicas diarias.

El contenido de Na y K en frutos de *Capsicum* reportados por Khadi *et al.* (32) y Ribes-Moya *et al.* (30) fueron de 9,7 a 31,9 mg/100 g de peso seco en Na y de 1509 a 5180 mg/100 g en K. En este estudio la variación fue de 13,1 a 45,2 mg en Na y de 1833 a 3239 mg/100 g en K. Las comparaciones sugieren que, en este trabajo, algunas poblaciones presentan mayores valores de Na, pero en K la inferencia es opuesta; aun cuando se encuentra dentro de los rangos indicados. Por tanto, la diferencias entre morfotipos en relación a tamaño, forma y color de fruto, descritas por Castellón-Martínez *et al.* (25), concuerda con divergencias en macroelementos y oligoelementos esenciales y la población genética, genotipo o variedad son determinantes para evaluar las divergencias entre morfotipos o entre variedades como refieren Khadi *et al.* (32) y Ribes-Moya *et al.* (30). Las diferencias significativas entre y dentro morfotipos de *C. annuum* de Oaxaca, México en minerales en fruto, concuerdan con la diferencias en compuestos bioactivos determinadas por Vera-Guzmán *et al.* (10) para morfotipos semejantes de la misma región de origen, y con la capacidad de diferenciar esos morfotipos por sabor y aroma por sus consumidores (6). Esto indica una alta distintibilidad entre morfotipos que son aprovechados en la gastronomía local.

Otros elementos igualmente relevantes para la nutrición humana son Cu, Mg y P; Salomons *et al.* (18), señalan que el consumo recomendable de estos elementos son de 0,7 a 0,9, 255 a 420 y de 580 a 700 mg/día, respectivamente. En los resultados aquí reportados hubo tres poblaciones que presentaron

más de 1 mg/100 g de Cu, hasta 205,8 mg/100 g de Mg y once poblaciones con más de 450 mg/100 g de muestra en base seca (Tabla 2). Es decir, la aportación potencial de *C. annuum* a la dieta de los consumidores, es de enorme relevancia porque con 100 a 150 g de peso seco, se satisfacen los requerimientos mínimos diarios de esos elementos. La poblaciones sobresalientes con cinco o más minerales de mayores valores fueron; CPI02, CPI09, CPI11, CSO01, CSO02, CSO03 CS07, CSO08, CS012 y CSO13 (Tabla 2), las que difieren en uno o más minerales de las reportadas en otros trabajos (21-24, 28, 29), lo que podemos inferir que el genotipo o variedad y origen filogenético influye en el contenido de minerales en fruto.

Entre los oligoelementos de gran relevancia nutricional están Fe y Zn, cuyas deficiencias se asocian con malnutriciones de niños y mujeres embarazadas (17). En este trabajo las variaciones en Fe fueron de 1,5 a 16,9 mg y en Zn de 1,2 a 3,2 mg/100 g de peso seco, cantidades relevantes para hacer aportaciones importantes a los requerimientos mínimos diarios; de 5 a 8 mg de Fe y de 6,8 a 11 de Zn (18). Esto hace de los frutos de *Capsicum* con alto uso potencial para la elaboración de dietas en las regiones donde se produce en forma tradicional, y no existen otras fuentes como nueces, lentejas, garbanzos, col u otros vegetales o fuentes de origen animal, comúnmente recomendadas por los nutriólogos, sobre todo Fe (33). En México, los frutos de chile se consumen verdes o inmaduros, maduros y secos, en este caso los valores reportados de minerales son en peso seco de muestras.

Los resultados del contenido de macroelementos y oligoelementos esenciales en frutos de chile (*C. annuum*), son estimadores de la composición de fruto y su aportación potencial a la alimentación de las comunidades rurales. No obstante, las formas de consumo son en fresco sin procesar o bien mediante un procesamiento mínimo (cocido hervido o frito). En este último caso, regularmente se combina con tomate (*Solanum lycopersicum* L.), miltomate (*Physalis ixocarpa* L.), cebolla y ajo, forma muy popular en la gastronomía mexicana. Esto implica que, el contenido de minerales aquí estimado en los frutos de *C. annuum* puede diferir de la aportación final a la dieta diaria. En consecuencia, se requieren estudios complementarios que ayuden a conocer el contenido de minerales de frutos de chile procesados (cocinados) o sin procesar pero en la forma acostumbrada

de consumo. Todo con el propósito de obtener estimadores robustos de la ingesta real.

CONCLUSIONES

La evaluación del contenido de minerales en frutos de cinco morfotipos de chile (*C. annuum*) de Oaxaca, México, mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre y dentro de morfotipos en contenido de macroelementos (Ca, Na, K, Mg, P y S) y oligoelementos esenciales (Cu, Fe, Mn y Zn), con base en el análisis de varianza. En el análisis discriminante múltiple se determinó que, además de corroborar las diferencias entre morfotipos, el contenido global de minerales entre los tipos Piquín, Nanche y Solterito fueron muy semejantes, también Solterito y Tabiche mostraron cierta similitud, y el tipo de Agua fue significativamente diferente de todos los tipos, con base en las funciones discriminantes y distancias cuadradas de Mahalanobis. Los valores del contenido de minerales aquí reportados, muestran que el chile es un alimento con alto valor nutricional; potencialmente 100 g de peso seco pueden suplir las necesidades diarias de Cu (0,7 a 0,9 mg), Mg (330 mg), P (580 mg), Ca (hasta 369.8 mg), Na (12.9 a 47.3 mg) y una proporción importante de los requerimiento de Fe (6 a 8 mg), Zn (6,8 a 11 mg), K (4,7 g), Mn (0.65 a 5.86 mg) y S (110.9 a 221.9 mg).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional por el financiamiento otorgado, a través de los proyectos: SIP: 201400074 y SIP: 20150297, y al Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca por las facilidades otorgadas en el usos de laboratorios.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores del presente trabajo manifestamos que no existen conflictos de intereses en cada una de las secciones que integran el presente artículo.

REFERENCIAS

- Loaiza-Figueroa F, Ritland K, Laborde JA, Tanksley SD. Patterns of genetic variation of the genus *Capsicum* (*Solanaceae*) in Mexico. *Pl Syst Evol*. 1989 Sep.; 165(1-2): 159-188.
- Perry F, Flannery K. Precolumbian use of chili peppers in the Valley of Oaxaca, México. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Jul.; 104: 11905-11909.
- Powis TG, Gallaga E, Lesure R, Lopez R, Grivetti L, Kucera H, Gaikwad NW. Prehispanic use of chili peppers in Chiapas, Mexico. *PLoS ONE*. 2013 Nov.; 8(11):e79013. doi:10.1371/journal.pone.0079013.
- Brown CH, Clement CR, Epps P, Luedeling E, Wichmann S. 2013. The paleobiogeography of domesticated chili pepper (*Capsicum* spp.). *Ethnobiology Letters*. 2013 Jan; 4:1-11.
- Long J. Los senderos prehispánicos del *Capsicum*. In: Long J, León A (coords.), Caminos y Mercados de México. Serie Histórica General 23, UNAM e INAH. México, D.F. 2010, pp: 79-105.
- Castellón-Martínez E, Chávez-Servia JL, Carrillo-Rodríguez JC, Vera-Guzmán AM. Preferencias de consumo de chiles (*Capsicum annuum* L.) nativos en los Valles Centrales de Oaxaca. *Rev Fitotec Mex*. 2012 Sep.; 35(Núm. Esp. 5): 27-35.
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2014. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola 2013 en México. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D.F. 2014 [citado junio 2015]. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>.
- Flores P, Hellín P, Lacasa A, López A, Fenoll J. Pepper mineral composition and sensory attributes as affected by agricultural management. *J Sci Food Agr*. 2009 Nov.; 89(14): 2364-2371.
- Kraft KH, Luna-Ruiz JJ, Gepts P. Different seed selection and conservation practices for fresh market and dried chili farmers in Aguascalientes, Mexico. *Econ Bot*. 2010 Dec.; 64(4): 319-328.
- Vera-Guzmán AM, Chávez-Servia JL, Carrillo-Rodríguez JC, López MG. Phytochemical evaluation of wild and cultivated pepper (*Capsicum annuum* L. and *C. pubescens* Ruiz & Pav.) from Oaxaca, Mexico. *Chilean J. Agric Res*. 2011 Oct.-Dec.; 71(4): 578-585.
- Ghasemnezhad M, Sherafati M, Payvast GA. Variation in phenolic compound, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annuum*) fruits at two different harvest times. *J Funct Foods*. 2011 Jan.; 3:44-49.
- Rao BN. Bioactive phytochemicals in Indian foods and their potential in health promotion and disease prevention. *Asia pacific J Clin Nutr*. 2003 Mar.; 12(1): 9-22.
- Clark R and Le S-H. Anticancer properties of capsaicin against human cancer. *Anticancer Res*. 2016 Feb.; 36(2): 837-844.
- Cázares-Sánchez E, Ramírez-Vallejo P, Castillo-González F, Soto-Hernández M, Rodríguez-González T, Chávez-Servia JL. Capsaicinoides y preferencia de uso en diferentes morfotipos de chile (*Capsicum annuum* L.) del centro-oriente de Yucatán. *Agrociencia*. 2005 Nov.-Dic.; 39(6): 627-638.
- Morán-Bañuelos SH, Aguilar-Rincón VH, Corona-Torres T, Castillo-González F, Soto-Hernández RM, San-Miguel-Chávez R. Capsaicinoides en chiles nativos de Puebla, México. *Agrociencia*. 2008 Oct.-Nov.; 42(7): 807-816.
- Fraga CG. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Aspects Med*. 2005; 26: 235-244.
- World Health Organization (WHO). Trace Elements in Human Nutrition and Health. World Health Organization, Belgium. 1996; 343 p.
- Solomons NW, Kaufer-Horwitz M, Bermúdez OI. Armonización de las recomendaciones nutricionales para Mesoamérica: ¿unificación regional o individualización regional?. *Arch Latin Nutr*. 2004 Dic.; 54(4): 363-373.
- Martínez-Ballesta MC, Domínguez-Perles R, Moreno DA, Muries B, Alcaraz-López C, Bastías E, García-Viguera C, Carvajal M. Minerals in plant food: effect of agricultural practices and role in human health. A review. *Agron Sustain Dev*. 2010 Apr.; 30(2): 295-309.
- Aguilar-Rincón, VH, Corona-Torres T, López-López P, Latournerie-Moreno L, Ramírez-Meraz M, Villalón-Mendoza H Aguilar-Castillo JA. Los Chiles de México y su Distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, ITConkal, UNAL y UAN. Montecillo, Texcoco, México. 2010, 114 p.
- Aghili F, Khoshgoftarmansh AH, Afyuni M, Mobil M. Mineral and ascorbic acid concentrations of greenhouse- and field-grown

- vegetables: implications for human health. *Int J Veg Sci.* 2012 Dec.; 18:64-77.
22. López A, Fenoll J, Hellín P, Flores P. Physical characteristics and mineral composition of two pepper cultivars under organic, conventional and soilless cultivation. *Sci Hortic-Amsterdam.* 2013 Feb.; 150: 259-266.
 23. Pérez-López JA, López-Nicolaz LM, Núñez-Delicado E, del-Amor FM, Carbonell-Barrachina AA. Effects of agricultural practices on color, carotenoids composition, and mineral contents of sweet peppers, cv. Almuden. *J Agric Food Chem.* 2007 Oct.; 55(20):8158-8164.
 24. Guil-Guerrero JL, Martínez-Guirado C, Reboloso-Fuentes MM, Carrique-Pérez A. Nutrient composition and antioxidant activity of 10 peppers (*Capsicum annuum*) varieties. *Eur Food Res Technol.* 2006 Nov.; 224: 1-9.
 25. Castellón-Martínez E, Carrillo-Rodríguez JC, Chávez-Servia JL, Vera-Guzmán AM. Variación fenotípica de morfotipos de Chile (*Capsicum annuum* L.) nativo de Oaxaca, México. *Phyton, Rev Int Bot Exp.* 2014; 83: 225-236.
 26. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Vol. 1, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA. 1990; p: 12-13, 27-28, 42, 330-331.
 27. Statistical Analysis System (SAS). SAS® Procedures Guide, Version 8. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 1999; 1643 p.
 28. Rubio C, Hardisson A, Martín RE, Báez A, Martín MM, Álvarez R. Mineral composition of the red and green pepper (*Capsicum annuum*) from Tenerife Island. *Eur Food Res Technol.* 2002 Jun.; 214(6): 501-504.
 29. Ogunlade I, Alebiosu AA, Osasona A. Proximate, mineral composition, antioxidant activity, and total phenolic content of some pepper varieties (*Capsicum* spp.). *Int J Biol Chem. Sci.* 2012 Oct.; 65(5): 2221-2227.
 30. Ribes-Moya A, Pereira L, Guijarro-Real C, Raigon MD, Fita AM, Rodríguez-Burruezo A. Mineral content in *Capsicum* pepper landraces: effect of the genotype and the ripening stage. *Bull UASVM Hort.* 2014 ; 72(2): 2519-260
 31. BenMansour-Gueddes S. Evolution of capsaicinoids and minerals composition during fruit development in some hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.). *Int J Agric Innov Res.* 2015; Jan-Feb; 3(4): 1094-1102.
 32. Khadi BM, Goud JV, Patil VB. Variation in ascorbic acid and mineral content in fruits of some varieties of chilli (*Capsicum annuum* L.) *Plant Foods Hum Nutr.* 1987 Mar.; 37(1): 9-15.
 33. Lopez D, Castillo C, Diazgranados D. El zinc en la salud humana-I. *Rev Chil Nutr.* 2010 Jun; 37(2): 234-239.

CONSUMER PRACTICES FOR PURCHASE, STORAGE, AND PREPARATION OF POULTRY AND EGGS IN SELECTED NORTH AND SOUTH AMERICAN COUNTRIES: A PILOT STUDY

COMPORTAMIENTO DE LOS CONSUMIDORES DURANTE LA COMPRA, ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN DE CARNE DE AVE Y HUEVOS EN PAÍSES SELECCIONADOS DE NORTE Y SUR AMÉRICA: UN ESTUDIO PILOTO

Kadri KOPPEL, Ph.D.^{*1}, Miriam SOSA, Dra.², Nelson G. GUTIERREZ, Ph.D.³, Paula CARDINAL, Lic.², Sandria L. GODWIN, Ph.D.⁴, Sheryl C. CATES, BA.⁵, Edgar CHAMBERS IV, Ph.D.¹

Recibido: Julio 08 de 2015. Aceptado: Marzo 31 de 2016

ABSTRACT

Background: Poultry, eggs, and their products represent a potential food safety hazard. Although consumer practices related to these foods have been studied in various countries, little data exists from Latin America. **Objective:** The objective of this pilot study was to provide initial data to characterize consumers' purchase, storage, handling, and preparation of poultry products and eggs in three countries: Argentina, Colombia, and USA. **Methods:** Consumers (n = 425 total) in each location completed a questionnaire about poultry products and egg purchase locations, storage conditions (i.e. refrigerator or freezer), preparation and handling practices, and managing leftovers. **Results:** The results indicated that in the USA most surveyed consumers purchased refrigerated eggs, whereas in Argentina (91%) and Colombia (84%) eggs typically were purchased at room temperature. Furthermore, almost all consumers in the USA stored eggs in the refrigerator, but 23% of Argentinian and 45.9% of Colombian consumers stored eggs at room temperature, which is potentially an unsafe practice. Some practices supported possible cross-contamination, for example washing raw eggs and poultry prior to cooking. **Conclusions:** These results are a first comparison across countries in the Americas of consumer poultry and egg practices and can serve as the basis for further research and development of food safety educational messages.

Keywords: Eggs, food safety, poultry, Colombia, Argentina

RESUMEN

Antecedentes: Aves de corral, huevos, y sus productos representan un potencial peligro en la seguridad alimentaria. Prácticas de consumo relacionadas con estos alimentos han sido estudiadas en varios países, pero pocos datos existen de Latinoamérica. **Objetivo:** El objetivo de este estudio piloto fue proveer información de manera de caracterizar la compra, almacenaje, y preparación de aves de corral y huevos en tres países: Argentina, Colombia, y Estados Unidos. **Métodos:** Consumidores (n=425 en total) en cada

¹ The Sensory Analysis Center, Kansas State University, Manhattan, KS, USA

² Departamento de Evaluación Sensorial de Alimentos (DESA-ISETA), Instituto Superior Experimental de Tecnología Alimentaria, H. Irigoyen 931, Nueve de Julio (6500), Provincia de Buenos Aires, Argentina

³ Facultad de Ingeniería, Universidad Surcolombiana. Neiva, Colombia

⁴ Department of Family and Consumer Services, Tennessee State University, Nashville, TN, USA

⁵ RTI International, Research Triangle Park, North Carolina, USA

* Author of correspondence: kadri@ksu.edu.

locación, completaron cuestionarios acerca del comercio de compra de aves de corral y huevos, condiciones de almacenamiento (e.j. refrigerador o freezer), preparación y prácticas de manipulación, y manipulación de sobras. **Resultados:** Los resultados indicaron que en Estados Unidos, la mayoría de los consumidores encuestados adquiere huevos almacenados en refrigeración, mientras que en Argentina (91%) y Colombia (84%) los huevos adquiridos estaban almacenados a temperatura ambiente. Asimismo, casi la totalidad de los consumidores en Estados Unidos almacenan los huevos en refrigeración, mientras que un 23% y un 45.9% de consumidores Argentinos y Colombianos, respectivamente almacenan huevos a temperatura ambiente, lo cual potencialmente significa una práctica no segura. Algunas prácticas sostienen posible contaminación cruzada, por ejemplo el lavado de aves y huevos previos a la cocción. **Conclusiones:** Los resultados muestran una primera comparación entre países de América sobre las prácticas de consumo de aves de corral y huevos, que servirán como base para futuras investigaciones y desarrollos de mensajes educacionales sobre seguridad alimentaria.

Palabras clave: Huevos, seguridad alimentaria, aves de corral, Colombia, Argentina.

INTRODUCTION

Several steps in the food production and distribution system could be responsible for food contamination; however, consumers often are the last ones to manipulate food before consumption and ultimately are responsible for any mishandling at home. Kennedy *et al.* found that the main determinants of contamination for other foods while handling raw meat and poultry were related to washing contaminated hands, cutting boards, and knives during and after cooking (1). Reviews of general food safety practices by consumers have stressed the importance of educating the consumer (2) and sometimes have found different results from surveys in comparison to observational studies (3). Studies on USA consumer purchase (4-5), preparation (6), and storage practices (7-8) have found that educated consumers are more likely to engage in risky food handling practices. Income, age, race, and gender are commonly collected demographics that could predict behavior characteristics. Thus far, studies have found male consumers to be less aware of food safety practices and that high income does not necessarily predict knowledge of food safety practices (9).

Food safety studies in multiple countries

Most studies that have looked at food safety and practices including those for eggs and poultry products are focusing on consumers in single countries. In North America, an abundance of examples can be drawn from the USA (4,8,10-12) and some in Canada (13). Fewer studies have been conducted in South America. For example, Califano, Antoni, Giannuzzi, and Mascheroni studied unsafe practices at homes in Argentina and discovered a number of violations of food safety guidelines; these authors suspected that this is a cultural, rather

than an educational issue (14). Studies that describe consumer poultry or egg handling practices in Colombia are scarce. In one study conducted by Forero and Romero knowledge and practices of food handling in households in Bogota, Colombia were evaluated (15). Those authors found that there is a need for consumer education about food safety practices. Studies have rarely focused on food safety issues related to eggs and poultry purchase, storage, or behavior in multiple countries. One of the few examples studied consumer perceptions of chemical and microbiological risks related to water, poultry, fish, and milk powder in four European countries and Brazil (16). During focus groups those authors found that consumers considered chemical contaminants more hazardous and less controllable than microbiological risks. Koppel, Suwonsichon, Chitra, Lee, and Chambers studied eggs and poultry-related practices in three Asian countries (17). Those authors found that considerable differences exist among Asian countries consumer practices. Furthermore, practices in selected European countries have been studied by Koppel, Timberg, Shalimov, Vazquez-Araujo, Carbonell-Barracchina, Di Donfrancesco, and Chambers (18).

