



TÓPICOS SELECTOS **de CIENCIAS** **QUÍMICAS**

Coordinador **Leobardo Manuel Gómez Oliván**



TÓPICOS SELECTOS
de CIENCIAS
QUÍMICAS



**Universidad Autónoma
del Estado de México**

Dr. en Ed. Alfredo Barrera Baca
Rector

Dr. en C.I. Amb. Carlos Eduardo Barrera Díaz
Secretario de Investigación y Estudios Avanzados

Dr. en C. Erick Cuevas Yañez
Director de la Facultad de Química

Mtra. en Admón. Susana García Hernández
*Directora de Difusión y Promoción de la Investigación
y los Estudios Avanzados*

TÓPICOS SELECTOS **de CIENCIAS** **QUÍMICAS**

Leobardo Manuel Gómez Oliván
Coordinador



**Universidad Autónoma
del Estado de México**

TÓPICOS SELECTOS **de CIENCIAS** **QUÍMICAS**

2a edición impresa, abril 2018
1a edición para Internet, abril 2018

ISBN: 978-607-422-928-8
ISBN versión digital: 978-607-422-929-5

D. R. © Universidad Autónoma del Estado de México
Instituto Literario núm. 100 ote.
Centro, C.P. 50000,
Toluca, Estado de México
<http://www.uaemex.mx>

Este libro cuenta con el aval de dos pares externos.

El contenido de esta publicación es responsabilidad de los autores.

En cumplimiento del Reglamento de Acceso Abierto de la Universidad Autónoma del Estado de México, la versión digital de esta obra se pone a disposición del público en el repositorio de la UAEM (<http://ri.uaemex.mx>) para su uso en línea con fines académicos y no de lucro, por lo que se prohíbe la reproducción parcial o total, directa o indirecta del contenido de esta presentación impresa sin contar previamente con la autorización expresa y por escrito de los editores, en términos de lo así previsto por la *Ley Federal del Derecho de Autor* y, en su caso, por los tratados internacionales aplicables.

Impreso y hecho en México

Índice

Prólogo.....	11
I. Comparación de tratamientos electroquímicos en la remoción de fenol.....	13
Rosalinda Marín Nava, Gabriela Roa Morales, Reyna Natividad Rangel, Jaime Espino Valencia y Rubí Romero Romero	
II. Configuraciones alternas de un reactor con intercambio de calor y membranas por simulación	39
Ángel Bautista Delgado, Armando Ramírez Serrano, Rubí Romero Romero y César Pérez Alonso	
III. Estudio económico de una columna de absorción para la captura de CO ₂ emitido en una planta termoeléctrica.....	59
Vidal Morales Mercado, Rosa Hilda Chávez Torres, Rubí Romero Romero y Reyna Natividad Rangel	
IV. Preparación de catalizadores heterogéneos de sodio soportados en zeolita NaX para la obtención de biodiesel	81
Sandra Luz Martínez Vargas, Rubí Romero Romero, Reyna Natividad Rangel y Víctor Sánchez Mendieta	
V. Recubrimiento de monolitos con LaMnO ₃ /γ-Al ₂ O ₃	101
María del Carmen Zepeda Mondragón, Reyna Natividad Rangel, Ramón Montiel López, Armando Ramírez Serrano, Rosa María Gómez Espinosa	
VI. Estabilidad térmica oxidativa de un sistema nutracéutico incorporando aceite esencial de chía (<i>Salvia hispanica</i> L.) y ácido ascórbico en emulsiones dobles.....	121
Héctor Carrillo Navas, Julián Cruz Olivares, Juan Orozco Villafuerte, Eleazar Aguirre Mandujano y César Pérez Alonso	
VII. Purificación de un antígeno recombinante de hepatitis E expresado en <i>Hansenula polymorpha</i>	139
Abraham Álvarez García, Jorge Javier Ramírez García y Néstor Octavio Pérez	

VIII. Estrés oxidativo producido por antiinflamatorios no esteroideos sobre el bioindicador <i>Hyalella azteca</i>	181
Leobardo Manuel Gómez Oliván, Marcela Galar Martínez, Nadia Neri Cruz, Hariz Islas Flores, Arturo Colín Cruz, Patricia Vieyra Reyes, Nely San Juan Reyes, Octavio Dublán García y Leticia Xóchitl López Martínez	
IX. Evaluación de la utilización de herceptin® (Traztuzumab) como tratamiento adyuvante de cáncer de mama tipo HER2 en el Centro Oncológico Estatal del ISSEMYM.....	213
Gerardo Daniel Miranda Mendoza, Leobardo Manuel Gómez Oliván, Marcela Galar Martínez, Paula Anel Cabrera Galeana, Patricia Vieyra Reyes, Octavio Dublán García y Leticia Xóchitl López Martínez	
X. IMC, niveles de adiponectina E IL-6 como factores interrelacionados en la carcinogénesis mamaria, implicación de la vía de señalización de leptina y adiponectina en la respuesta al tratamiento.....	245
Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez, Juan Juventino Torres Juárez, Hugo Mendieta Zerón y Leobardo Manuel Gómez Oliván	
XI. Farmacología de la nicotina y sus efectos en el sistema nervioso central.....	265
Patricia Vieyra Reyes, Clementina Jiménez Garcés, Margarita Hernández González y Leobardo Manuel Gómez Oliván	
XII. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del extracto acuoso de pèrsimo (<i>Diospyros kaki</i> L.), maracuyá (<i>Passiflora edulis</i> var Sims) y flor de jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	295
Tania Andrómeda Romero Herrera y María Dolores Hernández Navarro	
XIII. Cinética del daño al DNA por la incorporación del radiofármaco ^{99m} Tc-N ₂ S ₂ -TAT (49-57) Lys3-BN empleando el ensayo cometa en linfocitos humanos.....	313
Myrna Alejandra Luna Gutiérrez, Julieta Castillo Cadena, Guillermina Ferro Flores y Rafael Valencia Quintana	

XIV. Polimorfismos de la glutatión S-transferasa GSTM1 y GSTT1 en leucemia aguda y la respuesta al tratamiento, utilidad del meta-análisis.....	335
Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez y Julieta Castillo Cadena	
XV. Estudio de la reactividad de hidruros de aluminio estéricamente protegidos con moléculas pequeñas insaturadas.....	361
Mónica Mercedes Moya Cabrera, Vojtěch Jančík, Rosa María Gómez Espinosa y Telésforo Jesús Morales Juárez	
XVI. Formación y estructura cristalina de dos diferentes compuestos a partir de la sulfonación de trifenilestibina.....	381
Rosa María Gómez Espinosa, Iván García Orozco, Marisol Reyes Lezama, Fernando Cortés Guzmán, Mónica Mercedes Moya Cabrera, Vojtěch Jančík y Telesforo Jesús Morales Juárez	
XVII. Síntesis de un análogo de AZT, un compuesto anti-HIV	397
Davir González Calderón, Carlos Augusto González González, Aydeé Fuentes Benítes, Erick Cuevas Yáñez, David Corona Becerril y Carlos González Romero	
XVIII. Uso de la reacción de Heck en la síntesis de compuestos orgánicos mediada por microondas.....	415
Ana María Llaguno Rueda, Erick Cuevas Yáñez, Aydeé Fuentes Benites, Carlos González Romero y David Corona Becerril	

PRÓLOGO

La Química es una de las ramas de la ciencia que ha tomado mayor importancia en las últimas décadas. Es imposible no pensar en ella al escuchar los avances milagrosos de fármacos, materiales inteligentes, tecnología nanométrica, computadoras cuánticas o procesos catalíticos, donde la transformación controlada de la materia ha logrado la creación de sustancias con propiedades hechas a medida. En ese sentido, el papel de la Facultad de Química, en la formación de profesionales de dicha área, cobra una importancia superlativa; además del compromiso y la responsabilidad de formar sujetos no sólo con conocimiento, sino desarrollar su conciencia social y ecológica, indispensables para la situación actual y futura.

El Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la Facultad de Química UAEM está consciente de dichos compromisos, y con el fin de reforzar la formación de nuestros estudiantes presenta *Tópicos Selectos de Ciencias Químicas*. Este libro es un ejercicio formal de escritura de los resultados de investigación que, de acuerdo con el Reglamento de los Estudios Avanzados de la Universidad Autónoma del Estado de México, forma parte importante del proceso para obtener el grado en la modalidad de tesis por capítulo para libro. Por ello en cada capítulo se ha seguido una evaluación rigurosa de los contenidos, en un formato académico como el utilizado en las editoriales de mayor prestigio científico.

Los capítulos contenidos en este ejemplar reflejan la actividad académica desarrollada por los alumnos e investigadores asociados al Posgrado en las diferentes áreas de acentuación que lo integran: Ingeniería Química, Química Analítica, Químico Biológica, Química Inorgánica y Química Orgánica.

El área de Ingeniería Química presenta una comparación de tratamientos electroquímicos en la remoción de fenol, un estudio de la configuración alterna de un reactor con intercambio de calor y membranas por simula-

ción, el estudio económico de una columna de absorción para la captura de CO₂ emitido en una planta termoeléctrica, la preparación de catalizadores heterogéneos de sodio soportados en zeolita NaX para la obtención de biodiesel, el estudio de recubrimiento de monolitos con LaMO₃ / γ-Al₂O₃, así como el estudio de la estabilidad térmica oxidativa de un sistema nutracéutico incorporando aceite esencial de chía (*Salvia hispanica* L.) y ácido ascórbico en emulsiones dobles.

El área de Química Analítica presenta el estudio de la purificación de un antígeno recombinante de hepatitis E expresado en *Hansenula polymorpha*.

En el área de acentuación Químico Biológica, se presentan estudios de estrés oxidativo producido por antiinflamatorios no esteroideos sobre el bioindicador *Hyalella azteca*; la evaluación del uso de Herceptin® (Traztuzumab) como tratamiento adyuvante de cáncer de mama tipo HER2 en el Centro Oncológico Estatal del ISSEMYM; el estudio de los niveles de adiponectina e IL-6 como factores interrelacionados en la carcinogénesis mamaria; implicación de la vía de señalización de leptina y adiponectina en la respuesta al tratamiento, una revisión de la farmacología de la nicotina y sus efectos en sistema nervioso central; el estudio de la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* del extracto acuoso de pèrsimo (*Diospyros kaki* L.), maracuyá (*Passiflora edulis* var *Sims*) y flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.); la cinética del daño al DNA por la incorporación del radiofármaco 99mTc-N2S2-TAT (49-57) Lys3-BN empleando el ensayo cometa en linfocitos humanos; así como los polimorfismos de la Glutación S-Transferasa GSTM1 y GSTT1 en leucemia aguda y la respuesta al tratamiento, utilidad del meta-análisis.

El área de Química Inorgánica presenta el estudio de la reactividad de hidruros de aluminio estéricamente protegidos con moléculas pequeñas insaturadas, así como la formación y estructura cristalina de dos diferentes compuestos a partir de la sulfonación de trifenilestibina.

Las investigaciones del área de Química Orgánica son la síntesis de un análogo de AZT, un compuesto anti-HIV, y el uso de la reacción de Heck en la síntesis de compuestos orgánicos mediada por microondas.

Dejamos ahora en manos del lector los comentarios finales sobre esta edición, esperando contribuir en el área de la Química con aportaciones de interés para el desarrollo de cada una de las áreas de acentuación de nuestro Posgrado.

Capítulo I

Comparación de tratamientos electroquímicos en la remoción de fenol^{*}

Rosalinda Marín Nava¹
Gabriela Roa Morales^{1 *}
Reyna Natividad Rangel^{1 **}
Jaime Espino Valencia²
Rubí Romero Romero^{1 ***}

1. Introducción

El agua se ha convertido en un recurso estratégico para el desarrollo económico y la supervivencia de los países, debido a su escasez y a la pérdida de su calidad original. En el presente año, según Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), United Nations International Children's Emergency Fund (UNICEF) y el Programa Conjunto de Monitoreo del Agua y Saneamiento, 894 millones de personas en el mundo no tienen acceso a agua segura, lo que representa el 13% de la población mundial, mientras que 2.5 millones no cuentan con sistemas de saneamiento. Cada año mueren 1.5 millones de niños por contacto con agua en malas condiciones (INEGI, 2009).

Un importante número de contaminantes proviene de los compuestos fenólicos, pues son especies tóxicas, bioacumulativas y persistentes (TBP); se encuentran generalmente en aguas residuales de la industria petroquímica (6-500 mg/L), química y farmacéutica (0.1-1600 mg/L) (Busca *et al.*, 2008). Debido a que es una sustancia tóxica, el fenol ha sido clasificado como un contaminante prioritario en la lista de la United States Environmental Protection Agency (USEPA). La presencia de cualquier descarga de fenoles en los cuerpos receptores debe evitarse, ya que su presencia, durante el proceso de cloración, promueve la formación de clorofenoles, compuestos mucho más tóxicos (Gimeno *et al.*, 2005). La USEPA ha establecido un estándar de purificación del agua menor a 1 ppb de fenol en aguas superficiales (Busca *et al.*, 2008; Canton *et al.*, 2003).

2. Tratamientos para remover fenol

Una extensa literatura (Agladze *et al.*, 2007; Egusquiza *et al.*, 2008; Kyriacou *et al.*, 2005; Khoufi *et al.*, 2007) reporta diferentes tratamientos para remover el fenol, pues es considerado un compuesto modelo de otros compuestos orgánicos (TBP) (Busca *et al.*, 2008).

2.1. Métodos para el tratamiento de efluentes fenólicos

Se pueden distinguir dos métodos para el tratamiento de efluentes fenólicos: los no destructivos y destructivos; los primeros permiten la recuperación y reutilización del fenol así como la adsorción con carbón activado (Dabrowski *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2009) y la extracción con solventes (Lazarova y Boyadzhieva, 2004); mientras en los segundos (Baena, 2005), el fenol es transformado por oxidación, ya sea biológica (Juang y Tsai, 2006), química (Canton, Esplugas y Casado 2003) o electroquímica (Dehkordi y Ebrahimi, 2009). Busca *et al.* (2008) exponen los métodos investigados recientemente, para purificar efluentes contaminados con fenol, los cuales se presentan en la figura 1.

Los tratamientos de adsorción, biodegradación e incineración no logran una remoción óptima (Baena, 2005), he aquí la importancia de los procesos electroquímicos como la electrocoagulación (EC) y la electroperoxicoagulación (EPC), pues son particularmente apropiados para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con compuestos orgánicos persistentes.

2.1.1. Procesos electroquímicos

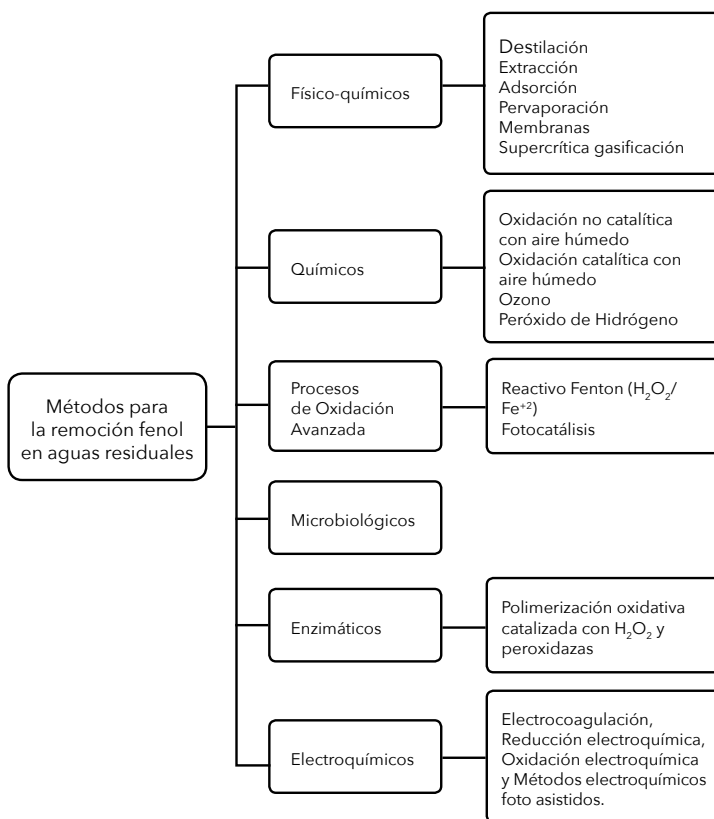
La aplicación de la electroquímica para abatir la contaminación ha sido el tópico de numerosos libros y revistas (Ammar *et al.*, 2006; Boye *et al.*, 2003; Brillas *et al.*, 2003; Guinea *et al.*, 2008; Cañizares *et al.*, 2007a; Martínez-Huitle y Brillas, 2009). La mayor ventaja de esta tecnología es su compatibilidad ambiental, pues proporciona un método limpio, que aporta versatilidad, alta eficiencia en energía, la posibilidad de automatizar y seguridad (Barrera-Díaz *et al.*, 2008).

Algunos procesos electroquímicos son: Electrocoagulación, Reducción electroquímica, Oxidación electroquímica, Oxidación electroquímica indirecta con oxidantes fuertes, Electroperoxicoagulación y Métodos electroquímicos foto asistidos (Martínez-Huitle y Brillas, 2009).

2.1.1.1. Electrocoagulación

La electrocoagulación EC fue patentada en 1909, se basa en usar una corriente eléctrica para disolver ánodos de sacrificio de Fe o Al, los cuales están inmersos en el agua contaminada, produciendo los iones metálicos correspondiente y al hidrolizarse se producen los hidróxidos propios que actúan como coagulantes y las partículas coaguladas pueden ser separadas mediante precipitación o electroflotación.

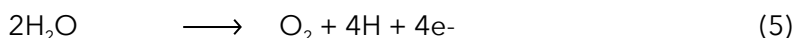
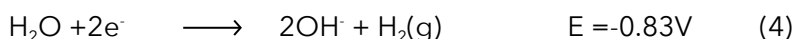
Figura 1. Principales métodos utilizados para remover fenoles en aguas residuales



En general, los siguientes procesos se presentan durante un tratamiento por electrocoagulación EC:

1. Reacción en los electrodos para producir los iones metálicos. La oxidación electrolítica de Fe^0 genera Fe^{+2} o Fe^{+3} en el ánodo y la producción de H_2 en el cátodo (Moreno *et al.*, 2009).

Reacciones en el ánodo



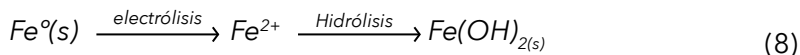
2. Formación de coagulantes en el agua (Modirshahla *et al.*, 2008; Mollah *et al.*, 2001).



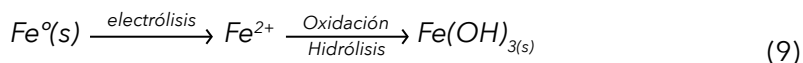
3. Remoción de los compuestos con coagulantes mediante sedimentación o electroflotación cuando se involucra el H_2 (Moreno *et al.*, 2009).
4. Otras reacciones químicas y electroquímicas que involucran la reducción de impurezas orgánicas y formación de iones metálicos en el cátodo y la coagulación de partículas coloidales.

Sin embargo, la revisión literaria muestra ambigüedad alrededor del mecanismo involucrado en este proceso.

- a) Algunos estudios (Lakshmanan, Clifford y Samanta, 2009) reportan que la oxidación electrolítica del hierro produce Fe^{+2} , el cual se hidroliza para producir $\text{Fe}(\text{OH})_{2(\text{s})}$ insoluble, otros reportan la formación del $\text{Fe}(\text{OH})_{2(\text{s})}$ sin dar detalles de su formación.

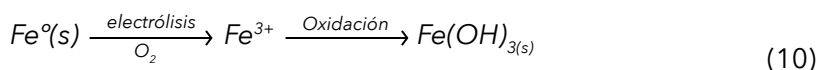


- b) Otros estudios (Mollah *et al.*, 2004) señalan la formación de Fe^{+2} en el ánodo, seguido por la oxidación de Fe^{+2} por el oxígeno disuelto para formar $\text{Fe}(\text{OH})_{3(\text{s})}$.



Una modificación en la secuencia de esta reacción es reportada por Moreno *et al.* (2009), quien establece la oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} como un paso anterior a la hidrólisis del Fe^{+3} , para producir $\text{Fe}(\text{OH})_{3(\text{s})}$.

- c) Se reporta un tercer mecanismo que involucra una etapa de oxidación electrolítica de Fe^0 a Fe^{+3} , seguido de la hidrólisis para producir $\text{Fe}(\text{OH})_{3(\text{s})}$.



Otros estudios (Ratnia *et al.*, 2004) reportan la formación de $\text{Fe}(\text{OH})_{3(\text{s})}$, sin proporcionar detalles de su formación.

Una gran cantidad de contaminantes en cuerpos de agua ha sido degradada y eliminada aplicando electrocoagulación (EC). Mollah *et al.* (2004) presentan una tabla de contaminantes removidos mediante este proceso, entre los que se encuentran colorantes, metales pesados, iones, grasas y aceites.

Asimismo, se ha determinado que la eficiencia del tratamiento depende del sistema electrolítico, el pH y la corriente.

Antes de abordar este tema, debemos definir los siguientes términos:

En la degradación de los compuestos orgánicos se monitorea la demanda química de oxígeno, DQO –parámetro que mide la cantidad de sustancias susceptibles de ser oxidadas por medios químicos, disueltas o en suspensión dentro de una muestra líquida– la cual se utiliza para medir el grado de contaminación, se expresa en miligramos de oxígeno diatómico por litro ($\text{mg}_{\text{O}_2}\text{L}^{-1}$) y su porcentaje de remoción se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\%DQO = \frac{(\Delta DQO)_t}{DQO} * 100 \quad (11)$$

Donde $(\Delta DQO)_t$ es la remoción de DQO a un tiempo t , y DQO_0 es la demanda química de oxígeno inicial, antes del tratamiento.

Densidad de corriente es la corriente eléctrica por unidad de área de electrodos, j (Acm^{-2}),

$$j = \frac{I}{A} \quad (12)$$

Donde I es la corriente eléctrica (A) y A es área (cm^2).

La cantidad de metal disuelto o depositado se determina mediante la ecuación:

$$w = \frac{j t M}{n F} \quad (13)$$

Donde:

w es la cantidad del material del electrodo disuelto (gcm^{-2})

t es tiempo en s, M la masa molar del electrodo

n número de electrones en la oxidación/reducción

F la constante de Faraday (96500 Cmol^{-1}) (Mollah *et al.*, 2004)

La eficiencia promedio de la corriente a un tiempo t está dada por la ecuación:

$$\text{CE}(\%) = \frac{(\Delta \text{COD}) t F V_s}{8 I t} * 100 \quad (14)$$

Donde V_s es el volumen de solución (L), la constante 8 es la masa equivalente (geq^{-1}) del oxígeno (Brillas, Siries y Oturan, 2009).

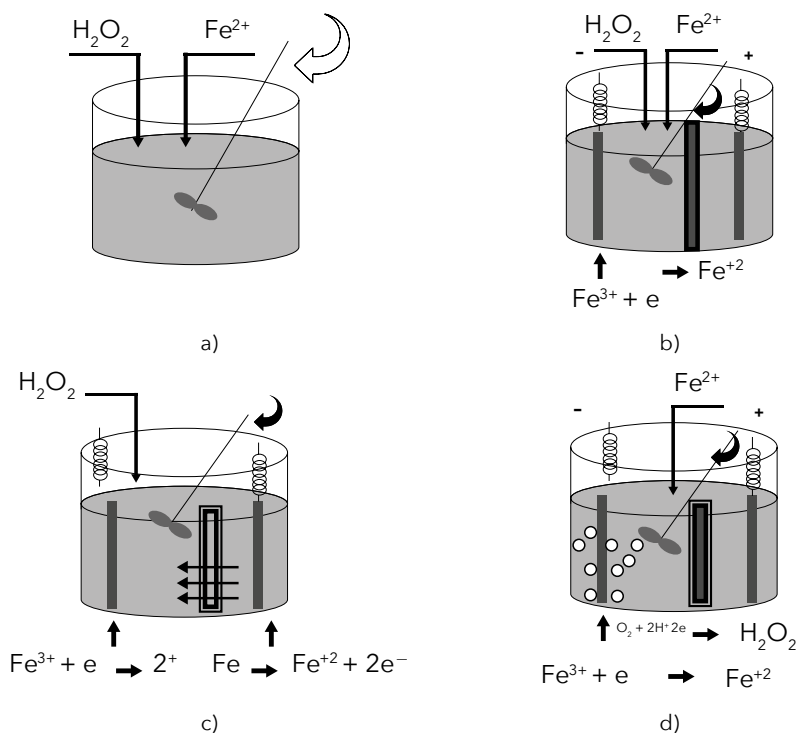
Las ventajas de la electrocoagulación son promover la floculación por la turbulencia generada por el O_2 y el H_2 , así como la electroflotación. El equipo es fácil y simple de operar, remueve partículas coloidales, evita el uso de reactivos, no tiene partes móviles, produce menos lodo que la coagulación convencional, compatibilidad ambiental, no es necesario el control del pH, excepto para valores extremos. Sus desventajas: remplazo de electrodos, formación de una capa de óxido en el cátodo, disminuye la eficiencia, se requiere alta conductividad en el agua (Mollah *et al.*, 2001).

Otro caso puede realizarse aplicando peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es un fuerte oxidante ($E=1.8\text{V}$ vs SHE) y se ha utilizado para tratar

varios contaminantes. Sin embargo, el H_2O_2 no es muy efectivo para el tratamiento de contaminantes refractarios (Benitez *et al.*, 2000). Se puede mejorar su eliminación utilizando metales de transición para catalizar la descomposición del H_2O_2 y producir radicales $\bullet\text{OH}$, los cuales tienen un potencial oxidante de 2.8V vs SHE (Cañizares *et al.*, 2007b), esta reacción es conocida como Fenton (Neyens y Baeyens, 2003). El reactivo Fenton fue descubierto hace más de 100 años, pero no fue hasta los años 60 cuando se aplicó en la destrucción de compuestos orgánicos tóxicos y se demostró su eficiencia en la degradación de compuestos orgánicos volátiles (VOCs), benceno, tolueno, etilenbenceno xileno BTEX, colorantes solventes clorados, bifenilos policlorados, metales pesados (Arienzo *et al.*, 2002).

La figura 2 muestra las diferentes variantes del reactivo Fenton y la tabla 1 explica en que consiste cada caso (Qiang, Chang y Huang, 2003).

Figura 2. Variantes del reactivo Fenton



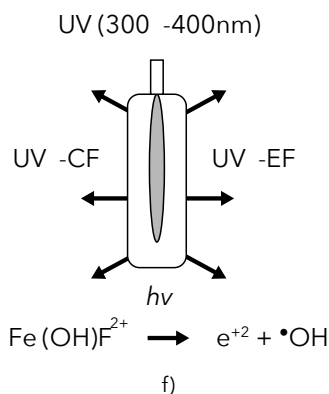
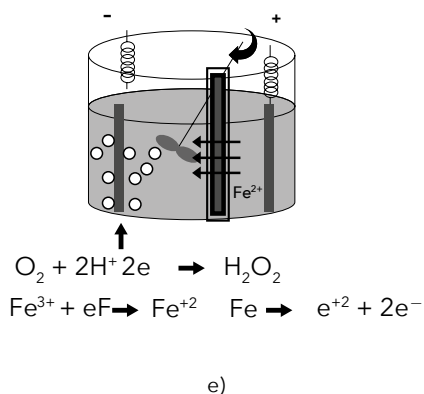


Tabla 1. Variantes del reactivo Fenton

Figura	Reacción	Características
A	Fenton Clásico	El H_2O_2 y el Fe^{+2} son adicionados externamente.
B	Reacción Fenton con regeneración de Fe	El H_2O_2 y el Fe^{+2} son adicionados externamente, pero el Fe^{+2} es regenerado en el cátodo.
C	Electroperoxicoagulación	El H_2O_2 es aplicado externamente y se utiliza un ánodo de sacrificio de hierro como fuente de Fe^{+2} . Y el Fe^{+2} es regenerado en el cátodo.
D		El H_2O_2 es generado en cátodo y el Fe^{+2} se adiciona externamente.
E	Electro-Fenton	El H_2O_2 y el Fe^{+2} son generados en el cátodo.
F	Fenton Foto asistido	La radiación UV (300–400 nm) simultáneamente genera Fe^{+2} y $\bullet\text{OH}$.

2.1.1.2. Electroperoxicoagulación

Enfocándose en la electroperoxicoagulación EPC (figura 2), la cual se basa en utilizar un ánodo de sacrificio Fe, el cual es electrodisuelto proporcionando cantidades de Fe^{+2} al efluente, y un exceso de Fe^{+3} que precipita como $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (Neyens y Baeyens, 2003; Brillas y Casado, 2002).

La EPC aumenta el poder oxidante del reactivo Fenton porque produce los iones ferrosos *in situ*, lo cual minimiza el desperdicio de los radicales $\bullet\text{OH}$, y la cantidad requerida de H_2O_2 , y debido a la posibilidad de la conversión electroquímica de los iones ferrosos mediante la reacción (17), se mejora considerablemente la eficiencia y minimiza la cantidad de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ formado.

En la tabla 2 se muestra una amplia recopilación de las reacciones que se llevan a cabo con el reactivo Fenton.

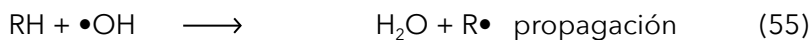
Tabla 2. Reacciones involucradas en reactivo Fenton

	Reacciones	K (s ⁻¹ o M ⁻¹ s ⁻¹)	Ref.
15	$\text{Fe}^0(\text{s}) \longrightarrow \text{Fe}^{+2}_{(\text{aq})} + 2\text{e}^-$		(Arienzo <i>et al.</i> , 2001)
16	$\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{+3} + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$	55	(De Laat y Le, 2005)
17	$\text{Fe(III)} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe(II)} + \text{HO}_2\bullet/\text{O}_2\bullet + \text{H}^+$	$2.0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(Duesterberg <i>et al.</i> , 2008)
19	$\text{Fe(III)} + \text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2\bullet \longrightarrow \text{Fe(II)} + \text{O}_2 + \text{H}^+$	$1.76 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(Duesterberg <i>et al.</i> , 2008)
20	$\text{Fe(II)} + \text{HO}\bullet \longrightarrow \text{Fe(III)} + \text{OH}^-$	3.2×10^8	(Duesterberg <i>et al.</i> , 2008)
21	$\text{Fe(II)} + \text{HO}_2\bullet/\text{O}_2\bullet \longrightarrow \text{Fe(III)} + \text{H}_2\text{O}_2$	1.34×10^6	(Duesterberg <i>et al.</i> , 2008)
22	$\text{Fe}^{+3} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{FeOH}^{2+} + \text{H}^+$	$2.9 \times 10^{-3} \text{ M}$	(De Laat y Gallard, 1999)
23	$\text{Fe}^{+3} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Fe(OH)}_2 + 2\text{H}^+$	$7.62 \times 10^{-7} \text{ M}^2$	(De Laat y Gallard, 1999)
24	$2\text{Fe}^{+3} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Fe}_2(\text{OH})_2^{+4} + 2\text{H}^+$	$0.8 \times 10^{-3} \text{ M}$	(De Laat y Gallard, 1999)
25	$\text{Fe}^{+3} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Fe}^{+3}(\text{HO}_2)^{2+} + \text{H}^+$	3.1×10^{-3}	(De Laat y Gallard, 1999)
26	$\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{FeOH}^+ + \text{H}^+$	1.90 s^{-1}	(De Laat y Gallard, 1999)
27	$\text{FeOH}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Fe(III)}(\text{OH})(\text{HO}_2)^+ + \text{H}^+$	2×10^4	(De Laat y Gallard, 1999)
28	$\text{FeOH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{+3} + \bullet\text{OH} + 2\text{HO}^-$	5.9×10^6	(De Laat y Gallard, 1999)
29	$\text{FeHO}_2^{+2} \longrightarrow \text{Fe}^{+2} + \text{HO}_2\bullet$	2.3×10^{-3}	(De Laat y Le, 2005)
30	$\text{FeOH}^+ + \bullet\text{OH} \longrightarrow \text{Fe}^{+3} + 2\text{OH}^-$	2.7×10^8	(De Laat y Le, 2005)
31	$\text{Fe(II)} + \text{HO}_2\bullet \longrightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{HO}_2^-$	1.2×10^6	(De Laat y Le, 2005)
32	$\text{Fe(II)} + \text{O}_2\bullet \longrightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{O}_2^{2-}$	1×10^7	(De Laat y Le, 2005)
33	$\text{Fe(III)} + \text{HO}_2\bullet \longrightarrow \text{Fe}^{+2} + \text{O}_2 + \text{H}^+$	$2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(De Laat y Le, 2005)
34	$\text{Fe(III)}(\text{HO}_2)^{+2} \longrightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{HO}_2\bullet$	$2.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	(De Laat y Gallard, 1999)
35	$\text{Fe}^{+3}(\text{OH})(\text{HO}_2)^+ \longrightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{HO}_2\bullet + \text{OH}^-$	$2.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	(De Laat y Gallard, 1999)
36	$\text{Fe}^{2+} + \text{HO}_2\bullet \longrightarrow \text{Fe(III)}(\text{HO}_2)^{2+}$	1.2×10^6	(De Laat y Gallard, 1999)
37	$\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2\bullet + \text{H}^+ \longrightarrow \text{Fe(III)}(\text{HO}_2)^{2+}$	$1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(De Laat y Gallard, 1999)
38	$\text{Fe(III)} + \text{HO}_2\bullet \longrightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + \text{H}^+$	$< 2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(De Laat y Gallard, 1999)
39	$\text{Fe(II)} + \text{O}_2\bullet \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{2-}$	1.0×10^7	(De Laat y Le, 2005)
40	$\text{Fe}^{+3} + \text{O}_2\bullet \longrightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$	$5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(De Laat y Le, 2005)
41	$\text{H}_2\text{O}_2 + \bullet\text{OH} \longrightarrow \text{HO}_2\bullet/\text{O}_2\bullet + \text{H}_2\text{O}$	3.3×10^7	(De Laat y Le, 2005)
42	$\text{HO}_2\bullet/\text{O}_2 + \bullet\text{HO}_2\bullet/\text{O}_2\bullet \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	2.33×10^6	(Duesterberg <i>et al.</i> , 2008)
43	$\text{HO}\bullet + \text{HO}_2\bullet/\text{O}_2\bullet \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	7.15×10^9	(Duesterberg <i>et al.</i> , 2008)
44	$\text{HO}\bullet + \text{HO}\bullet \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	5.2×10^9	(Duesterberg <i>et al.</i> , 2008)
45	$\text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{HO}_2^- + \text{H}^+$	$1.26 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	(De Laat and Le, 2005)

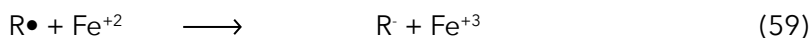
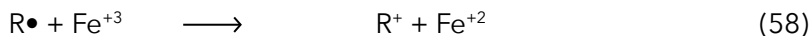
Continúa...

	Reacciones	K (s ⁻¹ o M ⁻¹ s ⁻¹)	Ref.
46	$\text{HO}_2\bullet \rightleftharpoons \text{O}_2^- + \text{H}^+$	$1.58 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$	(De Laat and Gallard, 1999)
47	$\text{O}_2^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{HO}_2\bullet$	$1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(De Laat and Gallard, 1999)
48	$\text{HO}_2\bullet + \text{O}_2\bullet^- + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2 + \text{OH}^-$	$9.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(De Laat and Gallard, 1999)
49	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HO}_2\bullet \longrightarrow \text{OH}\bullet + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$	0.5	(De Laat and Le, 2005)
50	$\text{HO}_2\bullet + \text{HO}_2\bullet \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	8.3×10^5	(De Laat and Gallard, 1999)
51	$\text{HO}_2\bullet + \text{O}_2\bullet^- \longrightarrow \text{HO}_2^- + \text{O}_2$	9.7×10^7	(De Laat and Le, 2005)
52	$\bullet\text{OH} + \text{HO}_2\bullet \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	$0.71 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(De Laat and Gallard, 1999)
53	$\bullet\text{OH} + \text{O}_2\bullet^- \longrightarrow \text{OH}^- + \text{O}_2$	$1.01 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	(De Laat and Gallard, 1999)
54	$\text{H}^+ + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{O}$	1×10^{20}	(De Laat and Le, 2005)

El radical $\bullet\text{OH}$ puede extraer un átomo de hidrógeno e iniciar una reacción en cadena de acuerdo con las siguientes reacciones:



Los radicales orgánicos producidos en la reacción (55), se oxidan con el Fe^{+3} o reducidos por el Fe^{+2}



De las reacciones anteriormente listadas se debe prestar especialmente atención a las reacciones (20) y (55) pues son competitivas, en la reacción (20) se consumen los radicales $\bullet\text{OH}$ desperdiciándolos. Entonces el Fe^{+2} actúa como reactivo y no como catalizador. La regeneración del Fe^{+2} es controlada por la transferencia de electrones entre el Fe^{+3} y el cátodo y por la transferencia de masa del Fe^{+3} a través de la interface solución-cátodo. La formación de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ no solamente disminuye la concentración de hierro, sino que además inhibe la regeneración del Fe^{+2} .

Un exceso de RH dificulta la reacción entre el ion ferroso y el radical $\bullet\text{OH}$, con lo cual se ve favorecida la reacción (55).

En la reacción (41) el H_2O_2 actúa como un consumidor de radicales $\bullet\text{OH}$ y no como iniciador de la reacción (55).

Los contaminantes son removidos por la acción combinada de la oxidación del radical $\bullet\text{OH}$ y la coagulación promovida por $\text{Fe}(\text{OH})_3$, por esta razón se tienen altas eficiencias, en las primeras etapas de degradación, pues domina la oxidación con $\bullet\text{OH}$ y posteriormente impera la polimerización o coagulación (Brillas y Casado, 2002). Los avances en el sistema Fenton se enfocan en estudiar las características de los reactivos y las variables como pH, T, cantidad de compuesto orgánico, Fe^{+2} , Fe^{+3} y H_2O_2 .