The lack of cross-cultural food safety studies is problematic given the prevalence of food borne illness around the world and the risk associated with consumption of contaminated poultry products (19). In addition, with increased immigration (for example from Latin America to the USA) cultural practices that are common in one country likely will be practiced in the new country. The benefits of cross-cultural studies include increased knowledge regarding possible cross-contamination, spoilage, and resulting food-borne illnesses and a uniform research approach to consumers that

would allow data comparison. Furthermore, this data could prove helpful in developing consumer educational messages to prevent risky practices across countries and cultures if similarities exist or show where messaging needs to be different when practices differ.

The objective of this pilot study was to characterize consumers' purchase, storage, handling, and preparation of poultry products and eggs in selected locations of three North and South American countries: Argentina, Colombia, and USA.

MATERIALS AND METHODS

Questionnaire and Data Collection

The questionnaire was developed in English and translated into Spanish and back-translated into English by native speakers to ensure the questionnaire was comparable across countries. The questionnaire was tested on food safety experts and staff before the study was conducted to ensure adequacy of respondent understanding. Data was collected in November and December 2012 and in January, February, and March 2013 in the USA, Colombia, and Argentina. The information was gathered via an online survey (Kansas City, Missouri, USA), at a central location (Nashville, Tennessee, USA; Buenos Aires, Argentina), and via one-on-one interviews (Huila, Colombia). The questionnaire was the same as used by Koppel *et al.* in a comparison of Asian consumers' food safety related practices (17). The consumers in this study did not represent an entire country's consumers, but did provide a glimpse at the similarities and differences among the various countries.

The questionnaire collected information on a wide range of home storage and handling practices. Information from 11 selected multiple-choice questions regarding consumers' egg and poultry related purchase, storage, refrigeration, and preparation practices is presented in this paper.

Demographic information regarding consumer gender, age (<35; ≥35), household income (low: <\$25,000; medium: \$25,000-\$50,000; high: >\$50,000 or equivalent as determined by the country), education level (less than college; some college courses or higher) was collected at the end of the questionnaire. Income categorization for Colombia was not available. Demographic information is shown in Table 1.

Table 1. Demographic information of participating consumers

Demographic segmentation, %	USA (n=227)	Argentina (n=100)	Colombia (n=98)
Gender			
Male	26.4	0.0	30.6
Female	73.6	100.0	69.4
Age			
<35	55.5	23.0	54.1
≥35	44.5	77.0	45.9
Education			
Less than college	9.3	59.0	43.9
Some college courses or more	90.7	41.0	56.1
Income			
Low	51.5	52	N/A*
Medium	30.4	48	N/A
High	18.1	0	N/A

*N/A – income information not available for Colombia.

Respondents

All participating respondents were pre-screened according to the following conditions: age >18; the respondent was the primary food shopper in the household or shared food shopping responsibility with someone else; the respondent was the food preparer and knew about food storage in the household or was one of several people who cooked and knew about food storage in the household, and the consumer had a refrigerator in their home. A total of 227 respondents from Kansas City, Missouri, and Nashville, Tennessee in the USA, 100 from the Buenos Aires region of Argentina, and 98 from the Huila (Neiva) region of Colombia completed usable questionnaires. Respondents in the Kansas and Missouri area were recruited from a database of consumers and were reimbursed for their participation in the amount of \$10. Respondents in Tennessee area were not reimbursed for their participation and were recruited as a convenience sample among the students in Tennessee State University and Nashville State Community College and parents of local schoolchildren. Respondents in the Buenos Aires area in Argentina were recruited among parents of schoolchildren attending public schools, among women receiving monthly food aid, and among women listed in a consumer database. Respondents in Huila area in Colombia were recruited among homemakers and office workers.

Data Analysis

Chi-square tests were performed on collected frequencies to study the relationships between the countries studied. The analysis was conducted using the Excel function CHITEST (Microsoft Excel 2010, Microsoft, Redmond, WA, USA).

RESULTS

Purchase and storage behavior

The respondents were asked to indicate their means of obtaining fresh eggs. In the USA and in Colombia most surveyed respondents and in Argentina 32% of respondents purchased eggs from the store or supermarket (Table 2). In addition, 48% of Argentinian respondents purchased eggs from a local market, while in Colombia and USA this practice was not common. Significantly more ($p < 0.05$) consumers purchased eggs from

the farmer directly or raised their own chickens in Colombia and Argentina.

At the time of purchase, eggs typically were either refrigerated or at room temperature, depending on the regulations in each location. The respondents were asked to indicate if during purchase the fresh eggs had been refrigerated or not and their way of storing the fresh eggs at home. Eggs usually were refrigerated in the USA (96%) at the time of purchase, but were at room temperature in Colombia (84.7%) and Argentina (91%) (Table 2). In addition, 45.9% of surveyed consumers in Colombia and 23% of consumers in Argentina stored raw eggs at room temperature in their homes (Table 2). In the USA most consumers stored eggs in the refrigerator.

The respondents were asked about storage practices of cooked eggs in the shell. Total of 22% of surveyed Colombian consumers stored cooked eggs in the shell at room temperature or did not know how to store cooked eggs (Table 2).

Table 2. Purchase, storage, and preparation practices of raw poultry and eggs by % of respondents

	Question	USA	Colombia	Argentina	p-value
1*	Direct from farmer at his/her farm or you raise your own chickens	5.7**	17.3	20.0	0.00
	Store (such as grocery specialty wholesale or discount)	88.1	80.6	32.0	0.00
	Market (such as farmers market)	6.2	2.0	48.0	0.00
2	Refrigerated	96.9	15.3	9.0	0.00
	Room temperature	3.1	84.7	91.0	0.00
3	In refrigerator	98.2	54.1	76.0	0.00
	At Room temp	1.3	45.9	23.0	0.00
	Don't know	0.4	0.0	1.0	0.59
4	In refrigerator	92.4	77.6	90.9	0.41
	At Room temp	4.9	17.3	4.0	0.00
	Don't know	2.7	5.1	5.1	0.46
5	Yes I always wash raw poultry	42.3	93.8	15.0	0.00
	Yes I always wash eggs	3.5	1.0	29.0	0.00
	Yes I always wash raw poultry and eggs	3.5	0.0	23.0	0.00
	Sometimes if they seem dirty	14.1	3.1	21.0	0.00
	No	36.6	2.1	12.0	0.00
6	1 hour or less	79.0	61.2	91.0	0.06
	More than 1 hour but less than 2 hours	17.9	35.7	6.0	0.00
	More than 2 hours but less than 3 hours	2.7	1.0	2.0	0.64
	More than 3 hours but less than 4 hours	0.4	2.0	0.0	0.19
	4 hours or more	0.0	0.0	1.0	0.20

* 1 - Where do you usually buy eggs?; 2 - When you usually buy eggs are they refrigerated or at room temperature?; 3 - How would you say you usually store raw eggs (in the shell)?; 4 - How would you say you usually store cooked eggs (in the shell)?; 5 - Do you wash raw poultry/eggs before cooking them?; 6 - The last time you had leftovers from a freshly prepared salad that contained eggs or mayonnaise, how long did you let the leftovers sit at room temperature before you put them in the refrigerator or ate them later without refrigeration?

** Values shown in bold are statistically significantly different among the countries according to chi-square test ($p < 0.05$).

Preparation and Storage Behavior

The respondents were asked to indicate whether they would usually wash raw poultry or eggs before cooking. Approximately 46% respondents in the USA, 93% in Colombia, and 38% in Argentina reported washing raw poultry before cooking. Furthermore, 29% of Argentinian respondents reported washing raw eggs (Table 2). Most Colombian and USA respondents did not report washing raw eggs. An additional 3-21% of respondents claimed washing poultry or eggs only if after visual inspection it seemed necessary.

This study found that most Argentinian and Colombian consumers would either wash poultry, or wash both eggs and poultry before cooking; in comparison to 42% of USA consumers claimed to wash poultry, and this may be related to higher consumer knowledge of safe food preparation practices.

The respondents were asked to specify the approximate time before they would refrigerate a home-made salad with mayonnaise. The majority of respondents stored home-made salads with mayonnaise within 2 hours of preparation at room temperature (Table 2). A total of 79% of USA, 61% of Colombian, and 91% of Argentinian consumers would refrigerate the freshly prepared salads within 1 hour or less.

DISCUSSION

Purchase and storage behavior

Total of 48% of Argentinian respondents purchased eggs from a local market, while in Colombia and USA this practice was not common. Purchasing fresh eggs from a farmer's market has not been found common in selected Asian countries (17) or in selected European countries, either (18). Total of 17 and 20% of consumers purchased eggs from the farmer directly or raised their own chickens in Colombia and Argentina, respectively. Similar practices have been observed in Italy and Spain (18). These findings are important considering recent data from the USA showing that poultry products purchased at farmers' markets had higher levels of bacteria such as *Salmonella* and *Campylobacter* when compared to those purchased from supermarkets (20). That study also found that organically produced poultry had higher levels of bacteria than did conventionally produced chickens, even when purchased from the supermarket.

Eggs usually were refrigerated in the USA at the time of purchase, and similar practices have been observed in Estonia (18) and Korea (17). Eggs during purchase were at room temperature in Colombia and Argentina, as well as in India (17), Italy and Spain (18). In addition, 45.9% of surveyed consumers in Colombia and 23% of consumers in Argentina stored raw eggs at room temperature, while most European and Asian consumer stored eggs in the refrigerator (17, 18). In the USA most consumers stored eggs in the refrigerator, and these findings are in line with those from Godwin and Coppins (4).

At the time of purchase, eggs typically were either refrigerated or at room temperature, depending on the regulations regarding storage, and egg pre-treatment, such as washing by the manufacturer, in each location. However, it is not known how well consumers in different countries are informed of the local food safety regulations. Considering the annual average temperatures of each of these locations, storing at room temperature likely impacts the shelf life of eggs. In addition to variation in retail refrigeration practices in these locations, at home most of the USA consumers refrigerated the eggs, while portions of Argentinian and Colombian respondents did not. This may be caused by cultural differences among the consumers, such as purchasing groceries on the same day or day before using the groceries in food. This study did not ask about the quantities of the eggs purchased at one time, the packaging methods of the eggs, or the time eggs would be stored at home. This type of data would provide more understanding of actual potential risks in everyday practices of these consumers.

Colombian and Argentinian consumers were significantly more likely to store raw eggs at room temperature than USA consumers ($p=0.000$). This practice could subject consumers to a higher risk for foodborne diseases, such as Salmonellosis. Still, refrigeration is only effective in preventing foodborne illnesses if the refrigerator is cleaned regularly and maintained at correct temperatures (21).

Preparation and Storage Behavior

The respondents were asked to indicate whether they would usually wash raw poultry or eggs before cooking. Approximately 46% respondents in the USA, 93% in Colombia, and 38% in Argentina reported washing raw poultry before cooking. Variable portions of consumers have been found

to do the same in other countries. For example, in Estonia 29% of the surveyed consumers reported to wash raw poultry, while 40% of Italians and 44% of Spaniards reported the same (18). Furthermore, 29% of Argentinian respondents reported washing raw eggs, while most Colombian and USA respondents did not report washing raw eggs. Washing raw eggs was less common in Asian countries, as well, as reported by Koppel *et al.* (17).

In the USA consumer education tools are of high quality and readily available in the Internet. Some studies have conducted interventions and improved consumers' food safety related behavior through these (22). According to the Food Safety and Inspection Services on-line materials (23) washing raw meats and poultry is not recommended due to possible cross-contamination to kitchen surfaces. Other countries, however, rarely have these types of educational tools and this is reflected by consumer knowledge and practices. This study found that most Argentinian and Colombian consumers would either wash poultry, or wash both eggs and poultry before cooking; in comparison to 42% of USA consumers claimed to wash poultry, and this may be related to higher consumer knowledge of safe food preparation practices. In comparison in Thailand it was found that approximately half of the consumers washed both raw chicken and eggs before cooking (17).

Home-made mayonnaise and home-made salads with mayonnaise should be stored carefully (24). FSIS recommends that freshly prepared salads be refrigerated within 2 hours of preparation (25). *Salmonella enteritidis* was able to grow rapidly in salads and mayonnaise that was stored at 25 °C, but not when stored at 10 °C (5). *Listeria monocytogenes*, however can grow in contaminated pasta and egg salads even in cold storage (26). According to this study the majority of respondents followed this recommendation in USA, Argentina, and Colombia (Table 2). It appears that consumers either knew about this recommendation or have other reasons for putting food away quickly. Future studies should investigate if actual practice times are similar to the reported practice times as research has shown self-reported practices to be less precise than practices observed (27).

Cross-cultural study

This study was the first study to compare food safety practices among North and South American countries. The importance of the study is in the

comparison and collected knowledge of consumer practices from three countries that could be used in developing a uniform approach in educating consumers about food safety. However, there are some limitations to the study as well. The consumers recruited in each country were not balanced by their sociodemographic background information and this made comparison of consumer segments difficult. Furthermore, the respondents were recruited as a convenience sample and this does not necessarily represent average responses of the consumers in the community. Still, the results of this study for the USA were similar to a nationally representative study conducted in the USA (5) and may help in providing a more uniform understanding about culturally specific food preparation practices.

The cross-cultural approach of this study found that there are differences among surveyed consumers in the USA, Argentina, and Colombia. Future studies would benefit from including culture-specific aspects into questionnaires. These aspects may be pre-determined by conducting focus group studies or consumer interviews and may include issues like specific food preparation or purchase practices (28-29).

CONCLUSIONS

This pilot study evaluated consumers' self-reported purchase, storage, handling, and preparation of poultry products and eggs in three North and South American countries: Argentina, Colombia, and the USA. Some differences were found in purchase and storage behaviors among consumers in all three countries. For example, while most consumers in the USA stored eggs in the refrigerator, 23% of Argentinian and 45.9% of Colombian consumers stored eggs at room temperature. This study also showed some risky handling and preparation practices, such as storing raw eggs at room temperature (Colombia) and washing poultry and chicken. Further studies should investigate topics such as storage times of eggs in Colombia and Argentina to determine potential risk of storing eggs at room temperature, and potential educational interventions that could educate consumers about safe practices.

ACKNOWLEDGEMENTS

Parts of this research in the US were supported, by a grant from the United States Department of

Agriculture, GRANT 10980553, Project #TENX-2011-06512 titled “Development and evaluation of science-based messages to improve consumers’ storage handling and preparation of poultry and poultry products”. The authors declare no conflict of interests.

REFERENCES

- Kennedy J, Nolan A, Gibney S, O’Brien S, McMahon MAS, McKenzie K, Healy B, McDowell D, Fanning S, Wall PG. Determinants of cross-contamination during home food preparation. *British Food J.* 2011 Feb; 113(2):280-297.
- Forsythe RH. Food safety: A global perspective. *Poultry Sci.* 1996 Dec; 75(12):1448-1454.
- Redmond EC, Griffith CJ. Consumer food handling in the home: a review of food safety studies. *J. Food Prot.* 2003 Jan; 66(1):130-161.
- Godwin S, Coppings RJ. Analysis of consumer food-handling practices from grocer to home including transport and storage of selected foods. *J. Food Dist. Res.* 2005 Jan; 36(1):55-62.
- Kosa KM, Cates SC, Bradley S, Chambers E IV, Godwin S. Consumer reported handling of raw poultry products at home: results from a national survey. *J. Food Prot.* Accepted for publication 27th August 2014.
- Kilonzo-Nthenge A, Chen F-C, Godwin SL. Efficacy of home washing methods in controlling surface microbial contamination of fresh produce. *J. Food Prot.* 2006 Feb; 69(2):330-334.
- Kosa KM, Cates SC, Karns S, Godwin SL, Chambers D. Consumer home refrigeration practices: results of a web-based survey. *J. Food Prot.* 2007 Jul; 70(7):1640-1649.
- Cates SC, Kosa KM, Karns SA, Godwin S, Chambers D. Consumer storage practices for refrigerated ready-to-eat foods: results of a web-enabled survey. *Food Prot. Trends.* 2007 Jul; 27(7):530-543.
- Patil SR, Cates S, Morales R. Consumer food safety knowledge, practices, and demographic differences: findings from a meta-analysis. *J. Food Prot.* 2005 Sep; 68(9):1884-1895.
- Williams MS, Ebel ED, Golden NJ, Schlosser WD. Temporal patterns in the occurrence of *Salmonella* in raw meat and poultry products and their relationship to human illnesses in the United States. *Food Cont.* 2014 Jan; 35(1):267-273.
- Chen F-C, Godwin SL, Kilonzo-Nthenge A. Relationship between cleaning practices and microbiological contamination in domestic kitchens. *Food Prot. Trends.* 2011 Nov; 31(11):672-679.
- Godwin SL, Chen F-C, Chambers E IV, Coppings R, Chambers D. A comprehensive evaluation of temperatures within home refrigerators. *Food Prot. Trends.* 2007 Mar; 27(3):168-173.
- Nesbitt A, Thomas MK, Marshall B, Snedeker K, Meleta K, Watson B, Bienefeld M. Baseline for consumer food safety knowledge and behavior in Canada. *Food Cont.* 2014; 38:157-173.
- Califano AN, Antoni GL, Giannuzzi L, Mascheroni RH. Prevalence of unsafe practices during home preparation of food in Argentina. *Dairy Food Env. Sanit.* 2000 Dec; 20(12):934-943.
- Forero JO, Romero JR. Conocimientos y prácticas en manejo de alimentos en hogares en la ciudad de Bogotá, Colombia. *Una Salud. Revista Sapuvet de Salud Públic.* 2012 Jan; 3(1):15-35.
- Kher SV, De Jonge J, Wentholt MTA, Deliza R, Cunha de Andrade J, Cnossen HJ, Luijckx NBL, Frewer LJ. Consumer perceptions of risks of chemical and microbiological contaminants associated with food chains: a cross-national study. *Int. J. Cons. Studies.* 2013; 37:73-83.
- Koppel K, Suwonsichon S, Chitra U, Lee J, Chambers EIV. Eggs and Poultry Purchase, Storage, and Preparation Practices of Consumers in Selected Asian Countries. *Foods.* 2014 Jan; 3(1):110-127.
- Koppel K, Timberg L, Shalimov R, Vazquez-Araujo L, Carbonell-Barracchina A.A, Did Donfrancesco B, Chambers E.IV. Purchase, storage, and preparation of eggs and poultry in selected European countries: A preliminary study. *Brit. Food J.* 2015; 117(2):749-765.
- Suzuki H, Yamamoto S. *Campylobacter*. Contamination in retail poultry meats and by-products in the world: A literature survey. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2009; 71:255-261.
- Scheinberg J, Doores S, Cutter CN. A microbiological comparison of poultry products obtained from farmers’ markets and supermarkets in Pennsylvania. *J. Food Safety.* 2013; 33:259-264.
- Byrd-Bredbenner C, Berning J, Martin-Biggers J, Quick V. Food safety in home kitchens: a synthesis of the literature. *Int. J. Env. Res. Public Health.* 2013; 10:4060-4085.
- Bearth A, Cousin M-E, Siegrist M. Uninvited guests at the table – A consumer intervention for safe poultry preparation. *J. Food Safety.* 2013 Apr; 33(4):394-404.
- FSIS. (2013a) Food safety factsheets. Washing food: does it promote food safety? [WWW document] [Accessed on 18th May, 2015] Available in: <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/safe-food-handling/washing-food-does-it-promote-food-safety/washing-food>.
- Kurihara K, Mizutani H, Nomura H, Takeda N, Imai C. Behavior of *Salmonella* enteritidis in home-made mayonnaise and salads. *Japanese J. Food Microbiology.* 1994; 11:35-41.
- FSIS. (2013b) Food safety factsheets. Leftovers and food safety. [WWW document] [Accessed on 18th May, 2015.] Available in: http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/safe-food-handling/leftovers-and-food-safety/ct_index.
- Hwang C-A, Marmer BS. Growth of *Listeria monocytogenes* in egg salad and pasta salad formulated with mayonnaise of various pH and stored at refrigerated and abuse temperatures. *Food Microbiol.* 2007; 24:211-218.
- DeDonder S, Jacob CJ, Surgeoner BV, Chapman B, Phebus R, Powell DA. Self-reported and observed behavior of primary meal preparers and adolescents during preparation of frozen, uncooked, breaded chicken products. *Brit. Food J.* 2009 Sep; 111(9):915-929.
- Parra PA, Kim H, Shapiro MA, Gravani RB, Bradley SD. Home food safety knowledge, risk perception, and practices among Mexican-Americans. *Food Cont.* 2014; 37:115-125.
- Henley SC, Stein SE, Quinlan JJ. Identification of unique food handling practices that could represent food safety risks for minority consumers. *J. Food Prot.* 2012 Nov; 75(11):2050-2054.

CONSERVACIÓN DE MANGO TOMMY ATKINS MÍNIMAMENTE PROCESADO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE UN RECUBRIMIENTO DE ALOE VERA (*ALOE BARBANDENSIS* MILLER)

CONSERVATION OF MINIMALLY PROCESSED MANGO TOMMY ATKINS BY APPLYING
AN ALOE VERA (*ALOE BARBANDENSIS* MILLER) COATING

Andrés F. PÉREZ T. M.Sc.^{1*}, Iván D. ARISTIZÁBAL T. D.Sc.², Jorge I. RESTREPO F. M.Sc.³

Recibido: Septiembre 01 de 2015. Aprobado: Mayo 31 de 2016.

RESUMEN

Antecedentes: El mango es una fruta climatérica que puede ver limitada su comercialización debido a la deficiencia en sistemas de procesamiento y conservación que ocasionan pérdidas poscosecha en la cadena agroindustrial. Los frutos mínimamente procesados y tratados con recubrimientos comestibles representan una alternativa para mitigar la perecibilidad del fruto, conservando sus atributos de calidad y ofreciendo al consumidor un producto de fácil consumo y almacenamiento. **Objetivos:** Conservar y prolongar la vida útil de mango Tommy Atkins mínimamente procesado con la aplicación de un recubrimiento comestible de Aloe vera, evaluando su efectividad mediante el análisis de parámetros físicos, fisicoquímicos, respiratorios, microbiológicos y sensoriales durante almacenamiento refrigerado. **Métodos:** El recubrimiento comestible fue preparado con gel mucilaginoso de aloe vera en una Concentración de 50 % P/P en dilución y homogenizado con cera carnauba y glicerol, para luego ser aplicado por inmersión en los frutos previamente cortados y secados en estufa. Se diseñaron cuatro tratamientos experimentales: C, R, PreREC y CA, almacenados en refrigeración durante un periodo de 12 de días, en los que se evaluó parámetros como firmeza, color, porcentaje de pérdida de peso, pH, Brix, acidez (%), tasas respiratorias, conteos microbiológicos y descriptores sensoriales por medio de un perfil de aproximación multidimensional. Los datos fueron procesados mediante ANOVA y por el método de comparaciones múltiples LSD. **Resultados:** Las muestras tratadas con el recubrimiento (R y PreREC) mostraron un retraso en la pérdida de la firmeza, menores cambios de color, una menor pérdida de peso, un aumento menos acelerado del pH y de °Brix y valores más elevados de acidez con respecto a los tratamientos control. Se lograron tasas bajas de consumo de O₂ y una producción controlada de CO₂ en comparación a las muestras sin tratar. A nivel microbiológico, el recubrimiento disminuyó el crecimiento de mesófilos, mohos y levaduras; mientras que sensorialmente, descriptores como la firmeza, calidad general, olor y sabor característico mostraron una mayor calificación por parte del panel sensorial. **Conclusiones:** El recubrimiento permitió conservar por 3 días más las muestras de mango mínimamente procesado respecto a los tratamientos control.

Palabras clave: aloe, mango, mínimamente procesado, recubrimiento comestible.

¹ Químico, Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

² Profesor Asociado, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Medellín-Colombia.

³ Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: afperez@unal.edu.co

ABSTRACT

Background: Mango is a climacteric fruit which can limit its marketing due to some deficiencies in processing and preservation systems that cause postharvest losses in the agribusiness and value chain. Minimally processed fruits and edible coatings represent an alternative to decrease the perishability of fruits, preserving its quality attributes and offering to consumers an easy product to use and storage. **Objectives:** The aim of this study was to conserve and extend the shelf life of minimally processed “Tommy Atkins” mango covered by an edible coating made of aloe vera mucilage, assessing its effectiveness by analyzing physical, physicochemical, respiratory, microbiological and sensory parameters during refrigerated storage. **Methods:** The edible coating was prepared with aloe vera, which is a mucilaginous gel, in a concentration of 50% w/w in dilution and homogenized with carnauba wax and glycerol. Then aloe vera was applied by immersion in the pre-cut fruits and dried in stove. Four experimental treatments were designed: C, R, PreREC and CA, stored under refrigeration for a period of 12 days, in which parameters such as strength, color, percentage weight loss, pH, Brix, acidity (%), respiratory rates, microbiological counts, and sensory descriptors were evaluated by a multidimensional approach profile. Data were analyzed using ANOVA and the LSD multiple comparison method. **Results:** Samples treated with the edible coating (R y PreREC) showed a delay in the loss of firmness, less color changes, less loss of weight, a less increase in pH and Brix values, and a higher acidity compared to the control treatments. Low rates of O₂ consumption and controlled CO₂ production compared to untreated samples were achieved. Coating decreased the growth of mesophilic, molds and yeasts; while sensory descriptors as firmness, overall quality, characteristic odor and taste showed a higher rating by the sensory panel. **Conclusions:** Edible coating made of aloe vera gel allowed to keep for 3 more days samples of minimally processed mango compared to control treatments.

Keywords: Aloe, mango, minimally processed, edible coating.

INTRODUCCIÓN

El consumo de frutas mínimamente procesadas que se enmarcan bajo la denominación de IV gama se presenta como una alternativa a las exigencias del consumidor actual por encontrar alimentos que sean fáciles de consumir, manipular y almacenar, con tiempos de preparación mínimos, con vida útil prolongada y con características de calidad similares a las de un producto fresco (1). Según la FAO, la poca demanda en el consumo de frutas por parte del consumidor por debajo de los límites estimados de la OMS (400g diarios por persona), que viene ligada a la deficiencia en sistemas de procesamiento y comercialización en países en vía de desarrollo, incentiva a la búsqueda de tecnologías para el aprovechamiento del material vegetal, que puedan aportar valor agregado, beneficio económico para los productores e intermediarios de la cadena agroindustrial y que eviten por tanto las pérdidas del alimento por la senescencia natural o cuando ocurran sobreproducciones (1-3). El mango, *Mangifera indica* L, es una fruta de consumo masivo, con una importante fuente de vitaminas y minerales, pero que requiere de un especial cuidado en poscosecha

debido a su carácter climatérico, que lo hace más susceptible al deterioro y a la pérdida de sus atributos de calidad durante su maduración (4, 5). A pesar de sus bondades, los frutos mínimamente procesados enfrentan una problemática en lo relacionado a su conservación, ya que los daños mecánicos infligidos durante su procesamiento promueven la aceleración de cambios metabólicos naturales como la respiración, que hacen que los frutos sean más vulnerables a la proliferación microbiana y a la pérdida de atributos de calidad (6). En la actualidad, los recubrimientos comestibles (RC) se presentan como una tecnología de conservación capaz prolongar la vida útil de estos alimentos, contrarrestando los efectos indeseables del procesamiento mínimo, actuando como una fina capa que se adhiere al alimento, permitiendo la formación de una barrera que tendrá como función permeabilizar adecuadamente los gases de la respiración, contrarrestar la pérdida de humedad y disminuir los cambios metabólicos en el fruto que causan su maduración (7). El gel mucilaginoso de aloe vera al ostentar propiedades biológicas, antimicrobianas y antivirales, ha llamado el interés de la agroindustria para ser utilizado como ingrediente funcional en productos de consumo masivo

y últimamente ha sido parte de investigaciones en conservación de productos frescos o mínimamente procesados como recubrimiento comestible, conservando los atributos que calidad y prolongando su vida útil (8-12). Hasta el momento, no se encuentran reportes de uso de aloe vera para la conservación de mango mínimamente procesado, pero los resultados promisorios de este mucilago como recubrimiento comestible en cuanto a conservación y prolongación de vida útil en fresas, uvas de mesa, moras, kiwis, o granadas mínimamente procesadas (2, 8, 11, 13, 14), conllevan a la investigación del aloe vera para esta clase de producto IV gama. En este contexto, esta investigación tuvo como objetivo conservar y prolongar la vida útil de mango variedad Tommy Atkins mínimamente procesado con la aplicación de un recubrimiento comestible de aloe vera, evaluando mediante parámetros físicos, fisicoquímicos, respiratorios, microbiológicos y sensoriales su efectividad en un periodo de almacenamiento refrigerado.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Control de Calidad de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, en el Laboratorio de Empaque de la Fundación INTAL, en el Laboratorio de Análisis Microbiológico y Fisicoquímico de la Corporación Interactuar y en el Laboratorio de Análisis Sensorial de la Universidad de Antioquia.

Se utilizaron mangos (*Mangifera indica* L. var. Tommy Atkins) provenientes de cultivos comerciales de la zona productiva de Sopetran-Antioquia, adquiridos en la Central Mayorista de Antioquia de la ciudad de Medellín, recién cosechados, con ausencia de daño mecánico, uniformes en tamaño y con grado de madurez 2 de acuerdo a la NTC 5210 (15), los cuales fueron transportados al laboratorio y fueron procesados siguiendo el diagrama de flujo para elaboración de mango mínimamente procesado propuesto por Siddiq *et al.*, (2012) (16). El gel o mucilago de aloe vera 100% natural, se obtuvo de hojas de *Aloe barbadensis* Miller, cultivadas en la vereda El Carmelo, Medellín-Antioquia. La cera carnauba grado alimentario en escamas, glicerol (99,5%), polisorbato 80 (mono oleato de sorbitan), ácido ascórbico y ácido cítrico fueron adquiridos comercialmente. Como material de empaque se utilizaron cajas de poliestireno biorentado, BOPS de 350mL.

Preparación del recubrimiento comestible

El cristal o mucilago de aloe vera se formuló a una concentración del 50% P/P, en dilución con agua destilada. Una porción de la de solución acuosa de aloe vera fue calentada con cera carnauba al 0,1% P/P que actuó como fase oleosa a 95°C por 5 min, y luego se adicionó la porción faltante de la solución de aloe con polisorbato 80 al 0,01% P/P, que actuó como emulsificante del sistema y glicerol al 1% P/P como plastificante. Por último, la formulación establecida fue homogenizada con un Ultraturrax, marca IKA, modelo T25, a 20.000 rpm por 4 min, y fue almacenada en refrigeración a $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$ hasta el momento de su uso (2).

Aplicación del recubrimiento

Se utilizaron cubos de mango de aproximadamente 2,0 cm de lado; presentación comercial sugerida en la literatura (16-18). El recubrimiento fue aplicado a los cubos por inmersión durante un tiempo de 30 segundos y luego fueron secados a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ en una estufa de aire forzado durante 1 hora (19). Se plantearon 4 tratamientos experimentales. El tratamiento C (control o blanco), en el cual se utilizaron mangos sumergidos en agua destilada; el tratamiento R, mangos con aplicación del RC formulado; el tratamiento PreREC, mangos con aplicación del mismo RC con previa inmersión en una solución de ácidos orgánicos (1% ácido cítrico + 1% ácido ascórbico) por 2 min; y el tratamiento CA (Control de ácidos), muestras de mango con solo inmersión en la solución de ácidos orgánicos (enunciada con anterioridad) por 2 min. La unidad experimental estuvo conformada por 100 g de cubos de mango mínimamente procesado empacados en una caja BOPS. Todas las unidades experimentales fueron sometidas a almacenamiento refrigerado en una vitrina vertical refrigeradora a una temperatura media de $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y una humedad relativa del $89,6\% \pm 7\%$ HR. Por tiempo de evaluación y tratamiento se utilizaron 6 réplicas para los análisis físicos, fisicoquímicos, respiratorios y de color, y 3 réplicas para los análisis microbiológicos y sensoriales, para un total de 252 unidades experimentales. El análisis respiratorio se realizó como una evaluación de réplicas independientes debido al método experimental utilizado.

Evaluación de parámetros

Firmeza: La firmeza fue medida en un texturómetro TA.XT2 (Stable Micro System®) y el software Texture Expert Excced®, v 2.64 los días 0, 3, 6, 9 y 12 de almacenamiento. Se utilizó una celda cilíndrica de 5mm (P/5), a una velocidad de 2mm/s y una deformación hasta del 50% del material. Las pruebas de textura se realizaron sobre 5 cubos de mango al azar por unidad experimental de cada tratamiento. De la curva fuerza-deformación, se determinó la fuerza máxima de ruptura del tejido expresada en Newton (N) (2).

Color: El color de los cubos de mango mínimamente procesado fue medido por reflectancia en un espectrocolorímetro X-Rite®, modelo SP-64, con observador a 10° e iluminante D65 los días 0, 3, 6, 9 y 12 de almacenamiento. Se realizaron mediciones sobre 10 cubos de mango MP seleccionados aleatoriamente por unidad experimental y se obtuvieron las coordenadas L^* , a^* , b^* utilizando el sistema uniforme de espacio de color Hunter; en donde L^* representa la luminosidad, a^* la variación verde-rojo y b^* la variación azul-amarillo. Con estas coordenadas se calculó la diferencia de color (ΔE) utilizando la ecuación 1:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde ΔL^* , Δa^* y Δb^* , representan las diferencias entre los parámetros de color de los cubos para cada tratamiento, respecto a las coordenadas medias del tratamiento control en el día cero (inicio del almacenamiento) (20).

%Pérdida de peso: Las pérdidas de peso (%PP) se determinaron por gravimetría sobre las unidades experimentales los días 0, 3, 6, 9 y 12 de almacenamiento, mediante la diferencia entre pesos, tomando como base el peso inicial (P_i) menos los pesos en las diferentes fechas de muestreo del almacenamiento (P_f). Se expresaron los resultados como porcentaje de pérdida de peso (%) mediante la ecuación 2 (20):

$$\%PP = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Análisis fisicoquímicos: El % de acidez por unidad experimental se cuantificó por volumetría. El jugo extraído de 2g de mango se homogenizó en 100 mL de agua destilada y se tituló el sobrenadante con NaOH 0,1N y fenoltaleína como indicador. La acidez titulable de la muestra se expresó como el

porcentaje en peso del ácido predominante (ácido cítrico) según la NTC 5210 (15). El contenido de sólidos solubles, se determinó empleando un refractómetro Hanna® modelo HI 96801, con previa calibración empleando agua destilada. Posteriormente se ubicó una porción del jugo extraído de 10g de mango sobre el prisma del refractómetro. Se expresó el porcentaje de sólidos solubles como °Brix de los cubos de mango de cada tratamiento por unidad experimental (15). Para el pH, se pesaron 10 g de la fruta por unidad experimental de cada tratamiento, que fueron homogenizados en 100 mL de agua destilada. Se realizó la lectura directa de la solución con un pHmetro marca Hanna® modelo Session1, para cada tratamiento por unidad experimental (15). Los análisis fisicoquímicos fueron realizados los días 0, 3, 6, 9 y 12 de almacenamiento.

Tasas de respiración (TR) de CO₂, O₂ y coeficiente respiratorio (CR): Se determinaron con la evaluación del porcentaje de CO₂ producido y el O₂ consumido de una muestra de mango de 150 g, en el espacio de cabeza de un sistema estático completamente hermético (Recipiente de cristal de 600mL, con un septum en la superficie de la tapa) con un analizador de gases marca PBI Dansensor®, con sensibilidad de 0,1% para CO₂ durante 7 días con un seguimiento de evaluación cada 24 horas. Las tasas respiratorias y el CR fueron calculados de acuerdo a las ecuaciones 3, 4 y 5 (21,22):

$$TR_{CO_2} = \left[\frac{(G_{CO_2})_{t+1} - (G_{CO_2})_t}{\Delta t} \right] \frac{V_{fr}}{W} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$TR_{O_2} = \left[\frac{(G_{O_2})_t - (G_{O_2})_{t+1}}{\Delta t} \right] \frac{V_{fr}}{W} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$CR = \frac{TR_{CO_2}}{TR_{O_2}} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Dónde: TR_{CO_2} es la tasa de respiración de CO₂ (mL [CO₂] kg⁻¹h⁻¹); TR_{O_2} es la tasa de respiración de O₂ (mL [O₂] kg⁻¹h⁻¹); G_{CO_2} y G_{O_2} es la concentración de CO₂ y O₂ en el espacio de cabeza, respectivamente; t es el tiempo de almacenamiento, h; Δt es la diferencia de tiempo entre dos mediciones de gas; V_{fr} es el volumen libre o de cabeza de la cámara de respiración, mL; y W es el peso de la fruta, kg.

Análisis microbiológicos

El recuento de bacterias mesófilas se realizó de acuerdo a la NTC 4519 (23) por la técnica

de recuento de colonias en placa a 35 °C, norma equivalente a la ISO 4833. Los resultados se reportaron como UFC (unidades formadoras de colonias) de bacterias mesófilas (2). El recuento de mohos y levaduras se realizó de acuerdo a la NTC 4132 (24), con base en la técnica de recuento de colonias en placa a 25 °C, norma equivalente a la ISO 7954. Los resultados se reportaron como UFC de mohos y levaduras (2). La detección de *Salmonella spp* se realizó de acuerdo a la NTC 4574 (25) y el número más probable (NMP) de coliformes totales y fecales se realizó de acuerdo a la metodología planteada en el Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano (26). Todas las pruebas microbiológicas para cada tratamiento se realizaron por triplicado, los días 0, 6 y 12 del almacenamiento refrigerado. Cabe resaltar que todos los ensayos microbiológicos son acreditados en NTC-ISO/IEC 17025

Análisis sensorial

La evaluación se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis Sensorial de la Universidad de Antioquia por un panel compuesto por 5 jueces entrenados, el cual tiene implementado el Sistema de Gestión de Calidad de acuerdo a la NTC-ISO/IEC 17025. La prueba utilizada fue un perfil sensorial por aproximación multidimensional, donde se evaluaron los descriptores de sabor característico, sabor fresco, olor característico, firmeza y calidad general, teniendo en cuenta una escala de calificación 0 a 5, donde 0 es ausente y 5 muy intenso, definiendo 2,5 como límite inferior de aceptación de los frutos evaluados. Para el descriptor Calidad general se tuvo un escala de aceptación de 0 a 3, donde 1 es Baja, 2 Media y 3 es alta calidad, definiendo 2 como límite de aceptabilidad. Se realizó el análisis de acuerdo a la metodología planteada en la NTC 3932 (27), los días 0, 6, 9 y 12 del almacenamiento refrigerado.

Análisis estadístico

El efecto de los tratamientos sobre las variables de respuesta descritas previamente se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA) y por el método de comparaciones múltiples LSD (mínimas diferencias significativas), con un nivel de confianza del 95% utilizando el paquete estadístico SAS® versión 9.0.

RESULTADOS

Firmeza

Se presenta una disminución gradual de los valores de firmeza para todos los tratamientos a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento. A partir del día 6 y hasta el final del almacenamiento, los tratamientos R y PreREC forman un grupo homogéneo en cuanto a la estabilización de los valores de firmeza que son significativamente mayores ($p < 0,05$), en comparación a los tratamientos que no poseen el recubrimiento, los cuales evidencian una disminución marcada en el periodo evaluado (Figura 1).

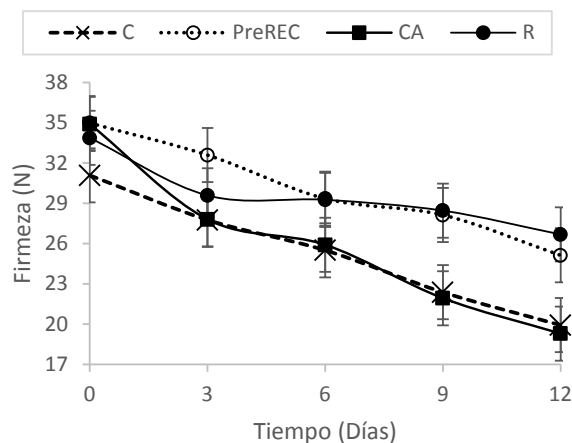


Figura 1. Evolución de la firmeza evaluada en mango mínimamente procesado sometido a diferentes tratamientos durante almacenamiento refrigerado

Color

Se puede observar claramente que para los días 0 y 3, los intervalos de confianza LSD no mostraron diferencias significativas de ΔE entre los tratamientos (Figura 2), indicando así que el uso del recubrimiento comestible de Aloe vera no alteró el color natural de la fruta, siendo esto una condición deseada cuando se utilizan tecnologías de conservación de este tipo (28). El cambio significativo del color se hace evidente para el tratamiento testigo C a partir del día 6 con respecto a los demás tratamientos, comportamiento que continúa con aumentos significativos hasta el último día de análisis. Para el final del almacenamiento, con el grupo homogéneo conformado por los tratamientos R, PreREC y CA se logró un valor medio de 9,03 unidades de cambio de color con respecto al color de referencia del inicio del almacenamiento, mientras que el tratamiento C, cambió en promedio 17,48 unidades.