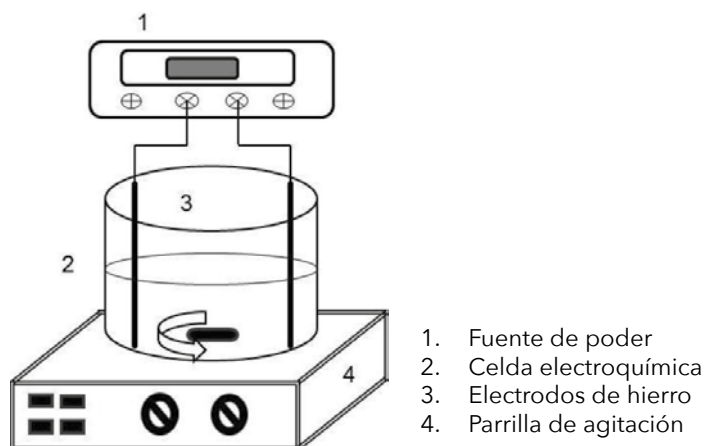
En el presente trabajo se muestran y comparan dos procesos electroquímicos para el tratamiento de agua con una concentración conocida de fenol, utilizando electrodos de hierro a diferentes valores de pH e intensidad de corriente.

3. Metodología

Se emplean electrodos de hierro de 10 cm*5 cm, ácido sulfúrico, sulfato de sodio, hidróxido de sodio, peróxido, 4-aminoantipirina, ferrocianuro de potasio e hidróxido de amonio. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada.

Los experimentos se llevaron a cabo en una celda sin división con capacidad de 300 mL, similar a la mostrada en la figura 3 y se aplicó corriente eléctrica mediante una fuente de poder (GWINSTEK GPR-1820HD). La distancia entre electrodos fue de 2 cm.

Figura 3. Celda electroquímica para llevar a cabo EC y EPC



Para la caracterización fisicoquímica se realizaron estudios de Demanda Química de Oxígeno (DQO), turbiedad y color según lo indica el Standard Methods de 1990. La DQO se midió a 420 nm empleando reactivo HACH HD, color a 455 nm y la turbidez a 840 nm (FAU). Mientras que la concentración de fenol se determinó con base en NMX-AA-050-SC-FI-2001.

Antes y durante el tratamiento electroquímico se midió con un potenciómetro HANNA HI 9811 y ajusto el pH de la solución fenólica con soluciones 0.1M, 0.01M H_2SO_4 o NaOH.

4. Resultados y discusión

4.1. Influencia de la intensidad de corriente I y el pH en la EC

A continuación se abordará un caso de estudio donde se establece cómo influyen la intensidad de corriente I y el pH en la EC.

Se somete una solución de fenol con una concentración de 10 mgL^{-1} equivalente a 20 mgL^{-1} de DQO, con una turbidez 0 FTU y color de 0, a electrocoagulación; usando Na_2SO_4 como electrolito soporte, en un reactor agitado, similar al mostrado en la figura 2, provisto con dos electrodos de hierro con dimensiones de $10\text{cm} \times 5\text{cm}$ bajo las condiciones mostradas en la tabla 3.

Tabla 3. Nomenclatura y condiciones preliminares de los tratamientos EC

Experimento	Corriente, A	pH
EC-1	2	3 sin control
EC-2	4	3 sin control
EC-3	2	3 con control
EC-4	4	3 con control

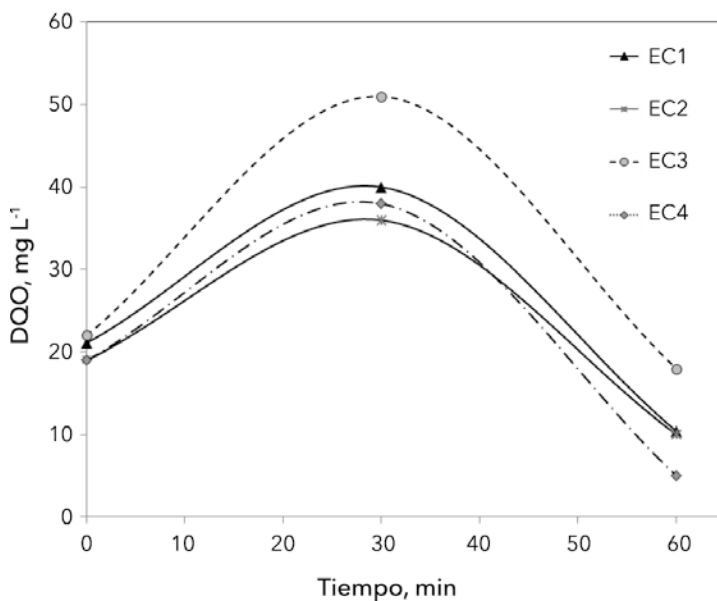
Durante el periodo de tratamiento se monitorea color, turbidez (FTU) y DQO ($\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$) y se calcula $w\text{Fe}^{+2}$, $w \text{Fe}^{+3}$ y % DQO para los diferentes tratamientos de EC, los cuales se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Nomenclatura y resultados obtenidos para los tratamientos de EC

Experimento	j , Acm^{-2}	$w \text{Fe}^{+2}$, gcm^{-2}	$w \text{Fe}^{+3}$, gcm^{-2}	Color, Pt-Co	DQO, mg L^{-1}	% DQO	Turbidez, FTU
EC-1	0.01	$1.04 \cdot 10^{-2}$	$6.94 \cdot 10^{-3}$	94	10.4	47	14
EC-2	0.02	$2.08 \cdot 10^{-2}$	$1.39 \cdot 10^{-2}$	57	10	50	7
EC-3	0.01	$1.04 \cdot 10^{-2}$	$6.94 \cdot 10^{-3}$	0	18	10	0
EC-4	0.02	$2.08 \cdot 10^{-2}$	$1.39 \cdot 10^{-2}$	1	5	74	1

En la figura 4 se muestra la disminución de DQO en función del tiempo para los cuatro tratamientos de EC descritos en la tabla 4. En esta figura se puede observar que a los 30 min se incrementa la DQO debido a una posible interferencia con el Fe(II) .

Figura 4. Curva de eliminación de DQO en función del tiempo, para los tratamientos de EC

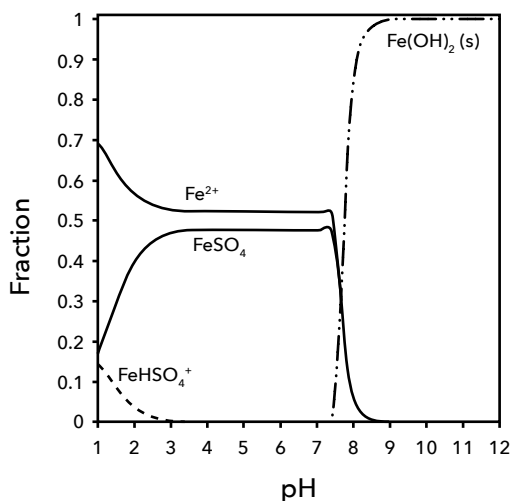


Al comparar los tratamientos EC-1 y EC-2, donde se aplica una corriente de 2 A (100 Am^{-2}) y 4 A (200 Am^{-2}), respectivamente, sin control de pH, se determina que un aumento en la densidad de corriente no contribuye sustancialmente en la disminución de DQO. Los datos mostrados en

la figura 4 indican una remoción de DQO de 47% y 50 % de remoción para EC-1 y EC-2, que coinciden con los resultados obtenidos. Para otros autores, como Linares *et al.* (2009), la remoción de contaminantes orgánicos de un complejo industrial, determinó que al aplicar una corriente de 45.45 Am^{-2} se logra una remoción de DQO del 70%, y al aumentar la corriente a 60.6 Am^{-2} solamente se obtiene un 73% de remoción, por lo que existe la posibilidad de que se desperdicie la corriente y tenga como consecuencia el calentamiento de la solución reactiva.

Sin embargo, al comparar los datos de color y turbidez para los tratamientos EC-1 y EC-2 se presentan valores altos entre 14 y 7 en turbidez; además de 94 y 57 en color. Esto es debido a que el 50% de Fe(II) electrogenerado se encuentra como $\text{Fe(OH)}_2 (\text{s})$ cuando llega a pH 8 como se puede observar en la figura 5 (Barrera-Díaz *et al.*, 2011), por lo que en este caso no existe una coagulación adecuada. Es posible que una parte de Fe(II) se oxide a Fe(III) y al estar a bajas concentraciones proporciona color y turbidez a las muestras.

Figura 5. Diagramas de distribución de especies de Fe(II)



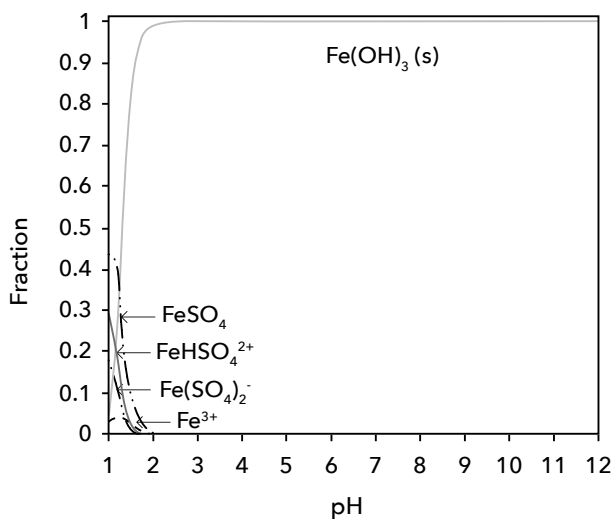
Fuente: Barrera-Díaz *et al.* (2011)

Por otro lado, cuando se controla el pH del sistema (EC-3 y EC-4), el comportamiento de la DQO muestra 10% y 74% de eliminación respectivamente. El color y la turbidez permanecen sin cambio con respecto a sus

valores iniciales. Esto es asociado a que la especie de Fe predominante a estas condiciones es el Fe(III) y, de acuerdo con el diagrama de distribución de especies (figura 6, Barrera *et al.* 2011), el 99.9% corresponde a la formación de Fe(OH)_3 , especie que contribuye mayoritariamente en la coagulación del fenol y, por lo tanto, en su eliminación.

Se concluye que la densidad de corriente y el pH controlan la velocidad de reacción, pues determinan la cantidad de Fe(II) y Fe(III) producida y consecuentemente la producción de coagulante, además ajusta la velocidad y tamaño de burbujas afectando el crecimiento del floc (Modirshahla *et al.*, 2008).

Figura 6. Diagramas de distribución de especies de Fe(III)



Fuente: Barrera-Díaz *et al.* (2011)

4.2. Influencia de la intensidad de corriente I y el pH en la EPC

A continuación se aborda un caso de estudio, donde se establece cómo influyen la intensidad de corriente (I) y el pH en la EPC.

Se somete una solución de fenol con una concentración de 10 mgL⁻¹, equivalente a 20 mgL⁻¹ de DQO con una turbidez 0 FTU y color de 0 Pt-Co, al tratamiento de electroperoxicoagulación EPC, empleando sulfato

de sodio como electrolito soporte, en un reactor agitado (similar al mostrado en la figura 2c), provisto con 2 electrodos de hierro con dimensiones de 10cm*5cm; bajo las condiciones mostradas en la tabla 5.

Tabla 5. Nomenclatura y condiciones preliminares de tratamiento EPC

Experimento	Corriente, A	pH
EPC-1	2	3 con control
EPC-2	2	3 sin control
EPC-3	4	3 con control
EPC-4	4	3 sin control

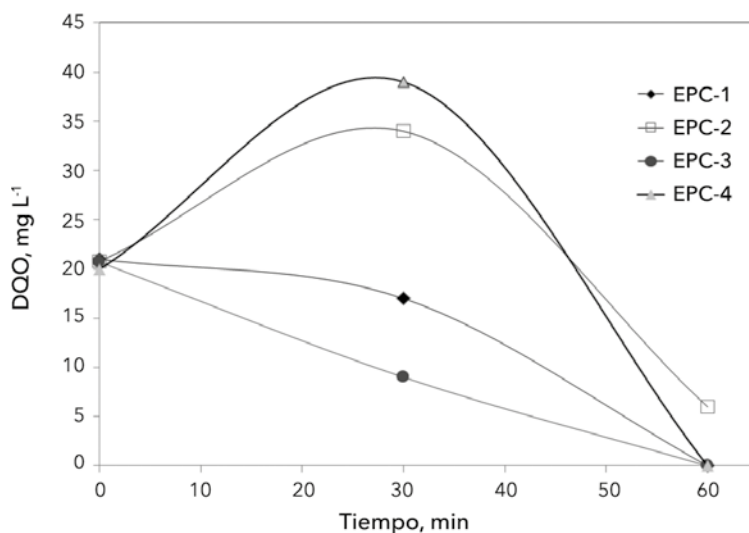
Se obtienen los resultados de color, turbidez y DQO para los diferentes tratamientos de EPC, los cuales se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Nomenclatura y resultados obtenidos para los tratamientos de EC

Experimento	j, Acm ⁻²	w Fe ⁺² , gcm ⁻²	w Fe ⁺³ , gcm ⁻²	Color, Pt-Co	DQO, mg L ⁻¹	% DQO	Turbidez, FTU
EPC-1	0.01	1.04*10 ⁻²	6.94*10 ⁻³	0	ND	100	0
EPC-2	0.01	1.04*10 ⁻²	6.94*10 ⁻³	0	6	71	0
EPC-3	0.02	2.08*10 ⁻²	1.39*10 ⁻²	1	ND	100	1
EPC-4	0.02	2.08*10 ⁻²	1.39*10 ⁻²	1	1	95	1

En la figura 7 se muestra la disminución de DQO en función del tiempo para los cuatro tratamientos de EPC. Se observa que a los 30 minutos de tratamiento los sistemas ECP-2 y ECP-4 presentan un incremento de DQO que es asociado a las interferencias del Fe(II) y H₂O₂ ya que en estos casos no se controla el pH, disminuyéndose la posibilidad de que se lleve a cabo la reacción de Fenton (16).

Figura 7. Curva de eliminación de DQO en función del tiempo, para los tratamientos de EPC



Al comparar los tratamientos EPC-2 y EPC-4, aplicando una corriente de 2 A (100 Am^{-2}) y 4 A (200 Am^{-2}), respectivamente, sin control de pH, se determina que un aumento en la densidad de corriente contribuye sustancialmente en la disminución de DQO. Los datos mostrados en la figura 7 indican una remoción de DQO del 71% y 95 % de remoción para EPC-2 y EPC-4, correspondiente. Esto está de acuerdo con otros estudios, en los cuales se ha reportado hasta un 90% de remoción de fenol en 30 minutos, cuando se aplica una densidad de corriente 3.5 A/cm^2 a electrodos de acero inoxidable y carbón. Este tiempo es reducido a sólo 10 minutos, incrementando la densidad de corriente 7.5 Acm^{-2} (Cañizares *et al.*, 1999).

El efluente experimenta un aumento de pH debido a la continua producción de OH^- en el cátodo por la reacciones (16, 20, 30, 48, 53) y es consumido para formar $\text{Fe}(\text{OH})_3$. A un $\text{pH} > 4$ los iones Fe^{+2} son inestables y son fácilmente transformados a Fe^{+3} , los cuales forman complejos con los radicales hidroxilo. Además, bajo condiciones alcalinas el H_2O_2 pierde su poder oxidante, debido a que se promueve su descomposición a O_2 y H_2O reacción (49).

Por otro lado, cuando se controla el pH del sistema (EPC-1 y EPC-3), el comportamiento de la DQO muestra 100% de eliminación para ambos

casos. Esto está asociado a que la especie de Fe predominante a estas condiciones es el Fe(II), la cual contribuye mayoritariamente en la reacción Fenton (16) y, por lo tanto a, la mineralización del fenol. Lo que concuerda con numerosas investigaciones que establecen el rango óptimo de pH para el reactivo Fenton de 2-4 (Pignatello, Oliveras y Mackay 2006; Arienzo *et al.*, 2001). Así también Pignatello describe un incremento en la constante de la reacción (16) (Pignatello, Oliveras y Mackay 2006; Neyens y Baeyens, 2003).

El tratamiento EPC-1 es considerado el más eficiente, porque requiere menor consumo de corriente eléctrica y remueve el 100% DQO comparado con los otros tratamientos.

Por los resultados anteriormente expuestos, se eligen los experimentos EC, EPC-1 y EPC-2 para estudiar la cinética de remoción del fenol; se utiliza una concentración inicial de fenol de 850 mgL^{-1} ($9.03 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$) y un tiempo de tratamiento de 30 min. En la figura 8 se muestran los perfiles de concentración.

Los datos de la figura 8 se analizaron mediante el método integral para determinar el orden de la reacción y la constante cinética correspondiente. En la tabla 7 se muestran los resultados de dicho análisis

Figura 8. Perfiles de concentración (EPC-1), (EPC-2) y (EC).

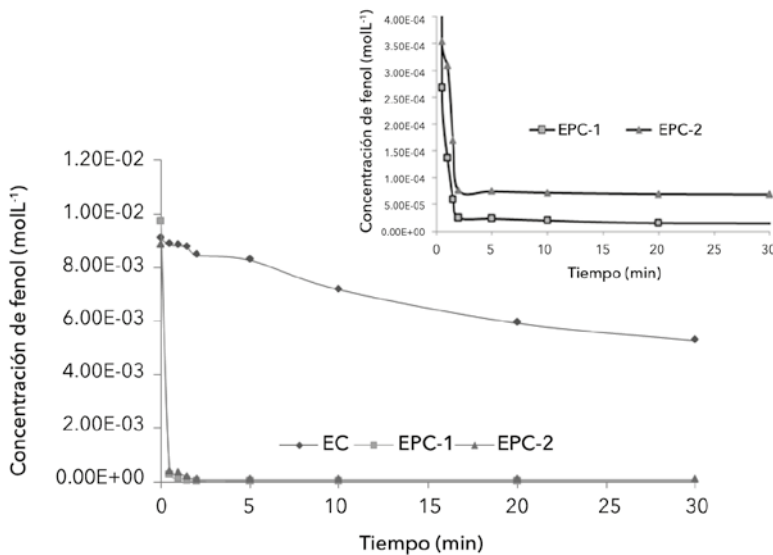


Tabla 7. Cinética de reacción para los perfiles de concentración

Experimento	Intervalo de concentración molL ⁻¹	Orden de reacción	Constante cinética	r ²
EC	9.07X10 ⁻³ a 5.27X10 ⁻³	2	0.0470Lmol ⁻¹ s ⁻¹	0.9938
EPC1	9.73X10 ⁻³ a 2.68X10 ⁻⁴	0	3.16*10 ⁻⁴ molL ⁻¹ s ⁻¹	1
EPC1	1.37X10 ⁻⁴ a 2.53X10 ⁻⁵	1	0.02805167 s ⁻¹	0.999
EPC2	8.81X10 ⁻³ a 3.54X10 ⁻⁴	0	2.82*10 ⁻⁴ Lmol ⁻¹ s ⁻¹	1
EPC2	3.10X10 ⁻⁴ a 7.58X10 ⁻⁵	1	0.02277 s ⁻¹	0.9916

De la tabla 7 se desprende que el proceso de electroperoxicoagulación es independiente de la concentración en un rango de concentración de 9.73X10⁻³ molL⁻¹ a 2.68X10⁻⁴ molL⁻¹; sin embargo, a partir de una concentración de 1.37X10⁻⁴ el orden global es 1. Este cambio de orden de reacción muy probablemente está indicando una diferencia de mecanismo o bien, de paso controlante en el mismo. Es posible que la generación de radicales •OH disminuya por la formación de complejos Fe⁺³ con sulfato (De Laat y Le, 2005), lo cual evita la formación nuevamente de Fe⁺² y por lo tanto, las reacciones (16) y (17) se ven desfavorecidas. Esto indica que los contaminantes son removidos por la acción combinada de la oxidación del radical •OH y la coagulación promovida por Fe(OH)₃, por esta razón se tienen altas eficiencias en las primeras etapas de degradación, pues domina la oxidación con •OH y posteriormente impera la polimerización o coagulación (Brillas y Casado, 2002). El proceso de electrocoagulación, sin embargo, muestra una dependencia constante de orden 2 con la concentración, esto se debe a que en este proceso no hay peróxido de hidrógeno y, por lo tanto, las reacciones (16) y (17) son inexistentes. Más aún, de acuerdo con la figura 5 (Barrera-Díaz *et al.*, 2011) las especies existentes son FeSO⁺⁴, FeHSO₄²⁺, Fe(SO₄)₂⁻. Es de esperarse que la concentración de estas especies coagulantes sea menor conforme el tiempo pasa, disminuyendo la probabilidad de que se encuentre con la materia orgánica y la oxide.

5. Conclusión

Después de comparar ambos procesos electroquímicos -EC y EPC-, se puede concluir que el mejor tratamiento para la remoción del fenol es la EPC bajo las siguientes condiciones: 2A y ajuste de pH a 3, pues así se

logra una remoción del 99% y una mineralización completa en 2 minutos de tratamiento, comparada con la EC que sólo logra 41% de remoción en un tiempo de 30 minutos.

Se comprueba que para que se lleve a cabo la reacción Fenton es necesario tener un pH ácido y el gran poder oxidante del radical $\bullet\text{OH}$.

6. Referencias

- Agladze, G.R. et al. (2007). The "In-cell" and "Ex-cell" Fenton Treatment of Phenol, 4-Chlorophenol and Aniline. *Journal of applied electrochemistry*, 37(3), 385-393.
- Ammar, S. et al. (2006). Electrochemical Degradation of the Dye Indigo Carmine at Boron-Doped Diamond Anode for Wastewaters Remediation. *Environmental Chemistry Letters*, 4(4), 229-233.
- Arienzo, M., Adamo, P., Chiarenzelli, J., Bianco, M.R. and De Martino, A., 2002. *Retention of Arsenic on Hydrous Ferric Oxides Generated by Electrochemical Peroxidation*. Chemosphere. 48: 1009-1018.
- Arienzo, M., Chiarenzelli, J., Scrudato, R., Pagano, J., Falanga L. & Connor B. 2001. Iron-mediated reactions of polychlorinated biphenyls in electrochemical peroxidation process (ECP). Chemosphere, 44, 1339-1346.
- Baena, N.M., 2005. *Degradación de Fenol Mediante Aireación y Foto Fenton: Estudio de las Variables de Operación A la Nivel Planta Piloto*. Tesis Maestría. Instituto Politecnico Nacional.
- Barrera-Díaz, C., Linares-Hernández, I., Roa-Morales, G., Bilyeu, B. and Balderas-Hernández, P., 2008. *Removal of Biorefractory Compounds in Industrial Wastewater by Chemical and Electrochemical Pretreatments*. Ind. Eng. Chem. Res. 48: 1253-1258.
- Barrera-Díaz, C., Bilyeu, B., Roa, G. and Bernal-Martinez, L., 2011. *Physicochemical Aspects of Electrocoagulation*. Sep. and Purif. Rev. 40: 1-24.
- Benitez, F.J., Beltran-Heredia, J., Acero, J. L. and Rubio, F.J., 2000. *Contribution of Free Radicals To Chlorophenols Decomposition by Several Advanced Oxidation Processes*. Chemosphere. 41: 1271-1277.

- Boye, B., Marième, Dieng, M. and Brillas, E., 2003. *Electrochemical Degradation of 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid in Aqueous Medium by Peroxi-Coagulation. Effect of Ph and UV Light*. *Electrochim. Acta*. 48: 781-790.
- Brillas, E., Boye, B., Baños, M.Á., Calpe, J.C. and Garrido, J.A., 2003. *Electrochemical Degradation of Chlorophenoxy and Chlorobenzoic Herbicides in Acidic Aqueous Medium by the Peroxi-Coagulation Method*. *Chemosphere*. 51: 227-235.
- Brillas, E. and Casado J., 2002. *Aniline Degradation by Electro-Fenton (R) and Peroxi-coagulation Processes Using a Flow Reactor for Wastewater Treatment*. *Chemosphere*. 47: 241-248.
- Brillas, E., Sires, I. and Oturan, M.A., 2009. *Electro-Fenton Process and Related Electrochemical Technologies Based on Fenton's Reaction Chemistry*. *Chem. Rev.* 109: 6570-6631.
- Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C. and Arrighi, L., 2008. *Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments*. *J. Hazard. Mater.* 160: 265-288.
- Canton, C., Esplugas, S. and Casado, J., 2003. *Mineralization of Phenol in Aqueous Solution by Ozonation Using Iron or Copper Salts and Light*. *Appl. Catal. B-Environ.* 43: 139-149.
- Cañizares, P., Domínguez, J. A., Rodrigo, M. A., Villaseñor, J. and Rodríguez, J., 1999. *Effect of the Current Intensity in the Electrochemical Oxidation of Aqueous Phenol Wastes at An Activated Carbon and Steel Anode*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 38: 3779-3785.
- Cañizares, P., Jiménez, C., Martínez, F., Sáez, C. and Rodrigo, M.A., 2007a. *Study of the Electrocoagulation Process Using Aluminum and Iron Electrodes*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46: 6189-6195.
- Cañizares, P., Lobato, J., Paz R., Rodrigo, M.A. and Sáez, C., 2007b. *Advanced Oxidation Processes for the Treatment of Olive-Oil Mills Wastewater*. *Chemosphere*. 67: 832-838.
- Dabrowski, A., Podkoscielny, P., Hubicki, Z. and Barczak, M., 2005. *Adsorption of Phenolic Compounds by Activated Carbon-A Critical Review*. *Chemosphere*. 58: 1049-1070.

- De Laat, J. and Gallard, H., 1999. *Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Fe(III) in Homogeneous Aqueous Solution: Mechanism and Kinetic Modeling*. Environ. Sci. Technol. 33: 2726-2732.
- De Laat, J. and Le, T.G., 2005. *Kinetics and Modeling of the Fe(III)/H₂O₂ System in the Presence of Sulfate in Acidic Aqueous Solutions*. Environ. Sci. Technol. 39: 1811-1818.
- Dehkordi, A.M. and Ebrahimi, A. A., 2009. *Catalytic Wet Peroxide Oxidation of Phenol in a New Two-Impinging-Jets Reactor*. Ind. Eng. Chem. Res. 48: 10619-10626.
- Duesterberg, C.K., Mylon S.E. and Waite, T.D., 2008. *pH Effects on Iron-Catalyzed Oxidation using Fenton's Reagent*. Environ. Sci. Technol. 42: 8522-8527.
- Egusquiza, M.G., Romanelli G.P., Cabello, C.I., Botto I.L. and Thomas H.J., 2008. *Arene and Phenol oxidation with Hydrogen Peroxide Using Sandwich Type Substituted Polyoxometalates as Catalysts*. Catal. Commun. 9: 45-50.
- Gimeno, O., Carbajo M., Beltrán F.J. and Rivas F.J. 2005. *Phenol and Substituted Phenols Aops Remediation*. J. Hazard. Mater. 119: 99-108.
- Guinea, E., Arias, C., Cabot, P.L., Garrido, J.A., Rodriguez, R.M., Centellas, F. and Brillas, E. 2008. *Mineralization of Salicylic Acid in Acidic Aqueous Medium by Electrochemical Advanced Oxidation Processes Using Platinum and Boron-Doped Diamond as Anode and Cathodically Generated Hydrogen Peroxide*. Water Res. 42: 499-511.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (2009). *Estadísticas a Propósito del día Mundial del Agua Datos Nacionales*. Artículo en línea, disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2009/Agua09.doc>. Consultado el 22 de marzo de 2009.
- Juang, R.S. and Tsai, S.Y. 2006. *Growth kinetics of Pseudomonas Putida in the Biodegradation of Single and Mixed Phenol and Sodium Salicylate*. Biochem. Eng. J. 31: 133-140.
- Khoufi, S., Feki, F. and Sayadi, S., 2007. *Detoxification of Olive Mill Wastewater by Electrocoagulation and Sedimentation Processes*. J. Hazard. Mater. 142: 58-67.

- Kyriacou, A., Lasaridi K.E., Kotsou, M., Balis C. and Pilidis, G., 2005. *Combined Bioremediation and Advanced Oxidation of Green Table Olive Processing Wastewater*. *Process Biochem.* 40: 1401-1408.
- Lakshmanan, D., Clifford, D.A. and Samanta, G., 2009. *Ferrous and Ferric Ion Generation during Iron Electrocoagulation*. *Environ. Sci. Technol.* 43: 3853-3859.
- Lazarova, Z. and Boyadzhieva, S., 2004. *Treatment of Phenol-Containing Aqueous Solutions by Membrane-Based Solvent Extraction in Coupled Ultrafiltration Modules*. *Chem. Eng. J.* 100: 129-138.
- Martinez-Huitle, C.A. and Brillas, E., 2009. *Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: A general review*. *Appl. Catal. B-Environ.* 87: 105-145.
- Modirshahla, N., Behnajady, M. A. & Mohammadi-Aghdam, S., 2008. *Investigation of the Effect of Different Electrodes and their Connections on the Removal Efficiency of 4-Nitrophenol from Aqueous Solution by Electrocoagulation*. *J. Hazard. Mater.* 154: 778-786.
- Mollah, M.Y.A., Morkovsky P., Gomes, J.A.G., Kesmez M., Parga, J. and Cocke D.L., 2004. *Fundamentals, Present and Future Perspectives of Electrocoagulation*. *J. Hazard. Mater.* 114: 199-210.
- Mollah, M.Y.A., Schennach, R., Parga J.R. and Cocke D.L., 2001. *Electrocoagulation (EC), Science and Applications*. *J. Hazard. Mater.* 84: 29-41.
- Moreno, C.H.A., Cocke, D.L., Gomes, J.A.G., Morkovsky, P., Parga, J.R., Peterson, E. and Garcia, C. 2009. *Electrochemical Reactions for Electrocoagulation Using Iron Electrodes*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48: 2275-2282.
- Neyens, E. and Baeyens, J., 2003. *A Review of Classic Fenton's Peroxidation as an Advanced Oxidation Technique*. *J. Hazard. Mater.* 98: 33-50.
- Pignatello, J.J., Oliveros, E. and Mackay, A., 2006. *Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry*. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 36: 1-84.

- Qiang, Z., Chang, J.H. and Huang, C.P., 2003. *Electrochemical Regeneration of Fe^{2+} in Fenton Oxidation Processes*. Water Res. 37: 1308-1319.
- Ratna, K.P., Chaudhari, S., Khilar, K.C. and Mahajan, S.P., 2004. *Removal of Arsenic from Water by Electrocoagulation*. Chemosphere. 55: 1245-1252.
- Yamamoto, T., Kim S.I., Chaichanawong, J., Apiluck, E.U. and Ohmori, T., 2009. *Removal of Aqueous Organic Pollutants By Adsorption-Catalytic Process Using Mesoporous Carbon Beads Loaded With Metal Oxides*. Appl. Catal. B-Environ. 88: 455-461.

Capítulo II

Configuraciones alternas de un reactor con intercambio de calor y membranas por simulación

Ángel Bautista Delgado^{1*}
Armando Ramírez Serrano¹
Rubí Romero Romero²
César Pérez Alonso¹

1. Introducción

En la actualidad y debido al gran avance científico y tecnológico, en la ingeniería química en el campo de ingeniería de reactores, se han diseñado reactores cada vez más novedosos para llevar a cabo reacciones altamente exotérmicas de una manera más controlada en su operación y con una disminución significativa en la emisión de efluentes contaminantes al medio ambiente.

En nuestros días, el empleo de reactores multitubulares para reacciones de oxidación parcial continua vigente ya que, debido a su configuración espacial, se pueden lograr buenos controles de temperatura eficientes en reacciones muy exotérmicas; sin embargo, aun presentan algunas deficiencias en cuanto al consumo energético y el control de adición de los reactivos al reactor.

Por otro lado, en las últimas décadas se ha incrementado el uso de reactores con membrana con aplicaciones en reacciones de oxidación parcial, pero solamente a nivel laboratorio, permitiendo alcanzar mejores controles de adición de reactivos en el lecho catalítico, no así de la temperatura de reacción. Una de las ventajas de usar reactores con membrana es alcanzar incrementos en la conversión, las cuales sido comprobados por una gran cantidad de investigadores, y además han hecho evidente los potenciales beneficios económicos de su implementación industrial (Zaspalis y Burggraaf, 1991; Zaman, 1994, Saraco *et al.*, 1999; Dittmeyer *et al.*, 2001; Dixon, 2003; Seidel-Morgenstern, 2005). Algunas de las aplicaciones más

importantes de las membranas corresponden a las separaciones de compuestos orgánicos y deshidrogenaciones de hidrocarburos como la del ciclohexano, etilbenceno, metano, etano, propano (Tiscareño, 1996; Isamil, 2001; Saucedo, 1999) y reacciones de oxidaciones parciales como el etano, metano (O'Neil, 2006) y etileno (Donsi *et al.*, 2005).

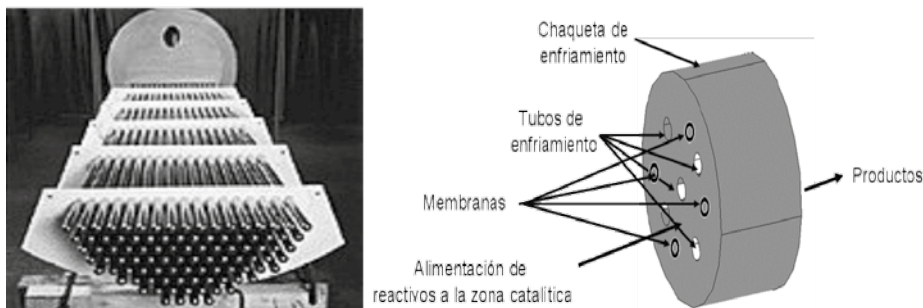
Para lograr alcanzar mejores rendimientos y conversiones, se han propuesto nuevas alternativas de diseño de reactores novedosos, considerando las ventajas que presentan los reactores tubulares y con membrana. El diseño de éste es considerar un reactor con intercambio de calor y membranas, donde el catalizador se encuentra en la coraza y algunos tubos permiten la adición controlada de reactivos (membranas) y otros de enfriamiento (Ramírez, 2007). En este capítulo se presenta una investigación que permita encontrar las mejores configuraciones para alcanzar las mejores conversiones y rendimientos por arriba de los reactores convencionales.

Para llevar a cabo la simulación del reactor con intercambio de calor y membranas, se eligió la reacción de oxidación parcial del etileno para la obtención de óxido de etileno. La producción de este intermedio tiene una gran importancia industrial, ya que se emplea como materia prima para la producción de un gran número de productos químicos principalmente en el área textil, farmacéutica y tensoactivos. La participación en la producción del óxido de etileno en la industria mexicana representa el 5% respecto a la producción mundial que fue en el 2010 de 19 millones de toneladas, y es una oportunidad para incidir en la participación en este proceso.

1.1. Reactor con intercambio de calor y membranas

En los trabajos presentados en el AMIDIQ (Ramírez, 2004 y 2005), se contempló la derivación de un modelo para la simulación del diseño de un reactor de lecho empacado, cuya configuración es similar a la de un intercambiador de calor, donde el catalizador se encuentra empacado por el lado de la coraza y rodeado de tubos para la transferencia de calor y la adición controlada de reactivo. En la figura 1 se presenta un esquema donde se representa el reactor modelo.

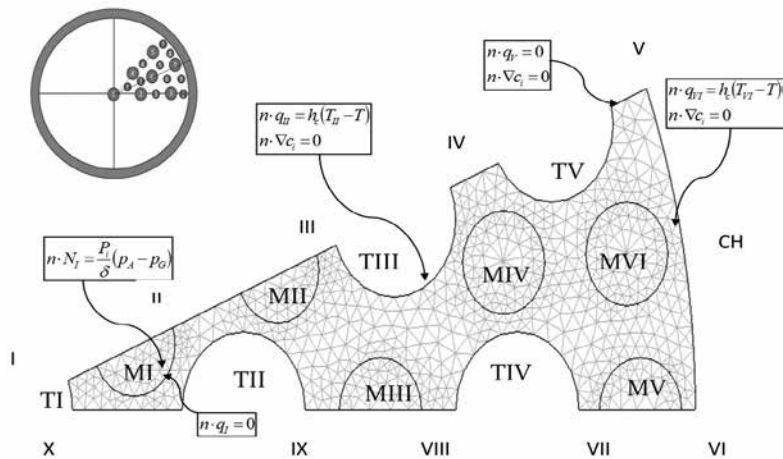
Figura 1. Esquema del reactor con intercambio de calor y membranas



Las diferentes configuraciones del reactor se basaron en el modelo propuesto por Tiscareño Ramírez (2009), la cual se inició con la distribución de 13 tubos; 9 tubos de membrana y 4 de enfriamiento. En este capítulo se muestra el escalamiento a 25, 49, 97 y 137 tubos buscando con ellos la mejor distribución y configuración con la finalidad de obtener las mejores conversiones y rendimientos, además de evitar la formación de puntos calientes y lograr un mejor control de la temperatura mediante la modificación de diámetros de los tubos y flujos de alimentación de oxígeno y etileno.

Las dimensiones del reactor se mantuvieron constantes, con un diámetro de 10 cm y una longitud de 50 cm. Se presentan tres zonas en el reactor: a) zona de reacción (coraza), donde se encuentra empacado el catalizador; b) zona de adición controlada del reactivo (membranas); y c) zona de la interfases de intercambio de calor (enfriamiento). En la figura 2 se presenta un dieciseisavo de la parte frontal del reactor, cuya distribución consiste de 97 tubos; 64 corresponden a las membranas y 33 de enfriamiento, con diámetros de 6 mm y 9 mm respectivamente.

Figura 2. Malleo y condiciones fronteras para una unidad simétrica del modelo



Las condiciones de frontera son presentadas en la figura 2, donde los datos de MI a MVI corresponden a las membranas, las condiciones de TI a TV a los tubos de enfriamiento, a la chaqueta la condición VI y las condiciones de la I hasta la XI a las de simetría.

La temperatura del fluido en el interior de cada tubo y chaqueta del reactor varía en dirección axial y se considera un perfil unidimensional axial de temperatura dentro de cada tubo de enfriamiento; la misma consideración es tomada en cuenta para las membranas.

Para el mejor desarrollo del modelo se consideraron las siguientes suposiciones:

- La velocidad superficial varía con la posición axial, pero es independiente de la radial y angular.
- La dispersión y la conductividad axial son despreciables en comparación a la magnitud de los términos convectivos.
- Los coeficientes radiales de transporte de difusividad efectiva y conductividad efectiva se suponen constantes.
- El coeficiente de película de transferencia de calor, h_c , se considera constante para cada tubo y de la chaqueta durante la simulación.

- La membrana se considera selectiva a uno de los reactivos; inerte y distribuye el reactivo en dirección axial del lecho catalítico.
- Se desprecia las resistencias internas y externas de transferencia de masa.
- El sistema se supone en estado estacionario.