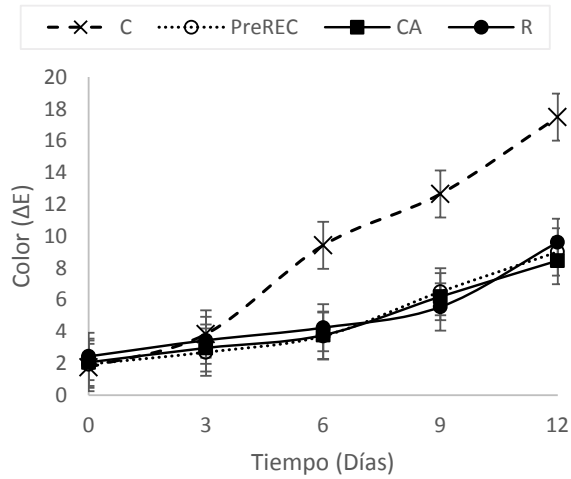


Figura 2. Evolución de la diferencia de color (ΔE) evaluada en mango mínimamente procesado sometido a diferentes tratamientos durante almacenamiento refrigerado.

Porcentaje de pérdida de peso

Los intervalos de confianza de la prueba LSD para los días 0, 3 y 6, no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los cuatro tratamientos, sin embargo a partir del día 9 y hasta el final del almacenamiento, el uso del recubrimiento de aloe vera y cera carnauba contribuyó a la reducción significativa ($p < 0,05$) de la pérdida de peso en las muestras de los tratamientos R y PreREC con respecto al control C y al tratamiento CA (Figura 3).

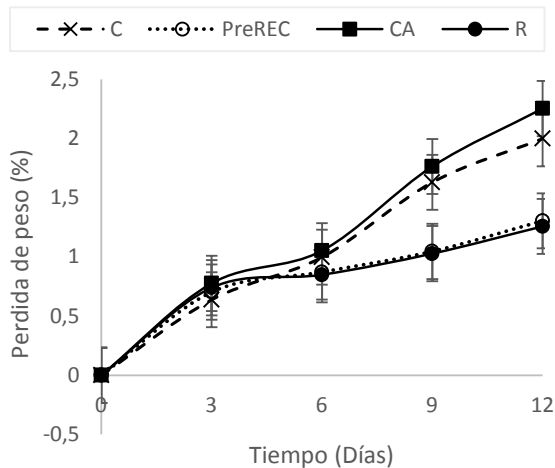


Figura 3. Evolución del porcentaje de pérdida de peso en mango mínimamente procesado sometido a diferentes tratamientos durante almacenamiento refrigerado.

Análisis Fisicoquímicos

En general, se puede apreciar una tendencia significativa de aumento en los valores de pH y °Brix, así como una tendencia a la disminución de los porcen-

tajes de acidez independientemente del tratamiento utilizado durante el almacenamiento (Figura 4).

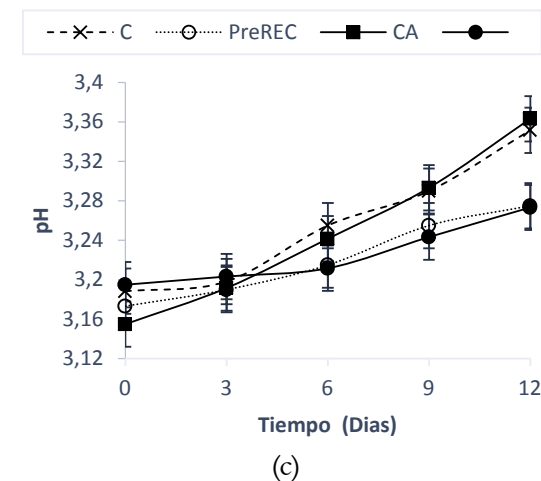
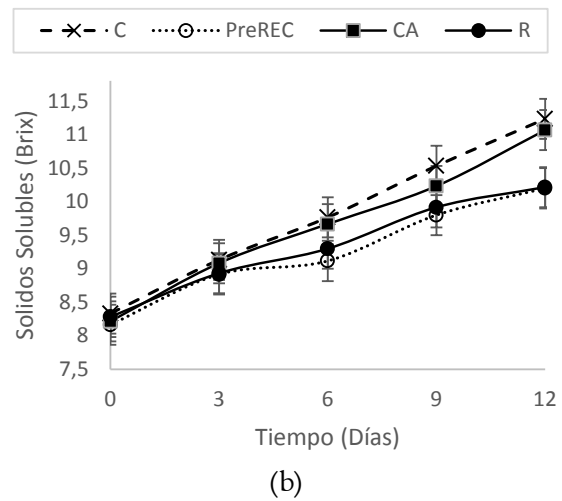
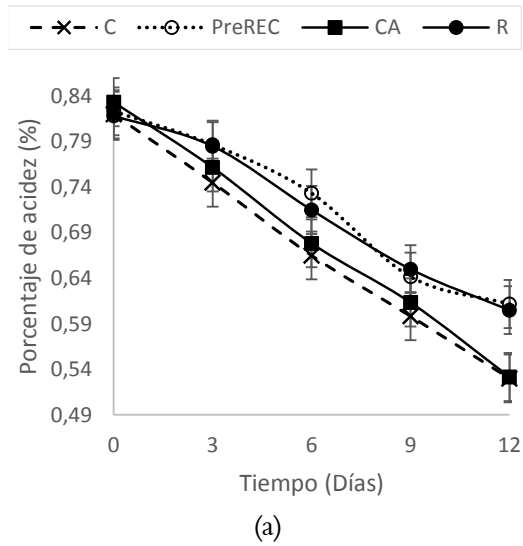


Figura 4. Evolución del % acidez (a), sólidos solubles (b) y pH (c) en mango mínimamente procesado sometido a diferentes tratamientos durante almacenamiento refrigerado.

En la evaluación de la acidez titulable se encontraron porcentajes significativamente mayores en las muestras tratadas con el recubrimiento comestible (R y PreREC) a partir del día 3 con respecto al control (C) y a partir del día 6 en relación al tratamiento CA hasta el final del almacenamiento (Figura 4a).

En cuanto a los sólidos solubles, se puede apreciar el efecto significativo ($p < 0,05$) del recubrimiento comestible tanto del tratamiento R como PreREC con valores menores de °Brix con respecto al tratamiento control (C) desde el día 6 hasta el último día de almacenamiento, logrando además diferencia significativa con respecto a CA, en el día 12 (Figura 4b). Finalmente, para el comportamiento del pH se evidencian diferencias significativas desde el día 6 ($p < 0,05$) para los tratamientos con recubrimiento comestible (R y PreREC), con valores menores de pH comparados con las muestras del tratamiento C; dicho comportamiento permaneció hasta el último día de almacenamiento. Caso similar ocurre al comparar R y PreREC con CA, pero solo se evidenciaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) a partir del día 9 (Figura 4c).

Tasas de respiración (TR) de CO₂, O₂ y coeficiente respiratorio (CR)

Las tasas respiratorias de O₂ (Figura 5a) y de CO₂ (Figura 5b), se comportaron de manera similar durante todo el tiempo de almacenamiento, mostrando valores significativamente mayores ($p < 0,05$) para los tratamientos C y CA con unas tasas elevadas para las primeras 48 horas del experimento, seguido por un descenso gradual hasta el final del tiempo de almacenamiento. Los tratamientos con recubrimiento (R y PreREC) mostraron una disminución uniforme a lo largo del almacenamiento con unas tasas significativamente menores ($p < 0,05$) a las reportadas para las muestras sin recubrir. En la Figura 5c, el CR, definido como la relación entre la tasa de CO₂ producido y la de O₂ consumido, presentó valores entre 0,87 y 1,1, con diferencias significativas ($p < 0,05$), dependiendo del tratamiento y del tiempo transcurrido de almacenamiento.

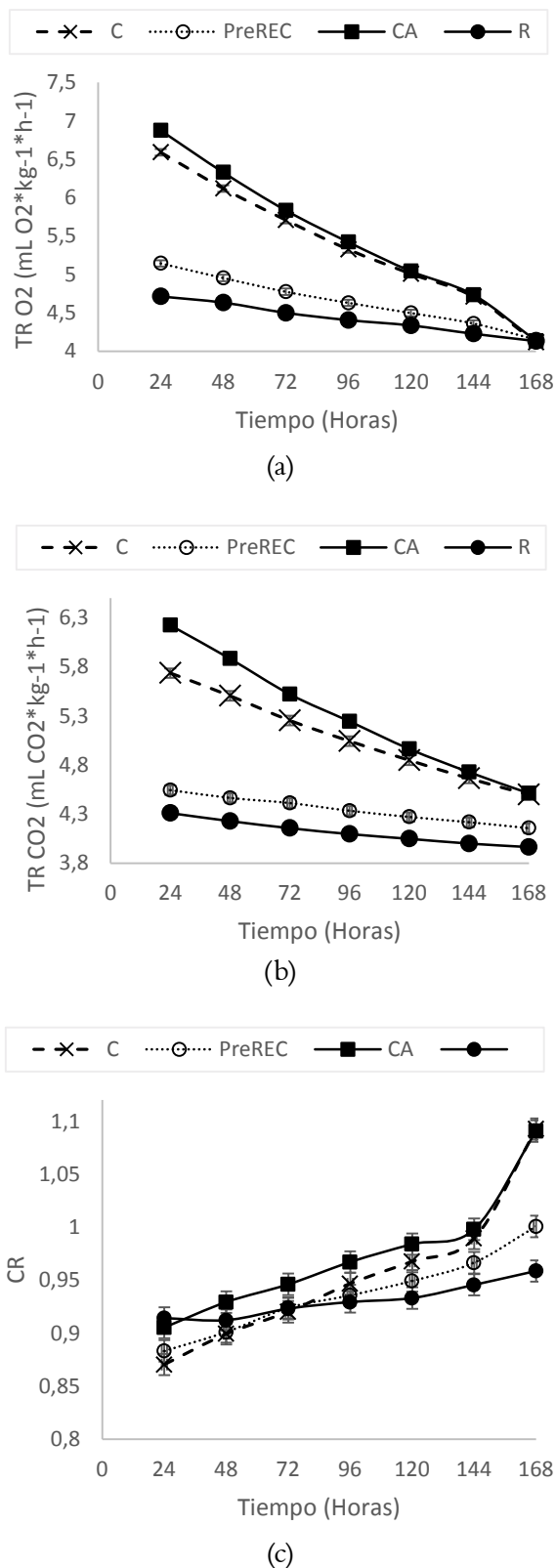


Figura 5. Evolución de las tasas respiratorias de O₂ (a), CO₂ (b) y cociente respiratorio CR (c) evaluados en mango mínimamente procesado sometido a diferentes tratamientos durante almacenamiento refrigerado

Análisis microbiológicos

El análisis de varianza ANOVA, no mostró efectos significativos ($p < 0,05$) con respecto al tratamiento utilizado, pero si por el tiempo de almacenamiento. Para todos los tratamientos se evidenció un incremento durante los días de evaluación en los conteos de mesófilos aerobios y de mohos y levaduras presentándose diferencia significativa el día 12 de almacenamiento como se aprecia en la Tabla 1. Para el último día de almacenamiento, se observa que los valores promedio de las muestras sin recubrimiento (C y CA) sobrepasan los límites máximos establecidos para el conteo de microorganismos deteriorantes, que según sugiere Torres (2007) (29) es de 1×10^4 Ufc/g [4 Log Ufc/g], mientras que las muestras con

recubrimiento (R y PreREC) conservan valores más bajos al de referencia; caso similar ocurre con los valores promedio para hongos y levaduras siendo menores los conteos obtenidos para las muestras tratadas con el recubrimiento, sin embargo ningún valor sobrepasó el límite propuesto de deterioro. En lo referido a la evaluación de coliformes totales y fecales, y la detección de salmonella se tuvo en cuenta los límites máximos o parámetros establecidos por normatividad INVIMA para ensaladas crudas de frutas y vegetales [150 NMP/g, < 3 NMP/g y Ausencia, respectivamente] (30). Como se observa en la Tabla 1, ninguno de los tiempos de evaluación sobrepasó los límites establecidos, independiente del tratamiento utilizado.

Tabla 1. Parámetros microbiológicos evaluados en muestras de mango mínimamente procesado sometido a diferentes tratamientos durante almacenamiento refrigerado.

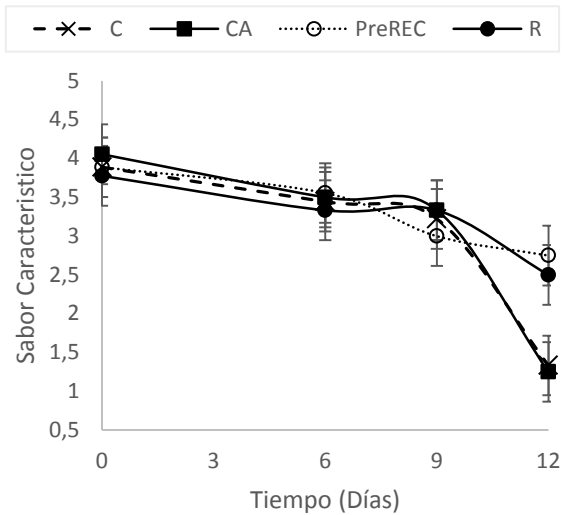
Parámetro Microbiológico	Tiempo (Días)	Tratamiento			
		C	CA	R	PreREC
Mesófilos Aerobios (Log Ufc/g)	0	1,6931 ^a ±0,345	1,7365 ^a ±0,241	1,4184 ^a ±0,487	1,8157 ^a ±0,290
	6	1,7195 ^a ±0,317	1,3597 ^a ±0,101	1,5604 ^a ±0,309	1,6414 ^a ±0,187
	12	4,3202 ^b ±0,271	4,0503 ^b ±0,551	3,3425 ^b ±0,492	3,8603 ^b ±0,194
Mohos/Levaduras (Log Ufc/g)	0	1,2271 ^a ±0,239	1,4184 ^a ±0,101	1,1590 ^a ±0,275	1,3920 ^a ±0,357
	6	1,2594 ^a ±0,241	1,3010 ^a ±0,301	1,2007 ^a ±0,173	1,2594 ^a ±0,241
	12	3,2776 ^b ±0,130	3,0790 ^b ±0,269	2,7606 ^b ±0,091	3,0543 ^b ±0,273
Coliformes Fecales (NMP/g)	0	<3	<3	<3	<3
	6	<3	<3	<3	<3
	12	<3	<3	<3	<3
Coliformes totales (NMP/g)	0	<3	<3	<3	<3
	6	<3	<3	<3	<3
	12	<3	<3	<3	<3
Investigación de <i>Salmonella</i> /25g (Prueba Presuntiva)	0	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	6	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
	12	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Diferentes letras en un misma columna indican diferencia significativa ($p < 0,05$) entre tiempos.

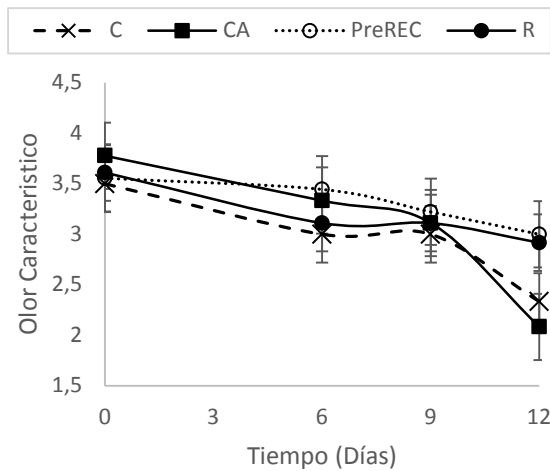
Análisis sensorial

La evolución de los descriptores correspondientes a sabor característico, olor característico, y firmeza se pueden observar en la Figura 6. Para estos tres descriptores se observa una tendencia a la disminución de la intensidad percibida por los jueces a lo largo del almacenamiento. No se evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos hasta después del día 9 para estos descriptores, lo que induce a pensar que el recubrimiento no

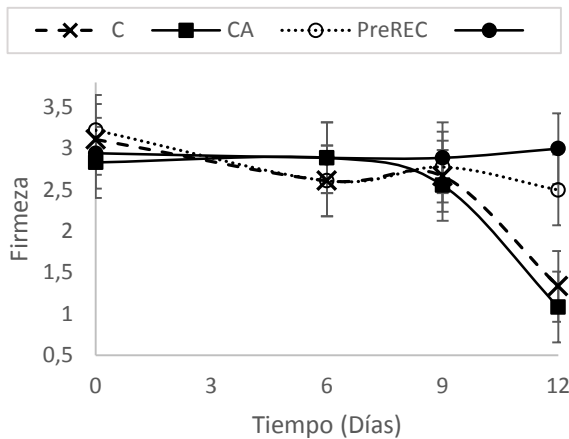
aportó sabores objetables a la percepción del sabor y olor característico en los primeros días del análisis, lo cual es una característica buscada al momento de formular un recubrimiento comestible (3). Para el final del almacenamiento los tratamientos R y Pre-REC se comportaron como un grupo homogéneo que se estabilizó mostrando valores de intensidad significativamente mayores a los mostrados por el grupo formado por C y CA, los cuales decayeron por debajo del límite propuesto de aceptación en sus valores de intensidad.



(a)



(b)



(c)

Figura 6. Evolución del descriptor sabor característico (a), olor característico (b) y firmeza (c) en mango mínimamente procesado sometido a diferentes tratamientos durante almacenamiento refrigerado.

Para el descriptor Calidad General se observa que para el primer día de análisis todas las muestras presentan valores en un rango de 2 a 3, lo que sugiere una calidad media-alta, comportamiento que se mantiene hasta el día 9 para todos los tratamientos (Figura 7). Para el final del almacenamiento se muestra una diferencia significativa entre las muestras tratadas con el recubrimiento comestible (R y PreREC) las cuales conservan una apreciación de calidad media frente a las no tratadas (C y CA), las cuales decayeron por debajo del límite de aceptabilidad, lo que las hace muestras de baja calidad para el consumo.

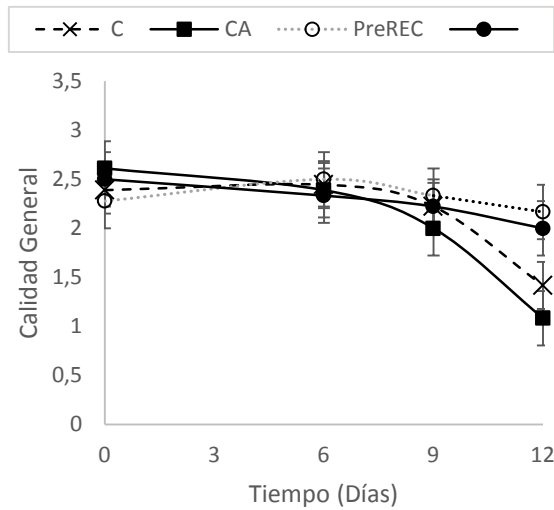


Figura 7. Evolución del descriptor Calidad General en mango mínimamente procesado sometido a diferentes tratamientos durante almacenamiento refrigerado.

DISCUSIÓN

La pérdida de la firmeza posiblemente se atribuye a la degradación o digestión de polisacáridos pécticos de la pared celular por actividad de enzimas como la pectinesterasa, poligalacturonasa y B-galactosidasa, como también a la pérdida de presión de turgencia celular durante la maduración en el almacenamiento (31-33). El comportamiento de la firmeza en las muestras recubiertas va ligado al efecto de las propiedades de barrera frente a las pérdidas de humedad que provee el componente lipídico en la formulación, retrasando la deshidratación de la muestra (1). Según Abassi *et al.*, (2019) (31) los recubrimientos comestibles también disminuyen la disponibilidad de oxígeno en el fruto, lo que permitiría la reducción de la actividad de enzimas pécticas que producen la pérdida de la

firmeza. Lo anterior ha sido sugerido por Navarro *et al.*, (2011) (34), refiriéndose específicamente a un recubrimiento a base de aloe vera.

Los cambios en el color (ΔE) se deben a procesos bioquímicos ligados a la maduración natural del fruto que pueden causar el oscurecimiento de los tejidos celulares, al igual que la deshidratación superficial, provocando cambios en los parámetros de color del alimento (6, 35, 36). El menor cambio de color en los tratamientos R, PreREC y CA se debe al efecto benéfico que aporta el recubrimiento de Aloe y la acción antioxidante de los ácidos orgánicos sobre la disminución de los procesos respiratorios y enzimáticos que ocasionan el oscurecimiento del fruto (2,18). Lo anterior ha sido corroborado por Ramírez, (2012) (2), quien logró un menor cambio de color en el último día de almacenamiento para moras recubiertas con Aloe vera y cera carnauba con respecto al control.

Autores como Djoua *et al.*, (2010) (36) reportaron también un menor cambio de los valores de ΔE para las muestras de mango mínimamente procesadas tratadas con un recubrimiento de quitosano, las cuales mostraban para el último día de almacenamiento un valor de 16,7 en contraste con las muestras control que cambiaron 25,3 unidades.

Los menores porcentajes de pérdida de peso en muestras tratadas con el recubrimiento se podrían explicar debido al efecto conjunto de barrera contra la pérdida de agua y solutos de la pulpa exterior que proveen los polisacáridos del aloe vera con la acción hidrofóbica de la cera carnauba (2,12,35). Estos resultados en disminución de pérdida de peso por efecto de la utilización de un recubrimiento comestible a base de aloe vera y cera carnauba, coinciden con los presentados por Restrepo y Aristizábal, (2010) (19) y Ramírez (2012) (2) en fresas y moras, respectivamente. En el presente estudio se logró un valor promedio de porcentaje de pérdida de peso para el final del almacenamiento de alrededor del 1,29% para las muestras tratadas con el recubrimiento comestible a base de aloe vera (R y PreREC), siendo un valor menor comparado con otros estudios en mango mínimamente procesado, en los cuales reportan porcentajes promedio de 6%, 10,27% y 10,12% para un recubrimiento de almidón de yuca, quitosano y mucilago de opuntia, respectivamente, para el final del almacenamiento (18, 35, 37), lo que indica que el recubrimiento de aloe vera y cera carnauba representa una alternativa eficaz para disminuir la deshidratación de mango mínimamente procesado.

El comportamiento de los parámetros fisicoquímicos se debe al efecto de la maduración natural del fruto que promueve el gasto u oxidación de ácidos orgánicos internos disminuyendo la acidez e incrementando el pH y a otros procesos como la síntesis de sacarosa e hidrolisis de almidones que aumentan los sólidos solubles en el fruto (11, 13, 31, 38,39).

La menor tasa de disminución de la acidez titulable, los menores valores de °Brix y el comportamiento del pH de las muestras recubiertas en los últimos días de evaluación se le atribuye a la ralentización de la actividad metabólica y respiratoria que la fina capa de RC genera, evitando el consumo de ácidos orgánicos en especial de ácido cítrico (37, 40, 41, 42). Los resultados obtenidos con el recubrimiento de Aloe vera en los porcentajes de acidez se asemejan a lo reportado por Alikhani (2014) (37) para mangos mínimamente procesados recubiertos con mucilago de cactus y aceite de Rosemary y con lo mostrado por De Souza *et al.*, (2011) (33) para mangos recubiertos con quitosano a diferentes concentraciones. En estudios de Sothornvit y Rodsamran (2008) (39), se reportó que mangos mínimamente procesados que no fueron recubiertos por una fina capa elaborada a base de puré mango aumentaron significativamente sus valores de °Brix con respecto a los recubiertos a partir del día 4 de almacenamiento. Por último, la tendencia en resultados de pH se asemeja a lo evidenciado por Dussán *et al.*, (2014) (43) al reportar valores promedio de pH menores en mangos mínimamente procesados con recubrimientos de almidón de yuca y cera carnauba comparados con los frutos no tratados al final del almacenamiento, los cuales fueron 3,10 y 3,46 respectivamente, mientras que en el presente estudio se lograron valores medios de 3,27 para muestras recubiertas y de 3,35 para muestras no recubiertas para el final del almacenamiento.

La mayor velocidad de consumo de O_2 y producción de CO_2 reportada para los tratamientos sin recubrimiento (C y CA) podría estar relacionada con el estrés que sufre el tejido celular de los frutos causado por las operaciones de procesamiento mínimo como el corte y el pelado que causan una frecuencia respiratoria mayor (18,44), mientras que las tasas bajas reportadas para R y PreREC van ligadas posiblemente a la función que cumple el recubrimiento comestible en la modificación de la atmosfera interna del producto, actuando como capa semipermeable a la difusión controlada de gases y en la reducción de las reacciones de oxidación,

mayoritariamente enzimáticas, que se dan en la superficie de la fruta luego del procesado mínimo (1,7). Autores como Restrepo y Aristizábal, (2010) (19) y Ramírez (2012) (2) han reportado el efecto benéfico que puede proveer el aloe vera en conjunto con la cera carnauba y el glicerol en la disminución de las tasas de respiración, atribuyendo su eficacia a la barrera de intercambio gaseoso (O_2 y CO_2) que forman como RC (2,19). Los resultados del CR indicaron que en ninguno de los casos existió cambios en las rutas metabólicas y no hubo lugar para la presencia de respiración anaeróbica por efecto del recubrimiento o la preinmersión, que podrían generar reacciones fermentativas en los frutos, sabiendo de antemano que el rango de este coeficiente para una respiración aeróbica de oxidación de glucosa abarca un intervalo entre 0,7-1,3 (29,45).

El comportamiento del crecimiento microbiano para mesófilos y mohos y levaduras probablemente se deba a la disponibilidad de agua superficial que se pierde en el transcurso de la maduración natural del fruto (46). Lo mostrado para el último día de almacenamiento para estos microorganismos en las muestras recubiertas, probablemente se pueda explicar debido a la actividad antimicrobiana que ha sido atribuida al aloe vera y a su composición en antraquinonas, saponinas y acemananos que reducen el crecimiento de una gran variedad de bacterias gram-positivas y gram-negativas, además de proveer un mecanismo que inhibe el crecimiento micelial y la germinación de ciertos tipos de hongos (2, 8, 10, 12). En lo referido para coliformes totales y fecales y la detección de *Salmonella*, los resultados indicaron un manejo adecuado de las Buenas Prácticas de Manufactura en cada una de las etapas del procesamiento mínimo de las muestras, tal como fue reportado por Chiumarelli *et al.*, (2010) (46), quienes reportaron la no presencia de *Salmonella spp.* y conteos bajos de coliformes totales para muestras de mango *Tommy Atkins* mínimamente procesado sometido a diferentes tratamientos con recubrimientos comestibles (almidón de yuca – glicerol) y ácidos orgánicos, atribuyendo sus resultados al efectivo manejo de las prácticas de higiene y procesos de desinfección en las muestras precortadas.

En lo referente al análisis sensorial, el comportamiento del sabor característico probablemente se deba a la función del recubrimiento comestible de aloe vera en disminuir el deterioro del fruto controlando la respiración y procesos enzimáticos que pueden producir sabores indeseables (2). En el caso

del olor característico, el recubrimiento posiblemente actuó como un encapsulador de compuestos aromáticos gracias a su baja permeabilidad al oxígeno o como una barrera semipermeable que reduce el tránsito de compuestos aromáticos hacia el exterior del fruto (2, 7, 47). Por último para el descriptor firmeza, el comportamiento se asemeja a lo reportado a nivel instrumental, donde el recubrimiento actuó como barrera contra la pérdida de humedad y como agente que ralentiza la actividad de algunas enzimas pécticas que causan el ablandamiento de la fruta (30, 45). La apreciación global del descriptor calidad general, podría indicar que el recubrimiento imparte una función de conservación sobre el mango mínimamente procesado aumentando su tiempo de duración 3 días más en comparación con las muestras sin recubrir, manteniendo las características de calidad que lo hacen apto para su consumo. Lo anterior es soportado con los análisis instrumentales realizados a las muestras de mango mínimamente procesado, pues el recubrimiento logró conservar los parámetros fisicoquímicos y de color, controlar la respiración, disminuir la pérdida de agua, y mantener la firmeza de las muestras, siendo perceptibles las diferencias con respecto a los controles generalmente a partir del día 6, lo que para los jueces entrenados fue logrado solo después del día 9.

Limitaciones

Luego de seguir la sugerencia del panel sensorial para evaluar hasta el día 15 de almacenamiento, se comprobó la imposibilidad de realizarlo, puesto que para este día ningún tratamiento se encontraba apto para el consumo debido a la evidente contaminación microbiológica.

CONCLUSIONES

El gel mucilaginoso de aloe vera es eficaz para la formulación de un recubrimiento comestible para la conservación de mango mínimamente procesado al no aportar olores o sabores objetables a los característicos del fruto. La acción conjunta de los componentes de la formulación del RC (Aloe Vera- Cera carnauba), permitió la formación de una barrera frente a la pérdida de humedad y una barrera semipermeable a los gases de la respiración, logrando un control en los procesos respiratorios de producción de CO_2 y consumo de O_2 y una menor pérdida de peso en los mangos recubiertos, caracte-

rísticas buscadas para contrarrestar los efectos de la maduración y el deterioro de la calidad del producto.

En condiciones de almacenamiento en refrigeración a $4^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa del $89,6\%\pm 7\%\text{HR}$, el recubrimiento comestible formulado conserva parámetros fisicoquímicos como el pH, sólidos solubles y porcentaje de acidez, mostrando así que los procesos naturales de maduración fueron menos acelerados en las muestras con el recubrimiento. Igualmente el recubrimiento retrasa el cambio en la diferencia de color (ΔE), así como también permite que las muestras conserven valores mayores de firmeza durante el tiempo de almacenamiento, comprobado tanto instrumental como sensorialmente. A nivel microbiológico se reportaron conteos mayores de mesófilos aerobios y hongos y levaduras en aquellas muestras que no se encontraban recubiertas, lo que se ve reflejado en la percepción sensorial. El análisis sensorial demostró que el recubrimiento no aporta olores o sabores indeseables y que conserva la firmeza de las muestras de mango mínimamente procesado.

El descriptor Calidad General permitió establecer que las muestras de mango mínimamente procesadas pueden tener un tiempo de duración o de vida útil en refrigeración hasta de 12 días en el almacenamiento, 3 días más que las muestras sin recubrir.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia, a la Vicerrectoría de Investigación y a la DIME de la Universidad Nacional Sede Medellín, por la financiación que brindaron al proyecto titulado “Conservación de mango Tommy Atkins mínimamente procesado mediante un recubrimiento comestible de Aloe Vera” a través de la convocatoria del Programa Nacional de Proyectos para el fortalecimiento de la investigación, la creación, la innovación en posgrados de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015, proyecto 19847, así mismo a la convocatoria del Programa Nacional de apoyo a estudiantes de posgrado para el fortalecimiento de la investigación, creación e innovación de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015, proyecto 21887.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en esta investigación.

REFERENCIAS

- González-Aguilar G, Gardea A, Cuamea-Navarro F. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Primera Edición. Guadalajara, México: Logiprint Digital S; 2005. 558p.
- Ramírez J. Conservación de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) mediante la aplicación de un recubrimiento comestible de gel de mucílago de penca de sábila (*Aloe barbadensis* Miller). [Tesis de Maestría]. [Medellín, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia: 2012. 111p.
- Escobar A. Aplicación de la tecnología de barreras para la conservación individual y de mezclas de hortalizas mínimamente procesadas. [Tesis de Maestría]. [Medellín, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia: 2013. 108 p.
- Varela A, Materano W, Maffei M, Quintero I, Zambrano J. Uso de recubrimientos comestibles y baja temperatura para mantener la calidad de frutos de mango “Bocado” durante el almacenamiento. Rev. Fac. Agron. 2011 Sep 5; 28(1): 600-608.
- García J, Sandoval P, Forero F, Florian J, Salamanca G, Bernal J. Atributos de calidad del mango criollo para la agroindustria. Espinal, Colombia: Produmedios; 2010. 48p.
- Oms-Oliu G. Alternativas de envasado de peras y melón frescos cortados en atmosfera modificada. [Tesis Doctoral]. [Lleida, España]: Universidad de Lleida: 2008. 354p.
- Lin D, Zhao Y. 2007. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. Comp Rev Food Sci Food Saf. 2007 Abr 20; 6(3): 60-75.
- Valverde J, Valero D, Martínez-Romero D, Guillén F, Castillo S, Serrano M. 2005. Novel edible coating based on aloe vera gel to maintain table grape quality and safety. J Agr Food Chem. 2005 Oct 9; 53(20): 7807-7813.
- Serrano M, Valverde J, Guillén F, Castillo S, Martínez-Romero D, Valero D. Use of Aloe vera gel coating preserves the functional properties of table grapes. J Agr Food Chem. 2006 Mar 5; 54(11): 3882-3886.
- Martínez-Romero D, Alburquerque N, Valverde J, Guillén F, Castillo S, Valero D, Serrano M. Postharvest sweet cherry quality and safety maintenance by Aloe vera treatment: A new edible coating. Postharvest Biol Tec. 2006; 39(1): 93-100.
- Restrepo J. Conservación de fresa (*Fragaria X Ananassa* Duch Cv. Camarosa) Mediante la aplicación de recubrimientos comestibles de gel de mucílago de penca de sábila (*Aloe barbadensis* Miller). [Tesis de Maestría]. [Medellín, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia: 2009. 83p.
- Chauhan O, Raju P, Singh A, Bawa A. Shellac and aloe-gel-based surface coatings for maintaining keeping quality of apple slices. Food Chem. 2011 Jun 1; 126(3): 961-966.
- Benitez S, Achaerandio I, Sepulcre F, Pujola M. 2013. Aloe vera based edible coatings improve the quality of minimally processed ‘Hayward’ kiwifruit. Postharvest Biol Tec. 2013 Jul; 81(1): 29-36.
- Martínez-Romero D, Castillo S, Guillén F, Diaz-Mula H, Zapata P, Valero D, Serrano M. Aloe vera gel coating maintains quality and safety of ready-to-eat pomegranate aril. Postharvest Biol Tec. 2013 Dic; 86(1): 107-112.
- ICONTEC. Norma Técnica Colombiana. NTC 5210. Frutas Frescas. Mango. Variedades Mejoradas. Especificaciones. Bogotá, Colombia: ICONTEC; 2013. 31p.
- Siddiq M, Akhtar S, Siddiq R. Mango processing, products, and nutrition. En: Siddiq M, editores. Tropical and subtropical fruit processing and packaging. Primera Edición. New Delhi, India: John Wiley & Sons, Inc; 2012. 277-297p.
- Oliveira E, Gutierrez M, Jacomino P, Puschmann R, Ferreira N, Elesbao R, Yaguiui P. Formas de presentación. En: González-Aguilar G, Gardea A, Cuamea-Navarro F, editores. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados.

- Primera Edición. Guadalajara, México: Logiprint Digital S; 2005. 37-58p.
18. Chiumarelli M, Ferrari C, Sarantópoulos C, Hubinger M. Fresh cut "Tommy Atkins" mango pre-treated with citric acid and coated with cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starch or sodium alginate. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2011 Jul; 12(3): 381-387.
 19. Restrepo J, Aristizábal I. Conservación de fresa (*Fragaria x Ananassa Duch cv. Camarosa*) mediante la aplicación de recubrimientos comestibles de gel mucilaginoso de penca sábila (*Aloe Barbardensis* Miller) y cera de carnauba. *Vitae.* 2010 Ago 19; 17(3): 252-263.
 20. Ramírez J, Aristizábal I, Restrepo J. Conservación de mora de Castilla mediante la aplicación de un recubrimiento comestible de gel de mucílago de penca de sábila. *Vitae.* 2013 Nov 21; 20(3): 172-183.
 21. Ravindra M, Goswami T. Modelling the respiration rate of green mature mango under aerobic conditions. *Biosystems Engineering.* 2008 Feb; 99(2): 239-248.
 22. Brito A. Aplicación de recubrimientos a base de quitosano y aceite esencial de limón en el control de la poscosecha de la podredumbre azul de naranjas. [Tesis de Maestría]. [Valencia, España]: Universidad Politécnica de Valencia; 2012. 20p.
 23. ICONTEC. Norma Técnica Colombiana. NTC 4519. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30 °C. Bogotá, Colombia: ICONTEC; 2009. 12p.
 24. ICONTEC. Norma Técnica Colombiana. NTC 4132. Microbiología. Guía general para el recuento de mohos y levaduras. Técnica de recuento de colonias a 25 °C. Bogotá, Colombia: ICONTEC; 1997. 10p.
 25. ICONTEC. Norma Técnica Colombiana. NTC 4574. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para salmonella SPP. Bogotá, Colombia: ICONTEC; 2007. 27 p.
 26. INVIMA. Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano. Bogotá, Colombia: INVIMA; 1998.
 27. ICONTEC. Norma Técnica Colombiana. NTC 3932. Análisis sensorial. Identificación y selección de descriptores para establecer un perfil sensorial por una aproximación multidimensional. Bogotá, Colombia: ICONTEC; 1996. 20p.
 28. Kester J, Fennema O. Edible films and coatings: a review. *Food Technol.* 1986 Dec; 40(12): 47-59.
 29. Torres J. Optimización de las condiciones de operación de tratamientos osmóticos destinados al procesamiento mínimo de mango (*Mangifera indica* L.). [Tesis Doctoral]. [Valencia, España]: Universidad Politécnica de Valencia; 2007. 342p.
 30. Carreño L, Nocua O. Efecto combinado de dos recubrimientos comestibles con atmósfera modificada en mango (*Mangifera indica* L.) variedad Tommy Atkins mínimamente procesado refrigerado. [Trabajo de grado]. [Bogotá, Colombia]: Universidad de La Salle; 2011. 97p.
 31. Abbasi N, Iqbal Z, Maqbool M, Hafiz I. Postharvest quality of mango (*Mangifera Indica* L.) fruit as affected by chitosan coating. *Pak J Bot.* 2009 Feb; 41(1): 343-357.
 32. Sothornvit R, Rodsamran P. Mango film coated for fresh-cut mango in modified atmosphere packaging. *Int J Food Sci Tech.* 2010 Ago; 45(8): 1689-1695.
 33. De Souza M, Ascari C, Magalhaes K, Machado C. Pós-colheita de mangas "Tommy Atkins" Recobertas com quitosana. *Rev Bras Frutic Jaboticabal-SP.* 2011. Vol. Especial: 337-343p.
 34. Navarro D, Díaz-Mula H, Guillén F, Zapata P, Castillo S, Serrano M, Valero D, Martínez-Romero D. Reduction of nectarine decay caused by *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum* with Aloe vera gel alone or with the addition of thymol. *Int J Food Microbiol.* 2011 Dec 2; 151(1): 241-246.
 35. Chien P, Sheu F, Yang F. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *J Food Eng.* 2007 Ene; 78(1): 225-229.
 36. Djoua T, Charles F, Freire M, Filgueiras H, Ducamp-Collin M, Sallanon H. Combined effects of postharvest heat treatment and chitosan coating on quality of fresh-cut mangoes (*Mangifera indica* L.). *Int J Food Sci Tech.* 2010 Abr; 45(4): 849-855.
 37. Alikhani M. Enhancing safety and shelf life of freshcut mango by application of edible coatings and microencapsulation technique. *Food Sci Nutr.* 2014 May; 2(3): 210-217.
 38. Figueroa J, Salcedo J, Narváez G. Efecto de recubrimientos comestibles a base de almidón nativo y oxidado de yuca sobre la calidad de mango (*Tommy Atkins*). *Temas Agrarios.* 2013 Jul-Dic; 18(2): 94-105.
 39. Sothornvit R, Rodsamran P. Effect of a mango film on quality of whole and minimally processed mangoes. *Postharvest Biol Tec.* 2008 Mar; 47(1): 407-415.
 40. Kays S. Postharvest physiology of perishable plant products. New York, USA: Van Nostrand Reinhold; 1991. 532p.
 41. Navarro C. Recubrimientos Comestibles A Base De Hidroxipropil Metilcelulosa: Caracterización Y Aplicación. [Tesis Doctoral]. [Valencia, España]: Universidad Politécnica De Valencia. 2010. 270p.
 42. Jafarizadeh H, Osman A, Tan C, Abdul Rahman R. Evaluation of effectiveness of three cellulose derivative-based edible coatings on changes of physico-chemical characteristics of 'Berangan' banana (*Musa sapientum* cv. Berangan) during storage at ambient conditions. *Int Food Res J.* 2011 Ene; 18(4): 1381-1386.
 43. Dussán S, Torres C, Reyes P. Efecto del recubrimiento comestible sobre los atributos físicoquímicos de mango 'Tommy Atkins' mínimamente procesado y refrigerado. *Acta Agronómica.* 2014 May 19; 63(3): 1-11.
 44. Fontes L, Sarmiento S, Spoto M, Dias C. Conservação de maçã minimamente processada com o uso de películas comestíveis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2008 Oct-Dic; 28(4): 872-880.
 45. Camañas C. Incorporación de aceites esenciales en la conservación del caqui "rojo brillante" y melón "piel de sapo" mínimamente procesados. [Tesis Doctoral]. [Valencia, España]: Universidad Politécnica De Valencia. 2012. 208p.
 46. Chiumarelli M, Pereira M, Ferrari C, Sarantópoulos C, Hubinger M. Cassava starch coating and citric acid to preserve quality parameters of fresh-cut "Tommy Atkins" mango. *J Food Sci.* 2010 Jun; 75(5): 297-304.
 47. Martin-Belloso O, Soliva- Fortuny R, Baldwin E. 2005. Conservación mediante recubrimientos comestibles. En: González-Aguilar G, Gardea A, Cuamea-Navarro F, editores. Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. Primera Edición. Guadalajara, México: Logiprint Digital S; 2005. 341-356p.