Balance de masa en la cámara de reacción (Coraza).

$$\frac{\partial N_i}{\partial z} = \frac{D_e}{u_s} \left(\frac{\partial^2 N_i}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 N_i}{\partial y^2} \right) - \rho_B r_{p_i} \quad (1)$$

Balance de energía en la cámara de reacción (Coraza).

$$\frac{\partial T}{\partial z} = \frac{k_e}{u_s \rho c_p} \left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} \right) - \sum \frac{\rho_B (-\Delta H_r) r_{p_r}}{u_s \rho c_p} \quad (2)$$

Donde $N_i = u_s C_i$ es el flux molar del componente i , el subíndice r se refiere a la reacción independiente y r_p es la velocidad de reacción catalítica la cual incluye las resistencias externas e internas.

Balance de masa en las membranas. Debido a que los perfiles de concentración en el tubo de membrana dependen de la posición, es necesario incluir el balance de masa para esta región, sin término de reacción:

$$\left(\frac{\partial G_i}{\partial z} \right)_k = \frac{D_m}{u_m} \left(\frac{\partial^2 G_i}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 G_i}{\partial y^2} \right) \quad (3)$$

Donde G_i es el flux molar de oxígeno y k es el número de membrana dentro de la unidad de simetría.

Las condiciones de frontera se muestran en la figura 2 y describen a continuación:

Frontera en tubos de transferencia de calor. Las fronteras TI, TII, TIII y TIV corresponden a las fronteras donde el flux de calor conductivo de la zona

de reacción es igual al flux convectivo del fluido de enfriamiento. En estas fronteras no existe transferencia de masa.

$$n \cdot q_l = hc \cdot (T_l - T) \quad (4)$$

$$n \cdot \nabla C_i = 0 \quad (5)$$

Donde el subíndice l representa el número de frontera e i la especie de reacción.

Fronteras de Simetría. Las fronteras II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X y XI son fronteras de simetría tanto para la transferencia de calor como de masa.

$$n \cdot q_{II} = 0 \quad (6)$$

$$n \cdot \nabla C_i = 0 \quad (7)$$

Frontera de Permeación (Membranas). Las fronteras MI, MII, MIII, MIV, MV, MVI corresponden a la transferencia de masa a través de la membrana y se considera que no existe transferencia de calor.

$$n \cdot q_{III} = 0 \quad (8)$$

$$n \cdot q_{III} = \frac{P_i}{\delta} (P_i - P_G) \quad (9)$$

Frontera en la chaqueta de Enfriamiento. La frontera VI se considera la transferencia de calor a través de la chaqueta de enfriamiento del reactor.

$$n \cdot q_{VII} = hc \cdot (T_l - T) \quad (10)$$

$$n \cdot \nabla C_i = 0 \quad (11)$$

Ecuaciones auxiliares. Una de las suposiciones del modelo es considerar que la velocidad superficial varía con el flujo molar y temperatura; para tal efecto se emplea la siguiente ecuación:

$$u_s = T_{avg} \cdot F_T \cdot \left(\frac{R_g}{S \cdot P_T} \right) \quad (12)$$

Donde: S es el área transversal del reactor; T_{avg} la temperatura promedio de cada sección transversal y F_T es el flujo total de las especies que participan en la reacción.

La evaluación de los flujos molares para el oxígeno (A) y del etileno (B), tomados como variables independientes, se evalúan de la siguiente manera:

$$F_A = \int_{AT} N_A dA \quad (13)$$

$$F_B = \int_{AT} N_B dA \quad (14)$$

Para los flujos molares de las especies óxido de etileno (C), Agua (D) y Bióxido de Carbono (E) y el flujo total se obtiene por estequiometria (Ramírez, 2006; Tiscareño, 2007):

$$F_C = \frac{6}{5} [(F_{B_O} - F_{A_O}) - (F_B - \frac{1}{3} F_A)] \quad (15)$$

$$F_D = \frac{2}{5} [(F_B - 2F_A) - (F_{B_O} - 2F_{A_O})] \quad (16)$$

$$F_E = \frac{2}{5} [(F_B - 2F_A) - (F_{B_O} - 2F_{A_O})] \quad (17)$$

$$F_T = F_{T_O} - \frac{3}{5} [(F_{B_O} - \frac{1}{3} F_{A_O}) - (F_B - \frac{1}{3} F_A)] \quad (18)$$

2. Caso de estudio

Para el desarrollo de esta investigación se tomó como caso de estudio a la producción del óxido de etileno, con la intención de mostrar la factibilidad de emplear nuevas alternativas de diseño de reactores. La producción de este intermedio, por métodos convencionales, implica gastar grandes cantidades de energía para el control de la reacción, pues al ser una reacción extremadamente exotérmica presenta grandes riesgos de explosión, además de obtener bajos rendimientos debido a que las reacciones secundarias que castigan la selectividad de los productos al propiciar la formación de subproductos indeseables y sin valor agregado, en este caso, dióxido de carbono y agua.

La reacción de epoxidación del etileno emplea un catalizador de plata, el cual es fuertemente selectivo a la formación del óxido de etileno. Varios investigadores han estudiado y reportado la cinética de reacción (Twigg,

1946; Westertep y Ptasinski, 1984) donde proponen una serie de reacciones consecutivas y en paralelo para la formación del óxido de etileno y la formación de los productos indeseables. Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó la cinética de la oxidación parcial del etileno propuesta por Westertep (1984b) y Lordanidis (2002), los cuales sólo toman en cuenta las dos primeras etapas del sistema de reacción:



Considerando que ambas reacciones corresponden a una cinética de primer orden para el oxígeno y de orden cero para el etileno:

$$R_{\text{eo}} = k_1 C_{\text{O}_2} \quad (21)$$

$$R_{\text{ox}} = k_2 C_{\text{O}_2} \quad (22)$$

Donde:

$$k_1 = 70.4 \exp\left(\frac{-7200}{T}\right) \quad (23)$$

$$k_2 = 49.4 \times 10^3 \exp\left(\frac{-10800}{T}\right) \quad (24)$$

2.1. Implementación del software Comsol®

Para la simulación del reactor con membrana e intercambio de calor se utilizó el software comercial Comsol®, el cual tiene las características adecuadas para el desarrollo exitoso de este proyecto. Esta herramienta computacional es útil para modelar y resolver problemas científicos e ingenieriles basados en ecuaciones diferenciales parciales. Este software contempla la solución de acoplamiento de varios fenómenos físicos simultáneamente, como el transporte de masa, cantidad de movimiento y de energía.

La construcción de estos modelos requiere definir las propiedades fisicoquímicas de materiales que intervienen en el proceso: los valores de los parámetros de transporte y su dependencia espacial, los flujos molares de los componentes que intervienen en el proceso y las ecuaciones de transporte involucrados en el sistema. Para la solución numérica, se reali-

za por medio de la interface gráfica y apoyándose en la programación en lenguaje de Comsol®, compatible para los lenguajes en Matlab y Fortran. El software comercial Comsol® emplea el método de Elementos Finitos junto con un malleo adaptativo y con control del error usando una variedad de solucionadores numéricos.

Para formular el modelo del reactor con membrana e intercambio de calor se emplean los módulos de ingeniería química y de ecuaciones diferenciales parciales. Del módulo de ingeniería química se tomará en cuenta lo referente a la transferencia de masa y de transferencia de calor tridimensional, mientras que en el módulo de ecuaciones diferenciales parciales se establecerá un sistema unidimensional en estado transitorio.

3. Resultados

Debido a la naturaleza discreta del número de tubos de membrana y de intercambio, y el gran número de alternativas para su colocación interna, la optimización de la configuración interna es una tarea muy compleja; sin embargo, en el presente trabajo se han explorado directamente algunas configuraciones que en su acomodo pueden evitar perfiles pronunciados transversales y concentración. Intuitivamente se decidió explorar diferentes acomodados esperando perfiles favorables, para la distribución de tubos de enfriamiento y de membranas dentro del reactor. Además se adecuaron los diámetros de los tubos y se indagaron los flujos de etileno y oxígeno más adecuados, con la finalidad de obtener mejores conversiones y rendimientos y evitar en lo posible la formación de puntos calientes en el interior del reactor para este tipo de reacciones altamente exotérmicas.

Los diámetros de tubos de enfriamiento y de membranas utilizados para las configuraciones del reactor en las simulaciones se especifican en la tabla 1.

Tabla 1. Diámetros de membrana y tubo de enfriamiento

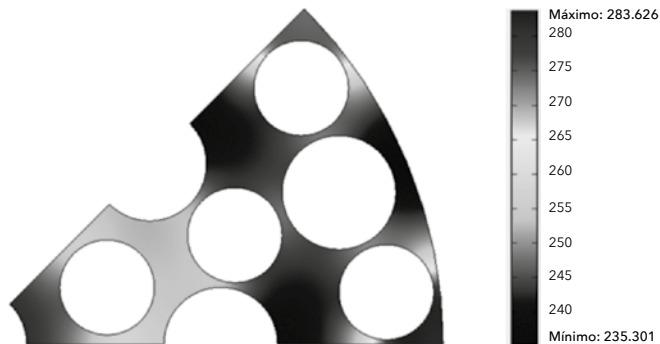
Cantidad de tubos			
Diámetros	49	97	137
Membranas	10 mm	6 mm	4 mm
Tubos de enfriamiento	12 mm	9 mm	7 mm

En las figuras 3, 4 y 5 se muestran los perfiles de temperatura en la sección transversal a la salida del reactor, para diferentes distribuciones y número

de tubos, de las tres mejores simulaciones con la variación de tubos de 49, 97 y 137 tubos respectivamente.

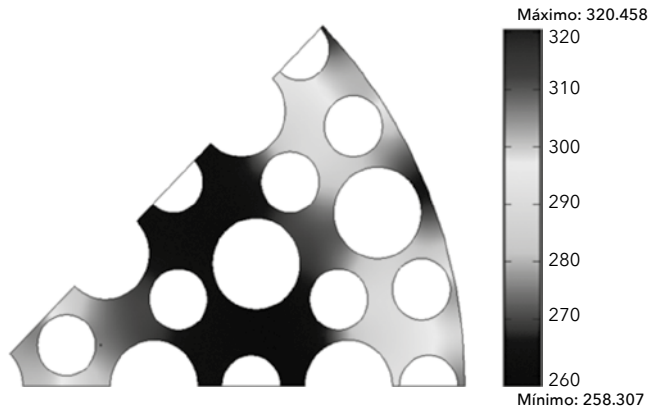
La figura 3 representa la unidad de simetría para un reactor con 49 tubos internos en total, 32 tubos son de membrana y 17 de enfriamiento. La distribución de temperatura es uniforme, presentando temperaturas máxima (283 °C) en la parte central de la sección y el centro del reactor; consecuencia de la relación Área/Volumen del reactor, y la temperatura mínima (235 °C) en la pared de la chaqueta. La conversión alcanzada fue de 51%, rendimiento del 62% y una selectividad de 61.1%.

Figura 3. Corrida de 49 tubos con una conversión de 51 por ciento, rendimiento de 62% y selectividad 61.6%



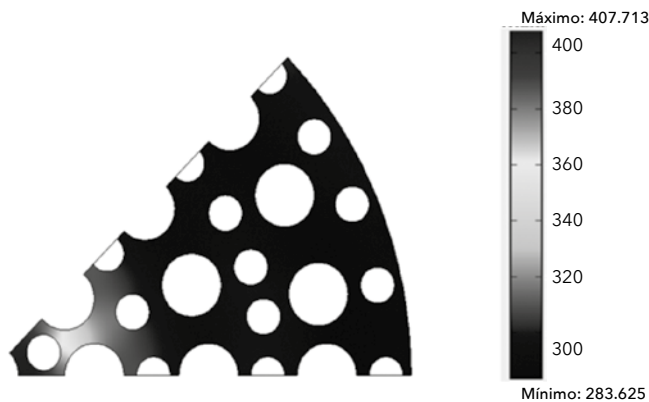
La figura 4 muestra la distribución de temperaturas para el reactor con 97 tubos (64 de membrana y 33 de enfriamiento). A diferencia de la configuración de 32 tubos, la temperatura máxima se incrementó a 320 °C y la mínima en 258 °C. Sin embargo, la conversión mejora en tres puntos porcentuales. La conversión alcanzada fue de 54%; rendimiento del 51% y una selectividad del 60.6%.

Figura 4. Corrida de 97 tubos con una conversión de 54 por ciento, rendimiento de 51%, selectividad de 60.6%, rango de temperaturas de 258 a 320 °C



En la figura 5 se muestra la distribución de temperaturas en un reactor que consta de 137 tubos (88 de membrana y 49 de enfriamiento). Para esta configuración, se observa que existe un incremento muy drástico, 407 °C, y la conversión y rendimiento disminuye considerablemente, por lo que no es recomendable considerar el diseño con esta configuración con las dimensiones establecidas. La conversión alcanzada fue de 24%, rendimiento del 29% y una selectividad de 61.7%.

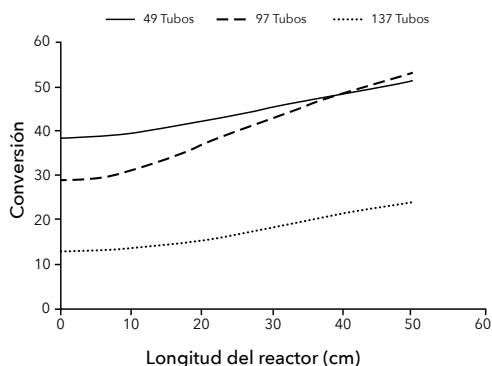
Figura 5. Corrida de 137 tubos con 24% de conversión, rendimiento de 29%, selectividad de 61.7%, rango de temperaturas de 283 a 407 °C



En las figuras 6, 7 y 8 se muestran las gráficas de comparación de los porcentajes de conversión, rendimiento y selectividad de las tres distribuciones mostradas en esta investigación, donde se puede apreciar que la mejor de ellas corresponde a un reactor constituido con 97 tubos, logrando una mejor conversión y rendimiento respecto a las otras configuraciones. Por otro lado se logra un mejor control de temperatura a través del reactor.

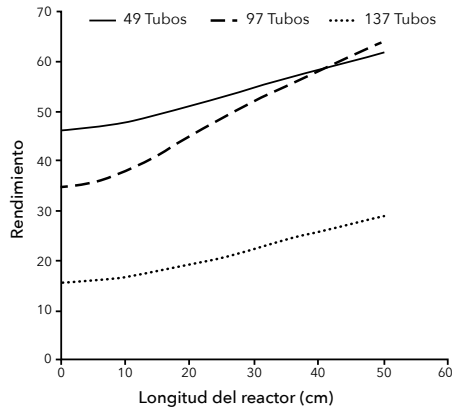
La figura 6 muestra el comparativo de la conversión alcanzada en la simulación para las distintas configuraciones, como se puede apreciar la que mayor conversión presenta es la de 97 tubos con un 54%, seguida de la 49 tubos con un 51% y por último la de 137 tubos con 24%.

Figura 6. Gráfica comparativa de la conversión en las tres distribuciones



La figura 6 muestra que el mejor rendimiento alcanzado en las simulaciones corresponde al reactor con 49 tubos, sin embargo, cuando la longitud del reactor alcanza los 50 cm, se logra obtener el mismo rendimiento. Es notorio que en el reactor con mayor número de tubos internos no se tienen resultados positivos.

Figura 7. Comparación del rendimiento para tres configuraciones del reactor



En la figura 7 se muestra el comparativo de la selectividad alcanzada en la simulación para las distintas configuraciones; además se aprecia la selectividad mejora cuando la temperatura es mayor, es decir, cuando el número de tubos se incrementa hasta 137 en la configuración del reactor.

Figura 8. Comparación de la selectividad para tres configuraciones distintas

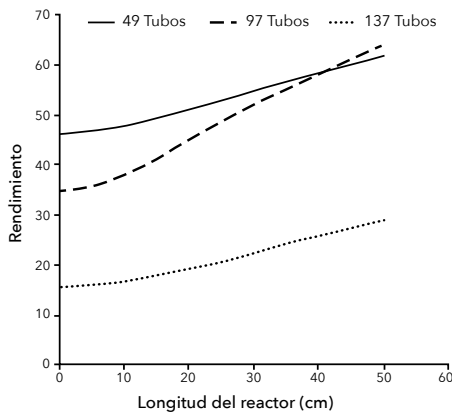


Tabla 2. Resultados de la simulación de conversión, rendimientos y selectividades a diferentes condiciones de operación

Corrida	Número de tubos	Condiciones		Temperatura °C		% Conversión	% Rendimiento	% Selectividad
		Flujo de oxígeno	Flujo de etileno	Mínima	Máxima			
1	49	0.002896	4.212	235	283	51	62	60.6
7	97	0.02606	1.6453	258	320	54	64	61.5
16	137	0.01158	2.6683	283	407	24	29	61.7

La tabla 2 muestra los mejores resultados de las simulaciones realizadas con distintas distribuciones y configuraciones de tubos en el reactor, considerando que el diámetro del reactor (10 cm), su longitud (50 cm) y la permeabilidad de la membrana ($6.08 \times 10^{-4} \text{ m}^2/\text{s Pa}$) se mantienen constantes.

4. Conclusiones

De la investigación realizada se pueden resaltar las siguientes conclusiones:

Debido a que la optimización de la configuración interna es una tarea muy compleja, de acuerdo con la naturaleza discreta del número de tubos y el gran número de alternativas para su colocación, se concluye que una de las mejores alternativas corresponde a la configuración de 97 tubos, en la cual se obtuvieron los mejores rendimientos y conversiones, a pesar de sacrificar la selectividad.

De acuerdo con las diferentes configuraciones y distribución de los tubos internos en el reactor, es posible lograr un buen control de temperatura en el interior del mismo, logrando perfiles uniformes, tanto en las direcciones axiales como radiales.

Para obtener las mejores condiciones de operación, se analizaron algunas de las variables continuas como los flujos molares de los reactivos, observándose que cuando se mantiene constante uno de los flujos (etileno), las

conversiones y rendimientos disminuyen, además la temperatura se incrementa significativamente. En el caso inverso, cuando el flujo de etileno varía, se observa un incremento en la conversión y en el rendimiento; además de lograr un mejor control de la temperatura.

Para lograr la optimización de reactores de esta naturaleza se requiere considerar: a) optimización de variables de flujos, concentraciones y temperaturas de alimentación así como los flujos y temperaturas de las corrientes de enfriamiento; b) estimación de la variación con la temperatura en los parámetros de transporte; c) considerar caídas de presión, y d) análisis de la variación de diámetros de tubos de enfriamiento y membranas en términos de las dimensiones del reactor.

5. Referencias

- Al-Juaied, M.A., D. Lafarga y A. Varma (2001). Ethylene Epoxidation in A Catalytic Packed-Bed Membrane Reactor: Experiments and Model. *Chemical Engineering Science*. 56(2): 395-402.
- Backer, R. (2004). *Membrane Technology and Applications*. 2da ed. Estados Unidos: John Wiley & Sons. 38-45.
- Basile, A., L. Paturzo y F. Laganà (2001). The Partial Oxidation of Methane to Syngas in a Palladium Membrane Reactor: Simulation and Experimental Studies. *Catalysis Today*. 67 (1-3): 65-75.
- Basile, A., L. Paturzo y A. Vazzana (2003). Membrane Reactor for the Production of Hydrogen and Higher Hydrocarbons From Methane over Ru/Al₂O₃ Catalyst. *Chemical Engineering Journal*. 93(1): 31-39.
- Bird, R., W. Steward y E. Lightfoot (2006). *Fenómenos de Transporte*. 2da ed. Limusa Wiley. Cap.13. pp. 1-29.
- Charudatta, S. P., S. A. Martin Van y J. A. M. Kuipers (2007). Fluidised Bed Membrane Reactor for Ultrapure Hydrogen Production via Methane Steam Reforming: Experimental Demonstration and Model Validation. *Chemical Engineering Science*. 62(11): 2989-3007.
- Dittmeyer, R., V. Höllein y K. Daub (2001). Membrane Reactors for Hydrogenation and Dehydrogenation Processes Based on Supported Palladium. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 173(1-2): 135-184.

- Dixon, A.G. (2003). Recent Research in Catalytic Inorganic Membrane Reactors. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 1(1): R6.
- Fernandes, F. A. N. y A. Soares (2006). Methane Steam Reforming Modeling in A Palladium Membrane Reactor. *Fuel*. 85(4): 569-573.
- Foust, A. y L. Wenzel (1989). *Principios de Operaciones Unitarias*. USA: CECSA, pp. 333-345.
- Hsieh, H. (1996). *Inorganic Membranes for Separation and Reaction*. El Sevier Science, pp. 119-127.
- O'Neill, C. y E. Wolf (2006). Yield Improvements in Membrane Reactors for Partial Oxidation Reactions. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 45(8): 2697-2706.
- Ramírez, A, F. Tiscareño y J. Ochoa (2007). Modelamiento tridimensional para reactores catalíticos con membranas e intercambio de calor para oxidación parcial de etileno. *Memorias del XXVII encuentro Nacional AMIDIQ*. Manzanillo, Colima.
- Ramírez, A., F. Tiscareño y J. Ochoa (2006). Modelamiento tridimensional para reactores catalíticos con membranas e intercambio de calor para oxidación parcial del etileno. *Memorias del XXVIII Encuentro Nacional AMIDIQ*, Manzanillo, Colima.
- Ramírez Serrano, A., F. Tiscareño Lechuga y J. A. Ochoa Tapia (2009). *Three-Dimensional Model of a Membrane Reactor Configuration with Cooling Tubes*. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 48(3): 1134-1139.
- Samil, A.F. y L.I. David (2001). A Review on the Latest Development of Carbon Membranes for Gas Separation. *Journal Membranes Science*. 193(1): 1-18.
- Saraco, G. et al. (1999). *High-Temperature Membrane Reactors: potential and problems*. *Chemical Engineering Science*. 54(13-14): 1997-2017.
- Saucedo Cervantes, J. A. (1999). Análisis de Factibilidad Económica de Reactores con Membranas en Procesos de Deshidrogenación. Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Celaya, México.

- Seidel Morgenstern, A. (2005). *Analysis and experimental investigation of catalytic membrane reactors. Integrated Chemical Processes: Synthesis, Operation, Analysis, and Control*. K. Sundmacher, A. Kienie y A. Seidel Morgenstern, Weinheim: Wiley-VCH, pp. 359-390
- Valiente A. y J. Noriega (1993). *Manual del ingeniero químico*. México: Limusa, pp. 521-533.
- Zaman, J. y A. Chakma (1994). *Inorganic Membrane Reactors. Journal Membranes Science*. 92(1): 1-28.
- Zaspalis, V.T. y A. J. Burggraaf (1991). *Inorganic Membranes: Synthesis, Characteristics and Applications* Ed. R.R. Bhave, New York: Reinhold, pp. 249.

Capítulo III

Estudio económico de una columna de absorción para la captura de CO₂ emitido en una planta termoeléctrica*

Vidal Morales Mercado^{1, 2 *}

Rosa Hilda Chávez Torres²

Rubí Romero Romero^{3 **}

Reyna Natividad Rangel^{3 ***}

1. Introducción

La contaminación ambiental es uno de los principales problemas de la sociedad contemporánea. El desarrollo tecnológico, el crecimiento demográfico, la industrialización y el uso de nuevos métodos de agricultura tecnificada son algunos de los factores que contribuyen a que se liberen al ambiente de forma continua cantidades cada vez mayores de un gran número de sustancias químicas, sintéticas y naturales. Dichas sustancias que se emiten al ambiente, en la mayoría de los casos ya rebasaron la capacidad de los sistemas para transformarlas, asimilarlas o eliminarlas; esto ha traído como consecuencia el deterioro ambiental (Rivero y Pociano, 1993).

En México la Ley Federal para el Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente de 1988 menciona que: "se entiende por contaminación la presencia en el ambiente de uno o más contaminantes (materia o energía) o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico" (LGEEPA, 1998).

Las sustancias consideradas contaminantes atmosféricos son numerosas, sólo por mencionar algunos: gases como el bióxido de azufre, los óxidos de nitrógeno, monóxido de carbono, bióxido de carbono, ozono, material particulado (PST) y diversos metales pesados (Jiménez, 2002).

El cambio climático está directamente asociado al consumo de energías fósiles y, debido a esta situación, el calentamiento global de la tierra es el resultado del aumento de las emisiones de los gases de efecto invernadero (Ballester, 2005).

El efecto invernadero es un fenómeno natural, el cual provoca un calentamiento de la atmósfera en sus capas bajas, los gases que lo producen se denominan gases de efecto invernadero, compuestos naturales de la atmósfera donde su concentración y distribución está regulada por los ciclos de carbono y nitrógeno. Los principales gases de efecto invernadero son producto de la actividad humana como: el N_2O producto de cambios de suelo agrícola; CH_4 procedente del gas natural, residuos sólidos y aguas residuales; CFC, proveniente de refrigerantes, repelentes y productos en aerosol; y el CO_2 producto de la combustión de combustibles fósiles. El CO_2 es emitido principalmente por 3 sectores: transporte, terciario (doméstico y servicios) y el sector eléctrico (Morales *et al.*, 2008).

El impulso económico de los países desarrollados y especialmente de aquellos en vías de desarrollo, está íntimamente ligado al crecimiento de la demanda energética. Las proyecciones energéticas indican aún la necesidad de utilizar combustibles del tipo fósiles y dicha necesidad seguirá en aumento hasta que no se desarrollen nuevas tecnologías verdes y económicamente eficientes. La baja eficiencia de los procesos actuales se visualiza en los efectos de contaminación (cambio climático) haciendo necesario controlar las emisiones de estos gases, como el CO_2 , regulándolos, con el fin de proteger el medio ambiente (Morales *et al.*, 2008).

El Protocolo de Kyoto es el primer paso esencial para la mitigación de la emisión de contaminantes. Actualmente, se discute y promueven por algunos gobiernos e industrias un instrumento adicional para mitigar el cambio climático. Este instrumento es la captura y secuestro de carbono (CCS, acrónimo en inglés de Carbón Capture and Storage) (1998), que consiste en la captura de dióxido de carbono, ya sea en una planta o instalación industrial. El transporte y la inyección final del CO_2 en formaciones geológicas del subsuelo, se realiza principalmente en formaciones salinas, o en yacimientos agotados de petróleo y gas. La captura de CO_2 puede ser una contribución significativa para mitigar el cambio climático de manera permanente en lugar de emitirse a la atmósfera. Con la creciente necesidad de reducir las emisiones antropogénicas de CO_2 , es evidente que las tecnologías existentes y nuevas para generar energía eléctrica, a partir de combustibles fósiles, tienen que desarrollarse aún más, pues este sector representa una gran fuente de emisiones de CO_2 (Craing, 2009).

La capacidad técnica de remover CO₂ de las fuentes puntuales de emisión se ha establecido. Sin embargo, actualmente son muy pocas las manifestaciones en gran escala de esta tecnología, principalmente por los costos que implica y en la mayoría de los casos las tecnologías individuales no han sido integradas al nivel que estaba previsto. De esta manera, si bien teóricamente se puede superar el índice de captura de emisiones, el enfoque actual de las investigaciones está en optimizar económicamente los procesos utilizados en la actualidad (Heischkamp *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2008).

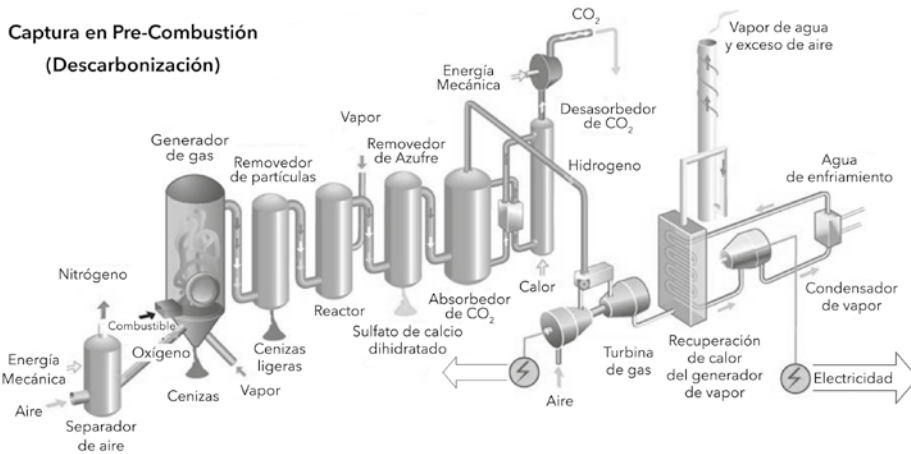
Existen tres categorías donde se puede llevar a cabo la captura de CO₂ en centrales eléctricas, las cuales son: Precombustión, Oxidación y Postcombustión. La diferencia entre ellas consiste en el tratamiento del combustible y el comburente. El uso de cada uno de estos métodos dependerá fundamentalmente de la concentración de CO₂, la presión del gas y el tipo de combustible que se utiliza (Heischkamp *et al.*, 2009; Morales *et al.*, 2008).

2. Captura de CO₂ en las diferentes etapas de la combustión en plantas generadoras de energía

2.1. Captura de CO₂ en la etapa de postcombustión

Este método consiste en producir a partir de gas natural o gas sintético (proveniente de la gasificación de carbón u otros hidrocarburos), una mezcla gaseosa compuesta principalmente de H₂ y CO₂ para posteriormente separar estos dos gases. La separación se basa en la descarbonización del combustible antes de la combustión mediante técnicas de gasificación del carbón o reformado del gas natural, como se muestra en la figura 1.

Figura 1. Diseño de planta con tecnología de captura en precombustión



Fuente: Vattenfall (2012).

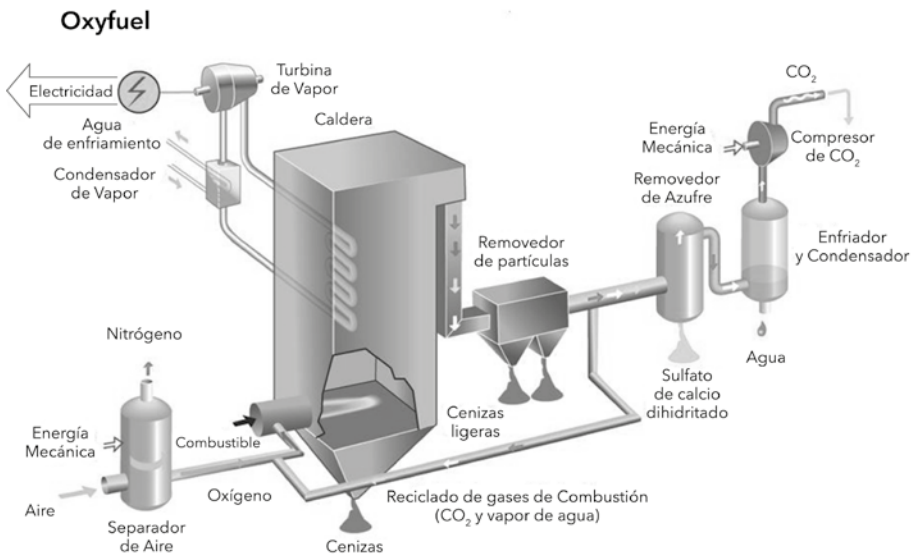
Las tecnologías que existen para la Captura de CO_2 en esta etapa son las que a continuación se mencionan:

- a) Adsorción a cambio de presión (PSA) - (TSA)
- b) Separación criogénica
- c) Absorción química
- d) Absorción física
- e) La separación de membrana

2.2. Captura de CO_2 en la etapa de oxidcombustión

El proceso se realiza durante la combustión y tiene una excelente proyección como tecnología aplicada, que consiste en utilizar oxígeno con un alto grado de pureza para la combustión, por lo que los gases de escape están compuestos principalmente de H_2O y CO_2 , que puede separarse fácilmente del vapor de agua mediante condensación. En la figura 2 se presenta un esquema básico de funcionamiento. Esta tecnología es utilizada en centrales de nueva generación con ciclos agua-vapor extremadamente crítico, así como también en turbinas de gas con o sin calderas de recuperación.

Figura 2. Esquema de combustión en oxígeno



Fuente: Vattenfall (2012).

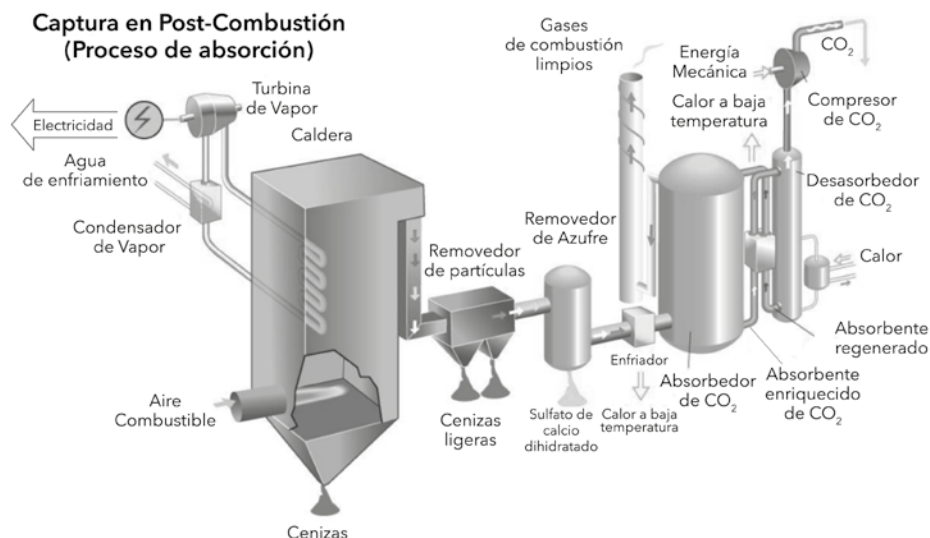
Al ser una tecnología reciente, existen muchos proyectos de investigación en el tema buscando mejores desempeños, eficiencias y bajos costos.

2.3. Captura de CO₂ en la etapa de la postcombustión

En este sistema, como se muestra en la figura 3, el CO₂ se separa de la corriente de los gases de escape producidos durante la combustión en presencia de aire y una porción de combustible, el cual no ha sido previamente tratado. Los métodos más utilizados para esta etapa donde el combustible y el comburente no tienen un previo tratamiento, provoca que los gases de emitidos en su mayoría contengan SO_x, NO_x, CO₂ y material particulado.

Para su captura posterior, entre los procesos más viables se encuentran el ciclo de calcinación, carbonatación y la absorción química con aminas. El resto de las opciones es menos utilizado ya sea por su bajo desarrollo o por los altos costos que implican. Dentro de ellas se encuentran la adsorción física, la destilación criogénica y las membranas.

Figura 3. Diseño de planta con tecnología de captura en postcombustión

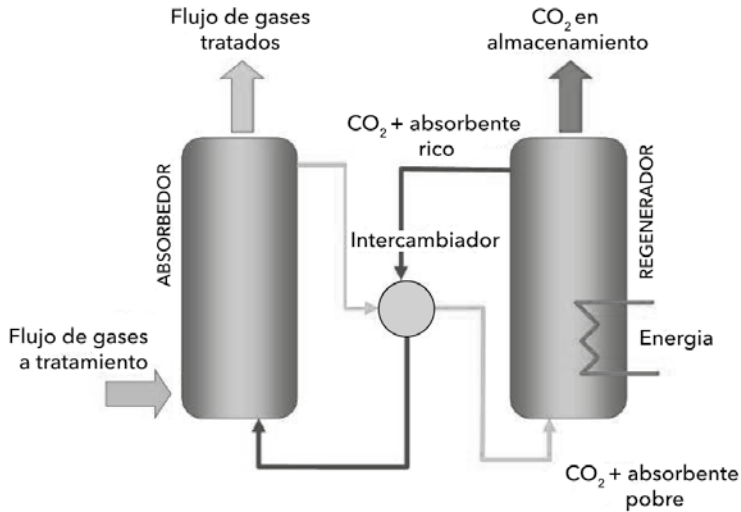


Fuente: Vattenfall (2012).

3. Captura de CO₂ con aminas, en la postcombustión

Hoy en día, la absorción química es la técnica más estudiada, madura y con mayor garantía de poder escalar a nivel industrial para llevar a cabo la captura de CO₂. Ésta se basa en la reacción química de una base alcalina en medio acuoso con un gas ácido. Generalmente consta de un absorbedor, un desasorbedor, una bomba de recirculación, un calderín y un condensador, como se muestra en la figura 4. Para ello se utilizan compuestos químicos (aminas y nuevos absorbentes en investigación) con gran afinidad a los gases ácidos (CO₂) y se usan como solventes formulados. Algunos de ellos también contienen activadores para promover la transferencia de masa en la absorción.

Figura 4. Diagrama de flujo de absorción química



Fuente: Instituto Tecnológico de cerámica (2010).

Los gases de combustión se introducen por la parte inferior del absorbedor (torre/columna) donde, a contracorriente, entran en contacto con una corriente líquida introducida por la parte superior y generalmente basada en aminas. El CO₂ reacciona con los grupos amina, formando el correspondiente carbamato, que se extrae por la parte inferior del separador conduciéndolo a la siguiente unidad. Allí se eleva su temperatura, lo que provoca la regeneración de la amina que se reintroduce en el proceso, y CO₂ que se comprime y transporta hasta el lugar dónde será almacenado o utilizado. La concentración de CO₂ recuperado es del 99.9% en volumen.

Como aminas, se emplean disoluciones acuosas de alcanolaminas, como la monoetanolamina (MEA), dietanolamina (DEA), trietanolamina (TEA) y metildietanolamina (MDEA). Se trata de un proceso muy efectivo, aunque tiene ciertos inconvenientes, como: la necesidad de gran cantidad de energía para la recuperación de la amina saturada y la degradación de la misma, así como la tendencia de los elementos utilizados en el proceso a corroer el equipo. En la tabla 1 se muestra algunas ventajas y desventajas de esta tecnología (Instituto Tecnológico de Cerámica, 2010; Morales, 2008).

Tabla 1. Ventaja e inconvenientes de la absorción química

Ventajas	Inconvenientes
Tecnología comercial en diversos procesos, muy estudiada.	Consumo de vapor, aproximadamente 1 tonelada de vapor por tonelada de CO ₂ .
Requiere menos modificaciones en plantas existentes.	Consumo eléctrico: 18 kWh/t CO ₂ .
Posibilidad de utilizar varios sistemas en serie, de manera que se optimice el proceso.	Consumo de agua de refrigeración.
El proceso se ve favorecido por las bajas presiones parciales, de los gases a tratar.	Gran volumen de gases.
	Depuración adicional, para eliminar SO ₂ y NO _x .
	Consumos de nuevas materias primas (amoniaco, aminas...).

Fuente: Instituto Tecnológico de cerámica (2010).

Aunque existen varias tecnologías comerciales para la separación de CO₂, el lavado de los gases de combustión con aminas se proyecta como la más prometedora cuando se trata de una aplicación a gran escala. Como una planta de 500 MW o más grande. Una razón de lo expuesto anteriormente, es la gran experiencia que se tiene en la operación de este proceso, en la industria petroquímica para la recuperación mejorada de petróleo (EOR, acrónimo en inglés de Enhanced Oil Recovery) (Heischkamp *et al.*, 2009).

Una de las aminas utilizadas en este proceso es la (MEA) Monoetanolamina (Figura 5) y se caracteriza por su alta capacidad de absorción, bajo peso molecular y alta alcalinidad. La estabilidad de su carbamato producido al reaccionar reversiblemente con el ácido es uno de los principales problemas de su utilización como solvente, ya que se requiere una gran cantidad de calor para provocar la desorción del gas (Davis y Rochelle, 2009).

Figura 5. Equilibrio de adsorción de CO₂ por la MEA



Sin embargo, durante mucho tiempo se han logrado grandes avances sustanciales en lo que respecta al desarrollo de nuevos disolventes. Otro factor es que esta tecnología sólo se ha hecho para uso de plantas comerciales y las existentes están diseñadas para capturar una cantidad máxima de

1,000 ton/día en el caso de la EOR, 800 ton/día para la industria química y 300 ton/día en la industria alimentaria (Heischkamp *et al.*, 2009).

Un estudio realizado por Mangalapally *et al.*, (2009), en Alemania, menciona que el principal reto para la captura del CO₂ en la etapa de post-combustión de los gases que se emiten en las centrales eléctricas, es la reducción de la eficiencia debido a la gran cantidad de energía que se necesita para la regeneración del disolvente; sin embargo mencionan que una manera de reducir esta penalización en la eficiencia, es posible con la aplicación de nuevos solventes (Prasad *et al.*, 2009).

A continuación se menciona uno de los estudios realizados con aplicación de nuevos solventes para la absorción de CO₂: se mezcló una solución acuosa de monoetanolamina (MEA) y 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) y se llevó a cabo una serie de ensayos, para obtener información sobre la transferencia de masa y datos para el diseño del proceso, en donde se encontró que el coeficiente global de transferencia de masa (j) generalmente aumenta con el flujo de líquido, temperatura y concentración de amina total; no obstante, disminuye la presión parcial y la carga de CO₂. A una mayor concentración de MEA en la mezcla de MEA-AMP causa que aumente, pero ésta se revierte a cargas de CO₂ altas (Dey y Aroonwilas, 2009).

Uno de los factores de seguir usando la MEA se debe a su bajo costo de producción y la disponibilidad relativa, otro es que en la actualidad hay pocos datos publicados sobre las tasas de degradación térmica de MEA. Davis y Rochelle (2009) investigaron la degradación de la MEA, donde la degradación térmica de la amina se cuantifica en función de la concentración inicial, la carga de CO₂ y la temperatura en un intervalo de condiciones de la columna absorbidora y desabsorbidora. La suma de los productos de degradación de N,N'-di(2-hidroxietil)urea, 1-(2-hidroxietil)-2-imidazolidona, y N-(2-hidroxietil)etilendiamina constituyen la mayoría del total de la pérdida de MEA. La temperatura es dependiente de la velocidad constante, así como de la energía de activación, la cual es similar a la de la dietanolamina de 29 kcal/mol que corresponde al cuádruple de la velocidad de degradación cuando la temperatura de la columna desabsorbidora decrece 17°C. En 135°C la velocidad de degradación varía de 2.5 a 6% por semana. Utilizando datos específicos de una columna desabsorbidora, originados a través del modelo Aspen®, se observó que las pérdidas debidas al empaque son significantes, pero

la mayor pérdida de MEA ocurre en el rehvador y en el sumidero rehvador. La degradación térmica es menor cuando la temperatura del rehvador se mantiene por debajo de los 110°C.

Otro reto importante para la eliminación del CO₂ mediante la captura en la post-combustión es la gran cantidad emitida de los gases de combustión. En aplicaciones típicas de combustión, el flujo de gas emitido son del orden de miles de toneladas por hora, correspondiente a los millones de metros cúbicos por hora de combustible usado, y de cientos de toneladas de CO₂ emitidos por hora (Prasad *et al.*, 2009).

Si bien se tiene dificultades con la degradación térmica de la amina, así como la gran cantidad de energía necesaria para poder liberar el CO₂ del solvente, también es importante volver a señalar lo mencionado en el párrafo anterior. “La gran cantidad de CO₂ producido en las centrales eléctricas”. Por esta razón, también se ha llevado a cabo algunas investigaciones sobre la integración del proceso de captura de CO₂ por medio de simulación numérica; en los cuales la principal idea es probar si la tecnología de remoción de CO₂ con aminas es viable para poder mitigar este contaminante en caudales de gran escala, como son las plantas de energía.

Alguno de estos estudios, como el realizado por Heischkamp y Oeljeklaus (2009), se llevó a cabo por medio de un análisis de integración del proceso de captura de CO₂ en una planta de energía, la cual utiliza carbón como combustible, incluyendo las condiciones adecuadas para poder transportar el CO₂. Para este propósito, la simulación de la planta de captura se llevó a cabo mediante el modelo Aspen Plus® y la simulación de la planta de energía se realizó con EbsilonProfessional®. Los autores concluyen que la simulación del proceso de lavado con Aspen Plus® ayudó a establecer las condiciones necesarias para proporcionar la cantidad de energía requerida de la planta de potencia para la regeneración del solvente. Debido a que el proceso de lavado requiere una gran demanda de energía utilizando MEA como solvente absorbedor y la captura de CO₂ fue del 90%, los autores observaron que no es posible extraer vapor del sistema de generación de electricidad de la planta de potencia sin afectar permanentemente su eficiencia.

En el artículo se menciona que la presión decrece en la línea de vapor como resultado de la extracción de vapor. Esto puede ser controlado con la construcción de una válvula reguladora en la línea de vapor pero también provocaría irreversibilidades. Por otra parte concluyen que para

llevar a cabo la compresión del CO₂ es necesario tener al menos cuatro etapas de compresión para alcanzar el estado supercrítico del CO₂ (Heischkamp y Oeljeklaus, 2009).

Actualmente, se están llevando diferentes estudios para la captura y secuestro de CO₂, entre los cuales se encuentra la absorción y desorción con aminas. Varios de estos trabajos, como se mencionó anteriormente, son enfocados al estudio de la degradación de la amina y a la búsqueda de la alternativa de otros solventes; en muchos casos la amina mezclada con otros compuestos. El estudio técnico-económico de las plantas piloto o de demostración, la caracterización de empaques utilizados en las columnas absorbedoras y desabsorbedoras, así como a la integración del proceso en cuanto a energía por medio de simulación. Todo esto realizado con la finalidad de que el proceso de captura de CO₂ por medio de absorción química sea empleado a gran escala para el tratamiento de los gases de combustión de las centrales de energía.

4. Características de la columna de absorción experimental

La columna que se utiliza en este proyecto, para llevar a cabo el proceso de captura de CO₂ experimentalmente, tiene dimensiones de 4.0 metros de longitud, 3.0 metros de altura empacada y 0.3 metros de diámetro, se encuentra ubicada en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) y está provista por el empaque estructurado ININ18. Durante la experimentación se pone en contacto un flujo gaseoso y líquido a contracorriente, donde se lleva a cabo la transferencia de masa de la fase gaseosa a la fase líquida, en este caso Aire-CO₂ a MEA al 30%. La figura 6 ilustra la columna experimental. Las características del empaque estructurado ININ 18 son las siguientes:

Figura 6. Columna experimental del estudio.

Tipo	Acero inoxidable
Hilo calibre	18 mm
Espacio poroso (ϵ)	0.9633
Área geométrica (a_p)	418 m ² /m ³
Diámetro (D_ϵ)	0.252 m
Ángulo (θ)	45°



Fuente: Chávez et al. (1999).

Durante la experimentación en la columna de absorción se utilizaron dos modelos matemáticos para representar el fenómeno estudiado. Uno es el modelo Hidrodinámico de Stichlmair, el cual es un modelo general desarrollado para la predicción de la caída de presión en las regiones de precarga, carga e inundación en columnas empacadas en las cuales el flujo gaseoso y líquido están en contracorriente. El modelo ha sido validado para varios tipos de empaques, tanto para aleatorios y estructurados. El segundo es el modelo de Bravo, el cual ha sido desarrollado para predecir o analizar el rendimiento de columnas contenidas con empaques estructurados. El modelo abarca la retención líquida, la caída de presión, la máxima capacidad de rendimiento y la eficiencia en la transferencia de masa.

5. Metodología

Para determinar el costo económico de una columna de absorción, capaz de tratar el CO_2 emitido en una planta termoeléctrica, lo primero que se realizó previo a este trabajo fue estudiar técnicamente la columna de absorción experimental para determinar la capacidad de captura del CO_2 . Para conocer la efectividad del proceso, se realizó lo siguiente:

- 1) Se determinaron las regiones hidrodinámicas de precarga, carga e inundación experimentalmente.

- 2) Se ajustó el modelo de Stichlmair a los valores hidrodinámicos experimentales obtenidos.
- 3) Se evaluó el grado de absorción del CO₂ mediante el análisis de cromatografía de gases de las corrientes gaseosas de entrada y salida de la columna experimental.
- 4) Se determinó la altura de una unidad de transferencia experimentalmente y se confirmó el dato obtenido mediante el modelo de Bravo.

Con los resultados técnicos obtenidos se realizó el escalamiento de la columna experimental a una columna industrial, capaz de capturar el CO₂ emitido en una planta termoeléctrica, además se determina el costo del equipo.

5.1. Dimensionamiento de una columna de absorción para la captura de CO₂ emitido en una planta termoeléctrica

Para dimensionar una columna de absorción, es necesario conocer el efluente emitido de esta unidad, para lo cual se gestionó una cooperación del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares con la Comisión Federal de Electricidad (CFE) para poder obtener datos de alguna planta de generación eléctrica del país y conocer el dato anterior mencionado. Con los datos técnicos previamente obtenidos, durante el estudio técnico de la columna de absorción y conociendo el flujo emitido en una planta termoeléctrica, se determina el tamaño de la columna de absorción. Para determinar experimentalmente la altura de una unidad de transferencia (*HETP*), se utilizó la ecuación que a continuación se presenta.

$$HETP = Z/NTU \quad (1)$$

Para el cálculo del *HETP* en este estudio el valor de *Z* es de 3 metros, ya que es la altura total empacada. Y para determinar el número de unidades de transferencia (*NTU*) necesarios para una absorción mayor al 90% de CO₂ en esta investigación se utilizó la siguiente ecuación:

$$NTU = y_1 - y_2 / (y - y^*)_M \quad (2)$$

Estas ecuaciones se resuelven en función de las concentraciones de entrada y salidas de la columna de absorción, considerando $(y - y^*)_M$ es el

promedio logarítmico de las diferencias de concentraciones en los puntos terminales de la torre (Treybal, 1988).

5.2 Análisis económico de la columna absorción para el tratamiento del CO₂ emitido en una planta termoeléctrica

Para determinar el costo de la columna de absorción a escala industrial, se utilizó bibliografía especializada. Una de estas bibliografías utilizadas en este trabajo es el libro de Peter que tiene por título *Plant Desing and Economics for Chemical Engineers*; con esta bibliografía se evalúa el costo de la torres, bombas, intercambiadores de calor, etc.(Peters y Timmerhaus, 1980).

Por medio de la revista *Chemical Engineering and Processing* se obtiene los índices de los costos, los cuales son actualizados cada tres meses. Para actualizar los costos que se encuentran en los libros o publicaciones, previas al año que se desea estimar, se debe multiplicar el costo que resulta del equipo por el factor del año que se requiere evaluar y se divide entre el costo del año del año de evaluación. Por ejemplo, si un equipo costó \$21,000.00 en 1990, entonces se multiplica por el factor del 2010 y se divide por el factor de 1990, esta es una recomendación de la *Chemical Engineering and Processing*.

6. Resultados

6.1. Escalamiento de la columna de absorción

Los datos obtenidos experimentalmente durante el estudio técnico de la columna de absorción se muestran en las tablas 2 y 3:

Tabla 2. Porcentajes de absorción obtenidos durante las experimentaciones

Pruebas experimentales realizadas	ABS01		ABS02		ABS03	
		% Absorción		% Absorción		% Absorción
Concentración inicial a la entra de la columna	0.095		0.095		0.095	
Concentración final a la salida de la columna	0.0245	74.2	0.0204	78.5	0.0062	93.5

Tabla 3. Valores determinados experimentalmente de *NTU* y *HETP*

Pruebas experimentales realizadas	ABS01	ABS02	ABS03
Valores de <i>NTU</i>	6.60	7.67	9.86
Valores de <i>HETP</i>	0.45	0.39	0.30

La diferencia que existe entre cada uno de los valores obtenidos en las experimentaciones realizadas se debe al porcentaje con respecto a la inundación con que se operó la columna de absorción. El flujo líquido utilizado fue de $L = 15 \text{ l/min}$ y los flujos gaseosos fueron $G = 153, 187$ and $215 \text{ m}^3/\text{h}$, para ABS01, ABS02, ABS03, respectivamente y los porcentajes a los que se operó la columna de absorción con respecto a la inundación son: 41% para ABS01, 64% para ABS02 y 85% para ABS03.

Para determinar el tamaño de una columna de absorción a escala industrial, capaz de capturar el CO₂ emitido de una planta termoeléctrica, que emite 1200 Ton/h de gases de combustión, donde el 11% es CO₂, se realiza lo siguiente: Debido a que en un proceso de captura de CO₂ normalmente se realiza un lavado previo al efluente de los gases de combustión para retirar los SO_x y NO_x, la concentración del CO₂ es reducida al 9.5%, regularmente, por lo que al entrar a la columna absorbidora la concentración inicial es el 9.5%, por lo que se preparó durante esta investigación una mezcla de aire-CO₂ a esa concentración. El escalamiento se realiza a partir de la columna de absorción experimental estudiada técnicamente. Los datos utilizados para el escalamiento son los de ABS01, ya que fue la mejor absorción obtenida con el 93.5%, un valor de *NTU* de 9.86, *HETP* de 0.30 metros; y con base en la relación flujo de gas y líquido en la que se llevó a cabo esta experimentación, se obtiene una relación (L/G) del 3.3. En la tabla 4 se presenta los datos calculados para el escalamiento de la columna a escala industrial.

Tabla 4. Escalamiento de la columna

Flujo de una unidad en una central eléctrica					
$G =$	1200	Ton/h	$U_G =$	1.0736	m/s
$G =$	1200000	kg/h	$HETP =$	0.3	m
$G =$	969619	m ³ /h	% Inundación	85	

Continúa...

Flujo de una unidad en una central eléctrica					
G =	11.0109	kmol/s			
G =	333.522	kg/s	U' _G =	1.3287	kg/m²s
G'	12.1667	kmol/s	A _T =	251.02	m²
L/G =	3.3	Relación de columna experimental			
Utilizando la misma relación para la central eléctrica					
L'	40.1503	kmol/s			
Diámetro de la columna: T = 18 metros					

A partir de los datos calculados se determina que para tratar $1200\text{Ton}/h$ de gases de combustión emitidos en una planta termoeléctrica con una concentración de CO_2 del 9.5%, es necesario una columna con 18 metros de diámetro y 3 metros de altura empacada.

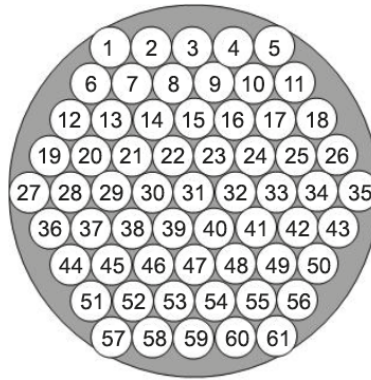
6.2. Costo de una columna de absorción para la captura de CO_2 emitido en una planta termoeléctrica

Para determinar el costo de la columna a escala industrial se realiza lo siguiente:

- Número de columnas experimentales necesarias para la columna industrial escalada de 18 metros de diámetro.
- Configuración de la columna de 18 metros de diámetro y 3 metros de altura empacada.
- Número de empaques para columna empacada.
- Costo de la construcción de la columna.

El número de columnas experimentales que se necesitan para cubrir el diámetro de 18 metros de la columna escalada industrialmente es de 61. En la figura 7 se muestra la configuración propuesta para tratar $1200\text{Ton}/h$ de gases de combustión, con las columnas experimentales en un arreglo en paralelo.

Figura 7. Arreglo de columnas experimentales para columna escalada



Cada columna experimental cuenta con 16 empaques estructurados ININ18, por lo que el total de empaques estructurados para las 61 columnas experimentales, son 964 empaques y su costo total de este número de empaques es de 151,152 dólares. Este costo es calculado con respecto al costo de producción para cada uno de los empaques elaborados, en donde se incluye la mano de obra, material e insumos. El costo total para las 61 columnas es de 120,000 dólares, en este costo se contempla el cuerpo de la columna, soporte de la columna y mano de obra, así como insumos. El costo total de la columna de 18 metros de diámetro con 3 metros de altura empacada y 4 de longitud, tiene un costo total de 271,152 dólares.

7. Conclusiones

El proceso de captura de CO₂ con monoetanolamina al 30%, en una columna de absorción es factible de ser escalado a nivel industrial, en este caso en el tratamiento de los gases de combustión emitidos en plantas termoeléctricas de México.

La captura de CO₂ con aminas en la parte de absorción es altamente eficiente, ya que la solución acuosa de monoetanolamina al 30% al ser pura no presenta resistencia a la transferencia de masa. Además, al operar la columna en un régimen de por arriba del 80% con respecto a la inundación se aumenta la rapidez de la transferencia de masa, en este caso el soluto que es el CO₂ se transfiere eficientemente de la fase gaseosa a la líquida.

8. Nomenclatura

$HETP$	Altura de una unidad de transferencia.
NTU	Número de unidades de transferencia.
Z	Altura de la torre experimental.
y^1, y^2	Concentraciones de la entra y salida de la columna experimental.
$(y-y^*)_M$	Promedio logarítmico de las diferencias de concentraciones en los puntos terminales de la torre.
ABS01	Experimentación 1, llevada a cabo al 41% respecto a la inundación.
ABS02	Experimentación 2, llevada a cabo al 41% respecto a la inundación.
ABS03	Experimentación 3, llevada a cabo al 41% respecto a la inundación.
L	Flujo líquido (l/min)
G	Flujo gaseoso (m^3/h)
G'	Flujo gaseoso inerte ($kmol/s$)
L'	Flujo líquido inerte ($kmol/s$)
U_G	Velocidad del gas (m/s)
U'_G	Velocidad superficial de masa del gas (kg/m^2s)
A_T	Área transversal de la columna (m^2)
T	Diámetro de la columna

9. Referencias

- Ballester, F. (2005). Cambio Climático y Salud. Escuela Valencia de estudios para la salud: Unidad de Epidemiología y Estadística (España). *Salud Pública* 2.
- Chavez, R.H., Suastegui, A.O., Guadarrama, J. (1999). Evaluación de un modelo de absorción en columnas con rellenos estructurados. *Información Tecnológica*. 10:2
- Craig, A.H. (2009). Advancing Carbon Sequestration Research in an Uncertain Legal and Regulatory Environment. Energy Technology Innovation Policy. *Discussion Paper*. 1:1-45.
- Davis, J., y Rochelle, G. (2009). Thermal Degradation of Monoethanolamine at Stripper Conditions. *Energy Procedia*. 1:327-333.

- Dey, A., y Aroonwilas, A. (2009). CO₂ Absorption into MEA-AMP Blend: Mass Transfer and Absorber Height Index. *Energy Procedia*. 1:211-215.
- Heischkamp, E., y Oeljeklaus, G. (2009). Study on a Coal-Fired Power Plant with CO₂ Flue Gas Scrubbing. *Energy Procedia*. 1:1019-1025.
- Informe de vigilancia tecnológica (2010). *Tecnologías de Captura de CO₂*. Observatorio Medioambiental y Energía. Instituto Tecnológico de Cerámica.
- Jiménez, E. (2002). *La contaminación ambiental en México. Causas, efectos y tecnología apropiada*. México. Limusa-Noriega.
- LGEEPA; *Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente* (1998). México.
- Mangalapally, H.P., Notz, R., Hoch, S., Asprion, N., Sieder, G., Garcia, H. y Hasse, H. (2009). Pilot Plant Experimental Studies of Post Combustion CO₂ Capture by Reactive Absorption with MEA and New Solvents. *Energy Procedia*. 1:963.
- Morales, H., Torres, C., Muñoz, C. (2008). *Tecnologías de captura y secuestro de CO₂*. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Peters, M.S., Timmerhaus, K.D. (1980). *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*. 3ª Edición. Ed. McGraw-Hill Kogakusha.
- Prasad, M.H., Notz, R., Hoch, S., Asprion, N., Sieder, G., Garcia, H., Hasse, H. (2009). Pilot plant Experimental Studies of Post combustion CO₂ Capture by Reactive Absorption with MEA and New Solvents. *Energy Procedia*. 1:963-979.
- Protocolo de Kyoto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático* (1998). Naciones Unidas. GE.05-61702 (S) 130605.
- Rivero, O., Ponciano, G. (1993). *Contaminación atmosférica y enfermedades respiratorias*. México. Primera edición. Biblioteca de Salud. Facultad de Medicina UNAM.
- Timothy, L.J. and David, W.K. (2004). Fossil Electricity and CO₂ Sequestration: How Natural Gas Prices, Initial Conditions and Retrofits Determine the Cost of Controlling CO₂ Emissions. *Energy Policy*. 32:367-382.

Treybal R. (1988). *Operaciones de Transferencia de Masa*. México, DF. Ed. McGraw-Hil.

Vattenfall, (2012). *Process, Carbon Capture and Storage*. Artículo en línea, disponible en: www.kjell-desing.com. Consultado el 9 de septiembre de 2012.

Capítulo IV

Preparación de catalizadores heterogéneos de sodio soportados en zeolita NaX para la obtención de biodiesel

Sandra Luz Martínez Vargas¹
Rubí Romero Romero^{1*}
Reyna Natividad Rangel^{1**}
Víctor Sánchez Mendieta²

1. Introducción

La mayor parte de la energía producida en el mundo, aproximadamente el 80%, proviene de combustibles fósiles: petróleo, carbón, gas natural; sin embargo, estos son recursos no renovables, y podrían acabarse en 30 años aproximadamente (Demirbas, 2005). Por ello, el estudio de la sustitución de éstos por otras fuentes de energía tales como: energía eólica, energía solar, energía geotérmica, energía nuclear y biocombustibles han cobrado gran importancia en los últimos años.

Se llaman biocombustibles a todos aquellos combustibles líquidos obtenidos a partir de productos biomásicos, que se utilizan principalmente en motores de combustión interna o en calderas de calefacción; entre estos se incluyen al biodiesel, bioetanol, biometanol, entre otros. Estos combustibles pueden ser técnicamente viables, económicamente competitivos, presentar ventajas medioambientales y ser fácilmente disponibles (Blommel, 2008; MacLeod, 2008).

Definición de biodiesel. De acuerdo con la norma D6751-07b del American Society for Testing and Material Standard, biodiesel es el conjunto de esteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de lípidos renovables, como los aceites vegetales empleados en los motores de ignición de compresión ó en calderas de calefacción. El biodiesel no tiene una fórmula molecular definida porque está constituido por una mezcla de diferentes moléculas que dependen del tipo de aceite que se haya empleado (Marchetti, 2007).

Ventajas medioambientales del uso del biodiesel. El biodiesel presenta varias ventajas medioambientales, a continuación se listan algunas de éstas: alta biodegradabilidad, 98.3% en 21 días; reducción de un 48% de las emisiones de monóxido de carbono; reducción de un 40% de las emisiones de óxidos de nitrógeno; en su combustión no se generan productos orgánicos aromáticos; disminución del efecto invernadero; contiene 11% de oxígeno en peso y no contiene azufre; disminución en un 47% de las emisiones de las partículas sólidas; mejora la lubricidad del combustible, aumentando la vida útil de los motores; es altamente biodegradable en el agua; no es tóxico, aproximadamente 10 veces menos tóxico que la sal común; reduce el calentamiento global debido a que emite menos CO₂ (78% menos) en su ciclo de vida, que el fijado mediante el proceso de fotosíntesis por las plantas usadas para producirlo (Filippis, 2005; Fukuda, 2001).

Normas para la caracterización del biodiesel. Los métodos analíticos usados para determinar las características del biodiesel son recomendados por la Organización Europea para la Normalización (UNE-EN 14214 *Ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME) para motores diesel*) esta organización especifica los criterios que debe de satisfacer un biodiesel de alta calidad, o una mezcla de diesel y biodiesel, para su uso en motores de vehículos. De la norma UNE-EN 14214, el porcentaje de ésteres metílicos, la viscosidad y el índice de acidez son las más importantes, ya que determinan la calidad del biocombustible.

Métodos de obtención del biodiesel. Existen tres procesos para la obtención de biodiesel, a continuación se detalla cada uno de ellos y se hace énfasis en el de transesterificación, que es el método que se aplicó para probar la actividad catalítica de los materiales propuestos.

Pirólisis o craqueo térmico. El biodiesel que se obtiene a través de éste método, es por la aplicación de energía térmica en presencia de aire o nitrógeno (entre 500 y 850 °C); la descomposición térmica de los triglicéridos produce una mezcla de compuestos: alcanos, alquenos, compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos. Mientras que la irolisis de aceites vegetales genera aceptables cantidades de azufre, agua y cenizas, es inaceptable la cantidad de residuos de carbono, esto representa una desventaja en este proceso. Los productos que se obtiene son químicamente similares a los derivados del petróleo (gasolina y diesel). Otra desventaja es que al remover el oxígeno durante el proceso térmico, también se elimina cualquier beneficio ambiental por el uso de combustible oxigenado (Demirbas, 2005).

Microemulsiones. El uso de microemulsiones con solventes como el metanol, etanol y 1-butanol para la producción del biodiesel, han sido estudiados como un medio para resolver el problema de la alta viscosidad de los aceites vegetales; las microemulsiones están formadas por una dispersión estable entre el alcohol y el aceite, éstas son isotrópicas y termodinámicamente estables en el aceite, el agua y el surfactante. Las desventajas de utilizar este método son la producción de residuos de carbono, una incompleta combustión y un incremento de la viscosidad del producto final (Mittelbach, 2004; Zmijewski, 1983).

Transesterificación o alcoholólisis. El biodiesel también se obtiene a través de la transesterificación de aceites y grasas con alcoholes de bajo peso molecular, en presencia de un catalizador adecuado. Generalmente, un mol de triglicérido reacciona con tres moles de alcohol para formar un mol de glicerina y tres moles de esteres del ácido graso respectivo; sin embargo, por ser una reacción reversible, en la práctica es necesario un exceso de alcohol para desplazar el equilibrio de ésta hacia los productos (Bournay, 2006; Mittelbach, 2004; Suppes, 2004).

La misión del catalizador es la de aumentar la solubilidad del alcohol en el aceite, facilitando el progreso de la reacción de transesterificación. De acuerdo a Suppes *et al.* (2004) actualmente, a nivel industrial se emplea la catálisis básica homogénea, alcanzando altas conversiones (> 98%), con condiciones moderadas de operación; sin embargo, la etapa de remoción de las trazas del catalizador y de los subproductos requiere de técnicas adicionales, lo que incrementa los costos de producción. Por lo anterior, el desarrollo de catalizadores heterogéneos que puedan disminuir dichos costos, representa un desafío (Romero, 2004).

Variables de la reacción de transesterificación. Marchetti *et al.* (2007) establecen que las variables más importantes en la reacción de transesterificación son el tipo de aceite, el tipo de alcohol, la relación molar alcohol: aceite, la temperatura de reacción, el tipo de catalizador y su concentración.

Tipos de aceites. Se utilizan aceites vegetales, grasas animales y aceites de reuso, principalmente. Los ácidos grasos que conforman los triglicéridos varían según el tipo de aceite (girasol, colza, coco, soya, palma, canola, etc.) o la grasa animal, de estas la más utilizada ha sido la grasa de pollo (Marchetti, 2007; Mittelbach, 2004; Ma, 1995).

Tipo de alcohol. Se utilizan alcoholes desde 1 hasta 8 átomos de carbonos, como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol y alcohol amílico. Generalmente se utilizan el metanol y el etanol, porque requieren condiciones moderadas de temperatura de reacción (aproximadamente 60 °C) con relaciones molares, alcohol: aceite, similares (6:1 a 15:1); mientras que para relaciones molares similares con otros alcoholes, como butanol, se requieren temperaturas de hasta 114 °C para alcanzar conversiones óptimas de la reacción. El metanol es el alcohol más usado en la reacción de transesterificación, por su bajo precio comparado con el precio de los otros alcoholes, y por sus propiedades físicas y químicas (carácter polar y su número de carbonos) que favorecen tiempos cortos de reacción, si se compara con el etanol en condiciones similares de reacción. La desventaja del uso de metanol es que éste se obtiene a partir de combustibles fósiles, mientras que el etanol se obtiene de fuentes renovables además de ser menos tóxico que el primero (Plentz Meneghetti, 2006; Demirbas, 2005; Geise, 2002). La reacción de transesterificación con etanol (etanólisis), produce biodiesel con un mayor índice de cetano. Sin embargo la separación del biodiesel de la glicerina es más difícil por la formación de emulsiones (ésteres etílicos-glicerina) estables, además de que no se dispone de alcohol etílico puro, el contenido de agua presente promueve reacciones secundarias que reducen la cantidad de biodiesel (Plentz Meneghetti, 2006; Zhou, 2006).

Relación molar alcohol: aceite. La relación óptima entre el alcohol y el aceite depende del tipo de catalizador que se utilice, el aumento de la relación molar permite alcanzar conversiones mayores al 90% en tiempos más cortos, debido a que un exceso de alcohol desplaza el equilibrio hacia la formación de los productos. Freedman *et al.*, (1986) mostraron que con una relación molar metanol: aceite de 6:1, se obtiene un máximo de rendimiento de ésteres (93 a 98%) en un medio homogéneo básico y aceites como los de soya, girasol o cacahuete. Si se aumenta la cantidad de alcohol por encima de relaciones 15:1, separar la glicerina es difícil y el rendimiento aparente de los ésteres descende debido a que parte de ésta se disuelve en el biodiesel. Las reacciones catalizadas por ácidos requieren relaciones mayores, del orden de 30:1 (Freedman, 1984). Yan *et al.*, (2008) reportaron el efecto de relaciones molares metanol/ aceite de colza, de 3:1, 6:1, 12:1, 18:1, 36:1 y 42:1, con el sistema heterogéneo (CaO/MgO), obteniendo porcentajes desde 13% hasta 92%.

Temperatura de reacción. La transesterificación puede llevarse a cabo a diferentes temperaturas, dependiendo del aceite o grasa utilizada. Las temperaturas de reacción reportadas en la mayoría de los trabajos van de 20 a 65 °C, ya que un aumento de ésta produce un aumento de la saponificación del aceite, disminuyendo en consecuencia el porcentaje de esteres (Vicente, 1998). La reacción a presión atmosférica se realiza a temperaturas cercanas al punto de ebullición del alcohol utilizado, en el caso del metanol de 60 a 70 °C. De acuerdo a Gerpen (2005), la mayoría de los procesos industriales, con sistemas homogéneos, trabajan a bajas temperaturas, presión atmosférica y tiempos de reacción largos para disminuir sus costos de producción.

Tipos de catalizadores. La transesterificación de triglicéridos se produce en ausencia de catalizadores si las condiciones de presión y temperatura son supercríticas, lo que encarece el proceso y lo hace poco viable (Tan, 2010). La principal ventaja de no utilizar un sistema catalítico en la reacción de transesterificación, es que se obtienen esteres de alta pureza (> 96.5%) y glicerina sin jabón. Los catalizadores pueden ser homogéneos, heterogéneos o enzimáticos. A continuación se hace un análisis del estado actual del uso de catalizadores heterogéneos para la reacción de transesterificación, se incluyen algunos de los trabajos más relevantes sobre este tópico, en función de las condiciones de operación o del porcentaje de biodiesel obtenido.

Catálisis heterogénea

En la última década se ha dado un desarrollo importante de sistemas heterogéneos a nivel laboratorio, generalmente utilizando aceites vegetales y metanol (Xie, 2006); sin embargo, algunos de estos catalizadores son difíciles de preparar, lo que incrementa su costo, y otros requieren condiciones supercríticas de operación (Albuquerque, 2008). Las ventajas del uso de los catalizadores heterogéneos es la minimización de las etapas finales de purificación de los productos, ya que estos catalizadores se eliminan fácilmente del medio de reacción (utilizando un solvente) por no estar disueltos; además de mejorar el rendimiento de la reacción, ya que se reducen o eliminan reacciones secundarias indeseables (hidrólisis y saponificación). Al no producir jabones por neutralización de los ácidos grasos libres ni por saponificación de los triglicéridos, su uso en aceites y grasas de alto índice de acidez mejora el rendimiento de la reacción. Adicionalmente estos catalizadores se pueden regenerar para

ser utilizados nuevamente y tienen un bajo grado de corrosión. Por lo antes citado, el uso de catalizadores heterogéneos disminuye los costos de producción y resultan medioambientalmente amigables (Dossin, 2006; Fukuda, 2001).

De acuerdo con diferentes estudios el carácter del catalizador (ácido o básico), determina la velocidad de la reacción de transesterificación. Este aspecto está relacionado con la fuerza básica del material y su número de sitios activos, que favorecen la reacción de transesterificación; por ello el biodiesel es usualmente producido utilizando catalizadores básicos, sin embargo existen diferentes estudios con sistemas ácidos (Di Serio, 2008; MacLeod, 2008; Marchetti, 2007; Bournay, 2006; Zhu, 2006; Lote-ro, 2005). Entre los catalizadores heterogéneos desarrollados en diferentes investigaciones se encuentran: carbonatos (Na_2CO_3 , K_2CO_3 , CaCO_3); óxidos alcalinos (K_2O , Na_2O) y alcalinotérreos (CaO , MgO , SrO , BaO); óxidos metálicos como ZnO , resinas de intercambio iónico, zeolitas, entre otros (Verziu, 2008; MacLeod, 2008; Liu, 2007; Dossin, 2006; Encinar, 2005; Suppes, 2004; Fukuda, 2001). En este contexto se ha evaluado la actividad catalítica de los óxidos de metales alcalinotérreos, presentando el siguiente orden: $\text{MgO} < \text{CaO} < \text{SrO} < \text{BaO}$, debido a su radio iónico y su alcalinidad. En otro estudio se probaron diferentes óxidos metálicos, SrO , MgO y ZnO para la obtención de biodiesel; en todos los casos se observó un mecanismo homogéneo: leaching y una cantidad importante de subproductos no deseables: jabones metálicos o gliceratos metálicos (Ramos, 2008; Bournay, 2006).

La oclusión de especies activas como son los óxidos, en diferentes soportes como zeolitas, alúminas y otros, tiene como propósito incrementar la actividad catalítica del material y/o la formación de un material altamente reactivo pero más económico que al utilizar el óxido solo. En este sentido, Davis (2000) ha reportado que los óxidos metálicos soportados en zeolitas ha dado como resultado un incremento en la basicidad del catalizador. El precursor es introducido al soporte a través de impregnación o por intercambio iónico y por medio de un tratamiento térmico se forma el óxido del metal.

Para la propuesta de los catalizadores se consideraron las ventajas de la zeolita NaX, material débilmente básico y aplicable a utilizarse a nivel industrial. La especie activa que se eligió fue Na_2O , para incrementar el carácter básico del soporte, tomando como base que se han reportado

resultados moderados con este metal. Se espera obtener porcentajes mayores al 90% de biodiesel a condiciones moderadas de reacción. Se considera que la propuesta es novedosa puesto que no existen trabajos previos que utilicen este sistema ni el método de preparación.

2. Experimentación

Reactivos

Aceite. Se utilizó como materia prima aceite de girasol, adquirido en un centro comercial.

Alcohol. Se utilizó el metanol, adquirido con J. T. Baker, con una pureza del 99.98%.

Catalizador. La zeolita Faujasita (NaX), con una relación molar silicio/aluminio de 1.3, fue suministrada por Fluka. La sal precursora fue acetato de sodio anhidro con una pureza del 99.3%, proporcionada por Fermont.

Preparación de los catalizadores

Los catalizadores preparados para el desarrollo de este trabajo son catalizadores soportados, ya que la especie activa (Na_2O) se depositó sobre la zeolita NaX, la cual también actúa en la reacción por presentar un carácter débilmente básico, ejerciendo una acción paralela o cooperativa con la fase activa (catalizador bifuncional) (Walton, 2006; Barthomeuf, 2003; Perego, 1997). Ertl (1997) ha reportado que el uso de la zeolita NaX como soporte, también se justifica por su gran superficie específica y porosidad, con objeto de extender el área del agente activo (Na_2O), y mejorar la estabilidad del catalizador evitando la unión o sinterización de los sitios activos por efecto de la alta temperatura y mejorar las características mecánicas. Para la preparación de los catalizadores se siguieron las etapas de preparación reportadas por Pinna (1998), estas etapas son: precalcínación, secado, calcinación y reducción.

Catalizador con óxido de sodio

Se utilizó la técnica de impregnación a humedad incipiente para soportar el óxido de sodio. Se trabajó con las concentraciones de 4.5 y 6%, en porcentajes en peso de sodio, en relación al peso de la zeolita NaX. Se esta-

blecieron estos porcentajes en base a trabajos reportados, con objeto de preparar un catalizador fuertemente básico, y obtener un porcentaje de biodiesel mayor al 90% (Albuquerque, 2008; Di Serio, 2008; Ramos, 2008; Yan 2008; Di Serio, 2006; Xie, 2006; Suppes, 2004; Barthomeuf, 2003).

Caracterización de los catalizadores

Aunque actualmente hay una gran variedad de técnicas analíticas para la caracterización de catalizadores heterogéneos, la elección depende de la información que se desee obtener. Para este trabajo se emplearon las técnicas de Fisisorción de Nitrógeno, Microscopía Electrónica de Barrido, Espectroscopía Foelectrónica de Rayos X, Absorción Atómica, Dispersión de Luz y el Método Cualitativo de Hammett.