EVALUATION OF PHARMACOTHERAPY USED ON GERIATRIC POPULATION IN AN INSTITUTION OF SPECIAL REGIME WITH THE SCREENING TOOL OF OLDER PERSONS' POTENTIALLY INAPPROPRIATE PRESCRIPTIONS (STOPP) CRITERIA

EVALUACIÓN DE LA FARMACOTERAPIA EN POBLACIÓN GERIÁTRICA DE UNA INSTITUCIÓN DE RÉGIMEN ESPECIAL CON LOS CRITERIOS THE SCREENING TOOL OF OLDER PERSONS' POTENTIALLY INAPPROPRIATE PRESCRIPTIONS (STOPP).

Ana María HERRERA E.¹ QF MSc, José Julián LÓPEZ G.^{1*} QF MSc

Recibido: Julio 05 de 2015. Aceptado: Mayo 27 de 2016.

ABSTRACT

Background: Geriatric patients represent a major challenge for appropriate prescription because they have significant changes in vital areas, multiple comorbidities among other things that encourage their fragility. In light of current evidence, the number of prescription errors increases with age and with the number of drugs USED, showing that people over 65 is at greater risk of medical error when more than 8 drugs are consumed. **Objectives:** To identify and describe the inappropriate medicines in elderly people in order to propose an institutional prescription guide based on the results of the application of the Screening Tool of Older Persons' Potentially Inappropriate Prescriptions (STOPP) assessment methodology. **Methods:** A cross-section observational study with a retrospective collection of information was carried out in order to identify the frequency of inappropriate prescriptions in 300 elderly patients that were over 65 years, with a consumption of more than 5 medications and applying the STOPP criteria. The study was made in a special regime medical institution, reviewing medical records and considering variables such as number of medications, indications, dosage, therapeutic duplication, interactions and contraindications, among others. **Results:** The principal diagnosis was hypertension (47%) followed by diabetes mellitus (10%) and other hypothyroidisms (4%). After applying the STOPP criteria to each of the medical records, it was found that 50.7% (152) of the studied population had at least one inappropriate prescription distributed as follows: 2 prescriptions had 4 STOPP criteria, 7 prescriptions had 3 STOPP criteria, 28 had 2 STOPP criteria and 115 had 1 STOPP criteria. **Conclusions:** It was found that half of the prescriptions have at least one inadequate prescribed criteria, being the most important the inappropriate use of not indicated drugs or without an indication. Finally, guidelines for the rational use of drugs in the elderly with every detail of this institution are proposed.

Keywords: Elderly, potentially inappropriate prescribing, polypharmacy, medication errors.

¹ Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia

* Autor de correspondencia: jjlopezg@unal.edu.co

RESUMEN

Antecedentes: Los pacientes geriátricos representan un reto importante para la prescripción apropiada porque tienen cambios significativos en sus funciones vitales y múltiples comorbilidades, entre otros, que los hacen frágiles. A la luz de la evidencia actual, el número de errores de prescripción aumenta con la edad y con el número de fármacos, demostrando que las personas mayores de 65 años tienen mayor riesgo de sufrir un error médico cuando se consumen más de 8 medicamentos. **Objetivos:** Identificar y describir los medicamentos inapropiados en adultos mayores con el fin de proponer una guía de prescripción institucional basada en los resultados de la aplicación de los criterios de evaluación de prescripción potencialmente inapropiados en adultos mayores (STOPP). **Métodos:** Se llevó a cabo un estudio observacional descriptivo de corte transversal, con recolección retrospectiva de información. Se cuantificó la frecuencia de prescripciones inadecuadas en 300 pacientes mayores de 65 años y con un consumo de más de 5 medicamentos. Posterior a esto se aplicaron los criterios STOPP por revisión de historias clínicas en una institución de régimen especial teniendo en cuenta variables como el número de medicamentos, indicación, posología, duplicidad terapéutica, interacciones, contraindicaciones, entre otros. Los criterios STOPP de prescripciones potencialmente inadecuadas contemplan el análisis por sistemas fisiológicos buscando posibles interacciones medicamentosas, contraindicaciones, duplicidad terapéutica y medicamentos que puedan representar un riesgo en adultos mayores por presentar cambios en su farmacocinética. **Resultados:** El diagnóstico principal es la presión arterial alta (47%), seguida de la diabetes mellitus (10%) y otros hipotiroidismos (4%). Después de aplicar los criterios STOPP para cada una de las historias clínicas, se encontró que el 50,7% (152) de la población del estudio tenía al menos una prescripción inadecuada distribuida de la siguiente manera: 2 recetas tenían 4 criterios STOPP, 7 recetas tenían 3 criterios STOPP, 28 tenían dos criterios STOPP y 115 tenían 1 criterios STOPP. **Conclusiones:** Se encontró que la mitad de las recetas tienen al menos un criterio de prescripción inadecuado, siendo el más importante el uso inadecuado de los medicamentos no indicados o sin indicación aparente. Por último, se proponen directrices para el uso racional de los medicamentos en los ancianos con todos los detalles de esta institución.

Palabras clave: Ancianos, prescripción potencialmente inadecuada, metodología STOPP, polifarmacia, errores de medicación.

INTRODUCTION

In the Fact Sheet number 338, the World Health Organization (WHO) reported that over 50% of drugs that are prescribed, dispensed or sold improperly and half of all patients fail to consume or use its medicines adequately [1]. This is mainly related to the appearance of adverse reactions, patients perceiving that the treatment as ineffective or because the drug intake scheme is very complicated. [2]

It is a challenge for physicians to provide a comprehensive care for elderly as aging is a complex process that affects many vital and organic system; in general, as older a patient gets, more medication is needed which leads to increased morbidity and mortality. Elderly patients have significant changes in the pharmacokinetic and pharmacodynamics profiles, a decrease in homeostatic mechanisms,

prescription at different healthcare levels, among others. [3]

It can be understood as a prescribing error, the wrong drug selection by indications, contraindications, known allergies, existing drug therapy, dose, dosage form, quantity, route, concentration, frequency of administration, instructions, illegible prescriptions and prescriptions that induce errors that could reach the patient. [4]

Geriatric patients represent a great challenge for proper prescription because they have multiple comorbidities for which, in most cases, they must take medications that leads to an increased risk of Adverse Drugs Reactions (ADRs) (a 35% of patients with polypharmacy are in a risk to present an ADR, and the 12% has to be admitted in an emergency service) [5], nonadherence, and an increased risk of morbidity and mortality as evidenced by an increase in health care costs [6].

The study by Gopinath et al [6] showed that 57% of American women over 65 years use more than 5 drugs, 12% use 12 or more medications, 60% were using at least one medicine without indication and 16% presented a therapeutic duplication. This data disregards the “Over The Counter” medicines (OTC), it is estimated that over 90% of the population use at least one OTC and about 50% use 2-4 of these medications. The prescription drugs most used are those listed for the cardiovascular system, and concerning the most used nonprescription medications are analgesics, vitamins, *Ginkgo biloba*, and antacids. [6]

In a study by Bregnhoi et al [8], 212 records were reviewed and it was shown that 39.5% had at least one inappropriate prescription according to the Medication Appropriateness Index criteria (MAI). In total, 12.3% of drugs were not indicated, 6% were being ineffective, 6.7% had dose errors, 0.7% had no proper instructions, 0.7% had clinically important drug interactions, 8.6% contraindications were clinically important, 3.1% had therapeutic duplication, the duration of treatment in 16.5% of prescriptions was not adequate and 27.1% did not represent the best cost/benefit alternative. Moreover, Hanlon et al [8] showed that patients who had polypharmacy are at increased risk of inappropriate prescribing with an OR of 1.28 95% CI (1.21 to 1.36).

There are several screening tool to identify Potentially Inappropriate Prescribing (PIP). McLeod (1987) have 38 indicators, IPET (2000) have 14 indicators and Beers (2003) have 48 indicators. However, all of them have limitation due to changing evidence, the licensing of important new drugs and the recognition of a more extensive list of PIP, lacking in clinical importance or prevalence of some criteria. A PIP is described as a poor risk – benefit balance, over-prescribing, miss-prescribing, or under-prescribing.

In light of the current evidence, the number of PIP increases with age and with the number of drugs. It has shown that people over 65, have a higher risk of having a PIP that matches the consumption of more than 8 drugs. [9] This project take into account the number of patients, medications and cost of institutional attention discussed above, to identify and describe the most common PIP in elderly people in order to propose an institutional prescription guide based.

MATERIALS AND METHODS

A cross-section observational study with a retrospective collection of information was carried in elderly patients that were over 65 years, with a consumption of more than 5 medications during January to May of 2013. The study was made in a special regime medical institution of low complexity, reviewing medical records and considering variables such as number of medications, indications, dosage, therapeutic duplication, interactions and contraindications, among others.

For the calculation of sample size, a total population of 2160 people was considered, with an expected prevalence of inappropriate prescribing of 34.5% (calculated using the weighted average of the data obtained from the literature review [8, 22, 23, 24]). For a confidence level of 95%, a sample size of 300 was obtained. The selection was made by a simple random sampling without replacement, using random numbers on a spreadsheet in Microsoft Excel®.

The variables considered for the development of the study and data collection were: age, gender, ICD 10 diagnosis, the number of drugs used, drugs that are not indicated, dosing regimen, the duration of the treatment, therapeutic duplication, interactions (showed by Micromedex®), contraindications, diagnosis of kidney disease, liver disease diagnosis and finally, the prescriptions were evaluated with the STOPP criteria.

All variables were recorded on a data collection tool in Excel® 2010.

This project is considered as a without risk investigation under Article 11 of Resolution 8430 of 1993 issued by the Ministry of Health. The protocol was approved by the institutional ethics committee.

RESULTS

Sociodemographic characterization of the population

For 2011, in the institution there was a population of 2,160 people over 65, who consumed five or more drugs, which represented 16.6% of the total population and 36.3% of spending, compared to total drug budget. The average cost of each prescription in this group was COP 284,149 (CI95% 1.730-841.082) equivalent to half Colombian statutory minimum wages. The median number of drugs used was 7 (IQR 6 - 9). Of the 2,160 patients

300 clinical records were analyzed, in which the average age was 74.5 years (95% CI 73.7 to 75.4; 51.4% were women (154) and the median amount of drugs consumed is 7 (RQ 5-11).

Pathologies and prescribed medications in the geriatric population

The principal diagnosis according to ICD 10 is high blood pressure with a 47%, followed by an unspecified diabetes mellitus with a 10% and other hypothyroidisms with a 4% of the population. In general, the most frequent diseases were of the cardiovascular type, followed by disorders of the thyroid gland, lung and central nervous system.

Furthermore, it was observed that the 36% of drug consumption was related to the treatment of diseases of the cardiovascular system. The drug more frequently prescribed was Losartan with 126 prescriptions, followed by Atorvastatin with 98 prescriptions and Hydrochlorothiazide with 84 prescriptions. In the second place, a 24% of the prescriptions were drugs related to the alimentary tract and the metabolism, where the medicine more often prescribed was Omeprazole with 150 prescriptions (50% of the total population), followed by Calcium citrate + Vitamin D with 46 prescriptions.

Frequency of inappropriate prescriptions

The analysis of the study variables showed that 63.7% (191) of the indications of drugs were related with pathology, while in 36.3%, at least one of the drugs used did not have any indication when compared with the diagnoses reported in the medical record. The drug more often prescribed without being indicated (secondary prevention of acute myocardial infarction) was acetylsalicylic acid (ASA) 100 mg in patients who haven't suffered cerebrovascular events. Regarding the dosage regimen, it was found that a person was sub-dosed (0.3%) with a prescription of ASA every 48 hours to prevent vascular events and 10 people had overdosed (3.3%) primarily related to the consumption of Losartan 200 mg/day, an intake of Pregabalin of 900 mg daily, a consumption of clonidine and colchicine above maximum doses, and finally a consumption of 600 mg/day of Fenofibrate when the maximum dose of the drug is 200 mg/day. [21]

Related to the duration of treatment was found that 1% of the individuals had treatments that exceed the indicated time, among which are those with a consumption by more than three years of

Alendronate. Facing the therapeutic duplication, the 4% had drugs with the same mechanism of action mainly the following medications: Calcitriol with Vitamin D, Nimodipine with Nifedipine and over two Non-Steroidal Anti Inflammatory Drugs (NSAIDs) for pain treatment.

Regarding the pathological disorders, it is evidenced that 19.3% (58) of the population has kidney damages and 6.3% (19) have hepatic impairment. In relation to drug-drug interactions and its contraindications, this study showed that 16.6% (50) of the population had potential drug-drug with high clinically significant interactions and a 17.3% (52) had contraindications related to drug interactions-pathology as the query in Micromedex[®] showed us. Among common drug-drug interactions there are VitaminD - Calcitriol, ACE inhibitors-Allopurinol, Fibrates-Statins, Leflunomide-Methotrexate-Prednisolone, Warfarin-ASA, Clopidogrel-Omeprazole. Between the interactions drugs-disease, the most common is the use of Metformin, Allopurinol and NSAIDs in people with kidney failure.

When analyzing the beginning of treatment of diseases with second-line drugs it was found that 31.3% (94) of the population began treatment with these medications including for the management of dyslipidemia, with Atorvastatin without having started with Lovastatin, cardiovascular diseases, with Metoprolol succinate without having started with Metoprolol tartrate, gastroesophageal reflux, with Esomeprazole without having started with Omeprazole and Nifedipine without having started with amlodipine or other smaller scale calcium channel blocker; implying exhaustion of therapeutic alternatives and higher costs for the institution.

After applying the STOPP criteria to each of the medical records, it was found that 50.7% (152) of the study population had at least one inappropriate prescription distributed as follows: 2 prescriptions had 4 STOPP criteria, 7 prescriptions had 3 STOPP criteria, 28 had 2 STOPP criteria and 115 had 1 STOPP criteria. Different studies have shown a high prevalence of PIP ranging from 19.2% [10] to 58% [11], but these results depend on the methodology used for this purpose. The criterion most frequently repeated was the use of ASA without history of cerebrovascular disease with 40%, followed by the use of Pump Proton Inhibitors (PPIs) for peptic ulcer full therapeutic doses over 8 more weeks with 8% frequency.

Finally, figure 1 shows algorithm proposed to management medicines in older patients.

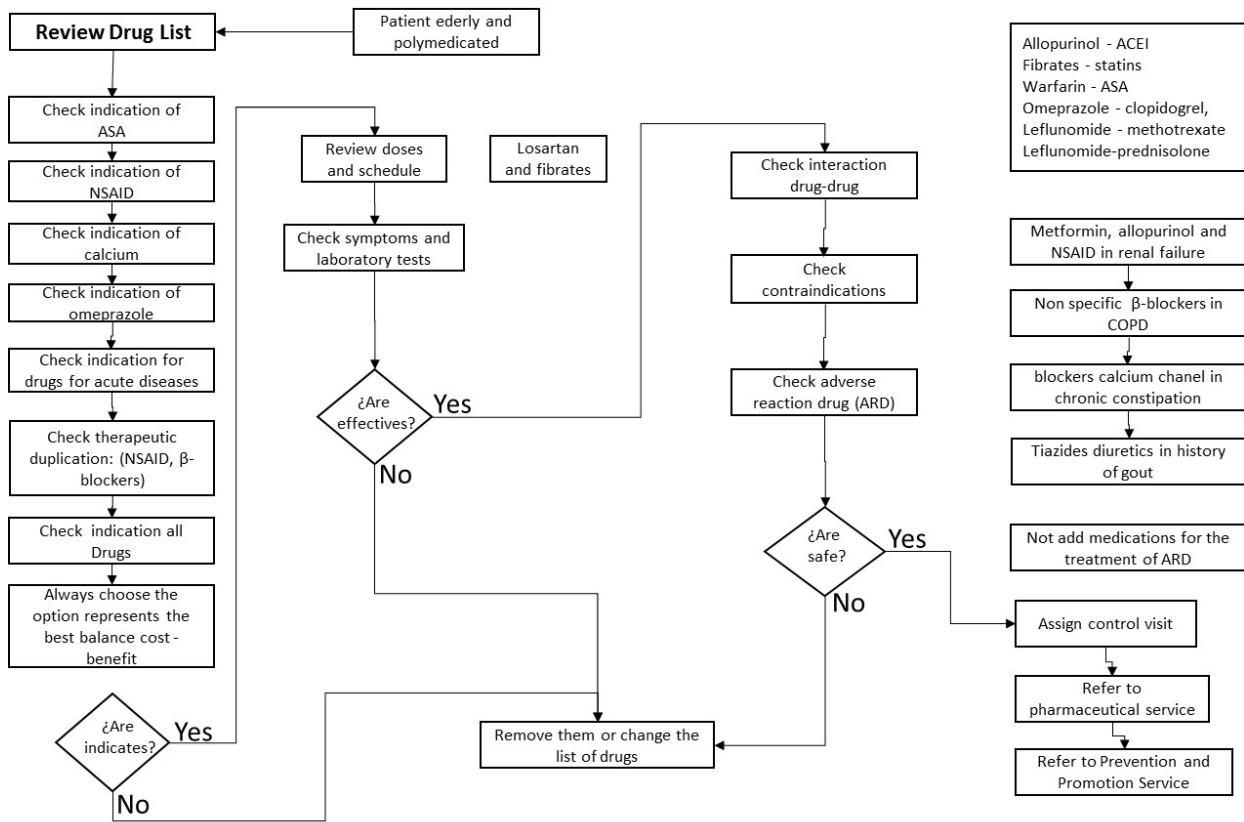


Figure 1. Algorithm to management drugs in older patients

Abbreviation: ASA: acetylsalicylic acid; NSAID: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease; ADR: Adverse Drug Reaction

DISCUSSION

There are several methodologies for evaluating inadequate prescriptions in Elderly Patients (EP), PIP were found in ranges from 20 to 58% [12-15] which showed a high risk to have a PIP in this population. STOPP and START criteria were developed in 2006 in Ireland by the European Union Geriatric Medicine Society in order to obtain a new listing that would evaluate the given PIP and pharmacological criteria of need, were validated by Delphi consensus among several researchers including geriatricians, primary care physicians and pharmacists [25]. It is noteworthy that this tool is not intended to substitute the clinical judgment, so that drug treatment should be individualized based on the needs and health problems of each EP.

All main diagnoses found are related to Chronic Non-Transmissible Diseases (NTDs) such as hypertension, diabetes mellitus and obesity affecting EP. [17] Given that hypertension and diabe-

tes mellitus are the main diagnoses found in the study, a strategy to implement in the institution is mandatory referral to the nutritionist with the aim to improve habits and health and safety measures relevant to each case.

The drug most commonly prescribed without being indicated is acetylsalicylic acid in patients who haven't suffered cerebrovascular events, because the risk of bleeding and gastric irritation is increased compared with the cardiovascular benefit when using ASA in primary prevention. [17] This result is high compared with those reported in the literature with values of 12% [5, 7] which means that it must be developed a strengthening in the review of all indications of drugs in the EP.