Reacción de Transesterificación

La actividad catalítica de los catalizadores fue evaluada en la reacción de transesterificación de aceite de girasol con metanol, se llevo a cabo en un sistema por lotes, en un matraz de vidrio de 250 mL equipado con un condensador de reflujo y un agitador magnético, inmerso en un baño a temperatura constante. Al finalizar la reacción se separó el catalizador y la glicerina por centrifugación y decantación respectivamente; el metanol se eliminó por evaporación a vacío. Las variables de operación que se mantuvieron constantes en la reacción de transesterificación fueron: Tiempo de reacción 6 h, temperatura de reacción 65°C, relación molar alcohol: aceite 6:1, velocidad de agitación 70 rpm y presión atmosférica.

A partir de los mejores resultados obtenidos, se decidió hacer un diseño de experimentos para optimizar el sistema Na_2O -4.5/NaX. Los niveles establecidos para este sistema se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Rangos y niveles experimentales de las variables independientes para la reacción de transesterificación con Na_2O -4.5/NaX

Variable de operación	Rango y niveles		
	-1	0	1
Temperatura de reacción (°C)	40	50	60
Relación molar alcohol: aceite	4:1	5:1	6:1
Catalizador (% en peso)	5	7.5	10

Caracterización del Biodiesel

Para evaluar la calidad del biodiesel producido se determinaron las siguientes propiedades: contenido de ésteres metílicos, la viscosidad cinemática, el índice de acidez y el punto de inflamación; que se consideran requisito a cumplir para la comercialización del biocombustible, de acuerdo a la norma UNE-EN 14214.

3. Resultados y discusión

Caracterización de los catalizadores $\text{Na}_2\text{O}/\text{NaX}$.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Se consideraron las muestras de 4.5 y 6% de Na_2O y la zeolita de partida, para analizar la morfología del material; en todos los casos no se observaron cambios en la estructura de la zeolita de partida. Por ejemplo, en el material Na_2O -6/ NaX se observa que el catalizador tiende a aglomerarse y se aprecia que la morfología de la zeolita patrón y su estructura *esférica* no se modifica, al tener sodio la zeolita de partida no se observa el metal sobre la superficie. Con esto se puede inferir que existe una buena dispersión del Na_2O (Figuras 1 y 2).

Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS). Esta técnica se utilizó para analizar la estructura electrónica de las moléculas de sodio de los materiales $\text{Na}_2\text{O}/\text{NaX}$. Esto permitió comprobar la formación del óxido de sodio en el soporte, ratificando con ello que la técnica de impregnación fue eficaz. Por ejemplo, al analizar la señal asociada al sodio 1s, en el material con el 4.5% se observó que ésta incluía más de un grupo, se realizó su deconvolución y se identificaron las energías del sodio de la zeolita NaX y del sodio del Na_2O , a 1070.55 eV y 1072.5 eV respectivamente (valores de energía de enlace del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, NIST).

Isotermas de fisisorción. Se determinó la distribución de tamaño de poro y el área superficial de los materiales. Como se observa en la tabla 2, el área superficial y el volumen de poro decrecen con el incremento en el porcentaje de sodio impregnado en la zeolita; este comportamiento se debe a que el sodio ocupa el volumen de los poros del soporte, esto coincide con resultados reportados por otros autores (Ramos, 2008; Suppes, 2004).

Tabla 2. Características morfológicas de los catalizadores con sodio

Características morfológicas a 350 °C	NaX	Na ₂ O-4.5%	Na ₂ O-6/%
Área BET (m ² /gr)	710	185	90
Diámetro medio de poro (Å)	16.61	20.93	24.71
Volumen total de poro (m ³ / g)	0.2951	0.0971	0.0256

Absorción Atómica. Esta técnica se utilizó para determinar la cantidad de metal soportado en la zeolita NaX. De acuerdo con los resultados obtenidos (no se incluyen), se puede concluir que el método de impregnación es eficaz y eficiente, puesto que se está impregnando la cantidad que se desea.

Dispersión de Luz. Esta técnica se basa en el análisis del patrón de dispersión generado al interactuar la luz para determinar el diámetro promedio de partícula y se utilizó con las muestras del 4.5 y 6% de sodio y la zeolita patrón, obteniendo 3.687 μm , 3.687 μm y 3.358 μm respectivamente. Como se observa el incremento en el tamaño del diámetro no es significativo respecto a la zeolita patrón, esto es congruente si se considera que el porcentaje del metal soportado es menor al 10%. Es importante resaltar que no existe diferencia entre el 4.5 y el 6% de sodio, lo que confirma los resultados de las características morfológicas, que señalan una disminución importante en el área de microporos, estos resultados sugieren que para el material del 6% de sodio, el metal ocupa los espacios de los canales de la red de la zeolita disminuyendo el área superficial y aglomerando al soporte.

Método Cualitativo de Hammett. En cuanto a los resultados obtenidos al aplicar la técnica de indicadores de Hammett se observó que, aun cuando la zeolita de partida contiene sodio no hubo un vire de color (de blanco a rosa) con la fenolftaleína, esto indica un carácter básico débil. Cuando el porcentaje impregnado de sodio es de 4.5 y 6% la fenolftaleína cambia a violeta, lo que indica que ambos catalizadores tienen la fuerza básica suficiente para transformar la fenolftaleína en sus bases conjugadas casi en su totalidad, numéricamente estos catalizadores tienen un pK_a cercano un pK_a de 15. Los resultados mostraron un aumento en la basicidad cuando se incrementa el porcentaje de sodio impregnado (tomando en cuenta la zeolita patrón y la de 4.5%), y sin cambio al incrementar el porcentaje de sodio impregnado de 4.5 a 6%. Este comportamiento se puede explicar

porque con el 4.5% sodio se favorece la formación de sitios básicos en el catalizador por la oclusión de óxidos de sodio en la zeolita y para el material con el porcentaje de sodio del 6%, el carácter básico es prácticamente el mismo, esto se confirma con el porcentaje de ésteres metílicos que se obtuvo con estos materiales.

Reacción de Transesterificación.

Actividad catalítica. El porcentaje óptimo de óxido de sodio fue de 4.5% con 98.6% de biodiesel, si se considera que la diferencia entre el porcentaje de ésteres metílicos con el 4.5 y el 6% de Na_2O no es significativa (0.5%). Es decir con el 6% de óxido se obtuvo un 99.1% de biodiesel. Como se observa, en ambos casos se cumple con la norma UNE 14214. También se evaluó la estabilidad del catalizador en un periodo de 12 semanas, en la semana 1 se obtuvo un 99.1% de ésteres metílicos, en la semana 4 el 98.8%, en la semana 8 se obtuvo el 98.2% y en la semana 12 el 97.9%. Se puede concluir que la disminución en el tiempo no es significativa, y que considerando que la zeolita de partida es higroscópica, el ensuciamiento del catalizador con compuestos del ambiente puede ocasionar su contaminación y con ello bloqueo de los poros.

Caracterización del Biodiesel. Las propiedades fueron evaluadas de acuerdo a la norma UNE-EN 14214. El producto obtenido con el 4.5 y el 6% de óxido de sodio cumple con todas las especificaciones, lo que asegura su viabilidad técnica, además en caso de utilizarse como biocombustible se podría disminuir su costo al utilizarse en mezclas con el diesel de origen fósil, siendo lo más común 20% de diesel fósil y 80% de biodiesel (Demirbas, 2005).

Optimización del sistema con Na_2O -4.5/ NaX . Se decidió optimizar el sistema con el 4.5% de óxido de sodio, esto obedece a que en base a los resultados obtenidos con este catalizador, se esperaba poder escalar la reacción de transesterificación utilizando este material. Se trabajó con la metodología de superficies de respuesta. Esta técnica permite construir un modelo matemático para analizar una variable de interés (biodiesel) y como es influenciada por otras (cantidad de catalizador respecto al aceite, relación molar alcohol: aceite, temperatura de reacción). El objetivo es determinar las condiciones óptimas del sistema (condiciones de reacción) para obtener el mayor porcentaje de ésteres metílicos a condiciones moderadas de operación.

En la tabla 1 se presentaron los niveles de los factores con los que se trabajó. Se entiende por factor a las condiciones del proceso que influyen la variable respuesta: cantidad de catalizador respecto al aceite (en porcentaje); relación molar alcohol: aceite, temperatura de reacción. Y por respuesta se refiere a la cantidad medible cuyo valor se ve afectado al cambiar los niveles de los factores de estudio, en este caso el porcentaje de biodiesel. Se han reportado en otros trabajos que la función de respuesta para la reacción de transesterificación es una ecuación polinomial, y para este sistema se obtuvo una ecuación de segundo grado utilizando el SPSS versión 14 (Pinzi, 2010; Tan, 2010; Vicente, 1998).

$$B = 63.3083 + 10.1944 X_1 + 4.2650 X_2 + 9.2694 X_3 + 5.6583 X_1^2 + 1.9633 X_2^2 + 8.2333 X_3^2 + 1.6300 X_1 X_2 - 0.9367 X_1 X_3 + 0.6208 X_2 X_3$$

Donde: B es el porcentaje de biodiesel (%), X_1 es la temperatura de reacción ($^{\circ}\text{C}$), X_2 es la cantidad de catalizador (% en peso), y X_3 es la relación molar alcohol: aceite.

De acuerdo con los coeficientes de la ecuación codificada se puede deducir que las variables que tiene un mayor efecto en la reacción de transesterificación son: temperatura de reacción X_1 , y la relación molar alcohol: aceite X_3 , y la interacción de las variables $X_1 X_2$. En cuanto a la interacción $X_1 X_3$ temperatura-relación molar alcohol: el aceite tiene un efecto negativo en dicha reacción. Estos valores permitirán proponer valores para optimizar el proceso, se podrán inferir los valores con el análisis de las superficies de nivel, o bien se pueden proponer valores y sustituirlos en la ecuación y con ello inferir el comportamiento del sistema. Se llevaron a cabo 30 reacciones, para modelar el sistema, los valores de porcentaje de biodiesel que se obtuvieron van desde 53.82 hasta 99.3%, dependiendo de las condiciones de reacción. Para cada condición se llevaron a cabo tres repeticiones.

El modelo se evaluó con un análisis ANOVA con un nivel de significancia del 95%. El nivel de correlación alcanzado fue del 92.5%, esto indica que el modelo es significativamente adecuado. Resultados similares han sido reportados en otros trabajos (Zhang, 2010). A continuación se incluyen las superficies de nivel que se obtuvieron a partir del modelo matemático, así como el análisis hecho a cada gráfica. Como se observa en la figura 3, a mayor temperatura de reacción el porcentaje de biodiesel se incrementa, en cuanto a la cantidad de catalizador se genera un mínimo

con el 7.5% en peso, y se presentan dos máximos con 5 y 10% en peso de catalizador a 40 °C. Sin embargo, a 60 °C se presenta un comportamiento prácticamente constante, sin importar la cantidad de catalizador, esto confirma lo mencionado en el modelo matemático. Además esto sugiere que a una mayor temperatura se tendrá un porcentaje de esteres metílicos cercano o igual al 100%.

En la figura 4, se observa un comportamiento constante a prácticamente cualquier temperatura con una relación molar aproximadamente de 5.5:1, sin embargo, con una relación molar de 6:1 a 50 °C se presenta un mínimo, y un máximo a 60 °C. Esto sugiere que a temperaturas entre 60 y 65 °C con relaciones molares mayores de 6:1 es posible obtener un porcentaje de biodiesel cercano a 100%.

De la figura 5 es posible confirmar los resultados de las gráficas anteriores, como se observa con un 7.5% en peso de catalizador se tienen los porcentajes más bajos de biodiesel, ello sugiere que para obtener porcentajes de esteres metílicos cercanos al 100% es necesario trabajar con porcentajes en peso de catalizador de 10% y una relación molar alcohol: aceite mayor o igual a 6:1.

4. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos, es posible concluir lo siguiente:

Se evaluó la actividad catalítica del material Na_2O -4.5/ NaX en la reacción de transesterificación, a condiciones moderadas de operación, obteniendo un biocombustible cuya composición es mayor al 90% en peso de ésteres metílicos. Además, el biodiesel cumple con especificaciones establecidas en la norma europea UNE-EN-14214.

La estabilidad del material Na_2O -4.5/ NaX es adecuada, con un buen manejo del material puede tener una vida útil de por lo menos 12 semanas, generando un producto de por lo menos 90% de esteres metílicos.

De acuerdo con la optimización hecha del sistema, es posible escalar la reacción a diferentes relaciones de las variables y obtener un porcentaje de biodiesel en peso del 100%.

Con las técnicas de caracterización empleadas fue posible evaluar la técnica de impregnación seca que resultó ser eficaz y eficiente para el material Na_2O / NaX .

5. Referencias

- Albuquerque, M.C., Jiménez-Urbistondo, I., Santamaría-González, J., Mérida-Robles, J.M., Moreno-Tost, R., Rodríguez-Castellón, E., Jiménez-López, A., Azevedo, D.C., Cavalcante Jr., C.L. y Maireles-Torres, P. (2008). CaO Supported on Mesoporous Silicas as Basic Catalysts for Transesterification Reactions. *J. Mol. Catal.* 334:35-43.
- Barthomeuf, D. (2003). Framework Induced Basicity in Zeolites. *Microporous Mesoporous Mat.* 66:1-14.
- Blommel, P.G. y Randy, D. (2008). *Production of Conventional Liquid Fuels from Sugar*. USA: Ed. Virent Energy Systems. Inc. Madison WI.
- Bournay, L., Casanave, D., Delfort, B., Hillio, G. y Chodorge, J.A. (2006). New Heterogeneous Process for Biodiesel Production: A Way to Improve the Quality and the Value of the Crude Glycerin Produced by Biodiesel Plants. *Catal. Today*. 106:190-192.
- Davis, R.J. (2000). New Perspectives on Basic Zeolites as Catalysts and Catalyst Supports. *J. Catal.* 216:396-405.
- Demirbas, A. (2005). Biodiesel Production from Vegetable Oils Via Catalytic and Non-Catalytic Supercritical Methanol Transesterification Methods. *Prog. Energ. Combust.* 31:466-487.
- Di Serio, M., Ledda M., Cozzolino, M., Minutillo, G., Tesser, R. y Santacesaria, E. (2006). Transesterification of Soybean Oil to Biodiesel by Using Heterogeneous Basic Catalysts. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45:3009-3014.
- Di Serio, M., Tesser, R., Pengmei, L. y Santacesaria, E. (2008). Heterogeneous Catalysts for Biodiesel Production. *Energy Fuels*. 22:207-217.
- Dossin, T.F., Reyniers, M.F., Berger, R.J. y Marin, G.B. (2006). *Simulation of Heterogeneously MgO-catalyzed Transesterification for Fine-chemical and Biodiesel Industrial Production*. *Appl. Catal. B: Gen.* 67: 136-148.
- Encinar, J.M., González, J.F. y Rodríguez-Reinares, A. (2005). Biodiesel from Used Frying Oil. Variables Affecting the Yields and Characteristics of the Biodiesel. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44: 5491-5499.
- Ertl, G. (1997). *Handbook of Heterogeneous Catalysis*. Vol. 3. Estados Unidos: Ed. Wiley Online Library.

- Filippis, P.D., Borgianni, C. y Paolucci, M. (2005). Rapeseed Oil Transesterification Catalyzed by Sodium Phosphates. *Energy Fuels*. 19: 2225-2228.
- Freedman, B., Pryde, E.H. y Mounts, T.L. (1984). Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 1638-1643.
- Freedman, B., Pryde, E.H. y Mounts, T.L. (1986). Transesterification Kinetics of Soybean Oil. *J.AOCS*. 63: 1375-1380.
- Fukuda, H., Kondo, A. y Noda, H. (2001). Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *J. Biosci. Bioeng.* 95: 405-416.
- Geise, R. (2002). Biodiesel's Bright Future Deserves Equality. *Render Mag.* 31: 16-17.
- Gerpen, J.V. (2005). Biodiesel Processing and Production. *Fuel Process. Tech.* 86: 1097-1101.
- Liu, X., He, H., Wang, Y. y Zhu, S. (2007). Transesterification of Soybean Oil to Biodiesel Using Sro as a Solid Base Catalyst. *Catal.s Commun.* 8: 1107-1111.
- Lotero, E., Liu, Y., Lopez, D.E., Suwannakarn, K., Bruce, D.A. y Goodwin Jr., J.G. (2005). Synthesis of Biodiesel Via Acid Catalysis. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44: 5353-5363.
- Ma, F. and Milford, A.H. (1995). Biodiesel Production: A Review. *Bioresour. Technol.* 70: 1-15.
- MacLeod, C.S., Harvey, A.P., Lee, A.F. y Wilson, K. (2008). Evaluation of the Activity and Stability of Alkali-Doped Metal Oxide Catalysts for Application to an Intensified Method of Biodiesel Production. *Chem. Eng. J.* 135: 63-70.
- Marchetti, J.M., Miguel, V.U. y Errazu, A.F. (2007). Possible Methods for Biodiesel Production. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 11: 1300-1311.
- Mittelbach, M. y Renschmidt, C. (2004). *Biodiesel: The Comprehensive Handbook*. Austria: Ed. Boersdruck Ges.m.b.H.
- NBB (National Institute of Standard and Technology) (2009). Estados Unidos. Artículo en línea, disponible en: <http://srdata.nist.gov/xps/>. Consultado en enero 2010.

- Perego, C. y Villa, P. (1997). Catalyst Preparation Methods. *Catal. Today*. 34: 281-305.
- Pinna, F. (1998). Supported Metal Catalyst Preparation. *Catal. Today*. 41: 129-137.
- Pinzi, S., Lopez-Gimenez, F.J., Ruiz, J.J. y Dorado, M.P. (2010). Response Surface Modeling to Predict Biodiesel Yield in a Multi-Feedstock Biodiesel Production Plant. *Bioresour. Technol.* 101: 9587-9593.
- Plentz-Meneghetti, S.M., Meneghetti, M.R., Wolf, C.R., Silva, E.C., Lima, G.E., De Lira-Silva, L., Serra, T.M., Cauduro, F. y De Oliveira, L.G. (2006). Biodiesel from Castor Oil: A Comparison of Ethanolysis versus Methanolysis. *Energy Fuels*. 20: 2262-2265.
- Ramos, M.J., Casas, A., Rodriguez, L., Romero, R. y Pérez, A. (2008). Transesterification of Sunflower Oil over Zeolites Using Different Metal Loading. A Case of Leaching and Agglomeration Studies. *Appl. Catal. A: Gen.* 346: 79-85.
- Romero, M.D., Ovejerero, G., Rodríguez, A., Gómez, J.M. y Agueda, I. (2004). O Methylation of Phenol in Liquid Phase over Basic Zeolites. *Ind. Eng. Chem. Res.* 43: 8194-8199.
- Suppes, G.J., Desari, M.A., Daskocil, E.J. y Mankidy, E.J. (2004). Transesterification of Soybean Oil with Zeolite and Metal Catalysts. *Appl. Catal. A: Gen.* 257: 213-223.
- Tan, T.K., Gui, M.M., Lee, K.T. y Mohamed, A.R. (2010). An Optimized Study of Methanol and Ethanol in Supercritical Alcohol Technology for Biodiesel Production. *J. Supercrit. Fluid.* 53: 82-87.
- Verziu, M., Cojocaru, B., Hu, J., Richards, R., Ciuculescu, C. y Filip, P. (2008). Sunflower and Rapeseed Oil Transesterification to Biodiesel over Different Nanocrystalline Mgo Catalysts. *Green Chem.* 10: 373-381.
- Vicente, G., Coteron, A., Martinez, M. y Aracil, J. (1998). Application of the Factorial Design of Experiments and Response Surface Methodology to Optimize Biodiesel Production. *Ind. Crops Products*. 8: 29-35.
- Walton, K.S., Morgan, B., Abney, M. y Le Van, D. (2006). CO₂ Adsorption in Y and X Zeolites Modified by Alkali Metal Cation Exchange. *Micropor. Mesopor. Mat.* 91: 78-83.
- Xie, W. y Huang, X. (2006). Synthesis of Biodiesel from Soybean Oil Using Heterogeneous KF/ZnO Catalyst. *Catal. Lett.* 107(1-2): 53-59.

- Yan, S., Lu, H. y Liang, B. (2008). Supported CaO Catalysts Used in the Transesterification of Rapeseed Oil for the Purpose of Biodiesel Production. *Energy Fuels*. 22: 646-651.
- Zhang, J., Chen, S., Yang, R. y Yan, Y. (2010). Biodiesel Production from Vegetable Oil Using Heterogeneous Acid and Alkali. *Catalyst. Fuel*. 89: 2939-2944.
- Zhou, W. y Boocock, D.G. (2006). Phase Behavior of the Base-Catalyzed Transesterification of Soybean Oil. *JAOCS*. 83: 1041-1045.
- Zhu, H., Wu, Z., Chen, Y., Zhang, P., Duan, S., Liu, X. y Mao, Z. (2006). Preparation of Biodiesel Catalyzed by Solid Super Base of Calcium Oxide and Its Refining Process. *Chinese J. Catal*. 27: 391-396.
- Zmijewski, M. y Kaufaman, K.R. (1983). Laboratory Endurance Test of a Sunflower Oil Blend in a Diesel Engine. *JAOCS*. 60: 1567-1573.

Capítulo V

Recubrimiento de monolitos con $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$

María del Carmen Zepeda Mondragón¹

Reyna Natividad Rangel^{1*}

Ramón Montiel López²

Armando Ramírez Serrano³

Rosa María Gómez Espinosa¹

1. Introducción

Los monolitos son estructuras constituidas por canales paralelos, rectos, uniformes y no interconectados que se pueden arreglar en secciones cuadradas o circulares. Por mucho tiempo su uso ha estado confinado al tratamiento de emisiones gaseosas. Sin embargo, en las últimas décadas se ha intentado extrapolar su uso a las reacciones selectivas de tres (Fishwick *et al.*, 2007) y dos fases (Donsí *et al.*, 2004). Con respecto a las reacciones de dos fases, el desarrollo de un catalizador activo, estable y selectivo en la combustión catalítica de hidrocarburos representa un creciente desafío para la catálisis.

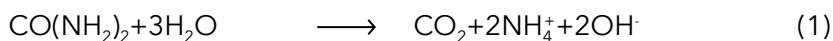
La preparación de un sistema catalítico con monolitos implica el depósito de un componente catalíticamente activo y/o un soporte (Alúmina, Sílice, Zeolitas, etc.) que contenga a su vez uno o más componentes catalíticamente activos sobre una estructura monolítica (Draelants *et al.*, 2001, Tomašić y Jović, 2006). Cabe resaltar que el proceso de preparación del sistema catalítico es de gran importancia ya que afecta propiedades fundamentales del catalizador como son actividad, selectividad, estabilidad química y térmica (Perego y Villa, 1997, Pinna; 1998). En este contexto, es deseable que el catalizador cuente con un área superficial específica grande y con ello una máxima actividad específica. Para tal efecto, es necesario que la fase activa se encuentre altamente dispersada, por lo que el componente activo es usualmente depositado sobre la superficie de un soporte el cual debe contar con las características de ser un material altamente poroso y con buena estabilidad térmica (Pinna 1998). En este tenor, los compuestos de lantano-manganeso con estructura tipo

perovskita soportados en γ -Alúmina (γ -Al₂O₃) y depositados en monolitos de Cordierita, emergen como una alternativa para llevar a cabo procesos de deshidrogenación oxidativa (DHO), debido a su elevada estabilidad química y térmica (Peña and Fierro, 2001; Donsì *et al.*, 2004), su buena actividad catalítica a temperaturas moderadas, su estabilidad estructural (Cimino *et al.*, 2000; Spinicci *et al.*, 2003; Barbato *et al.*, 2009), y su bajo costo al ser comparados con catalizadores de Pt y Pd.

A pesar de ser un material extensamente estudiado en reacciones importantes como DHO, la síntesis de LaMnO₃/ γ -Al₂O₃ en monolitos de cordierita no ha sido reportada a detalle, por lo que en este capítulo se presentará el efecto de variables importantes de síntesis sobre la cristalinidad y homogeneidad del depósito en el monolito. Tales variables son precursor de la fase γ -Al₂O₃, temperatura y tiempo de coprecipitación, fase depositada y tiempo de inmersión de los monolitos.

2. Síntesis del LaMnO₃ mediante el método de coprecipitación-deposito por hidrólisis de urea

El método que comúnmente se emplea para sintetizar los compuestos de lantano-manganeso con estructura tipo perovskita (LaMnO₃) es el método de coprecipitación-deposito por hidrólisis de urea (Perego y Villa, 1997; Pinna, 1998; Cimino *et al.*, 2000; Draelants *et al.*, 2001; Nares *et al.*, 2002), debido a que cuando un nitrato es utilizado como precursor de la fase activa resulta difícil de obtener una distribución homogénea de dicha fase en el soporte del catalizador, y en este caso este método permite obtener una mejor dispersión de la fase activa. Este método, básicamente consiste en llevar a cabo la precipitación lenta y controlada de hidróxidos de La y Mn en la alúmina. Para lo cual la hidrólisis de urea (reacción 1) es fundamental ya que de ella se producen los iones hidroxilo necesarios para producir los hidróxidos correspondientes a partir de precursores metálicos que usualmente son el nitrato de lantano hexa-hidratado (La(NO₃)₃·6H₂O) y el acetato de manganeso (C₄H₆MnO₄·4H₂O) (reacciones 2 y 3).



Debido al aumento de pH originado por la hidrólisis de urea, el hidróxido de lantano ($\text{La}(\text{OH})^+$) y el hidróxido de manganeso ($\text{Mn}(\text{OH})^+$) se depositan en los poros de la Al_2O_3 estabilizada (Perego y Villa, 1997; Cimino *et al.*, 2000). Una vez depositados los hidróxidos de lantano ($\text{La}(\text{OH})^+$) y de manganeso ($\text{Mn}(\text{OH})^+$), es necesario recuperar el precipitado para llevar cabo la evaporación del solvente y su calcinación. Después de esta calcinación (usualmente a 800°C), es posible obtener el óxido de lantano-manganeso con estructura tipo perovskita (LaMnO_3) dispersado en $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ estabilizada. Es importante mencionar que se recomienda emplear $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ estabilizada térmicamente debido a que la estructura perovskita se forma a temperaturas superiores a 800°C (Cimino *et al.*, 2000; Peña y Fierro, 2001). Tal temperatura coincide con la transición de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ a $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$. De no estabilizarse la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, dicho cambio de fase ocurriría al formarse la fase perovskita lo cual conllevaría a una reducción en el área superficial específica.

A continuación se describe el efecto de algunas variables importantes durante el proceso de síntesis por el método de coprecipitación-depósito por hidrólisis de urea. De manera más detallada, el proceso que se puede tomar como base para la síntesis de $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ es el siguiente (García, 2009): se prepara una dispersión con una concentración en peso del 16.7% de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ estabilizada, 8.3% de nitrato de lantano hexa-hidratado ($\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 4.7% de acetato de manganeso ($\text{C}_4\text{H}_6\text{MnO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y 20.3% de urea ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) en agua desionizada, la dispersión se agita a temperatura constante durante 15 minutos y posteriormente se mantiene a reflujo con agitación constante a 90°C -6 horas.

Cabe resaltar que el efecto de las variables arriba mencionadas no se encuentra reportado en la literatura y de ahí la importancia de mostrarlas en el presente capítulo.

2.1. Precursor de alúmina

El primer paso para sintetizar el LaMnO_3 es estabilizar térmicamente la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$. El proceso para estabilizarla se presenta en (McLaughlin *et al.*, 1998) y consiste en preparar una dispersión en agua desionizada del precursor de la fase γ , el precursor del La_2O_3 , ($\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), y ácido nítrico (HNO_3). Las concentraciones en la dispersión son en porcentaje en peso de 10.5, 4.6 y 0.1, respectivamente. Esta suspensión se mantiene agitada por 10 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se seca a 70°C por 44 horas. El sólido resultante se calcina por 3 horas a 800°C .

La importancia de este paso es evitar que la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ se sinterice y con ello exista una transición de la fase γ a la fase α , que corresponde a la fase más estable termodinámicamente de la alúmina, esto se logra agregándole un aditivo a la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, que para este caso fue el La_2O_3 .

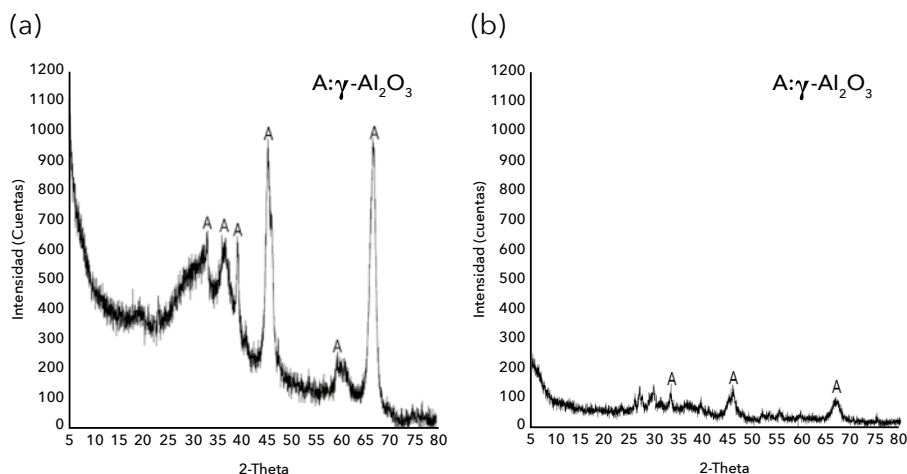
En la presente sección se muestra el efecto que tiene estabilizar térmicamente dos diferentes precursores de la alúmina (Dispal 25F4 y $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ comercial) sobre la cristalinidad de los polvos resultantes. Las diferencias principales entre cada uno de estos precursores son: tamaño de partícula, área superficial, tamaño de cristal (tabla 1) y composición química ya que el Dispal 25F4 es una bohemita (oxi-hidróxido de aluminio, AlOOH) que al ser deshidratada puede llegar a convertirse en $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (Fitzgerald *et al.*, 1997; Krokidis *et al.*, 2001; Kuiry *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2009). Estas diferencias tienen un efecto importante en la cristalinidad (Costa *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2009) del compuesto de lantano-manganeso; en la figura 1 se presentan los patrones de difracción obtenidos de las muestras de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ estabilizada térmicamente. En principio se observa que en ambas muestras aparecen los dos picos principales que identifican a la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, los cuales están localizados a $2\theta=45.8^\circ$ y 67° . Sin embargo, se puede apreciar en la figura 1a que emplear directamente $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ permite obtener picos más definidos y con mayor intensidad para esta fase identificada con la letra (A), lo que conlleva a una muestra más cristalina con respecto a la muestra obtenida con Dispal 25F4 como precursor de la fase γ (figura 1b). Es evidente que el uso de la bohemita conduce a obtener un material menos cristalino en el cual la intensidad de los picos de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ aún es débil. Retomando lo mencionado en (Guzmán-Castillo *et al.*, 2001; Krokidis *et al.*, 2001; Kuiry *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2009), someter la bohemita (Dispal 25F4) a un tratamiento térmico provocaría que se deshidratara y con ello se daría lugar a la transformación en la fase $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (Perego y Villa 1997) dado que esto no ocurre se puede entender que la estabilización con La_2O_3 de acuerdo con lo reportado en (McLaughlin *et al.*, 1998) también está inhibiendo o retrasando la transformación de fase de la bohemita (Dispal 25F4) hacia $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$.

Tabla 1. Propiedades físicas de los precursores de alúmina utilizados

Propiedades físicas	$\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$	Dispal 25F4
Al_2O_3 [%]	99.97	78
Tamaño de partícula en el polvo [μm] (d50)	3	30
Área superficial (BET)* [m^2/g]	92	250
Tamaño del cristal [nm]	20	8

Fuente: datos brindados por el proveedor de cada producto (Alfa Aesar y Sasol).

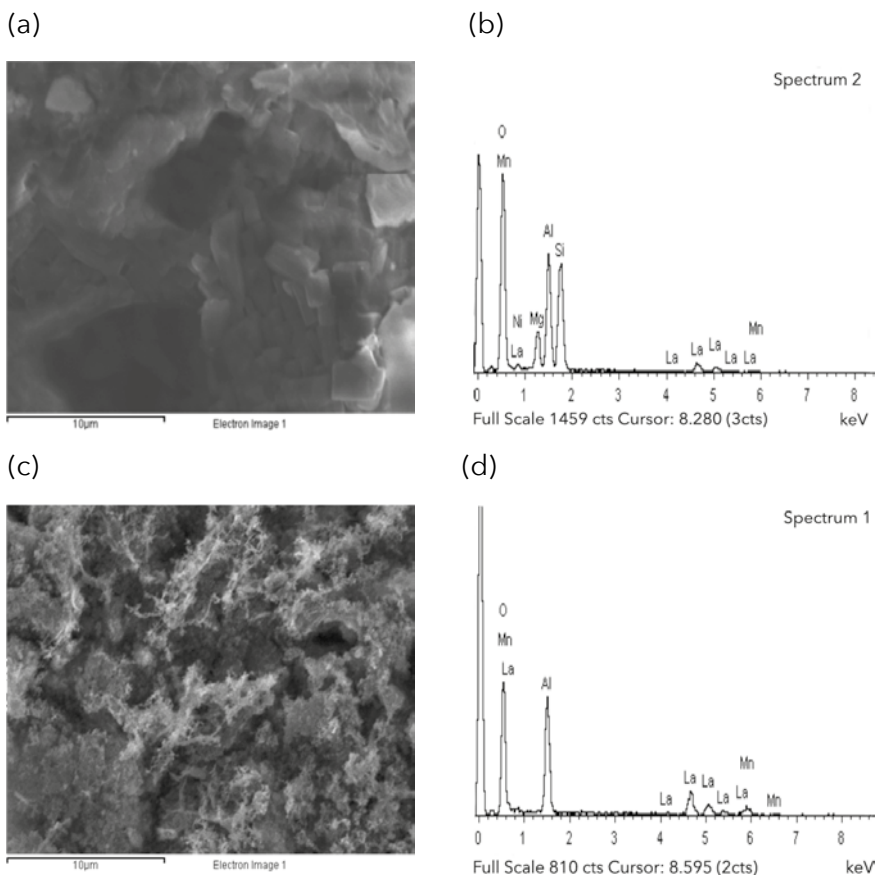
Figura 1. Difractogramas de la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ estabilizada a partir de (a) $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ comercial; (b) Al_2O_3 bohemita (Dispal 25F4)



En la figura 2 se observa que sintetizar $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ a partir de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ comercial estabilizada térmicamente favorece la formación del LaMnO_3 (figuras 2c y 2d) provocando que el recubrimiento de los monolitos con la fase activa (LaMnO_3) sintetizada a partir de la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ comercial, presente una mayor uniformidad que cuando se sintetiza el LaMnO_3 con la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ estabilizada a partir de la bohemita (Dispal 25F4). Las figuras 2a y 2c muestran la caracterización a través de MEB de la morfología de la superficie de monolitos recubiertos con el $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ sintetizado tanto con la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ comercial como con la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ a partir del Dispal 25F4, así como el análisis elemental (EDS) para observar la cantidad de especies de La y Mn depositada sobre los monolitos de cordierita (figuras 2b y 2d). Los

resultados obtenidos por MEB concuerdan con lo reportado en (Villegas *et al.*, 2007), dado que reflejan que la cantidad de especies de La es menor en los monolitos recubiertos con el $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ obtenido con el precursor Dispal 25F4, y además se tiene un recubrimiento no uniforme, lo anterior en principio indica que la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ comercial además de favorecer un recubrimiento más homogéneo (figura 2c), favorece la síntesis del LaMnO_3 .

Figura 2. Micrografías (5000x) y análisis elemental (EDS) del recubrimiento del monolito con $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ a partir de (a y b) Dispal 25F4, (c y d) $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ comercial



2.2 Temperatura de coprecipitación

El control de la temperatura es una variable importante en el proceso de coprecipitación-depósito por hidrólisis de urea (Cimino *et al.*, 2000;

Cybulski y Moulijn, 2006; Radnik *et al.*, 2006) ya que de ella depende principalmente la cinética de la reacción 1 (Cybulski and Moulijn, 2006).

El efecto de esta variable se puede discutir con base en la comparación de compuestos de $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ sintetizados a dos temperaturas diferentes de coprecipitación, manteniendo un tiempo constante de coprecipitación de 10 horas.

En la figura 3 se muestran los patrones de difracción correspondientes a materiales sintetizados a dos temperaturas diferentes de coprecipitación (50 y 90 °C). En tales difractogramas se observa que el incremento de la temperatura de co-precipitación de 50°C a 90°C favorece la formación de la fase LaMnO_3 con estructura tipo perovskita dado que se muestran claramente los picos de difracción a $2\theta = 23^\circ, 33^\circ, 41^\circ, 47^\circ, 53^\circ, 59^\circ, 69^\circ$ y 79° , lo que indica que el material corresponde a un cristal de LaMnO_3 de acuerdo con la tarjeta (01-075-0440).

El hecho de que se observe la fase perovskita con materiales co-precipitados a 50 °C, indica que a esta temperatura ya existe hidrólisis de urea. Sin embargo, este aspecto puede ser controversial, ya que de acuerdo con la literatura existente la urea comienza a disociarse por arriba de 60°C liberando iones OH^- conforme a la reacción 1 (Draelants *et al.*, 2001; Cybulski and Moulijn, 2006). No obstante, en la figura 4 se puede observar que efectivamente el pH de la solución comienza a incrementarse a $T=50^\circ\text{C}$ debido a la producción de iones OH^- vía hidrólisis de urea, dando lugar a que las reacciones 2-3 se desarrollen. Los hidróxidos así formados al ser calcinados y producir LaMnO_3 producen los picos de difracción observados en la figura 3. De acuerdo con la figura 4, el incremento de pH es mayor a 90 °C que a 50 °C. Esto indica que la concentración de iones OH^- también es mayor, y por lo tanto se esperaría que la concentración de hidróxido de La y Mn también lo fuese. Esto explicaría por qué existe una mayor cantidad de LaMnO_3 (dada por la intensidad de los picos en la figura 3) cuando los hidróxidos precursores se sintetizan a 90 °C.

Con respecto a los picos principales de la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, éstos se encuentran presentes en ambas muestras, sin embargo cuando la $T=90^\circ\text{C}$ la intensidad de los mismos disminuye, esto puede ser atribuido a que el porcentaje de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ disminuye en la muestra $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ porque la cantidad de especies de LaMnO_3 se incrementa.

En la figura 5 se presenta la caracterización de monolitos recubiertos con $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ provenientes de una coprecipitación a a) $T=50^\circ\text{C}$ y b)

T=90 °C. Se observa que el realizar la coprecipitación de hidróxidos a T=50 °C conduce a obtener la presencia de aglomerados (figuras 5a y 5b) en la superficie del monolito en lugar de un recubrimiento homogéneo como en el caso de la coprecipitación a 90 °C (figuras 5e y 5f). Asimismo, el análisis elemental (EDS) de cada recubrimiento (figuras 5c y 5d) evidencia el efecto positivo que la temperatura de hidrólisis tiene en la concentración de las especies de La y Mn puesto que a mayor temperatura se tiene una mayor presencia de éstas especies.

Figura 3. Efecto de la temperatura de hidrólisis de urea y/o coprecipitación en la cristalinidad de los depósitos sintetizados a 50°C (a) y 90°C (b)

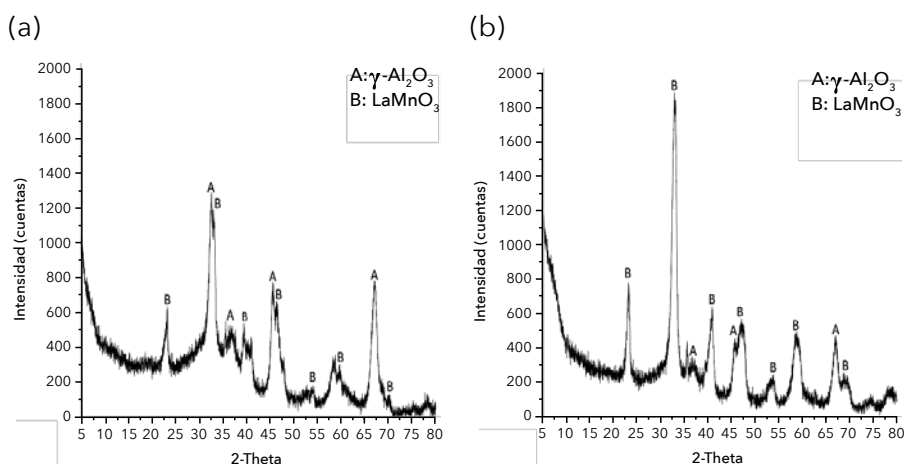


Figura 4. Efecto de la temperatura de hidrólisis de urea en la evolución del pH de la solución

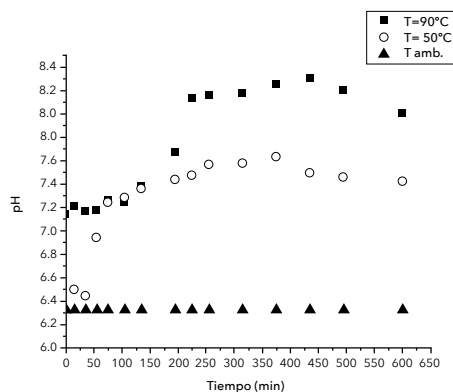
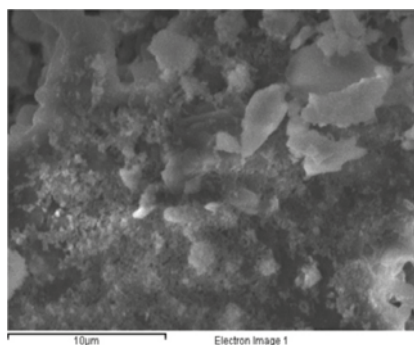
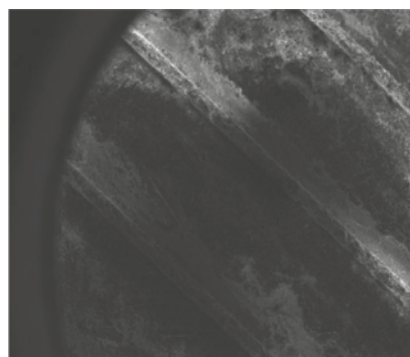


Figura 5. Micrografías del recubrimiento del monolito cuando la temperatura de coprecipitación o hidrólisis de urea es (a, b y c) 50 °C y (d, e y f) 90 °C

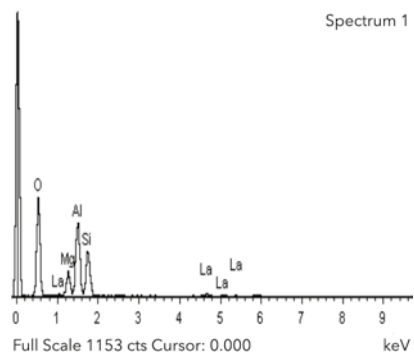
(a)



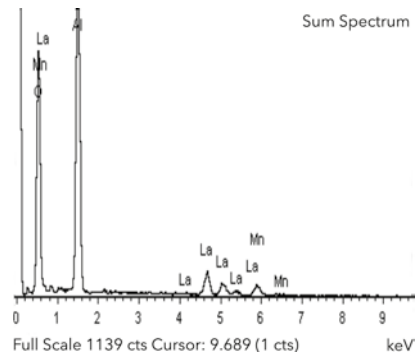
(b)



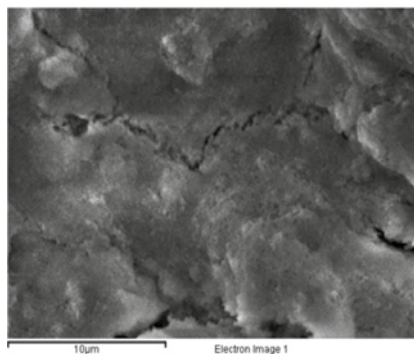
(c)



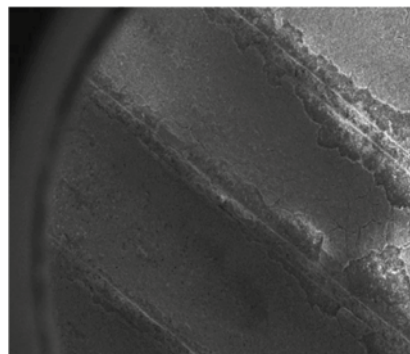
(d)



(e)



(f)



2.3 Tiempo de coprecipitación

La importancia del tiempo de coprecipitación durante la síntesis del LaMnO_3 es relevante debido a que la hidrólisis de la urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) es un proceso que toma relativamente un periodo largo de tiempo. La urea se adiciona a temperatura ambiente y conforme la temperatura y el tiempo de coprecipitación se incrementan, ésta se descompone en la solución acuosa generando iones OH^- (Perego y Villa, 1997; Draelants *et al.*, 2001), como se observa en la reacción 1. Conforme la urea se hidroliza, los iones OH^- se adicionan de manera gradual y homogénea en toda la dispersión lo que incrementa el pH de manera uniforme (Figura 4) (Radnik *et al.*, 2006; Gómez-Cortés *et al.*, 2009), favoreciendo la coprecipitación preferencial de los hidróxidos de los precursores de la fase activa (reacciones 2 y 3) dentro del poro del soporte.

En la literatura se reporta que el tiempo puede variar de 5-20 h para precipitar por completo los hidróxidos de lantano ($\text{La}(\text{OH})^+$) y de manganeso ($\text{Mn}(\text{OH})^+$) (Pinna 1998; Draelants *et al.*, 2001; Cybulski and Moulijn, 2006; Longo *et al.*, 2010). En la figura 6 se muestra la evidencia del efecto que el tiempo de coprecipitación tiene sobre la cristalinidad de las muestras de $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$. El difractograma que se muestra en la figura 6a corresponde a $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ sintetizado a partir de una solución en la que el tiempo de coprecipitación fue de 6 horas. Mientras que en la figura 6b se muestra el difractograma de una perovskita de LaMnO_3 que fue sintetizada a partir de una solución que se mantuvo 10 horas bajo condiciones de coprecipitación. La comparación de ambos espectros indica que el tiempo de coprecipitación favorece la formación del LaMnO_3 con estructura tipo perovskita.

En las figuras 5 y 7 se presentan los resultados obtenidos en MEB, tanto de la morfología de la superficie de los monolitos recubiertos, como de los análisis elementales (EDS) realizados. No se observan diferencias significativas en cuanto a la presencia de las especies de La y Mn, sin embargo, al comparar las figuras 5a, 5e y 7a se puede mostrar que las variables tiempo y temperatura de coprecipitación se encuentran correlacionadas e impactan en la homogeneidad del recubrimiento del monolito de forma tal que a baja temperatura y 10 h de reacción (figura 5a), el recubrimiento del monolito es en forma de aglomerados, conforme se incrementa la temperatura (90 °C) pero la reacción solo se lleva a cabo por un periodo de tiempo de 6 horas (figura 7a), la cantidad de aglomerados en

la superficie del monolito es mayor sin ser un recubrimiento homogéneo, y una vez que se lleva a cabo la reacción a 90°C -10 horas (figura 5e), el recubrimiento se vuelve prácticamente homogéneo.

Figura 6. Difracción de Rayos X a muestras de $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ mostrando efecto del tiempo de coprecipitación. (a) 6 horas; (b) 10 horas

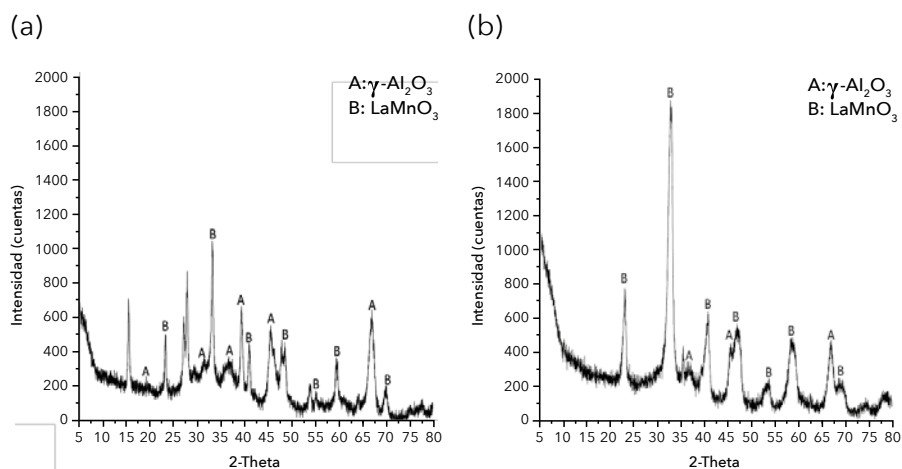
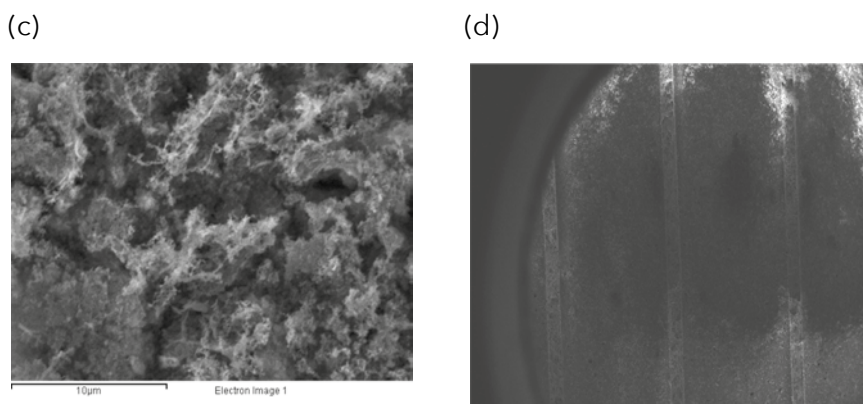
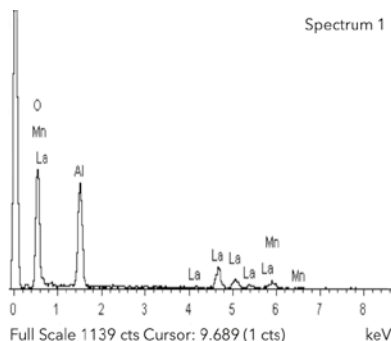


Figura 7. Micrografías (a y b) y EDS (c) de los monolitos recubiertos con $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ cuando la perovskita proviene de hidróxidos sintetizados bajo las siguientes condiciones: $T_{\text{coprec}} = 90^\circ\text{C}$, $t_{\text{coprec}} = 6\text{ h}$



(e)



2.4 Fase depositada en los monolitos de cordierita

Con el fin de evaluar la cristalinidad y la homogeneidad del recubrimiento $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, hasta ahora solo se han evaluado las siguientes variables: precursor de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$, temperatura y tiempo de coprecipitación, que por su naturaleza se pueden considerar como variables de síntesis. Sin embargo, existen también algunas variables involucradas durante el recubrimiento del monolito, cuyo efecto en la calidad es importante. Estas son las fases depositadas en el monolito de cordierita y el tiempo de inmersión del monolito en dicha fase.

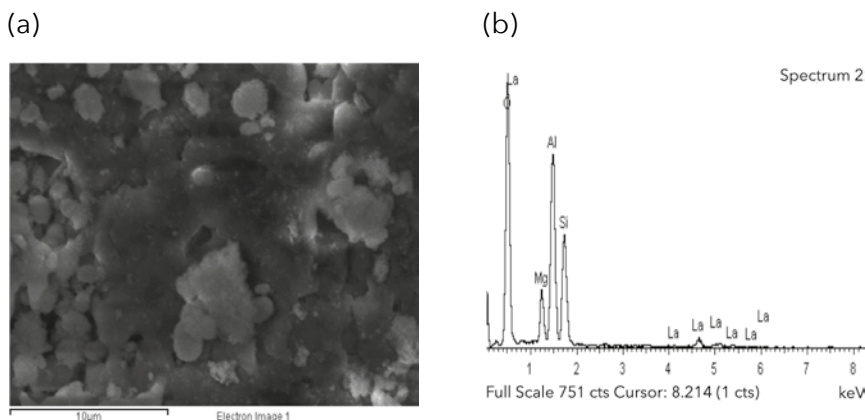
De manera convencional (Cimino *et al.*, 2000; Cimino *et al.*, 2001; Cimino *et al.*, 2007; Donsí *et al.*, 2005; Barbato *et al.*, 2009; Håkonsen *et al.*, 2010), primero se deposita $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ en las paredes del monolito. Posteriormente, este recubrimiento se estabiliza con La_2O_3 , para después realizar la coprecipitación de manera selectiva de los hidróxidos de La y Mn en los poros de la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ mediante el método de hidrólisis de urea; finalmente se retira el exceso de material de los canales del monolito con una corriente gaseosa (aire o N_2), y los monolitos ya recubiertos se secan a 120 °C por 3 horas y se calcinan a 800 °C también por 3 horas.

Una variante de este método es sintetizar el $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ en polvo según el procedimiento reportado por García (2009), y con dicho $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ preparar una dispersión en agua, posteriormente los monolitos se sumergen y se retiran de forma sucesiva en dicha dispersión, se remueve el exceso de material mediante un flujo de aire y los monolitos así recubiertos se secan a 120 °C por 3 horas. Otra alternativa, es preparar

la dispersión con la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ estabilizada térmicamente, y con los hidróxidos de La y Mn en sus poros en lugar de la perovskita LaMnO_3 , los monolitos recubiertos con esta fase se secan a 120°C por 90 min y se calcinan a 800°C por 4 horas con rampa de calcinación de $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$. En ambos casos, las condiciones de calcinación son fundamentales en el sentido de que a 800°C es cuando se obtiene la estructura cristalina tipo perovskita del LaMnO_3 , y la rampa usada permite que las moléculas presentes de agua y de gas se eliminen lentamente y ello favorezca un mejor recubrimiento en la superficie del monolito.

En las figuras 5e, 5f y 8 se presenta la morfología de la superficie de los monolitos obtenidos a partir del recubrimiento realizado con hidróxidos depositados en la $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ y del recubrimiento realizado con la fase totalmente sintetizada ($\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$). Se observa que el procedimiento que favorece una mayor presencia de La y un mejor recubrimiento es cuando los monolitos son impregnados con hidróxidos de La y Mn sobre $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ (figuras 5d, e y f). Es muy probable que la mayor homogeneidad obtenida con el recubrimiento con hidróxidos sea consecuencia de un menor tamaño de partícula al momento del depósito, a diferencia de que cuando el depósito se realiza con los óxidos, estos ya llevan un tratamiento térmico a alta temperatura que seguramente causa un incremento de tamaño de partícula debido a la sinterización, y en consecuencia se obtienen los aglomerados observados en la micrografía de la figura 8.

Figura 8. Micrografía (a) y EDS (b) de los monolitos recubiertos con $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ cuando la perovskita proviene de óxidos sintetizados bajo las siguientes condiciones:
 $T_{\text{coprec}} = 90^\circ\text{C}$, $t_{\text{coprec}} = 10\text{ h}$



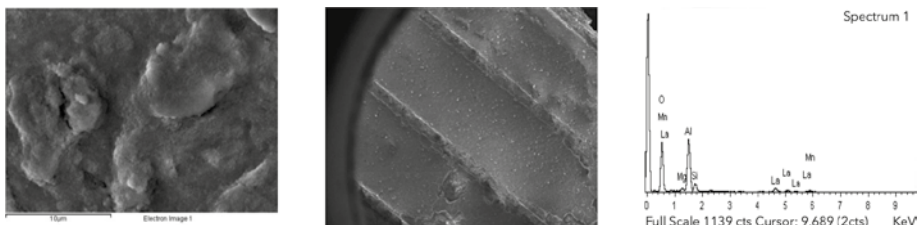
2.5 Tiempo de inmersión de los monolitos

El tiempo de inmersión de los monolitos dentro de la dispersión de los hidróxidos de La y Mn es otra variable que juega un papel importante en el recubrimiento de monolitos. Esta variable afecta principalmente la homogeneidad y la concentración de las especies activas, esto se evidencia en las micrografías mostradas en la figura 9. La figura 9a corresponde a un monolito que se mantuvo sumergido todo el tiempo de coprecipitación, es decir, 10 horas (*monolito a*). Después de este tiempo el monolito se retiró y se colocó un nuevo monolito que se mantuvo en la dispersión por espacio de 15 min-90°C (*monolito b*), concluido este tiempo se retiró ese monolito y se impregnó un nuevo monolito que se mantuvo en la dispersión 30 min-90°C (*monolito c*).

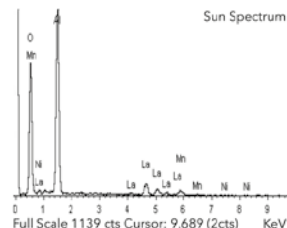
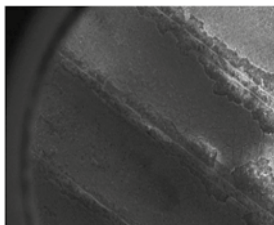
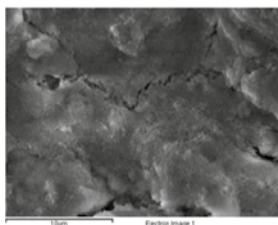
En la figura 9 se observa que el recubrimiento del *monolito a* (figura 9a) a pesar de ya cubrir toda la superficie del monolito muestra la formación de aglomerados. Sin embargo, en la figura 9 también se aprecia que una vez que se termina el tiempo de reflujo y se sumergen los posteriores monolitos, es notable que mientras mayor tiempo permanezca el monolito sumergido en la dispersión (figura 9b y 9c), se logra un mejor recubrimiento y una capa más homogénea del depósito de $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ en la superficie del monolito. Esta tendencia se repite en los EDS, en donde se observa que la presencia de especies de La y Mn va incrementando entre mayor tiempo esté sumergido el monolito después de que haya concluido el tiempo de coprecipitación.

Figura 9. Morfología de la Superficie (MEB) y EDS. Efecto del tiempo de inmersión en la morfología y análisis elemental del recubrimiento de los monolitos depositado como hidróxidos; (a) Monolito a; (b) Monolito b; (c) Monolito c

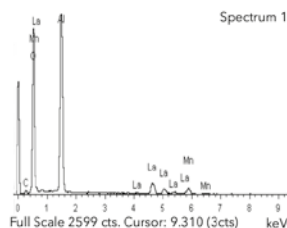
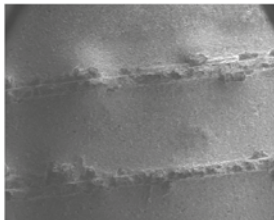
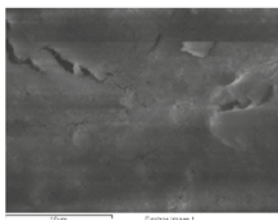
(a)



(b)



(c)



3. Conclusiones

De acuerdo con lo que se presentó en este capítulo se puede concluir que el recubrimiento de monolitos de cordierita con $\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ es un proceso en el cual resulta necesario considerar una serie de variables que involucran desde la síntesis de la fase activa ($\text{LaMnO}_3/\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$) hasta su depósito en los monolitos de cordierita. Se puede concluir que toda variable que afecte la concentración de las especies activas en solución y en el sólido, afecta la homogeneidad y cristalinidad del depósito. Para obtener un monolito de cordierita recubierto de manera homogénea con LaMnO_3 se recomienda seguir la siguiente secuencia: preparar $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ estabilizada térmicamente con LaO_2 , dispersar el sólido resultante en una solución de urea, nitrato de La y acetato de Mn. Mantener la coprecipitación de hidróxidos de La y Mn vía hidrólisis de la urea a reflujo a $90\text{ }^\circ\text{C}$ -10 h, una vez finalizado este tiempo impregnar los monolitos manteniendo la temperatura constante de $90\text{ }^\circ\text{C}$ y el tiempo de inmersión de los mismos de 30 min, para finalmente secar a $120\text{ }^\circ\text{C}$ -90 min y calcinar a $800\text{ }^\circ\text{C}$ -4 h a $0.5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Una vez que este proceso haya concluido se obtiene el catalizador monolítico mismo que puede ser evaluado catalíticamente en reacciones de combustión catalítica de hidrocarburos.

4. Referencias

- Barbato, P.S., Landi G, Pirone R, Russo G. y Scarpa A. (2009). Auto-thermal Combustion of CH₄ and CH₄-H₂ Mixtures over Bi-Functional Pt-LaMnO₃ Catalytic Honeycomb. *Catal Today*, 147(Supplement 1): S271-S278.
- Cai, W., Yu, J., Cheng, B., Su, B.L. y Jaroniec, M. (2009). Synthesis of Boehmite Hollow Core/Shell and Hollow Microspheres via Sodium Tartrate-Mediated Phase Transformation and Their Enhanced Adsorption Performance in Water Treatment. *J Phys Chem C*, 113: 14739-14746.
- Cimino, S., Casaletto, M.P., Lisi, L. y Russo, G. (2007). Pd-LaMnO₃ as Dual Site Catalysts for Methane Combustion. *Appl Catal A: General*, 327: 238-246.
- Cimino, S., Lisi, R. Pirone, G., Russo y M. Turco. (2000). Methane combustion on perovskites-based structured catalysts. *Catal Today*, 59: 19-31.
- Cimino, S., Pirone R. y Russo G. (2001). Thermal Stability of Perovskite-Based Monolithic Reactors in the Catalytic Combustion of Methane. *Ind Eng Chem Res.* 40: 80-85.
- Costa, T.M.H., Gallas, M.R, Benvenuti, E.V. y Da Jornada, J.A.H. (1999). Study of Nanocrystalline γ -Al₂O₃ Produced by High-Pressure Compaction. *J Phys Chem B.* 103 (21): 4278-4284.
- Cybulski, A. y Moulijn, J.A. (2006). *Structured Catalysts and Reactors*. CRC Press. 751-769.
- Donsí, F., Cimino, S., Benedetto, A.D., Pirone, R. y Russo, G. (2005). The Effect of Support Morphology on the Reaction of Oxidative Dehydrogenation of Ethane to Ethylene at Short Contact Times. *Catal Today*. 105 (3-4): 551-559.
- Donsí, F., Pirone R. y Russo G. (2004). Catalyst Investigation for Applications of Oxidative Dehydrogenation of Ethane in Short Contact Time Reactors. *Catal Today*. 91-92:285-288.
- Draelants, D.J., Zhao H. and Baron, G.V. (2001). Preparation of Catalytic Filters by the Urea Method and Its Application for Benzene Cracking in H₂S-Containing Biomass Gasification Gas. *Ind Eng Chem Res.* 40: 3309-3316.

- Fishwick, R.P., Natividad, R., Kulkarni, R., McGuire, P.A., Wood, J., Winterbottom, J.M. and Stitt, E.H. (2007). Selective Hydrogenation Reactions: A Comparative Study of Monolith CDC, Stirred Tank and Trickle Bed Reactors. *Catal Today*. 128 (1-2):108-114.
- Fitzgerald, J.J., Piedra, G., Dec, S.F., Seger, M. and Maciel, G.E. (1997). Dehydration Studies of a High-Surface-Area Alumina (Pseudo-boehmite) Using Solid-State ^1H and ^{27}Al NMR. *J Amer Chem Soc*. 119 (33): 7832-7842.
- Garcia, A.R., Brito de Barros, R., Fidalgo, A., y Ilharco, L.M. (2007). Interactions of L-Alanine with Alumina as Studied by Vibrational Spectroscopy. *Langmuir*. 23 (20): 10164-10175.
- García, J.A. (2009). *Recubrimiento de monolitos con óxido de Lantano-manganeso para reacciones de oxidación*. Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México.
- Gómez-Cortés, A., Díaz, G., Zanella, R., Ramírez, H., Santiago, P. y Saniger, J.M. (2009). Au-Ir/TiO₂ Prepared by Deposition Precipitation with Urea: Improved Activity and Stability in CO Oxidation. *J Phys Chem C*. 113 (22): 9710-9720.
- Guzmán-Castillo, M.L., Bokhimi, X., Toledo-Antonio, A., Salmones-Blásquez, J. y Hernández-Beltrán, F. (2001). Effect of Boehmite Crystallite Size and Steaming on Alumina Properties. *J Phys Chem B*. 105 (11): 2099-2106.
- Håkonsen, S.F., Walmsley, J.C. y Holmen, A. (2010). Ethene Production by Oxidative Dehydrogenation of Ethane at Short Contact Times Over Pt-Sn Coated Monoliths. *Appl Catal A: General*. 378 (1): 1-10.
- Krokidis, X., Raybaud, P., Gobichon, A.E., Rebours, B., Euzen, P. y Toulhoat, H. (2001). Theoretical Study of the Dehydration Process of Boehmite to γ -Alumina. *J Phys Chem B*. 105 (22): 5121-5130.
- Kuiry, S.C., Megen, E., Patil, S.C., Deshpande, S.A. y Seal, S. (2005). Solution-Based Chemical Synthesis of Boehmite Nanofibers and Alumina Nanorods. *J Phys Chem B*. 109 (9): 3868-3872.
- Longo, A., Liotta, L.F., Carlo, G.D., Giannici, F., Venezia, A.M. y Martorana, A. (2010). Structure and the Metal Support Interaction of the Au/Mn Oxide Catalysts. *Chem Mater*. 22 (13): 3952-3960.

- McLaughlin, K.J., Decaer B.L y Chavez M.M. (1998). *Process for Producing Stabilized Alumina Having Enhanced Resistance to Loss of Surface Area at High Temperatures*. United State. 5: 837,634.
- Nares, R., Ramírez, J., Gutiérrez-Alejandre, A., Louis, C. y Klimova, K. (2002). Ni/HB-Zeolite Catalysts Prepared by Deposition-Precipitation. *J Phys Chem*. 106: 13287-13293.
- Perego, C. and Villa P. (1997). Catalyst Preparation Methods. *Catal Today*. 34 (3-4): 281-305.
- Peña, M.A. and Fierro J.L.G. (2001). Chemical Structures and Performance of Perovskite Oxides. *Chem Rev*. 101 (7): 1981-2017.
- Pinna, F. (1998). Supported Metal Catalysts Preparation. *Catal Today*. 41(1-3):129-137.
- Radnik, J., Wilde, L., Schneider, M., Pohl, M.M. y Herein, D. (2006). Influence of the Precipitation Agent in the Deposition–Precipitation on the Formation and Properties of Au Nanoparticles Supported on Al₂O₃. *J Phys Chem B*. 110 (47): 23688-23693.
- Spinicci, R., Delmastro, A., Ronchetti, S., y Tofanari A. (2003). Catalytic Behaviour of Stoichiometric and Non-Stoichiometric LaMnO₃ Perovskite Towards Methane Combustion. *Mat. Chem. Phys*. 78 (2): 393-399.
- Tomašić, V. y Jović, F. (2006). State-of-the-Art in the Monolithic Catalysts/Reactors. *Appl. Catal. A: General*. 311: 112-121.
- Villegas, L., Masset, F. y Guilhaume, N. 2007. Wet Impregnation of Alumina-Washcoated Monoliths: Effect of the Drying Procedure on Ni Distribution and on Autothermal Reforming Activity. *Appl Catal A: General*. 320:43-55.

Capítulo VI

Estabilidad térmica oxidativa de un sistema nutracéutico incorporado a aceite esencial de chía (*Salvia hispanica* L.) y ácido ascórbico en emulsiones dobles*

Héctor Carrillo Navas^{1,2}
Julián Cruz Olivares¹
Juan Orozco Villafuerte³
Eleazar Aguirre Mandujano⁴
César Pérez Alonso^{2 *}

1. Introducción

1.1. Nutracéutico

Se considera que un alimento funcional es aquel que fomenta el desempeño fisiológico o bien, previene enfermedades del cuerpo humano siendo uno o más de sus componentes los responsables por estos beneficios a la salud. A estos componentes del alimento funcional se les conoce como nutraceuticos (Wildman, 2001).

La identificación de compuestos de interés para la prevención y el tratamiento terapéutico de enfermedades –como es el cáncer–, ha permitido la concientización sobre la necesidad de ingerir macro-nutrientes como proteínas, carbohidratos y grasas, así como micro-nutrientes, en donde se incluyen a las vitaminas, ya que las deficiencias de estos nutrientes producen síndromes de malnutrición y deficiencias vitamínicas muy conocidas. Los nutraceuticos no son nutrientes asociados con deficiencias en la dieta; sin embargo, son compuestos cuyo consumo ha sido asociado con la prevención y el tratamiento de enfermedades (Rajasekaran *et al.*, 2008).

1.2. Chía (*Salvia hispanica* L.)



Figura 1. Chía
(*Salvia hispanica* L.).

La chía (*Salvia hispanica* L.) es una planta anual de verano que pertenece a la familia de las labiatae, es una herbácea anual, de hasta 1 m de altura; presenta hojas opuestas, de 4 a 8 cm de largo y 3 a 5 de ancho. Las flores son hermafroditas, púrpuras a blancas, y aparecen en ramilletes terminales; florece entre julio y agosto en el hemisferio norte (Figura 1). Al cabo del verano, las flores dan lugar a un fruto en forma de aequino indehisciente. La semilla es rica en mucílago, fécula y aceite; tiene unos 2 mm de largo por 1.5 de ancho, y es ovalada y lustrosa, de color pardo grisáceo a rojizo (Peiretti y Gai, 2009).

Se ha determinado que las semillas de chía contienen cantidades de aceite que varían entre un 32-39%. Dicho aceite, junto con el de lino, ofrece el porcentaje natural conocido más elevado de ácido α -linolénico (50-64%) (Álvarez-Chávez *et al.*, 2008). De hecho, la chía presenta el mayor contenido de ácidos grasos esenciales, en particular Omega 3 y 6, en comparación con el porcentaje presente en las algas, en el pez menhaden (*Brevoortia tyrannus*) y la planta del lino; con la gran ventaja de que, el omega proveniente de la semilla de chía al contener antioxidantes naturales, puede preservarse por mayor tiempo que el proveniente de otras fuentes y no provoca el típico olor y sabor a pescado.

Se les denomina ácidos grasos esenciales ya que el organismo humano no los puede producir. Son moléculas con dos dobles enlaces que nuestra condición de mamíferos nos impide sintetizar y de allí la denominación de *esencial*. Los ácidos grasos poliinsaturados son conocidos como esenciales y dependiendo de cual es el primer átomo de carbono con enlace doble, los científicos hablan de la familia de ácidos grasos omega 3 (linolénico) y omega 6 (linoleico). La letra griega omega hace referencia a la ubicación de dicho primer enlace doble: en el tercer átomo de carbono ($\Omega 3$) o en el sexto ($\Omega 6$).

1.3. Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es también conocido como Vitamina C, trabaja fisiológicamente como un antioxidante soluble en agua, por su capacidad de enfriamiento o de estabilización de los radicales libres previniendo enfermedades degenerativas –incluido el cáncer–, enfermedades cardiovasculares, cataratas entre otras enfermedades. Es una de las vitaminas que con frecuencia es añadida en el comercio de las fórmulas fortificadas (Sablani *et al.*, 2007).

Las principales fuentes del ácido ascórbico de la dieta son las frutas, hortalizas, zumos y alimentos fortificados. Además de su función como nutriente esencial, el ácido ascórbico se utiliza ampliamente como aditivo alimenticio debido a sus propiedades antioxidantes y reductoras, es polar y, por lo tanto, es insoluble en aceites. Sin embargo, es sorprendentemente un antioxidante eficaz cuando se dispersa en aceites y también en emulsiones (Fennema, 2000).

En la industria de los alimentos, el ácido ascórbico es utilizado por dos razones: como suplemento vitamínico y como antioxidante proporcionando protección en la calidad nutricional y sensorial de los alimentos (Desai y Park, 2004). Sin embargo, presenta una alta inestabilidad frente a ciertos factores del medio ambiente; la causa principal de su deterioro es la oxidación provocando así la pérdida de su estructura activa y la formación de compuestos sin actividad biológica, además de compuestos con sabor y precursores del oscurecimiento no enzimático (Arroqui *et al.*, 2002).

Una manera de incorporar compuestos nutracéuticos de distinta naturaleza (hidrofílicos y lipofílicos) en un sólo sistema es mediante la formulación de emulsiones dobles.

1.4. Emulsiones dobles

Es posible preparar emulsiones dobles conocidas como *emulsiones de emulsiones*, éstas pueden ser del tipo agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$) o aceite-en-agua-en-aceite ($O_1/W/O_2$). Las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ consisten de gotas de agua dispersas en grandes glóbulos de aceite los cuales están dispersos a su vez en una fase acuosa continua (McClements, 2005).

Sus aplicaciones potenciales son numerosas, y el estudio de estos sistemas es actualmente un campo activo de la investigación, especialmente en áreas como biorremediación (Pimentel-González *et al.*, 2008), farmacéutica, cosméticos y alimentos (Lobato-Calleros *et al.*, 2008). Las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ permiten la encapsulación de moléculas activas en la fase acuosa interna, y esto hace posible enmascarar sabores u olores; protección contra la oxidación, luz o degradación enzimática; o para asegurar la liberación controlada de los ingredientes activos encapsulados.

Las emulsiones dobles son preparadas tradicionalmente mediante el método de dos etapas con dos tensoactivos de solubilidad opuesta. Para producir una emulsión doble $W_1/O/W_2$, primero un tensoactivo con un valor de balance hidrófilo-lipófilo bajo ($HLB < 5$) es disuelto en aceite. Después se añade agua, se homogeniza y se forma una emulsión W_1/O . El sistema es entonces re-emulsionado en una solución acuosa de tensoactivo con un HLB alto (> 10) para producir una emulsión doble $W_1/O/W_2$. Ambos tensoactivos se mezclan en las interfaces agua/aceite, y el tiempo de vida de las películas formadas en las interfaces es gobernada por la composición de la mezcla binaria de surfactantes (Pays *et al.*, 2001).

1.5. Estabilidad oxidativa

La oxidación es la responsable de los cambios químicos en los aceites y las vitaminas dando lugar al deterioro del sabor y del alimento. Se produce en presencia de luz, oxígeno, altas temperaturas y puede ser catalizada por metales. El consumo humano de los productos oxidados, en particular los radicales libres formados durante la oxidación, ha sido una causa en el desarrollo del cáncer (Kamal-Eldin, 2003).

La estabilidad oxidativa es una de las indicaciones más importantes para el mantenimiento de la calidad de los productos alimenticios (Tan *et al.*, 2002). La resistencia a la oxidación es reconocida como la estabilidad oxidativa en diferentes condiciones y se expresa como el período de tiempo necesario para lograr el punto final en que se pueden seleccionar los alimentos.

La estabilidad oxidativa puede ser estudiada por medio de la técnica de calorimetría diferencial de barrido (CDB). En ésta, la diferencia en el flujo de calor aplicado a una muestra y a una referencia es monitoreada en función del tiempo o temperatura; mientras la temperatura de la mues-

tra, en una atmósfera, es programada (Hines, 1995). La energía requerida para mantener esta pequeña diferencia de temperaturas es una medida de los cambios en la entalpía o en la capacidad calorífica de la muestra con respecto a la referencia. Paralelamente, se grafica el flujo de calor aplicado con respecto al incremento de la temperatura. A partir de este termograma se pueden calcular las temperaturas de transición y las transiciones cristalinas de diversos componentes alimenticios, incluyendo los lípidos (Ulkowski *et al.*, 2005).

La investigación sobre la oxidación requiere de mediciones altamente precisas de la cantidad de calor emitido. La técnica de CDB ofrece la ventaja de que se puede utilizar en régimen no isotérmico para evaluar la estabilidad térmica de sustancias químicas y para determinar parámetros cinéticos de reacciones simples o complejas (Smith *et al.*, 2005; Pérez-Alonso *et al.*, 2008).

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

El material emulsionado consta de: aceite esencial de chía (*Salvia hispanica* L.), que fue abastecido por el Laboratorio de Ingeniería Química de la Unidad El Cerrillo de la Facultad de Química de la UAEM y ácido ascórbico con 99.8% de pureza, adquirido en Sigma-Aldrich, S. A. de C. V. (Toluca, Estado de México).

Para la elaboración de la emulsión primaria (W_1/O) se utilizan dos agentes tensoactivos: grinsted PGPR (Ésteres de poliglicerol de poliricinoleato) y panodan SDK (Ésteres de mono y diglicéridos de ácido diacetil tartárico), ambos fueron adquiridos en la compañía Dannova Química, S.A. de C.V. (México, D.F.) y goma gelana (GG), que fue adquirida en la compañía Merck & Co. Kelco Division, Rahway, (NJ, EE.UU).

Para la fase acuosa externa de la emulsión (W_2) se utilizan tres biopolímeros: goma de mezquite (GM) (*prosopis laevigata*), recolectada (San Luis Potosí, México) en forma de lágrimas y se purifica de acuerdo a Vernon-Carter *et al.* 1996; maltodextrina (MD) con un equivalente de dextrosa DE-10, que fue adquirida en la compañía Complementos Alimenticios S. A. de C. V. (Naucalpan, Estado de México) y proteína de suero de leche

(PSL) (Hilmar™ 8000) conteniendo 80% de proteína en base seca que fue adquirida en la compañía Hilmar Ingredients, (Hilmer, CA, EE.UU).