In literature are reported dosage errors by 6.7% [7] although the data found in this study is lower than that reported in literature, the consumption of drugs not specified and/or higher than the recommended doses, exposes the EP to the risk of adverse events related to drugs, unwanted physiological

responses to exercise, promote drug interactions, adverse reactions and more. Sometimes the EP receives medications for the treatment of acute diseases, but those are included in the prescription and without further review of the evolution of the disease are still prescribed by “repeated formula”.

On the other hand, the variable duration of the treatment, it was evidenced that 1% are with treatments over time, indicated mainly by the relation in the consumption of more than three years of alendronate, the study realized by Erviti [18] questions the effectiveness of bisphosphonates after consumption for more than 3 years because they produce alteration of the bone structure.

Although the risks of certain interactions are known, sometimes there is no alternative treatment, so the risk should be reduced by adjusting doses (in case of interactions dependent of dosage) or the schedule of the medication intake (in the event that it is an interaction in time-dependent). In case that it cannot be solved by these methods, there should be considered closely monitoring for therapeutic failure or toxicity. Furthermore, strategies should be developed for the identification and the prevention of drug prescription that can interact, such as continuous training in order to develop skills versus managing medications in EP. For example, the number of drugs prescribed should be the minimum necessary, it should be verified if they are achieving the therapeutic effect in the dose, duration and indication signs and symptoms, through reviewing and periodically sending control laboratory tests in order to monitor therapy. Also, if an adverse reaction is found, the suspected drug is removed from the list or it is substituted with a drug which has a different drug mechanism, always avoiding the prescription of medication for the treatment of adverse reactions. Particularly, in the case of EPs, if the patient evidenced weakness, dizziness, depression, incontinence, among others, medications should be suspected.

Drug-related problems (DRPs) can be classified according to their origin [19] and it is related to the supply (access or necessity), and the drug use (physiological situations that modify the pharmacokinetics, possibility of resistance, interactions among others). In general criteria STOPP are classified as pharmacological DRPs since most of them are taken into account the pharmacodynamic and pharmacokinetic changes affecting EP and considered if the drug whether or not indicated

by special physiological conditions, pathologies or the presence of another drug. Among the pharmacological criteria are most evident the use of beta-blockers in cardio-selective presence of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and the use of calcium antagonists in patients with chronic constipation which can ultimately aggravate both conditions. The DRPs related to the use, could not be quantified in the study because of the method of data collection.

As evidenced by several studies [5, 7, 8, 12, 20, 15], consumption of more than 5 medications means a high risk of causing ADR, that added to the result of inappropriate prescribing obtained in this study, half of the population with the methodology STOPP are constantly at risk, because of that, measures must be taken for identification and prevention of PIP. It is proposed to strengthen the integration of clinical services to the pharmaceutical service that also aims to contribute in a harmonious and integral way to improve the quality of individual and collective life under the Health Promotion and Prevention.

It is necessary to separate the natural aging process of the diseases suffered by EPs to find the best balance at the time of prescription and not fall into the loop of the “medicalization of life” in the sense of considering processes related to natural aging like osteoporosis, menopause, among others as illnesses requiring treatment. It is noteworthy that in EPs and in the “less is more” drug therapy, the efficiency on prescription does not necessarily try to make it faster or cheaper, but to make it rational, in every sense of the word.

Limitations of the study

The main limitation of the study is to be conducted at an institution of special arrangements and a characteristic population, in this case EPs, so the results could not be extrapolated to other populations primarily with other care regime health. It is important to recognize this limitation though is that the EPs of the institution under study are different from other institutions because of special regime, making them of a different membership scheme that is particularly condescending and permissive.

It is important to recognize that due to the methodology of data collection, there may be a limitation related to the collection of information, caused by the diagnosis sub registry in the clinical records or the indications concerning secondary

pathologies that link the indication of drugs that are not used for the treatment of diseases object of the study. However, in cases where clearly evidenced no indication of a drug is proceeded to check up in medical history three years ago to try control this limitation.

In the application of STOPP criteria, sometimes the lack of detailed information on the medical record did not allowed to apply the criterion safely; it was applied only to the list of drugs and diagnostics reported in the medical history, which can represent a sub diagnosis and no complete record of the drug and no evidence that consumption of OTC drugs, homeopathic among others.

ACKNOWLEDGEMENTS

It is a great opportunity to present my deepest gratitude to all those who have collaborated with their help in the development of this work, especially to the Faculty of Pharmacy of the Universidad Nacional de Colombia. Authors declare that we have no conflict of interest with the results of this research.

REFERENCES

- Organización Mundial de la Salud. com. Medicamentos: Uso Racional de los Medicamentos. Nota descriptiva N.º 338. Mayo de 2010 [actualizada el 01 Dic 2012; acceso en 15 de Noviembre de 2011]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs338/es/>
- Ramos G, Olivares G. Guías para las buenas prácticas de prescripción: Metodología para la prescripción racional de medicamentos. Ministerio de Salud Chile. 2010. [actualización: 9 Feb 2010 – Fecha de acceso: Agosto 2011]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19008es/s19008es.pdf>
- Sempere E, Vivas Cristina. Uso racional de los medicamentos: Apuntes para el médico de Familia. Grup del medicament. Societat Valenciana de Medicina Familiar i Comunitaria. 2011. [actualización: Enero 2011; Fecha de Consulta: Noviembre 2011] Disponible en: <https://katharsismedicina.files.wordpress.com/2011/12/uso-racional-de-fc3a1rmacos.pdf>
- International Society of Drug Bulletins. Adherencia al tratamiento farmacológico en patologías crónicas. País Vasco. 2011. [Fecha de actualización Mayo 2011; fecha de acceso 02 Diciembre 2011]. Disponible en: http://www.osakidetza.euskadi.net/r85-pkcevi04/eu/contenidos/informacion/cevime_infac/eu_miez/adjuntos/infac_v19_n1.pdf
- Gopinath S, Rajalingam, Sriram, Vijayakumar. An individual based study of the geriatric population: a polypharmacy. Int J Pharm Pharm Sci. 2011; 3(4): 63-66.
- Claudene J, Jacobs L. Geriatrics medication management rounds: A Novel approach: Medication Screening cuestionaire. J Am Geriatr Soc. 2011; 59: 138-142.
- Bregnhøj L, Thirstrup J, Kristensen M, Bjerrum L, Sonne J. Prevalence of inappropriate prescribing in primary care. Pharm World Sci. 2007; 29(3): 109-115.
- Hanlon J, Schmader E, Samsa P. A method for assessing drug therapy appropriateness. J Clin Epidemiol. 2007; 45: 1045-1051.
- Zavaleta M, Castro L, Reyes I, López M, Bermúdez M. Prescription errors in a primary care university unit: urgency of pharmaceutical care in Mexico. Braz. J. Med. Biol. Res. 2008; 44(1): 115-126.
- MuathFahm, Hassan, Ghazali, AlRazzaq. Predictors of polypharmacy and adverse drug reactions among geriatric in patients at malaysian hospital. Health MED. 2010; 4(2): 273-285.
- Christy W, Ledford A, Villagrana M, Kreps G, Zhao X, McHorneyb C, Weathers M, Keefe B. Patient perceptions of physician communication and the process of prescription. Patient Educ Couns. 2010; 80: 384-392.
- Cahir C, Fahey T, Teeling M, Teljeur C. Medication errors: Definitions and classification. Br J ClinPharmacol 2010; 69(5): 543-52.
- Aronson JK Fonte. Medication errors: definitions and classification. Br J ClinPharmacol 2009; 67(6): 599-604.
- MuathFahmi, Hassan, Ghazali, AlRazzaq. Predictors of polypharmacy and adverse drug reactions among geriatric in patients at malaysian hospital. Health MED. 2010; 4(2): 273-285
- Christy W, Ledford A, Villagrana M, Kreps G, Zhao X, McHorneyb C, Weathers M, Keefe B. Patient perceptions of physician communication and the process of prescription. Patient Educ Couns 2010; 80: 384-392.
- Escuela Andaluza de Salud Publica. Aproximación del tratamiento farmacológico en ancianos. 2011. [actualización Abril 2011; Fecha de acceso 16 de Junio de 2012] Disponible en: <http://www.easp.es/web/documentos/MBTA/00001176documento.pdf2012>.
- Hughes, Sue. Thrombosis Guidelines Provide Weak Recommendation of Aspirin. 2012 [actualización: Enero de 2012; Fecha de acceso: 13 de Marzo de 2012] Disponible en: <http://www.medscape.org/viewarticle/759145?src=cmemp>.
- Erviti J. Problemas óseos asociados al uso de bifosfonatos: ¿Evitan o producen fracturas? BIT. 2009; 17(5): 65-84
- López J, Vacca C. En: Propuesta para la implementación y desarrollo de programas de seguimiento farmacoterapéutico a personas con patologías crónicas, coordinador. Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia. 2009. 1-83 p.
- OlivenaA, Michalakea I, Zalmana D, Dormana E, Yeshurunb D, Odeha M. Prevention of prescription errors by computerized, on-line surveillance of drug order entry. Int J Med Inform .2005; 74: 377-386.
- Thomson Reuters. Base de datos MICROMEDEX® 1.0 (Health Series). Bases de datos. [actualización: Abril 2016-fecha de acceso: Ago-Nov 2011]Disponible en: <https://www.micromedexsolutions.com/home/dispatch/ssl/true>
- Holguín E, Orozco J. Medicación potencialmente inapropiada en ancianos en un hospital de primer nivel, Bogotá. Rev. Salud Pública. 2010; 12(2): 287-299.
- Villalobos A, Cheng T, Martínez K, Torres P, Hernández L, Flores G. El error médico en la prescripción de medicamentos y el impacto de una intervención educativa. Bol Med Hosp Infant Mex. 2007; 64: 83-91.
- WHO. Introduction to Drug Utilization Research En: WHO International Worling Group for Drug Statistics Methodology. Oslo Norway. 2003. 4-49 p.
- O'Mahonya D, Gallagher P, Ryan C, Byrne C, Hamilton H, Barry P, O'Connor M. STOPP & START criteria: A new approach to detecting potentially inappropriate prescribing in old age. European Geriatric Medicine. 2010; 1: 45-51.

EVALUADORES / REVIEWERS

El comité Editorial expresa sus agradecimientos a todas las personas que colaboraron en la evaluación de los manuscritos puestos a consideración para ser publicados en la Revista Vitae Volumen 23 No. 1.

Editorial Board expresses gratitude to reviewers who cooperated with the evaluation process of all the manuscripts published in this volume 23 N°1 of Revista Vitae.

Elena María Vega
Universidad de Chile
Santiago, Chile

Elizabeth Parody
Universidad Icesi
Cali, Colombia

José María Prieto García
UCL
Londres, Reino Unido

María Álvarez de Sotomayor
Universidad de Sevilla
Sevilla, España

Isabel Vicario Romero
Universidad de Sevilla
Sevilla, España

Diana Granda Restrepo
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

María Dolores García Giménez
Universidad de Sevilla
Sevilla, España

Edison Osorio Durango
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

Gloria Tobón
Universidad de Antioquia
Medellín, Colombia

Mirari Arancibia
Universidad Técnica de Ambato (UTA)
Ecuador

Silvia Bautista
Instituto Politécnico Nacional
México

Ricardo Andrade Pizarro
Universidad de Córdoba
Córdoba, Colombia

Lilian Elizabeth Abugoch James
Universidad de Chile
Chile

Luis Felipe Muriel Millán
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad de México, México

Ramses Gallegos-Monterrosa
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Germany

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES*

Acta 22 de Junio de 2012

ALCANCE Y POLÍTICA DE REVISIÓN

La Revista VITAE es una publicación científica de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia, con una periodicidad cuatrimestral, que tiene como misión la divulgación del desarrollo y los avances académicos e investigativos en los diversos campos de las ciencias farmacéuticas, alimentarias y afines. Publica manuscritos originales e inéditos, los cuales son seleccionados por el Comité Editorial y evaluados por pares nacionales e internacionales. La responsabilidad por los juicios, opiniones y puntos de vista expresados en los manuscritos publicados corresponde exclusivamente a los autores. La posición de la Facultad se consigna en la sección Editorial.

RESERVA DE DERECHOS

El estudio y la selección de los manuscritos enviados por los colaboradores están a cargo del Comité Editorial. La recepción de un manuscrito no implica la aceptación ni publicación del mismo. En los manuscritos aceptados, el Comité Editorial se reserva el derecho de realizar las modificaciones editoriales necesarias para su publicación, al igual que su fecha de aparición en la Revista.

TIPOS Y CLASIFICACIÓN DE LOS MANUSCRITOS

La Revista VITAE publica los siguientes tipos de manuscritos:

- Artículos Resultado de Investigación
- Artículos Cortos
- Revisiones Estructuradas
- Editorial y Comentarios Editoriales
- Cartas al Editor

Los artículos son clasificados en una de las siguientes secciones:

- Alimentos: Ciencia, Tecnología e Ingeniería
- Atención Farmacéutica
- Biotecnología
- Farmacología y Toxicología
- Industrial Farmacéutica
- Productos Naturales

PRESENTACIÓN DE MANUSCRITOS

La Revista VITAE acepta para evaluación manuscritos en español y/o en inglés. El envío del manuscrito se debe realizar a través de la plataforma Open Journal System, donde la Revista administra los procesos de evaluación y

publicación. Para ello, se debe dirigir a la página web: www.udea.edu.co/vitae. De igual manera, se debe adjuntar los documentos solicitados por el equipo editorial, tal como se especifica en la información consignada en dicha página: los formatos (información del manuscrito y de los autores) y la licencia de acceso abierto. En esta página web encontrará una versión amplia de estas instrucciones, donde podrá consultar todo lo relacionado a los parámetros de presentación del manuscrito e información completa acerca de la estructura de cada uno de los tipos de manuscrito y las normas de estilos de los mismos.

REVISIÓN PREVIA AL CUMPLIMIENTO DE LAS NORMAS Y POLÍTICAS EDITORIALES:

Verificación del cumplimiento de las normas editoriales. El Equipo Editorial realiza una revisión en la que se verifica que el manuscrito cumpla con las normas estipuladas en este documento: entrega de la información solicitada, licenciamiento de la obra, estructura completa y adecuada del manuscrito y citación de acuerdo a las normas Vancouver. El autor puede verificar el cumplimiento de los requisitos antes de enviar el manuscrito utilizando la *Lista de Verificación* que se encuentra disponible en la página web, en *Author's forms and guidelines*.

Revisión Editorial. Posterior a la verificación del cumplimiento de las normas editoriales, antes de ser enviados a la evaluación por pares, el Comité Editorial realiza una evaluación previa de todos los manuscritos que cumplen las normas editoriales. El propósito de esta pre-revisión es garantizar que la estructura del manuscrito y los contenidos sean claros, pertinentes y reportados adecuadamente, con el fin de facilitar la evaluación por parte de los pares. Como resultado, el manuscrito puede ser enviado a revisión por pares, devuelto a los autores para correcciones o rechazado.

REVISIÓN POR PARES (PEER-REVIEW):

Una vez el Comité Editorial verifica que el manuscrito cumple con todos los parámetros establecidos por la Revista envía el manuscrito a dos pares, como mínimo, quienes deben emitir su concepto por escrito en el formato establecido para ello, a través de la plataforma *Open Journal*

System. El Equipo Editorial revisa y valora las evaluaciones, si es necesario se asesora de personas idóneas y como resultado, **acepta la publicación del manuscrito, lo devuelve a los autores para correcciones, o lo rechaza de forma definitiva.**

En los casos en que se solicitan correcciones, los autores deben enviar la nueva versión a través de la misma plataforma en un plazo máximo de catorce días calendario a partir de la fecha de notificación. En la corrección de pruebas de impresión final, sólo se permite cambios de forma relativos a redacción o estilo.

El manuscrito se publica en línea y de forma impresa, de la cual se envía tres ejemplares al autor principal.

COSTOS DE PUBLICACIÓN

El valor a pagar por manuscrito, exceptuando las cartas al editor y los comentarios editoriales, es de trescientos cincuenta mil pesos colombianos (\$440.000 COP), para transacciones nacionales, o doscientos dólares (\$220 USD), para transacciones internacionales. Este valor se paga cuando se notifica la aceptación para la publicación de la versión definitiva del manuscrito. La impresión de gráficos, figuras o fotografías en color es opcional y tiene un costo adicional por página necesaria de cien mil pesos colombianos (\$100.000 COP) para transacciones nacionales o sesenta y cinco dólares (\$65 USD) para transacciones internacionales.

LICENCIAMIENTO DEL MANUSCRITO

Los manuscritos publicados en la Revista VITAE quedan disponibles gratuitamente para la consulta pública, tanto en el sitio web como en los diferentes sistemas de indexación y bases de datos a los que está suscrita la Revista, bajo la Licencia Creative Commons, en el modo Attribution-Noncommercial-No Derivative Works aprobada en Colombia y por tanto son de acceso abierto (*Open Access*). Por tanto, los autores ceden, sin derecho a retribuciones económicas, a la Universidad de Antioquia, Revista VITAE, los Derechos sobre la publicación y reproducción en diferentes medios de difusión por el tiempo que establezca la normatividad vigente, mediante el documento de Licencia de Acceso Abierto a la Publicación propuesto para tal fin.

* La documentación requerida para presentar los manuscritos: los formatos, la lista de verificación, la licencia de acceso abierto a la publicación y una copia de estas instrucciones pueden ser descargados del sitio web www.udea.edu.co/vitae

INSTRUCTIONS TO AUTHORS*

Minutes No. 22 of June, 2012

SCOPE AND REVISION POLICIES

The Journal VITAE is a four-monthly scientific publication of the Pharmaceutical Chemistry Faculty of the University of Antioquia, which has the mission of spreading the voice about the development and the academic and research advances in the various fields of pharmaceutical, food and related sciences. The Journal publishes original and novel manuscripts, which are selected by the Editorial Board and evaluated by national and international peers. The responsibility over judgments, opinions and points of view expressed in the published manuscripts lies exclusively on the authors. The statement of the Faculty is recorded in the Editorial section.

RESERVATION OF RIGHTS

The evaluation and selection of the manuscripts submitted by the collaborators are in charge of the Editorial Board. The reception of a manuscript does not imply neither its approval nor publication. For the accepted manuscripts, the Editorial Board reserves the right to perform the necessary editorial modifications for its publication, as well as its release date in the Journal.

TYPES AND CLASIFICATION OF MANUSCRIPTS

The Journal Vitae publishes the following types of manuscripts:

- Articles of research results
- Short articles
- Structured Reviews
- Editorial section and Editorial comments
- Letters to the Editor

The articles are classified in one of the following sections:

- Foods: Science, technology and engineering.
- Pharmaceutical care
- Biotechnology
- Pharmacology and toxicology
- Pharmaceutical Industry
- Natural products

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

The Journal VITAE receives either English or Spanish written articles for evaluation. The submission of the article must be done through the Open Journal

System platform, where the Journal manages the evaluation and publication processes. For this, the authors must go to the web page: www.udea.edu.co/vitae. Likewise, the requested documentation by the Editorial team must be attached as it is specified through the information available in the web page: the forms (information about the manuscript and the authors) and the Open access license. In this web page the authors will find a larger version of these instructions, where will be able to find everything related to the submission parameters of the manuscript and complete information about the structure of every type of manuscript and its style rules.

PREVIOUS REVISION TO THE FULFILLMENT OF THE NORMS AND EDITORIAL POLICIES

Verification of the fulfillment of the editorial norms. The Editorial Team performs a revision in which is verified that the manuscript meets the stipulated norms in this document: submission of the requested information, licensing of the work, complete and proper structure of the manuscript and quotation in accordance with the Vancouver rules. The author may verify the fulfillment of the requirements before submitting the manuscript by using the List of verification, which is available in the web page in the Author's forms and guidelines sections.

Editorial revision. After the verification of the fulfillment of the editorial norms, and before being sent to the peers for evaluation, the Editorial Board performs a previous evaluation of all manuscripts that meet the editorial norms. The purpose of this previous revision is to guarantee that the structure of the manuscript and its contents are clear, relevant and properly reported, in order to facilitate the evaluation performed by the peers. As a result, the manuscript could be sent for peer review, returned to authors for corrections or rejected.