El agua en todos los experimentos fue bidestilada y proporcionada por el Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa y se utilizó azida de sodio (NaN_3) (Hycel de México, S.A. de C.V., México, D.F.) al 0.3 % como conservador de las soluciones de biopolímeros.

2.2. Métodos

2.2.1. Formulación de emulsiones dobles $W_1/O/W_2$

Se formularon 4 tipos de emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ variando las relaciones de biopolímero a W_1/O (2.12:1 y 4.12:1), con un total de 250 g de emulsión, usando el procedimiento de emulsiónamiento en dos etapas (tabla 1) (Lobato-Calleros *et al.*, 2008).

Tabla 1. Formulación de emulsiones dobles $W_1/O/W_2$

Mezcla	M1, M3	M2, M4
biopolímero : emulsión interna	2.12:1	4.12:1
Fase Acuosa Interna (W_1)	5.833 g	3.500 g
Goma Gelana	0.029 g	0.018 g
Panodan SDK	0.467 g	0.280 g
Ácido Ascórbico	1.750 g	1.050 g
Agua	3.588 g	2.153 g
Fase Oleosa (O)	23.333 g	14.000 g
Grinsted PGPR	1.867 g	1.120 g
Aceite esencial de chía	21.467 g	12.880 g
Fase Acuosa Externa (W_2)	220.833 g	232.500 g
Biopolímero *	61.921 g	72.153 g
Agua	158.913 g	160.348 g
Total de Emulsión	250.000	250.000

* M1 y M2 con GM66-MD17-PSL17; M3 y M4 con GM17-MD66-PSL17.

El procedimiento consiste en una primera etapa: la fase acuosa interna (W_1) donde es añadida gota a gota a la fase oleosa (O) y emulsionada con

un homogeneizador Ultra-Turrax T50 basic (IKA®-WERKE Works Inc., Wilmington, NC, EE.UU) a una velocidad de 5200 r.p.m. durante 5 min, con un baño de hielo para mantener la emulsión a 25 °C. En la segunda etapa, la W_1/O es re-emulsionada en una fase acuosa externa (W_2) conformada por una mezcla de biopolímeros y 0.3% en peso del total de la emulsión de azida de sodio (NaN_3), emulsionando con un homogeneizador Ultra-Turrax T50 basic (IKA®-WERKE Works Inc., Wilmington, NC, EE.UU) a una velocidad de 7600 r.p.m. durante 6 min. La fase acuosa externa se hidrata 24 h antes de ser preparada la emulsión doble $W_1/O/W_2$ (Rodríguez-Huezo et al., 2004).

2.2.2. Calorimetría diferencial de barrido de las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$

Se tomaron muestras de 4 a 5 mg de cada una de las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$, del material emulsionado y de los agentes tensoactivos para ser colocados en un calorímetro diferencial de barrido modulado TA Instruments modelo Q1000 (New Castle, DE, EE.UU), hasta una temperatura de 400 °C en rampas de calentamiento de 4.0, 6.0, 8.0, y 10.0 °C/min (β) partiendo de una temperatura de 30 °C y un flujo de oxígeno de 100 mL/min.

Al obtener los termogramas de las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$, que indican las temperaturas de oxidación en los diferentes intervalos de calentamiento, se determinó la constante de velocidad de oxidación por medio del método ASTM (1984). Donde los valores de las temperaturas del flujo de calor registradas (T_{ox}) para diferentes valores de β se pueden describir como:

$$\log \beta = a \frac{1}{T_{ox}} + b \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde: a y b son coeficientes que representan la pendiente y la ordenada al origen, al graficar $\log \beta$ vs T_{ox} y obtener una correlación de primer orden.

Finalmente se determinan:

$$Z = \frac{\beta E_a \exp \left(\frac{E_a}{RT_{ox}} \right)}{RT^2} \quad (\text{Ec. 2})$$

$$k = Z \exp \left(- \frac{E_a}{RT_{ox}} \right) \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde: k es la constante de reacción [s^{-1}], Z es el factor preexponencial [s^{-1}], E_a es la energía de activación en el proceso de oxidación [kJ/mol], R es la constante universal de los gases y T_{ox} es la temperatura de oxidación en el termograma [K] (ASTM, 1984).

3. Resultados y discusión

3.1. Calorimetría diferencial de barrido de las emulsiones dobles ($W_1/O/W_2$)

Las figuras 2, 3, 4, 5 y 6 muestran los termogramas de flujo de calor en función de la temperatura para las diferentes tasas de calentamiento del aceite esencial de chía, ácido ascórbico, goma gelana, grinsted PGPR y panodan SDK, respectivamente, mostrando temperaturas de oxidación (T_{ox}) entre 167.50 °C y 190.00 °C para el aceite esencial de chía; 187.50 °C y 190.00 °C para el ácido ascórbico; 245.00 °C y 255.00 °C para la goma gelana; 222.50 °C y 250.00 °C para el grinsted PGPR; 252.50 °C y 292.50 °C para el panodan SDK.

En las figuras 7 y 8 se presentan los termogramas representativos de flujo de calor en función de la temperatura, para las diferentes tasas de calentamiento de las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ formuladas con la mezcla GM66-MD17-PSL17 y GM17-MD66-PSL17, respectivamente, con una relación de biopolímero a W_1/O de 2.12:1. Los termogramas de flujo de calor obtenidos para la otra relación tuvieron un comportamiento similar a los presentados en las figuras 7 y 8.

Figura 2. Termograma de aceite esencial de chía puro

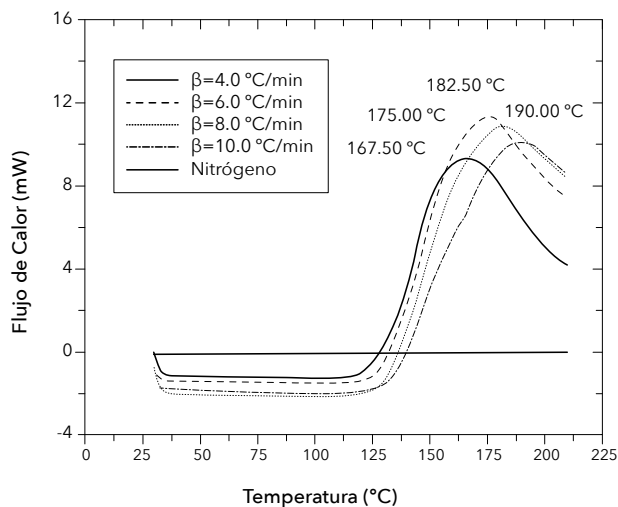


Figura 3. Termograma de ácido ascórbico puro

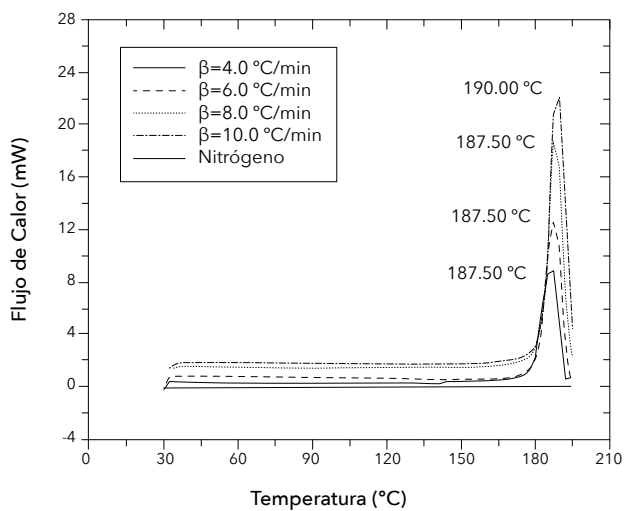


Figura 4. Termograma de goma gelana pura

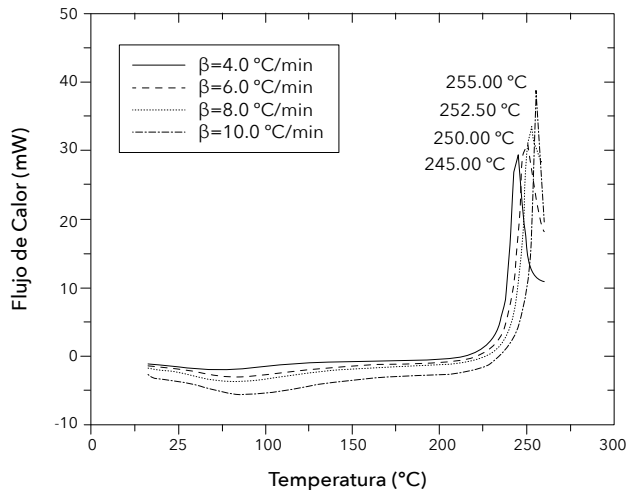


Figura 5. Termograma de grinsted PGPR puro

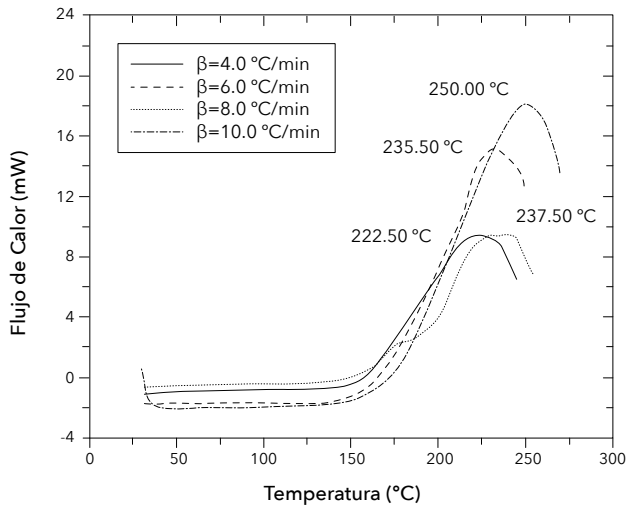


Figura 6. Termograma de panodan SDK puro

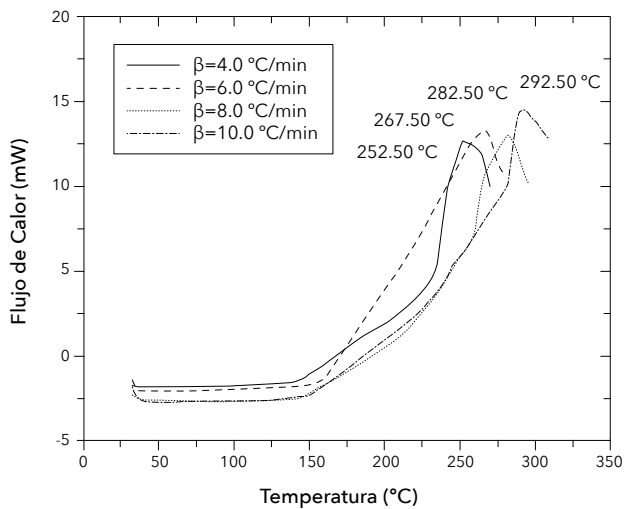


Figura 7. Termograma de la emulsión doble $W_1/O/W_2$ estabilizada con la mezcla GM66-MD17-PSL17 con relación 2.12:1

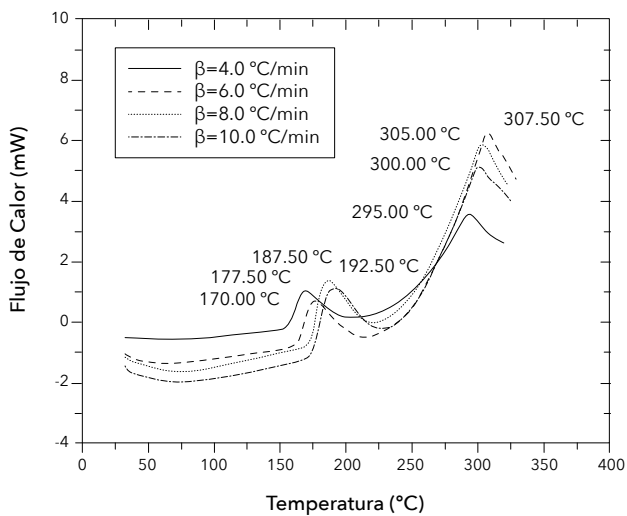
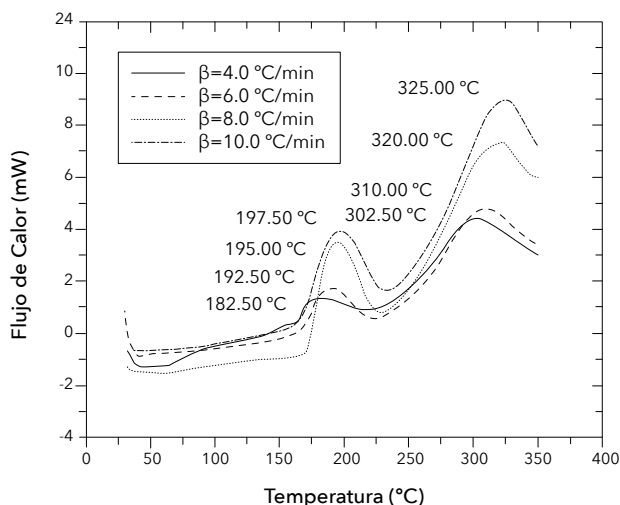


Figura 8. Termograma de la emulsión doble $W_1/O/W_2$ estabilizada con la mezcla GM17-MD66-PSL17 con relación 2.12:1



Para todos los tratamientos las temperaturas de oxidación (T_{ox}) del primer pico estuvieron entre 160.00 °C y 210.00, y las del segundo pico por arriba de los 292.00 °C. El primer pico se infiere que es la descomposición de la W_1/O y el segundo pico es la descomposición de la W_2 (Tabla 2 y 3).

En las tablas 2 y 3 se aprecian los parámetros cinéticos de los dos picos de las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$.

Se observa que los valores de E_a para el primer pico aumentan conforme la relación de biopolímero a W_1/O aumenta (de 2.12:1 a 4.12:1) y para el segundo pico los valores de E_a disminuyen conforme la relación de biopolímero a W_1/O aumenta para la mezcla formulada con GM66-MD17-PSL17. Los valores de E_a de la mezcla formulada con GM17-MD66-PSL17 para ambos picos disminuyen conforme la relación de biopolímero a W_1/O aumenta. La constante de reacción (k) para el primer pico para la mezcla formulada con GM66-MD17-PSL17, mostró que al aumentar la relación de biopolímero a W_1/O la velocidad con la que se lleva la oxidación aumenta sin embargo, para el segundo pico la k disminuye cuando aumenta la relación de biopolímero a W_1/O . Para la mezcla formulada con GM17-MD66-PSL17 los valores de k tienen un comportamiento similar al de su E_a , (disminuye conforme aumenta la relación de biopolímero a W_1/O).

Tabla 2. Parámetros cinéticos para el primer pico de las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$

Mezcla	Relación	β (°C/min)	T_{ox} (K)	E_a (kJ/mol)	Z (1/min)	k (1/min)
GM66-MD17-PSL17	2.12:1	4.0	443.15	59.29	1.54E+06	0.241
		6.0	450.65			
		8.0	460.65			
		10.0	465.65			
GM66-MD17-PSL17	4.12:1	4.0	463.15	85.38	8.30E+08	0.320
		6.0	473.15			
		8.0	478.15			
		10.0	480.65			
GM17-MD66-PSL17	2.12:1	4.0	455.65	95.99	2.26E+10	0.374
		6.0	465.65			
		8.0	468.15			
		10.0	470.65			
GM17-MD66-PSL17	4.12:1	4.0	443.15	61.87	3.03E+06	0.250
		6.0	455.65			
		8.0	460.65			
		10.0	465.65			

Tabla 3. Parámetros cinéticos para el segundo pico de las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$

Mezcla	Relación	β (°C/min)	T_{OX} (K)	E_a (kJ/mol)	Z (1/min)	k (1/min)
GM66-MD17-PSL17	2.12:1	4.0	568.15	185.64	3.45E+16	0.473
		6.0	573.15			
		8.0	578.15			
		10.0	580.65			
GM66-MD17-PSL17	4.12:1	4.0	568.15	154.35	3.69E+13	0.390
		6.0	575.65			
		8.0	580.65			
		10.0	583.15			
GM17-MD66-PSL17	2.12:1	4.0	575.65	101.77	2.78E+08	0.248
		6.0	583.15			
		8.0	593.15			
		10.0	598.15			

Continúa...

Mezcla	Relación	β (°C/min)	TOX (K)	Ea (kJ/mol)	Z (1/min)	k (1/min)
GM17-MD66-PSL17	4.12:1	4.0	575.65	93.45	.507E+08	0.230
		6.0	578.15			
		8.0	588.15			
		10.0	598.15			

El valor de la Ea más alta del primer pico se presentó con la mezcla formulada con GM17-MD66-PSL17, con la relación 2.12:1 (95.99 kJ/mol) y la Ea más alta para el segundo pico se presentó con la mezcla formulada con GM66-MD17-PSL17, con la relación 2.12:1 (185.64 kJ/mol). Estos resultados infieren que la mezcla que contiene maltodextrina en mayor proporción con una relación de 2.12:1, retarda más la difusión del oxígeno hacia el interior de la W_1/O conteniendo al aceite esencial de chía y ácido ascórbico, logrando una mejor estabilidad contra la oxidación (Beristain *et al.*, 2002). Estos resultados concuerdan también con el método desarrollado por Pérez-Alonso *et al.* (2003) que permite seleccionar efectivamente materiales de uso potencial en la protección de lípidos contra la oxidación.

4. Conclusiones

La técnica de CDB permite inferir el grado de protección del sistema nutracéutico mediante el cálculo de la energía de activación oxidativa y la constante de reacción, ya que las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ son altamente complejas.

5. Referencias

- Álvarez-Chávez, L.M., Valdivia-López, M.A., Aburto-Juárez, M.L. y Tecante, A. (2008). Chemical Characterization of the Lipid Fraction Ok Mexican Chia Seed (*Salvia Hispanica* L.). *Int J Food Prop.* 11: 687-697.
- Arroqui, C., Rumsey, T.R., Lopez, A. and Virseda P. (2002). Losses by Diffusion of Ascorbic Acid During Recycled Water Blanching of Potato Tissue. *J Food Eng.* 52: 25-30.
- ASTM (1984). Arrhenius Kinetic Constants for Thermally Unstable Materials. *Annual Book of ASTM STANDARS* (pp. 1040-1021). USA.

- Beristain, C.I., Azuara, E. y Vernon-Carter, E.J. (2002). Effect of the Water Activity on the Stability to Oxidation of Spray-Dried Encapsulated Orange Peel Oil Using Mesquite Gum (*Prosopis Juliflora*) as Wall Material. *J. Food Sci.* 67: 206-211.
- Desai, K.G.H. and Park, H.J. (2004). Encapsulation of Vitamin C in Tri-polyphosphate Cross-Linked Chitosan Microspheres by Spray Drying. *Drug Develop Res.* 63:181-189.
- Fennema, O.R. (2000). *Química de los Alimentos*. España: Ed. Acribia.
- Hines, P.J. (1995). *Thermal Methods of Analysis: Principles, Applications and Problems*. Great Britain: Ed. Blackie Academic and Professional.
- Kamal-Eldin, A. (2003). *Lipid Oxidation Pathways*. Champaign: Ed. AOCS Press.
- Lobato-Calleros, C., Sosa-Pérez, A., Rodríguez-Tafoya, J., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Alonso, C. y Vernon-Carter, E.J. (2008). Structural and Textural Characteristics of Reduced-Fat Cheese-Like Products Made from W1/O/W2 Emulsions and Skim Milk. *Lebensm Wiss Technol.* 41: 1847-1856.
- McClements, D.J. (2005). *Food Emulsions. Principles, Practices, and Techniques*. Estados Unidos: Ed. CRC Press.
- Pays, K., Giemanska-Kahn, J., Pouligny, B., Bibette, J. y Leal-Calderón, F. (2001). Coalescence in Surfactant-Stabilized Double Emulsions. *Langmuir.* 17: 7758-7769.
- Peiretti, P.G. y Gai, F. (2009). Fatty Acid and Nutritive Quality of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds and Plant During Growth. *Anim Feed Sci Tech.* 148: 267-275.
- Pérez-Alonso, C., Báez-González, J.G., Beristain, C.I., Vernon-Carter, E.J. y Vizcarra-Mendoza, M.G. (2003). Estimation of the Activation Energy of Carbohydrate Polymers Blends as Selection Criteria for Their Use as Wall Material for Spray-Dried Microcapsules. *Carbohydr Polym.* 53: 197-203.
- Pérez-Alonso, C., Cruz-Olivares, J., Barrera-Pichardo, J.F., Rodríguez-Huezo, M.E., Báez-González, J.G. y Vernon-Carter, E.J. (2008). DSC Thermo-oxidative Stability of Red Chili Oleoresin Microencapsulated in Blended Biopolymers Matrices. *J Food Eng.* 85: 613-624.

- Pimentel-González, D., Revah, S., Campos-Montiel, R., Monroy-Hermosillo, O. and Vernon-Carter, E.J., 2008. *A Laboratory Study of The Biodegradation of MTBE Solubilised In Water by a Microbial Consortium Entrapped in A Water-In-Oil-In-Water Double Emulsion*. *Process Biochem.* 43: 1239-1243.
- Rajasekaran, C., Meignanam, E., Vijayakumar, V., Kalaivani, T., Ramya, S., Premkumar, N., Siva, R. y Jayakumararaj, R. (2008). Investigations on Antibacterial Activity of Leaf Extracts of *Azadirachta Indica* A. Juss (Meliaceae): A Traditional Medicinal Plant of India. *Ethnobotanical Leaf.* 12: 1213-1217.
- Rodríguez-Huezo, M.E., Durán-Lugo, R., Prado-Barragán, L.A., Cruz-Sosa, F., Lobato-Calleros, C., Alvarez-Ramírez, J. y Vernon-Carter, E.J. (2007). Pre-Selection of Protective Colloids for Enhanced Viability of *Bifidobacterium Bifidum* Following Spray-Drying and Storage, and Evaluation of Aguamiel as Thermoprotective Prebiotic. *Food Res. Int.* 40: 1299-1306.
- Sablani, S.S., Al-Belushi, K., Al-Marhubi, I. y Al-Belushi, R. (2007). Evaluating Stability of Vitamin C in Fortified Formula Using Water Activity and Glass Transition. *Int. J. Food Prop.* 10: 61-71.
- Smith, K.W., Cain, F.W. y Talbot, G., (2005). Kinetic Analysis of Nonisothermal Differential Scanning Calorimetry of 1, 3-Dipalmitoyl-2-Oleoylglycerol. *J. Agr. Food Chem.* 53: 3031-3040.
- Tan, C.P., Che-Man, Y.B., Selamat, J. y Yussof, M.S. (2002). Comparative Studies of Oxidative Stability of Edible Oils by Differential Scanning Calorimetry and Oxidative Stability Index Methods. *Food Chem.* 72: 385-389.
- Ulkowski, M., Musialik, M. y Litwinienko, G. (2005). Use of Differential Scanning Calorimetry to Study Lipid Oxidation. 1. Oxidative Stability of Lecithin and Linolenic Acid. *J. Agr. Food Chem.* 53: 9073-9077.
- Vernon-Carter, E.J., Gómez, S.A., Beristain, C.I., Mosqueira, G., Pedroza-Islas, R. y Moreno-Terrazas, R.C. (1996). Color Degradation and Coalescence Kinetics of Aztec Marigold Oleoresin-In-Water Emulsions Stabilized by Mesquite or Arabic Gums and Their Blends. *J. Texture Stud.* 27: 625-641.
- Wildman, R.E. (2001). *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*. Inglaterra: Ed. CRC Press.

Capítulo VII

Purificación de un antígeno recombinante de hepatitis E expresado en *Hansenula polymorpha*

Abraham Álvarez García^{1, 2}

Jorge Javier Ramírez García¹

Néstor Octavio Pérez^{1 *}

1. Introducción

Virus de la Hepatitis E (HEV).

La hepatitis E es una enfermedad causada por el HEV, el cual es un virus desnudo y reclasificado como una especie del género *Hepevirus* de la familia *Hepeviridae* (Mayo, 2005). La enfermedad afecta principalmente a los habitantes de ciudades en vías de desarrollo llegando a causar epidemias (Okamoto, 2007).

La transmisión del virus, durante estos brotes, ocurre por la vía fecal-oral al consumir agua o alimentos contaminados. En ciudades con baja prevalencia y en casos donde no está ligada la enfermedad con viajes a áreas endémicas, la Hepatitis es considerada una zoonosis, especialmente entre granjeros que manipulan cerdos. Es más, los virus de humanos y cerdos están estrechamente relacionados y algunas cepas humanas son capaces de infectar cerdos (Meng, 2010).

Genoma

El genoma del virus de la Hepatitis E consiste de una sola cadena lineal en sentido positivo de RNA de aproximadamente 7.5 kb, la partícula mide entre 27 y 34 nm de diámetro (Harrison, 1999) tiene tres pautas de lectura abierta (ORF's por sus siglas en ingles Open-Reading Frame (Panda *et al.*, 2007). La ORF1 de aproximadamente 5kb codifica una poliproteína de aproximadamente 1690 aminoácidos. Se trata de proteínas no estructurales involucradas en la replicación del genoma viral, por análisis *in silico* se les ha atribuido las funciones de metiltransferasa, cisteína

proteasa, ARN helicasa y ARN polimerasa dependiente de ARN (Harrison, 1999). La ORF2 de aproximadamente 2 kb empieza en el extremo 3' de la región ORF1 y codifica una proteína estructural, la cual forma la cápside del virus con aproximadamente 660 aminoácidos y un peso molecular de 71 kDa (Harrison, 1999). La ORF3 se traslapa 1 kb con la ORF1, con el extremo 5' de la ORF2 y codifica para una fosfoproteína inmunogénica de aproximadamente 123 aminoácidos, con un peso molecular de 14.7 kDa, jugando un papel importante en el ensamble de las partículas virales (Tyagi *et al.*, 2002).

Serotipo y genotipos

Se han identificado cuatro genotipos y se han designado algunos subgenotipos (Ling *et al.*, 2006). El Genotipo 1 se ha detectado en la mayoría de los casos reportados. El Genotipo 2 se ha encontrado de algunas epidemias en México y África Central. Los genotipos 3 y 4 son detectados frecuentemente en cerdos y parecen ser menos virulentos para humanos que los genotipos 1 y 2 (Emerson and Purcell, 2003). Sin embargo, todos los genotipos del HEV se clasifican en el mismo serotipo. Esto abre la posibilidad para producir una vacuna profiláctica, ya que hasta el momento no hay una vacuna comercial contra la Hepatitis E en el mundo, a pesar de que hay varias en fases clínicas (Meng, 2010), como se muestra en la tabla 1.

Distribución geográfica global

El genotipo 1 predomina en países como China, India, Nepal, Pakistán, Vietnam, Marruecos y Egipto. El genotipo 2 se presenta en países como México, Egipto, el Congo y Nigeria. Los genotipos 1 y 2 pueden causar epidemias violentas, en contraste los genotipos 3 y 4 que incluye Estados Unidos, algunas ciudades Europeas, China y Japón, tienen mayor probabilidad de contagio por animales (Okamoto, 2007).

Proteínas Recombinantes de ORF2.

Debido a que no existe un modelo celular apropiado para la propagación del HEV, se han utilizado técnicas de biología molecular para su estudio.

Proteínas recombinantes, codificadas en los ORF2 y ORF3, son inmunogénicos y son útiles para el diagnóstico de la enfermedad (Meng, 2010).

EL ORF2 presenta una alta actividad neutralizante, mayor que de la proteína codificada por el ORF3 (Tam *et al.*, 1997) y ha sido el modelo para el desarrollo de vacunas. La habilidad de esta región para dar inmunidad depende en gran medida del estado conformacional de la proteína, y se ha caracterizado la respuesta inmunológica contra la región completa y contra una truncada tal como se muestra en tabla 1, acerca de los estudios preclínicos y clínicos hechos con varios antígenos expresados en diferentes hospederos (Amini-Bavil-Olyaei *et al.*, 2009).

Tabla 1. Desarrollos preclínicos y clínicos de diferentes vacunas contra el HEV

Sistema de Expresión	Designación (Fecha de estudio)	Origen de la cepa	ORF	Región de aminoácidos	Resultados / Modelo de vacunación	Referencias
Bacteria	trpE-C2 (1993)	Birmana	ORF2	221 - 660 aa (440aa)	Macaco <i>Cinomolgus</i>	(Purdy <i>et al.</i> , 1993)
	pQE-AC2.1 (1997; 2000)	Birmana	ORF2.1	267 - 660 aa (394aa)	Rata Wistar (inmunización exitosa)	(Li <i>et al.</i> , 2000, Li <i>et al.</i> , 1997a)
	23kDa (2001)	China (D11092)	ORF2	394 - 604 aa (211aa)	<i>Mono Rhesus</i> (inmunización exitosa)	(Im <i>et al.</i> , 2001, Zhang <i>et al.</i> , 2001a)
	Vacuna HEV239 (2005)	Genotipo 1 de HEV	ORF2	368 - 606 aa (239aa)	<i>Mono Rhesus</i> (inmunización exitosa)	(Li <i>et al.</i> , 2005)
	Healive™ + HEVp179	HEV TZ84 + HEV genotipo 4 (China)	ORF2	439 - 617 aa (179aa)	Ratones (BALB C) (inmunización exitosa)	(Dong <i>et al.</i> , 2007)
	pSVL-ORF3 (1996)	China	ORF3	1 - 123 aa (123aa)	Ratones (BALB C) (inmunización exitosa)	(Lu <i>et al.</i> , 1996)
	pcHEVORF2 (2002)	Birmana	ORF2	1 - 660 aa (660aa)	Macaco <i>Cinomolgus</i>	(Saleem <i>et al.</i> , 2002)
	pJHEV (1997, 2001)	Birmana	ORF2	1 - 660 aa (660aa)	Ratones BALB C (inmunización exitosa)	(He <i>et al.</i> , 2001; He <i>et al.</i> , 1997)
	pcHEVORF2 (2004)	Birmana	ORF2	1 - 660 aa (660aa)	Macaco <i>Cinomolgus</i>	(Kamili <i>et al.</i> , 2004)
	pcvHEV23 (2005)	China	ORF2 + ORF3	1 - 660 aa de ORF2 + 125aa de ORF3	Ratones BALB C (inmunización exitosa)	(Hong <i>et al.</i> , 2005)
Bacteria	pCl.sig3-ORF2.1 (2006)	Birmana	ORF2 + PORF2	394 - 660 aa (267 aa) + 50aa de péptidos señal	Rata Wistar / oveja (inmunización no exitosa/ exitosa)	(Li <i>et al.</i> , 2006)2006

Continúa...

Sistema de Expresión	Designación (Fecha de estudio)	Origen de la cepa	ORF	Región de aminoácidos	Resultados / Modelo de vacunación	Referencias
Bacteria	pCl.sig1-ORF2.1 (2006)	Birmana	ORF2 + PORF2	394 - 660 aa (267 aa) + 22aa de péptidos señal	Rata Wistar / oveja (inmunización exitosa/no exitosa)	(Li <i>et al.</i> , 2006)2006
	rORF2p (2007)	Genotipo 1 aislado de la India	ORF2	1 - 660 aa (660aa)	Ratones (BALC C) (inmunización exitosa)	(Deshmukh <i>et al.</i> , 2007)
	rNEp (2007)	Genotipo 1 aislado de la India	región ORF2-NE	458 - 607 aa (150aa)	Ratones (BALC C) (inmunización exitosa)	(Deshmukh <i>et al.</i> , 2007)
Planta	pHEV101, pHEV110 (2005)	Birmana	ORF2	112 - 660 aa (549aa)	Ratones (BALC C) (inmunización no exitosa)	(Maloney <i>et al.</i> , 2005)
	pRB94-E2 (2006)	China	ORF2	0.8kb del fragmento E2	Ratones (BALC C) (inmunización exitosa)	(Zhou <i>et al.</i> , 2006)
Insecto (sf96)	56kDa (1993, 1997, 1998)	Pakistaní (SAR-55)	ORF2	112 - 607 aa (496aa)	<i>Mono Rhesus</i>	(Robinson <i>et al.</i> , 1998; Tsarev <i>et al.</i> , 1997)
	50kDa (1997, 2001)	Birmana	ORF2	112 - 660 aa (549aa)	Ratones (BALC C) (inmunización exitosa)	(Li <i>et al.</i> , 2001; Li <i>et al.</i> , 1997b)
	53kDa (2000, 2001)	Pakistaní (SAR - 55)	ORF2	112 - 578 aa (467aa)	<i>Mono Rhesus</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2001b; Schofield <i>et al.</i> , 2000)
	56kDa (2002)	Pakistaní (SAR - 55)	ORF2	112 - 607 aa (496aa)	<i>Mono Rhesus</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)
	VLP-52C (2002)	Birmana	ORF2	112 - 660 aa (549aa)	Ratones BALC C (inmunización exitosa)	(Niikura <i>et al.</i> , 2002)
	56kDa (2003)	Pakistaní (SAR-55)	ORF2	112 - 607 aa (496aa)	<i>Mono Rhesus</i>	(Purcell <i>et al.</i> , 2003)
	50kDa (1997, 2004)	Birmana	ORF2	112 - 660 aa (549aa)	Macaco <i>Cynomolgus</i>	(Li <i>et al.</i> , 2004; Li <i>et al.</i> , 1997b)
	HEVORF2 53kDa (2008)	Gen sintético (Birmana)	ORF2	112 - 660 aa (549aa)	Ratones BALC C (inmunización exitosa)	(Renoux <i>et al.</i> , 2008)
	HEVORF2 43kDa (2008)	Gen sintético (Birmana)	ORF2	112 - 608 aa (497aa)	Ratones BALC C (inmunización exitosa)	(Renoux <i>et al.</i> , 2008)
Aa: aminoácido (s); CFA: Adyuvante Completo de Freud's; HPV. rProt.: Proteína recombinante, Virus del Papiloma Humano; IFA: Adyuvante Incompleto de Freud's; ORF: Lectura de Marco Abierto (Open-Reading Frame); rHEV: Virus de la Hepatitis E recombinante; rHEV-LP: Virus de la Hepatitis E recombinante como partícula; VLP: Virus como partícula.						

La protección alta se refiere a valores de protección del 75% o más en animales vacunados y retados después.

La expresión de una proteína recombinante del HEV por baculovirus en células de insecto sf9 ha sido probada con algunos candidatos de vacuna. El candidato de vacuna de 56kDa derivado de una cepa pakistaní ha alcanzado pruebas clínicas fase II.

2. Antecedentes

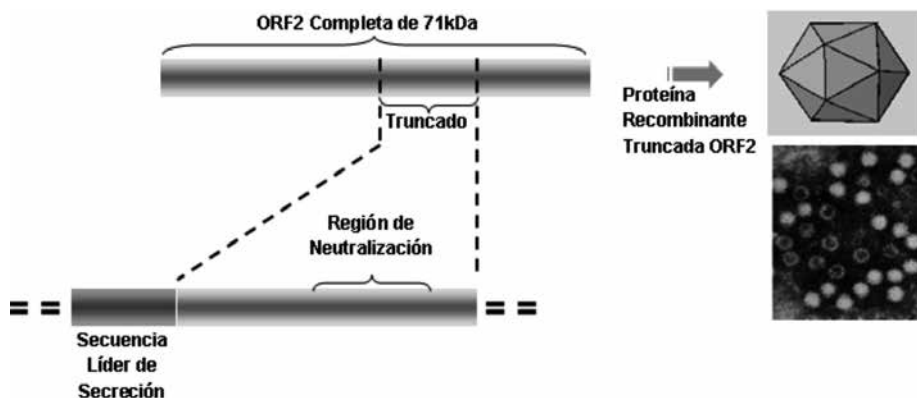
Plásmido

Meng y colaboradores (2001) identificaron epítopes neutralizantes del HEV de una cepa de Birmania, encontrando que en la posición de 452 a 617 aa del ORF2 hay reactividad cruzada contra 3 diferentes genotipos, considerando la construcción de proteínas recombinantes derivadas con esta secuencia de aminoácidos como candidatos para el desarrollo de una vacuna contra la Hepatitis E, por lo que la División de Hepatitis Viral del *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), de Atlanta, GA, EE.UU, en colaboración con Probiomed S.A. de C.V. y basado en lo descubierto por Meng (Meng *et al.*, 2001) construyó algunos plásmidos para ser transformados en la levadura *Hansenula polymorpha* y producir antígenos recombinantes del HEV. De éstos se facilitó uno a Probiomed el cual fue fusionado a una secuencia líder de secreción y así ayudar a la secreción del antígeno recombinante. En la figura 1 se muestra un diagrama de la construcción de este.

Transformación

Con el plásmido facilitado se logró transformar en la levadura *Hansenula polymorpha*, siguiendo el procedimiento de Dohmen y colaboradores (Dohmen *et al.*, 1991), estabilizando la clona, obteniendo un banco con 97% de estabilidad y una viabilidad del 98%.

Figura 1. Clonación del ORF2 truncado para la expresión del antígeno recombinante del HEV



Expresión

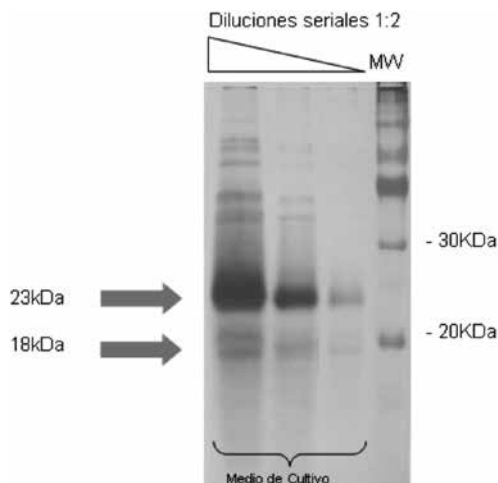
Al banco obtenido de la *Hansenula polymorpha* se le realizó pruebas de expresión de fermentación tanto en matraces como en biorreactores.

Al inocular un fermentador con medio de cultivo nutritivo de extracto de levadura al 4%, peptona al 2% y glicerol al 1%, al final de 72h de fermentación se cosechó el sobrenadante, se hicieron diluciones seriales 1:2 y 1:4 y se analizaron por SDS-PAGE al 15% (figura 2), encontrando una proteína con un peso molecular aproximado de 18kDa, sin embargo se identificó otra proteína de ~23 kDa.