PEER REVIEW

Once the Editorial Board verifies that the manuscript meets all the established parameters by the Journal, the manuscript is sent to two peers, at least, who must give a written concept in the

established format for this, through the platform Open Journal System. The Editorial Team reviews and assesses the evaluations, taking advice from qualified people if necessary, and as a result may approve the publication of the manuscript, return it to the authors for corrections, or reject it definitively.

In those cases that corrections are requested, the authors must send the new version using the platform within 14 (fourteen) calendar days since the date of notification. In the correction of tests of final printing, only form changes related to redaction and style are allowed.

The manuscript is published online and in printed version, which is sent 3 (three) copies to the main author.

PUBLICATION CHARGES

The amount payable for a manuscript, excluding the letters to editor and the editorial comments, is three hundred and fifty thousand Colombian Pesos (\$440.000 COP) for national transactions, or two hundred dollars (\$220 USD) for international transactions. This amount is paid when the approval for the publication of the manuscript's final version is notified. The printing of graphics, figures or color photographs is optional and applies extra charge of one hundred Colombian Pesos (\$100.000 COP) per required page, for national transactions, or sixty five dollars (\$65 USD) for international transactions.

LICENSING OF THE WORK

The manuscripts published in The Journal VITAE remain freely available for public consultation on the web site as on the different indexing systems and data bases that the Journal is subscribed, under the license Creative Commons, in the mode Attribution-Noncommercial-No Derivative Works, adopted in Colombia, and therefore are of Open Access. Hence the authors give, without right to economical retributions, to the University of Antioquia, Journal VITAE, the copyrights on the publication and reproduction through different diffusion media by the time set in the current regulations, by filling the document of Open Access License to the publication proposed for this purpose.

* Requested documentation for the submission of manuscripts: forms, verification list, and the Open access license to the publication. A copy of these instructions can be downloaded from the web site: www.udea.edu.co/vitae

INFORMACIÓN GRUPOS DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Química Farmacéutica / Universidad de Antioquia

Grupos clasificados en convocatoria COLCIENCIAS 2013	Coordinador	Objetivo del Grupo
Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas (A1)	Prof. Edison Osorio. Magister en Ciencias Farmacéuticas. Doctor en Farmacia. Profesor Área de Fitoquímica. ejosorio48@gmail.com edison.osorio@udea.edu.co	Búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas con compuestos activos a partir de fuentes naturales. Investigación en alimentos funcionales y materias primas funcionales útiles para la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica.
Productos Naturales Marinos (A)	Prof. Diana Margarita Márquez Fernández Magister en Ciencias Químicas Doctora en Ciencias Químicas diana.marquez@udea.edu.co	Investigar la biodiversidad colombiana haciendo especial énfasis en los productos naturales marinos y búsqueda de productos naturales funcionales. Además hemisintetizar compuestos bioactivos, realizar marchas fitoquímicas, estandarizar y validar metodologías de análisis y control de calidad de medicamentos y productos afines.
Programa de Ofidismo y Escorpionismo (A1)	Prof. Sebastián Estrada. Magister en investigación y desarrollo de medicamentos. Sebastian.estrada@siu.udea.edu.co	Fortalecer la investigación interdisciplinaria en el campo de la toxínología. <ul style="list-style-type: none"> • Adelantar investigaciones relacionadas con la clínica, epidemiología y tratamiento específico de las intoxicaciones causadas por animales venenosos, plantas y microorganismos. • Realizar proyectos de investigación orientados a la búsqueda de moléculas o productos con aplicación farmacéutica, alimentaria o agrícola. • Evaluar el uso de los venenos de origen natural con potencial aplicación en los campos: farmacéutico, alimentario, cosmético y agrícola. • Consolidar y ampliar las estrategias educativas en el área de la toxínología para beneficio de la sociedad. • Formar estudiantes de pregrado y posgrado en las áreas misionales del programa y facilitar los intercambios colaborativos con sectores productivos y grupos de investigación nacionales e internacionales.
Biodegradación y Bioconversión de Polímeros - BIOPOLIMER (A)	Freimar Segura Sánchez. Magister en Ciencias Farmacéuticas. Doctor en Farmacotecnia y Biofarmacia de la Universidad de Paris Sud-Francia. Profesor del Área Industrial Farmacéutica. freimar.segura@udea.edu.co freimars@gmail.com	Biodegradar y/o bioconvertir residuos agroindustriales a productos de valor agregado como enzimas, compuestos aromáticos u otros con actividad biológica, utilizando hongos basidiomicetos o sus enzimas ligninolíticas aisladas, para obtener biocombustibles, productos farmacéuticos, alimentos para animales, o nutrientes humanos y estabilizarlos utilizando técnicas de inmovilización. Por medio de nanotecnología desarrollar transportadores inteligentes para medicamentos, cosméticos y alimentos que permitan utilizarlos de forma más segura, eficiente y eficaz.
Diseño y Formulación de Medicamentos, Cosméticos y Afines (A1)	Prof. Oscar Flórez Acosta. Doctor en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias. Profesor Área Industrial Farmacéutica. Oscar.florez@udea.edu.co	Diseño, formulación y reformulación de productos farmacéuticos, cosméticos y afines.
Estudios de estabilidad de medicamentos, cosméticos y alimentos (Reconocido)	Cecilia Gallardo Cabrera. Doctora en Ciencias Químicas. Profesora Área de Producción Farmacéutica. cecilia.gallardo@udea.edu.co,	Contribuir al desarrollo de la industria y al mejoramiento de la salud pública, a través de la investigación e implementación de estudios de estabilidad en medicamentos, cosméticos y alimentos, de acuerdo a consideraciones científicas y regulaciones nacionales e internacionales. Desarrollo de tecnologías viables para la estabilización de dichas matrices.
Promoción y Prevención Farmacéutica (A1)	Prof. Pedro Amariles Muñoz. Magister en Farmacia Clínica y Farmacoterapia. Doctor en Farmacología. Profesor Área de Atención Farmacéutica. grupoppf@udea.edu.co www.udea.edu.co/pypfarmaceutica	Evidenciar la importancia y la contribución del profesional farmacéutico a la utilización, efectiva, segura y económica de los medicamentos, al igual que al mejoramiento de las condiciones de salud de la comunidad en contexto del Sistema General de Seguridad Social de Colombia. En este sentido, el grupo se orienta a: (1) diseñar y realizar trabajos de investigación relacionados con la implementación y valoración del efecto en salud de los servicios de Atención Farmacéutica: Seguimiento Farmacoterapéutico, Dispensación, Indicación Farmacéutica, Farmacovigilancia, Farmacoeconomía y Educación en Salud; (2) diseñar, desarrollar y valorar el efecto de herramientas informáticas sobre la eficacia y eficiencia en la realización de los servicios de Atención Farmacéutica; y (3) realizar labores de extensión y asesoría relacionadas con intervenciones en promoción de la salud; prevención de la enfermedad; y orientación al uso efectivo, seguro y económico de los medicamentos.
Grupo de Nutrición y Tecnología de Alimentos (A1)	Prof. José Edgar Zapata Montoya. Doctor en Biotecnología. Profesor Área de Ingeniería Aplicada edgar.zapata@udea.edu.co jedgar_4@yahoo.com	Desarrollar nuevas propuestas alimentarias basadas en métodos de conservación no térmicos y en procesos biotecnológicos. Revalorar subproductos proteicos por medio de hidrólisis enzimática, modelar biorreactores enzimáticos y fermentativos. Aprovechar excedentes de cosecha de frutas y hortalizas por medio de deshidratación osmótica, secado en lecho fluidizado y secado convectivo. Elucidar rutas metabólicas de microorganismo de interés alimentario y farmacéutico. Evaluar nuevas sustancias de origen natural con actividad antioxidantes.
Biotecnología Alimentaria -BIOALI (A)	Prof. José Contreras Calderón. Doctor en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Profesor Área de Ingeniería Aplicada. jose.contreras@udea.edu.co jccc78@hotmail.com	Bioconvertir materias primas y residuos agroindustriales en productos de interés alimentario mediante microorganismos. Desarrollar e implementar indicadores que permitan a la industria evaluar, controlar y mejorar la calidad de productos frescos y procesados. Diseñar, formular y estandarizar nuevos productos innovadores, funcionales y con alto valor añadido. Innovar en el desarrollo de empaques alimentarios inteligentes, funcionales y amigables con el medio ambiente. Brindar herramientas a comunidades de bajos recursos para que amplíen sus opciones y tengan acceso a alimentos saludables de bajo costo.
Grupo de Investigación en Análisis Sensorial (B)	Prof. Olga Lucía Martínez Álvarez. M.Sc. Salud Pública. Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Profesora Área de Ingeniería Aplicada. gruposenensorial@udea.edu.co; grupsensorial@gmail.com	Investigar los factores que intervienen en la calidad organoléptica de alimentos, bebidas, cosméticos, productos naturales, farmacéuticos y afines en las etapas de I+D+i. Realizar investigaciones sobre caracterización sensorial de materias primas y productos, incluyendo denominaciones de origen. Investigación y desarrollo ingenieril de sistemas tecnológicos de producción para el sector agroindustrial. Estudiar la correlación fisicoquímica, instrumental y sensorial.
Grupos sin categoría en convocatoria COLCIENCIAS 2013	Coordinador	Objetivo del Grupo
Grupo de Estudio e Investigaciones Biofarmacéuticas	Prof. Adriana María Ruiz Correa. MSc Ciencias Básicas Biomédicas (énfasis biodisponibilidad y bioequivalencia). Doctora en Ciencias Farmacéuticas. Profesora área Industrial Farmacéutica. amaria.ruiz@udea.edu.co	Profundizar en todos aquellos aspectos que afectan la absorción de los principios activos desde su forma de dosificación y desarrollar las metodologías necesarias para determinar estos efectos. Realizar estudios biofarmacéuticos, tanto <i>in vivo</i> como <i>in vitro</i> , para verificar si la sustancia activa llega al sitio de acción y de esta manera garantizar la eficacia terapéutica.
Grupo de Investigación en Tecnología en Regencia en Farmacia (creado en 2012)	Prof. Carlos Cataño Rocha. Magister en Ciencias Químicas. Profesor del área de Ciencias Farmacéuticas. Carlos.catano@udea.edu.co	Fortalecer la investigación en el campo de acción del Tecnólogo en Regencia de Farmacia con énfasis en Programas de Atención Primaria en Salud (APS) y en Temas de Terapias Alternativas y/o Complementarias
Grupo de Investigación en Alimentos Saludables -GIAS	Prof. María Orfilia Román Morales. Magister en Química. Profesora Área de Ingeniería Aplicada. mroman897@gmail.com grupogias@udea.edu.co	Diseñar, desarrollar y evaluar alimentos de alta aceptabilidad, nutritivos e inocuos, acorde con la tendencia actual del desarrollo de la industria alimentaria, adicionados de fibra dietaria, compuestos bioactivos y/o ingredientes funcionales, con el fin de ofrecer a la población colombiana nuevos productos alimentarios con efectos saludables y/o funcionales.



La connaissance doit être universelle
Wissen muss sein universell
El coneixement ha de ser
Conoscenza deve essere
Conhecimento deve ser
El conocimiento debe ser

Knowledge must be **UNIVERSAL**

Our Journal is ready to make universal the results of your research. From 2012 all the manuscript can be submitted in English or Spanish, or both (bilingual edition). The process will be done with international peer reviewers using english forms.

vitae

REVISTA DE LA FACULTAD
DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
MEDELLÍN, COLOMBIA

more info:

<http://www.udea.edu.co/vitae/>
vitae@udea.edu.co

Index in:



CUPÓN DE SUSCRIPCIÓN / SUBSCRIPTION COUPON

Nombres y apellidos
(Name and surname)

Cédula o Nit.
(I.D.)

Dirección
(Address)

Correo electrónico
(e-mail) Teléfono
(Phone N°)

Ciudad
(City) País
(Country)

Fecha
(Date) Firma
(Signature)

Forma de Pago

Banco
(Bank) Ciudad
(City)

Giro postal o bancario N°
(Money or banker's order N°)

Valor de la suscripción anual -tres números-

Colombia.....	\$120.000
Estudiantes (Anexar constancia).....	\$65.000
Exterior (Incluye transferencia bancaria).....	US\$ 70 EUR \$ 55

Todo pago debe hacerse a nombre de la Universidad de Antioquia – Revista VITAE.

Para su comodidad usted puede consignar el valor de la suscripción en las cuentas nacionales No. 180-01077-9 del Banco Popular o No. 1053-7037272 de Bancolombia, en cualquier oficina del país, a nombre de la UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA centro de costos 8516. Si paga por este sistema, sugerimos tomar una fotocopia del recibo y enviarnos el original, adjuntando este cupón diligenciado.

Precio publicación por artículo: Colombia \$440.00; Exterior US\$220 - EUR\$180

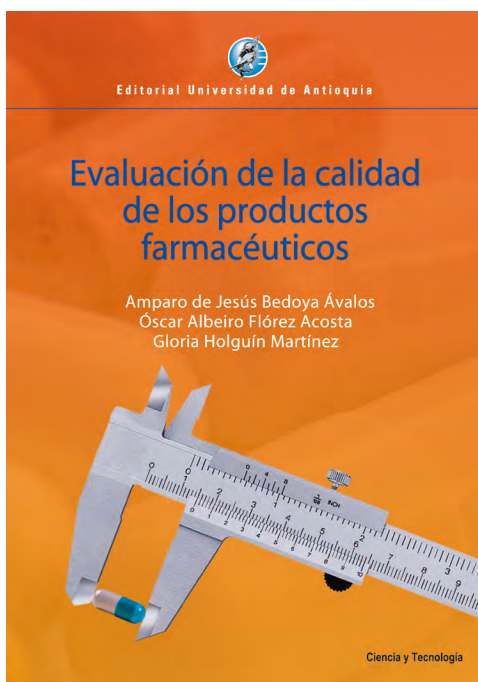
Correspondencia, canje y suscripciones: Revista VITAE, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Edificio de Extensión, Calle 70 No. 52-62 Piso 3 oficina 303. Teléfono: 57(4) 219 84 70. Apartado Aéreo 1226, Medellín, Colombia. Telefax (574) 219 54 59.

Dirección electrónica: www.udea.edu.co/vitae

Internet: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae>

Esta revista se imprimió en:

L. Vieco S.A.S.
PBX: (574) 448 9610
comercial@lvieco.com
Medellín - Colombia



Evaluación de la calidad de los productos farmacéuticos

Amparo de Jesús Bedoya Ávalos, Óscar Albeiro Flórez Acosta y Gloria Holguín Martínez

Ciencia y tecnología

17 × 24 × 1,2 cm

xvi, 248 p. Rústica

ISBN: 978-958-714-492-5

Química farmacéutica, industria farmacéutica, control de calidad de medicamentos, aseguramiento de la calidad

Libro de texto

Paratextos: 30 figuras, lista de abreviaturas y acrónimos, glosario, referencias bibliográficas, bibliografía e índice analítico

Reseña

El universo de conocimientos sobre el control de calidad aplicado a los productos farmacéuticos, químicos y cosméticos es vasto, disperso y se encuentra en constante actualización, especialmente en lo relacionado con la normatividad sobre buenas prácticas de laboratorio (BPL) y buenas prácticas de manufactura (BPM), publicadas en diversas fuentes como bases de datos bibliográficas, revistas especializadas y obras en distintos formatos.

Esto impulsó a los autores a consolidar un conjunto de temas introductorios sobre algunos temas como la normatividad actual para obtener productos farmacéuticos, la calidad de insumos como el agua, las materias pri-

mas y los empaques, sin dejar de lado temas importantes como los controles de calidad para formas farmacéuticas sólidas, semisólidas, ni las valoraciones microbiológicas en antibióticos y antisépticos.

Esta obra, fruto de años de experiencia docente de los autores, pretende ser útil en pregrados universitarios de química farmacéutica tanto para estudiantes como para docentes y servir de abre bocas para la actualización permanente en esta área del conocimiento.

Información de los autores

Amparo de Jesús Bedoya Ávalos

Química farmacéutica de la Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia), en 1981. Especialista en Gerencia de Producción de la Universidad Libre, Cali (Colombia) en 1985. Especialista en Farmacodependencia, de Fundación Universitaria Luis Amigó, Medellín en el año 2000.

En la actualidad es una docente jubilada desde noviembre de 2011.

Óscar Albeiro Flórez Acosta

Químico farmacéutico de la Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia), en 1990. Especialista en producción farmacéutica y Doctor en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, también en la misma universidad. Es autor de más de una docena de artículos publicados en revistas tanto nacionales como internacionales.

Se desempeña como docente en el Departamento de Farmacia, desde 1997, y como investigador del Grupo de Diseño y Formulación de Medicamentos, Cosméticos y Afines, de la Facultad de Química Farmacéutica, en la Universidad de Antioquia.

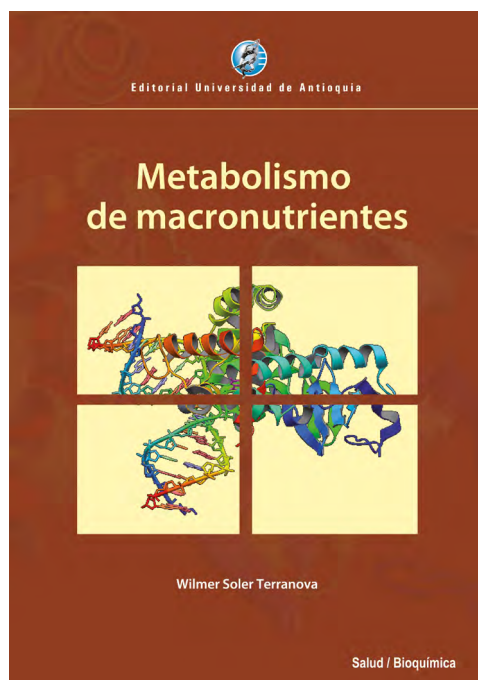
Gloria Holguín Martínez

Química farmacéutica de la Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia), en 1978. Realizó estudios de Perfeccionamiento en tecnología avanzada y control de medicamentos en la Cooperazione Italiana Regione Umbria, en Perugia (Italia), 1992. Es especialista en Sistemas de Administración de la Calidad ISO 9000, de la Universidad de Medellín (Colombia), en el año 2000.

Ha publicado varios textos tanto en calidad de autora como de coautora, al igual que diversos artículos en revistas locales y nacionales.

Su trayectoria administrativa y docente incluye cargos como el de directora de la revista *Vitae*, jefa del Departamento de Farmacia y del Centro de Investigaciones y Extensión; y docente tanto en pregrado como en posgrado en la Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia.

En la actualidad es profesora jubilada desde noviembre de 2010.



Metabolismo de macronutrientes

Wilmer Soler Terranova
Salud / Bioquímica

Metabolismo humano, lípidos, carbohidratos,
proteínas
Ciencias de la salud / Bioquímica

El organismo humano, desde el punto de vista biológico, es un sistema complejo capacitado para ejecutar diversas tareas mientras cumple sus funciones vitales; no obstante, esas funciones pueden verse afectadas por el entorno físico, social y mental en que dicho organismo se encuentre.

Esta obra detalla los cambios en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, tanto en estado absortivo, como durante ayuno, ejercicio y estrés, sin dejar de lado el estado general de salud del individuo, sus hábitos alimenticios, su régimen de actividad física, su exposición a condiciones tensionantes, y a situaciones lesivas, como el tabaquismo, el alcoholismo y otras adicciones.

Se expone la cinética y la termodinámica de las reacciones bioquímicas en general, el metabolismo de los carbohidratos como: la glucó-

lisis, el ciclo de Krebs, la vía de las pentosas, la gluconeogénesis, la glucogenogénesis y la glucogenólisis. Después se estudian los lípidos, las lipoproteínas y el colesterol, teniendo en cuenta los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos; y al final, se analiza el metabolismo de las proteínas. Es una obra dirigida a estudiantes y profesionales de medicina, aunque también es de interés para especialistas de otras áreas de la salud, como la nutrición, la dietética y la enfermería.

Wilmer Soler Terranova

Químico egresado de la Universidad del Valle (Cali, Colombia). Magíster en Bioquímica de la misma universidad. Autor de artículos publicados en revistas nacionales e internacionales y del libro De la sicoquímica a la vida.

Es miembro de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas, capítulo Antioquia, en calidad de vicepresidente.

Se desempeña como profesor titular del Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia), en cursos de pregrado y posgrado como los de Biología de la Célula, Neurociencias, Bioquímica Médica Deportiva, Toxicología Clínica y Bioquímica.