Al realizar un Western Blot se encontró que esta segunda banda de 23 kDa también mostró reactividad como la de 18 kDa (figura 3).

Para demostrar que la banda de 23 kDa fuera de una isoforma o glicosilación, se llevó a cabo una fermentación y se le adicionó Tunicamicina, como inhibidor de glicosilación y del producto sólo se encontró la expresión de la banda de 18kDa (resultados no mostrados) por lo que se demostró que esa banda se debe a glicosilación.

Figura 2. SDS PAGE al 15% del caldo fermentado que muestra la banda del antígeno de Hepatitis E

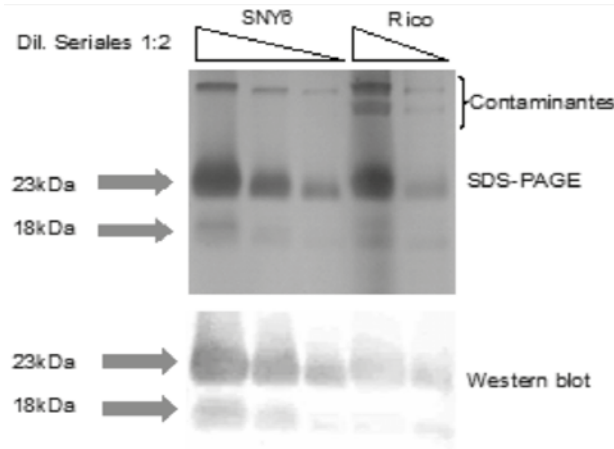


Según Degelmann (2004), el uso de medios sintéticos muestra interesantes resultados en su nivel de expresión, por lo que después de utilizar varios, se encontró que SNY6 a pH inicial de 5.5 y después de alcanzar un crecimiento en peso húmedo de 50g/L (aprox. en 24h) disminuir para pH 4.5, da un nivel mayor de expresión comparado contra el medio rico de extracto de levadura 4%, peptona 2% y glicerol 1%, tal como se muestra en el SDS-PAGE al 15% teñido con plata (figura 3).

Purificaciones Previas

Con el fin de obtener un antígeno puro se empezó a trabajar en su purificación empleando procesos de: a) concentración y diálisis usando membranas de polietersulfona de 300, 100 y 10 kDa, b) precipitaciones con polietilenglicol 8000 (PEG8000) y sulfato de amonio saturado, y c) cromatografía de exclusión molecular con la resina Superdex 75 de GE sin embargo, se obtuvieron purezas entre 30 a 40%; por lo tanto se requiere un diseño de purificación robusto y escalable en donde se obtenga un antígeno recombinante con una pureza mayor al 95%.

Figura 3. SDS PAGE al 15% y WB en membrana de PVDF del caldo fermentado que muestra la expresión e identidad del antígeno de Hepatitis E



Actividad inmunogénica

Se encontró que nuestro antígeno recombinante de Hepatitis E parcialmente purificado y formulado con hidróxido de aluminio, estimula la generación de anticuerpos anti-hepatitis E al ser inmunizado en ratones BALB C en dosis de 20, 10 y 1µg por ratón sin embargo, este título de anticuerpos aun es bajo, tan solo 1:100 para la dosis de 10µg por ratón, cuando se han reportados títulos de 1:8000 con la levadura *Pichia pastoris* (Yu-Pin *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2002), no obstante se necesita estudiar más en esto y comparar ambos sistemas de expresión.

3. Justificación

México es uno de los países con prevalencia a la infección por la Hepatitis E (Okamoto, 2007) y no existe ninguna vacuna comercial en el mundo (Meng, 2010).

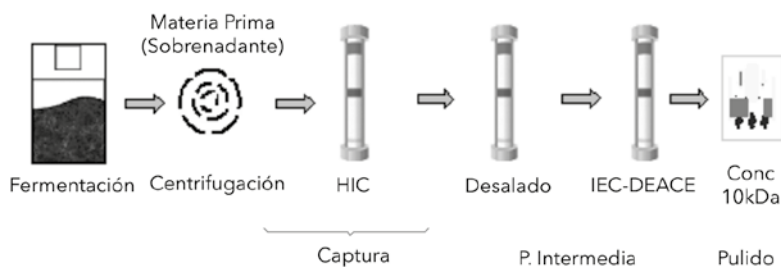
El plásmido se logró transformar y expresar en la levadura *Hansenula polymorpha*, demostrando inducir respuesta inmune en ratones. Por tal motivo, es necesario diseñar un proceso biotecnológico para la producción y purificación de este antígeno recombinante y poderse escalar a producción escala piloto.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un sistema de purificación basado en una secuencia de cromatografías: interacción hidrofóbica, exclusión molecular e intercambio iónico, monitoreando el avance de la purificación por los métodos de SDS-PAGE, ELISA y cuantificación de proteína por Bradford.

4. Metodología

Para llevar a cabo la purificación del antígeno recombinante del virus de la hepatitis E se diseñó una estrategia experimental que es mostrada en la figura 4.

Figura 4. Etapas desarrolladas en el proceso de purificación



La estrategia utilizada partió del sobrenadante obtenido de la cosecha de la fermentación por centrifugación seguido del paso de captura con la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica con la resina Phenyl 650M de Tosoh, continuando con un desalado con la columna empacada Sephadex G-25 F de GE, pasando a una Cromatografía de Intercambio Iónico con la resina DEAE Sepharose FF de GE y finalmente a una concentración en celda con membrana de polietersulfona con un tamaño de corte de 10kDa.

Los Métodos Analíticos utilizados como control de proceso fueron:

- Determinación de Concentración de Proteína por Bradford
- Determinación de Proteína S por SDS-PAGE al 15%
- Determinación de Absorbancia a 280nm
- Determinación de Conductividad Eléctrica
- Determinación de pH

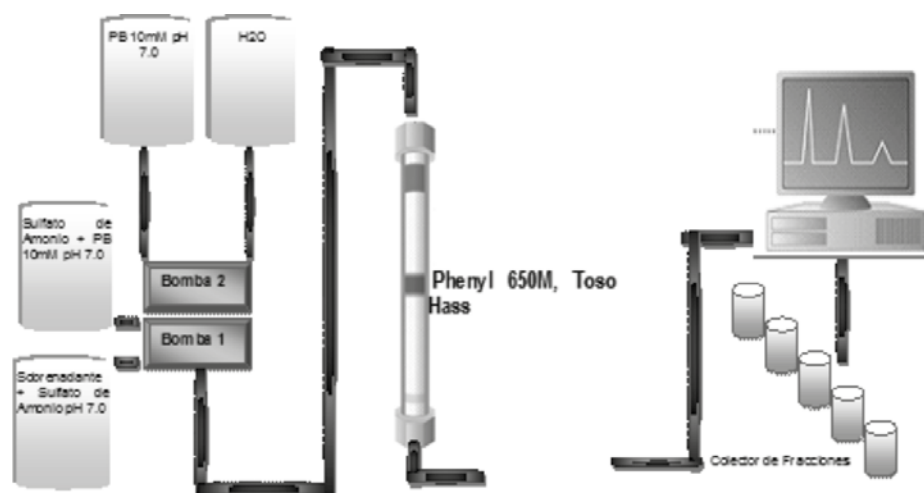
Los Métodos Analíticos utilizados para determinar identidad y pureza fueron:

- Determinación de Proteína S por SDS PAGE al 15% y Western Blot
- Determinación de Antígeno de Superficie de Hepatitis B por ELISA y HPLC-SEC.

Cromatografía de interacción hidrofóbica (Bonner, 2007)

La figura 5 muestra el Diagrama General de la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.

Figura 5. Diagrama General de la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica



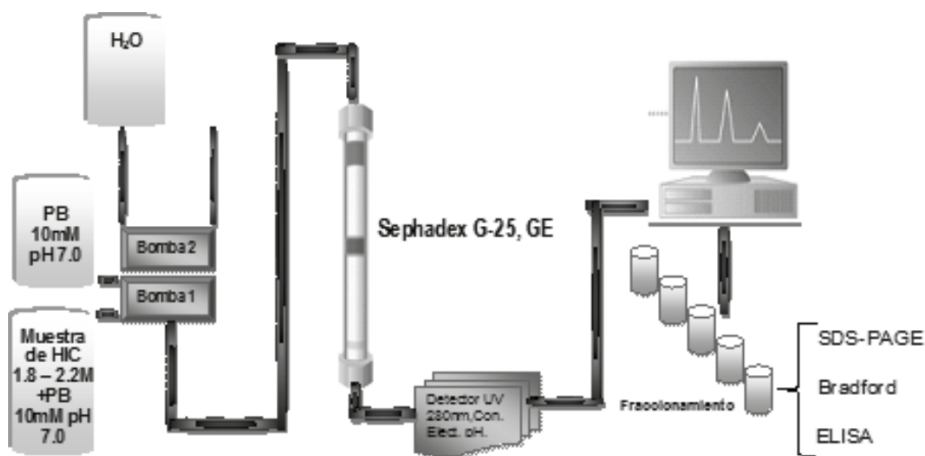
Previo al montaje de la cromatografía se probó la estabilidad de la proteína recombinante en las condiciones de operación planeadas. Para ello se utilizaron alícuotas de caldo y se acondicionaron a diferentes pH con NaOH o HCl, se probaron intervalos de 2 a 9 de pH. Asimismo se adicionaron diferentes concentraciones de sulfato de amonio, desde 0 a 2.4 M. Con base en estos resultados se escogieron como condiciones de operación pH 7 y de 1.8 a 2.2 M de sulfato de amonio.

El proceso cromatográfico se llevó a cabo con la resina de interacción hidrofóbica Phenyl 650M. Tiene el ligando fenilo y tiene un tamaño de poro de 90 μm . La columna se empacó siguiendo el procedimiento sugerido por el fabricante, cumpliendo con la prueba de simetría. Las muestras de caldo proveniente de la fermentación se acondicionaron con sulfato de amonio a concentraciones de 1.8 a 2.2 M y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mM a pH 7.0. Se probaron diferentes capacidades de carga, 10, 20, 40 y 60 VC. Bajo estas condiciones el producto se pega a la resina y es eluido por un cambio en la conductividad ocasionado por la eliminación del sulfato de amonio de la fase móvil. Se fraccionaron los picos resultantes y se analizaron por SDS-PAGE, ELISA y SEC-HPLC. La proteína se cuantificó por el método de Bradford.

Desalado por exclusión molecular (Bonner, 2007)

La figura 6 muestra el Diagrama General del Desalado por Exclusión Molecular.

Figura 6. Diagrama General de la Cromatografía de Exclusión Molecular

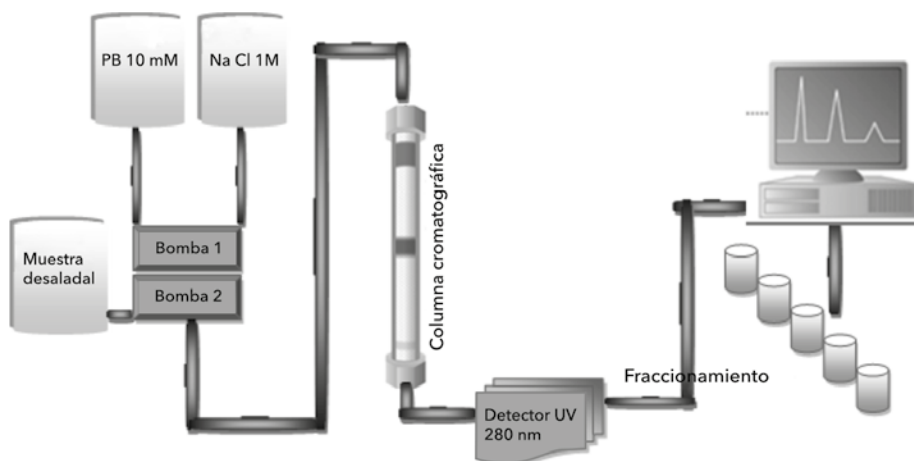


El proceso cromatográfico se llevó a cabo con la columna comercial empacada Desalting XK 16/20 con resina Sephadex G-25. Tiene un tamaño de poro de 150 μm . Las muestras provenientes de la cromatografía de interacción hidrofóbica se inyectaron a la columna eluyendo el producto de interés inmediatamente. Se fraccionó el pico resultante y se analizaron por SDS-PAGE, y ELISA. La proteína se cuantificó por el método de Bradford.

Cromatografía de intercambio aniónico (Bonner, 2007)

La figura 7 muestra el Diagrama General de la Cromatografía de Intercambio Iónico.

Figura 7. Diagrama General de la Cromatografía de Intercambio Iónico



El proceso cromatográfico se llevó a cabo con la resina de intercambio aniónico DEAE Sepharose Fast Flow. Tiene el ligando dietilenaminoetilo con carga parcial positiva, es un intercambiador aniónico débil y tiene un tamaño de poro de 90 μm . La columna se empacó siguiendo el procedimiento sugerido por el fabricante, cumpliendo con la prueba de simetría. Las muestras provenientes del desalado por exclusión molecular se inyectaron a la columna eluyendo el producto de interés como el no unido. Se fraccionaron los picos resultantes y se analizaron por SDS-PAGE y ELISA. La proteína se cuantificó por el método de Bradford.

Concentración en celda (Paul, 2004)

La concentración del "pool" de fracciones de cromatografía de intercambio iónico, fue llevado a cabo en una celda Amicon de (Millipore) con una membrana de polietersulfona de tamaño de corte de 10kDa de (Millipore), las muestras fueron concentradas al menos 5 veces del volumen inicial a una temperatura de 4°C.

Filtración estéril

Esterilizar el producto por filtración en acrodisco (Millipore) y tomar alícuotas del producto en tubos Nunc estériles de 15mL.

Métodos Analíticos

Electroforesis en Gel SDS-PAGE (Pitre, 2000)

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida según la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970), con un gel concentrador al 4% y un gel separador al 15% preparados en vidrios de 14.5 X 16.5 X 0.1 cm en forma de sándwich, colocados en una cámara de electroforesis (Cole-Parmer). Todas las muestras fueron incubadas a 100°C durante 15 minutos en buffer reductor (0.5M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 30% glicerol, DTT (ditiotreritol) 4mM y azul de bromofenol). Las muestras fueron colocadas en el gel y migradas a 100 Volts con una fuente de poder de Thermo EC.

Western Blot (Pitre, 2000)

Siguiendo el protocolo de la cámara de transferencia semi-seca WEP company, se transfirieron las proteínas contenidas en el SDS PAGE a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de BIO-RAD durante 1.5 h a 200mA incrementando la corriente gradualmente utilizando un sistema de soluciones amortiguadoras: solución anódica 1 (0.3M Tris-Base, 20% de metanol a un pH 10.4), solución anódica 2 (0.025M Tris-Base, 20% metanol a un pH 10.4) y solución catódica (0.025M Tris-Base, 0.04M DL-Norleucina, 20% metanol a un pH 9.4). Se desmontó la membrana, se bloqueó toda la noche con solución bloqueadora (10% leche baja en grasas, 2% albumina sérica bovina, 0.1% Tween 20 en PBS (cloruro de sodio 137mM, cloruro de potasio 2.7mM, fosfato monobásico de potasio 1.15mM, fosfato dibásico de sodio hepta hidratado 8mM)). Se lavó la membrana 4 veces con PBST (PBS más 0.1% Tween 20) de 10 minutos cada uno. Se incubó la membrana durante 2 horas a 37°C con anticuerpo primario policlonal de ratón Anti-HE (obtenido de la inmunización en ratones de antígeno de hepatitis E expresado en *E. coli*) con una dilución 1:16,000 diluido en PBST, 2% BSA, 10% NGS (suero normal de cabra) y colocó en un horno de hibridación (marca Heraeus). Se lavó la membrana 4 veces con PBST durante 10 minutos cada lavado. Se incubó la membrana durante 2 horas a 37°C con un

anticuerpo secundario monoclonal IgG anti-ratón marcado con peroxidasa a una dilución 1:10,000 diluido en PBST, 2% BSA, 10% NGS, en un horno de hibridación. Se lavó la membrana 4 veces con PBST por 10 minutos por lavado, y se siguió el protocolo de revelado del kit ECL de GE.

Se reveló la membrana utilizando una solución de DAB-H₂O₂ (25mg Diaminobencidina (Sigma), 5μL de peróxido de hidrógeno al 30% (Baker) en 50mL de PBST) hasta la aparición de las bandas correspondientes, se detuvo la reacción con agua Milli Q y se secó a temperatura ambiente.

Cuantificación de proteína por Bradford (Pierce and Suelter, 1977)

Se cuantificaron las proteínas con el Kit de Bradford de la marca Pierce, utilizando BSA (albúmina sérica bovina) como estándar a concentraciones (75, 150, 300 y 600 μg/mL) y agua como blanco. Se colocaron 10μL de cada muestra (curva estándar, muestra problema y blanco) por pozo y por triplicado en una placa de 96 pozos de fondo plano marca NUNC, seguido de la adición de 300μL de reactivo de Bradford, se homogeneizó, se dejó incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y se leyó a 620nm en un lector multiplacas marca Thermo Labsystems.

Elisa para la detección de antígeno (Tsarev et al., 1993)

Se colocó e incubó toda la noche a temperatura ambiente 0.001μg de proteína de las muestras (haciendo las diluciones respectivas, se incluyó controles positivos y negativos) diluidos en 100μL de PBS en una placa de 96 pozos de fondo plano. Se realizaron 4 lavados con PBST e incubó cada pozo durante 2 horas a 37°C con un anticuerpo primario policlonal de ratón Anti-HE, obtenido de la inmunización en ratones de antígeno de hepatitis E expresado en *E coli* con una dilución 1:2,000 diluido en PBST, 2% BSA, 10% NGS. Se realizaron 4 lavados con PBST y se incubó cada pozo durante 2 horas a 37°C con un anticuerpo secundario monoclonal IgG anti-ratón marcado con peroxidasa, a una dilución 1:10,000 diluido en PBST, 2% BSA, 10% NGS. Se realizaron 4 lavados con PBST y se incubó con 100μL de reactivo revelador OPD (una tableta de clorhidrato de o-fenilendiamina (Sigma) diluida en 7.5mL de HRP (48.6mL de ácido cítrico 100mM, 51.4mL de fosfato dibásico de sodio hepta hidratado 100mM) y 5μL de peróxido de hidrógeno) durante 20 minutos, se detuvo la reacción con 50μL de ácido sulfúrico al 1.25M y se leyó a 492nm en un lector multiplacas marca Thermo Labsystems.

HPLC-SEC (Dong, 2006)

Para la cromatografía analítica se utilizó un HPLC marca Waters™ con una columna de exclusión molecular de Tosoh G6000PW_{XL} (300 x 7.8 mm), guarda-columna Tosoh Guard PW_{XL}, sistema cromatográfico Waters 2690 y un detector UV-Vis 2487 y software Empower™. Como fase móvil se utilizó una solución de fosfato dibásico 10 mM con etanol al 10% con un gradiente isocrático con un flujo de 0.7 mL/min a 50° C por 40 minutos de corrida por muestra.

5. Discusión de resultados

Sistema Cromatográfico Integrado

Se logró diseñar una estrategia experimental para la obtención de un antígeno recombinante de hepatitis E partiendo del sobrenadante de cosecha de fermentación iniciando con un paso de captura mediante cromatografía de interacción hidrofóbica, seguido de un desalado por exclusión molecular y finalizando el proceso cromatográfico con un intercambio iónico. El producto se concentró en celda y se esterilizó por filtración.

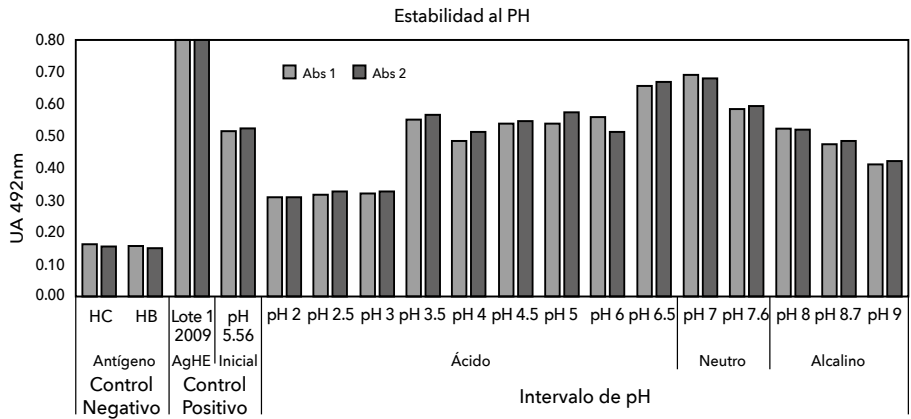
Cromatografía de interacción hidrofóbica

Se determinó la estabilidad del antígeno con diferentes concentraciones de sulfato de amonio y a diferentes valores de pH, encontrando comportamientos semejantes a los ya previamente analizados. Además, se caracterizó la capacidad de carga de la resina y se aplicó a un pequeño lote de sobrenadante de cosecha de fermentación de 2.2L.

Estabilidad al pH

El sobrenadante se estudió en el intervalo ácido y alcalino, se monitoreó la antigenicidad por ELISA, tal como lo muestra la figura 8 encontrando que es estable entre pH 6.5 y 7.0.

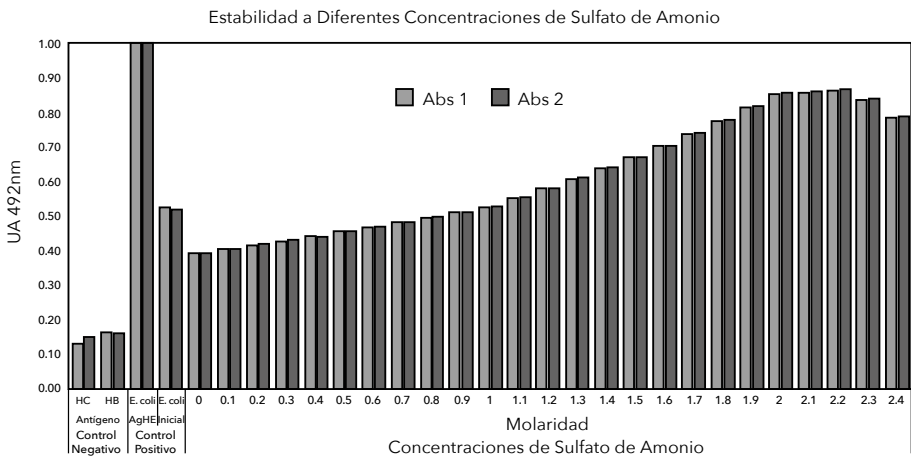
Figura 8. Efecto de pH en el sobrenadante de cosecha de fermentación



Estabilidad con sulfato de amonio a pH 7.0

Se estudió la estabilidad del antígeno recombinante concentraciones desde 0M hasta 2.4M de sulfato de amonio y se monitoreó la antigeneidad por ELISA como lo muestra la figura 9. Se observa que hay un incremento de absorbancia y permanece constante desde 2.0M a 2.2M y disminuyó a partir de 2.3 M.

Figura 9. Efecto de la concentración de sulfato de amonio en el sobrenadante de cosecha de fermentación



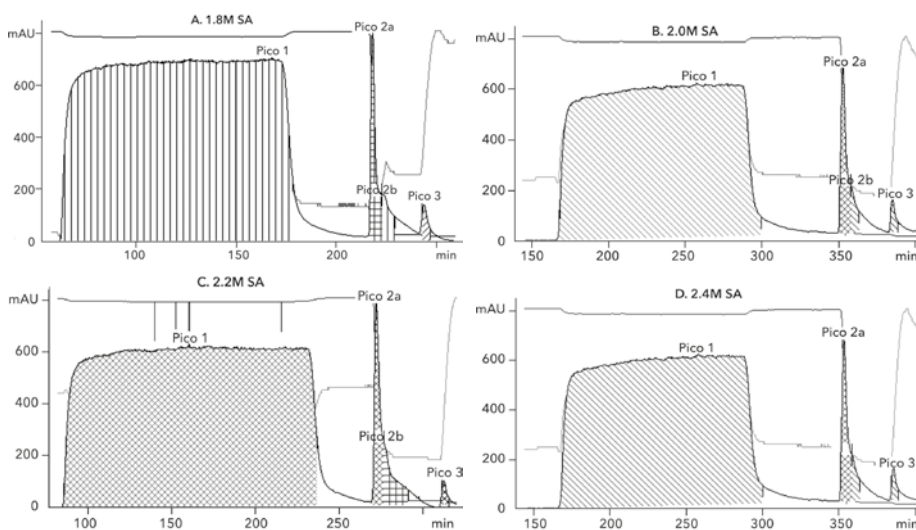
Concentración ideal de sulfato de amonio pH 7.0

Se decide trabajar con concentraciones desde 1.8M hasta 2.4M de sulfato de amonio a pH 7, ya que necesitamos encontrar la concentración ideal con el mejor rendimiento, antigenicidad y pureza.

Perfiles cromatográficos

En la figura 10 se muestran los perfiles cromatográficos de la interacción hidrofóbica para concentraciones desde 1.8 hasta 2.4M.

Figura 10. Perfiles cromatográficos (A, B, C y D) del efecto de la concentración de sulfato de amonio con la columna XK 16



La integración del área y altura, la mezcla de fracciones y la conductividad eléctrica de cada uno de los perfiles cromatográficos, son presentados en la tabla 2.

Tabla 2. Datos de integración de los perfiles cromatográficos

Cromatograma	Muestra	Fracciones	% Área	Altura (UA)	CE (mS/cm)
A	1.8 M SA	Pico 2a	2.91	0.80	213.8 - 10.1
B	2.0 M SA	Pico 2a	3.16	0.69	223.0 - 11.4

Continúa...

Cromatograma	Muestra	Fracciones	% Área	Altura (UA)	CE (mS/cm)
C	2.2 M SA	Pico 2a	3.16	0.78	237.8 - 12.0
D	2.4 M SA	Pico 2a	3.22	0.75	252.7 - 13.8

Parámetros de proceso y rendimiento

La cantidad de proteína total, la absorbancia a 492nm de ELISA para detección de antígeno, la conductividad eléctrica, el pH y el rendimiento por etapas, son mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Datos de la captura por cromatografía de interacción hidrofóbica

Parámetros	Inicial (Sobrenadante)	Interés Unido - HIC			
		1.8M	2.0M	2.2M	2.4M
Proteína Total (mg)	21.76	7.1	9.0	9.3	10.2
Antigenicidad Específica (ELISA) (UA/μg Antígeno)	13.8	28.3	26.9	20	20
C.E. (mS/cm)	7.5	135.5	152.5	167.4	180.9
pH	5.55	7.1	7.2	7.1	7.0
Rendimiento por Etapa (%)	100	32.7	41.5	42.8	46.7
Recobro por etapa (%)	100	67.1	80.8	62.1	67.7
Factor de Purificación	1	2.1	1.9	1.4	1.4
mg Proteína Total/mL Resina	0	5	5	5	5

Se encontró que el mejor recobro lo presenta la concentración de 2.0M de sulfato de amonio aunque la mayor antigenicidad y número de veces de purificación lo presenta la concentración de 1.8M de sulfato de amonio, sin embargo usaremos la de 2.0M de sulfato de amonio porque entre ambas muestra más rendimiento.

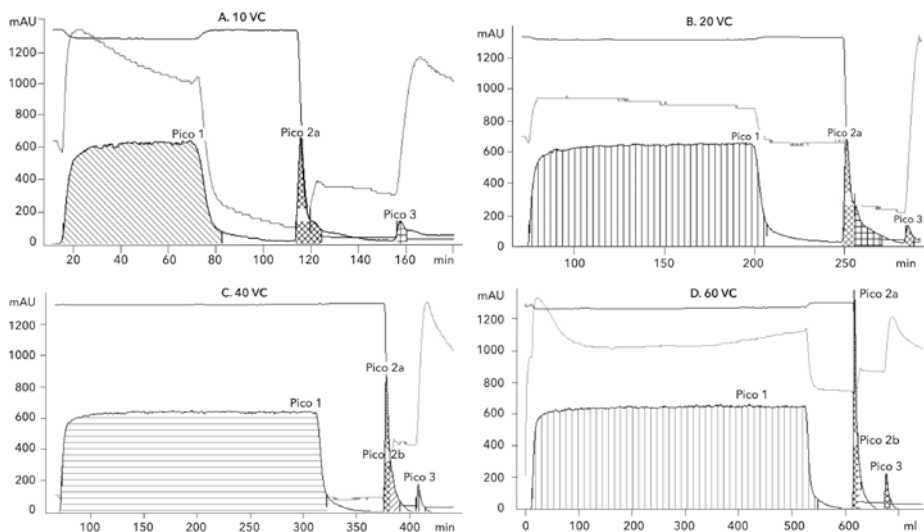
Capacidad de carga de la resina

Se caracterizó la capacidad de carga con una columna XK16/2.3, con 4.6mL de resina, probando 10, 20, 40 y 60 volúmenes de columna (VC) a una concentración de 2.0M de sulfato de amonio a pH 7.0, ya que es la concentración que mostró mayor recobro y mejor rendimiento que 1.8M.

Perfiles cromatográficos

En la figura 11 se muestran los perfiles cromatográficos de la interacción hidrofóbica a diferentes volúmenes de columna.

Figura 11. Perfiles cromatográficos (A, B, C y D) de la caracterización de la capacidad de carga de la resina



La integración del área y altura, las fracciones y la conductividad eléctrica de cada uno de los perfiles cromatográficos son presentados en la tabla 4.

Tabla 4. Datos de integración de los perfiles cromatográficos para volúmenes de columna

Cromatograma	Muestra	Fracciones	% Área	Altura (UA)	CE (mS/cm)
A	10 VC	Pico 2a	5.4	0.67	216.3 - 15.2
B	20 VC	Pico 2a	2.9	0.80	216.7 - 10.1
C	40 VC	Pico 2a	2.1	0.90	218.6 - 16.7
D	60 VC	Pico 2a	2.1	1.40	219.2 - 18.6

Parámetros de proceso y rendimiento

La cantidad de proteína total, la absorbancia a 492nm de ELISA para detección de antígeno, la conductividad eléctrica, el pH y el rendimiento por etapas, son mostrados en la tabla 5.

Tabla 5. Datos de la capacidad de carga de la resina

Parámetros	Interés Unido - HIC			
	10 VC	20 VC	40 VC	60 VC
Proteína Total (mg)	5.9	7.1	15.6	20.9
Antigencidad Específica (ELISA) (UA/mg Antígeno)	18.1	32.7	28	19.5
C.E. (mS/cm)	151.3	150.3	151.0	152.3
pH	6.9	7.1	7.0	7.1
Rendimiento por Etapa (%)	54.1	32.7	35.9	32.1
Recobro por etapa (%)	71	77.5	72.9	45.4
Factor de Purificación	1.3	2.4	2.0	1.4
mg Proteína Total/mL Resina	2.5	5.0	10	15

Los datos mostraron mejor resultado para la prueba con 20 VC, aunque no podemos descartar la de 40 VC, ya que también muestra resultados semejantes en recobro y no veces de purificación, no obstante la antigenicidad disminuyó. Por lo tanto se procesará un pequeño lote de sobrenadante de cosecha de fermentación y se analizará contra los datos obtenidos. Además el recobro es semejante desde 10 VC hasta 40 VC, pero con 60 VC disminuyó.

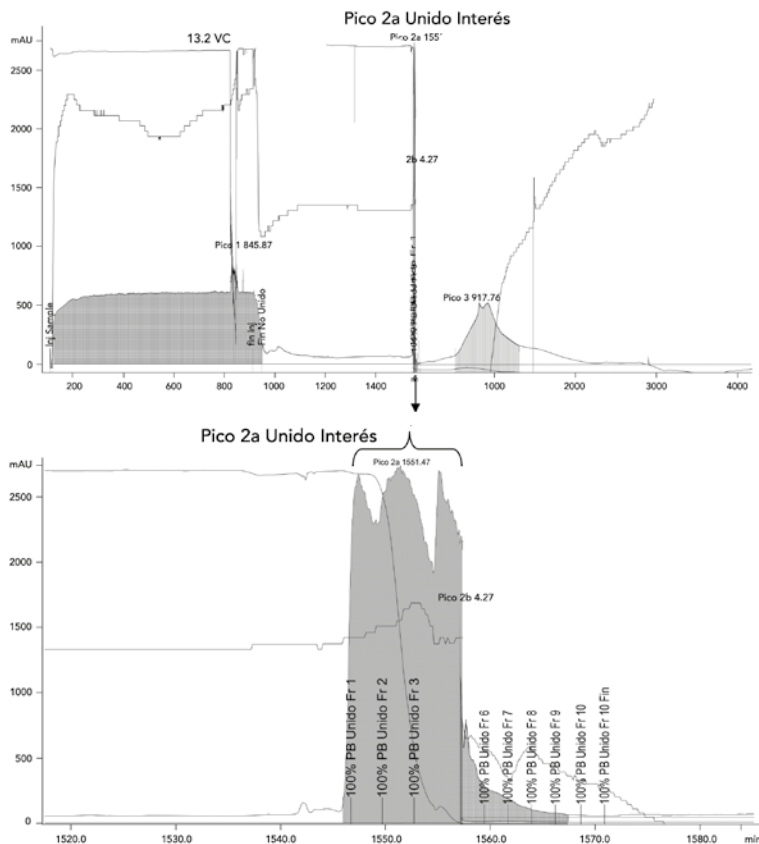
Cromatografía con una columna empacada XK 50/8.5

Se empacó una columna XK 50/8.5 con 167mL de resina Phenyl 650M, se acondicionó el sobrenadante a una concentración de 2.0M de sulfato de amonio, lo que represento 13.2 volúmenes de columna.

Perfiles cromatográficos

En la figura 12 se muestra el perfil cromatográfico con la columna empacada.

Figura 12. Perfiles cromatográficos de la columna empacada XK 50



El cromatograma A representa toda la corrida y se observa así porque se saturó la señal de absorbancia. El cromatograma B muestra el zoom del pico 2a que corresponde con nuestra proteína de interés y la integración del área y altura, el pool de fracciones y la conductividad eléctrica son presentados en la tabla 6.

Tabla 6. Datos de integración del perfil cromatográfico para 13.2 VC

Cromatograma	Muestra	Fracciones	% Área	Altura (UA)	CE (mS/cm)
A	13.2 VC	Pico 2a	5.2	2.7	235.5 - 13.3

Parámetros de proceso y rendimiento

La cantidad de proteína total, la absorbancia a 492nm de ELISA para detección de antígeno, la conductividad eléctrica, el pH y el rendimiento por etapas, son mostrados en la tabla 7.

Tabla 7. Datos de la captura para 13.2 VC

Parámetros	Inicial	Interés Unido - HIC
	(Sobrenadante)	13.2 VC
Proteína Total (mg)	517	200
Antigenicidad Específica (ELISA) (UA/μg Antígeno)	13.8	32.5
C.E. (mS/cm)	210	149.3
pH	7.0	6.7
Rendimiento por Etapa (%)	100	38.7
Recobro por etapa (%)	100	91.1
Factor de Purificación	1.0	2.4
mg Proteína Total/mL Resina	3.1	1.2

Se encontró que con esta columna de mayor volumen el recobro es mayor y el rendimiento se conservó, además solo se trabajó con 3.1mg de proteína total/mL de resina pudiéndose llevar hasta casi 10mg/mL.

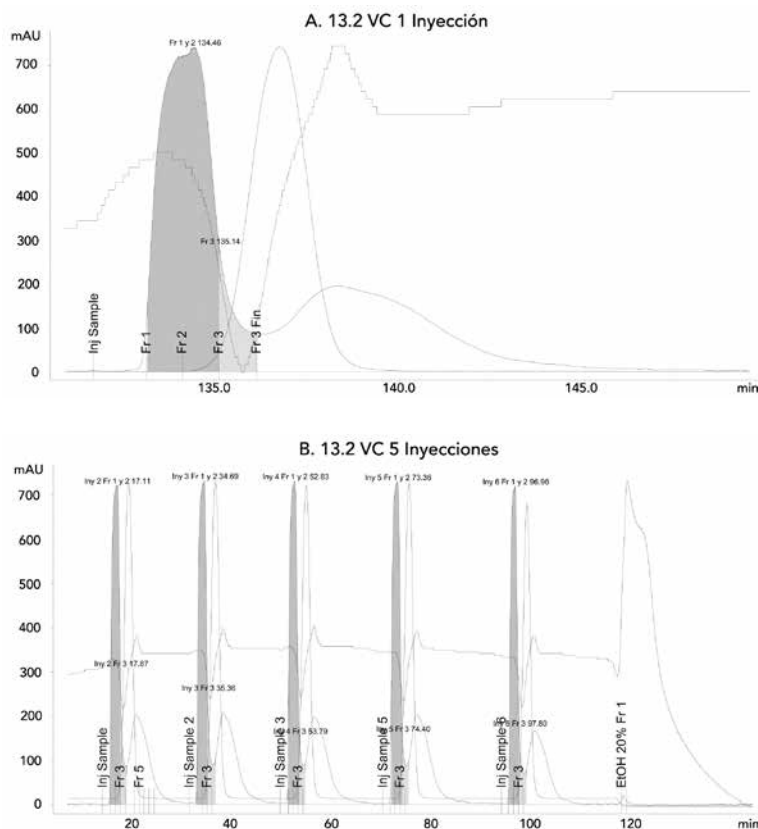
Desalado por exclusión molecular

Debido a que no se contó en este momento con una columna de desalado para todo el volumen obtenido de interacción hidrofóbica, se decidió realizar 6 inyecciones sucesivas en la columna, tal como se muestra en la figura 6.

Perfiles cromatográficos

Los perfiles cromatográficos se muestran en la figura 13.

Figura 13. Perfiles cromatográficos del desalado del pool de interacción hidrofóbica



La integración del área y altura, el pool de fracciones y la conductividad eléctrica de cada uno de los perfiles cromatográficos son presentados en la tabla 8.

Tabla 8. Datos de integración del perfil cromatográfico para el antígeno desalado inyección 1

Cromatograma	Muestra	Fracciones	% Área	Altura (UA)	CE (mS/cm)
A	13.2 VC	Fr 1 y 2	89.21	0.74	1.9 - 7.0

Parámetros de proceso y rendimiento

La cantidad de proteína total, la absorbancia a 492nm de ELISA para detección de antígeno, la conductividad eléctrica, el pH y el rendimiento por etapas, son mostrados en la tabla 9.

Tabla 9. Datos de la etapa de desalado a partir del unido de interacción hidrofóbica

Parámetros	Interés Desalado - SEC
	13.2 VC
Proteína Total (mg)	167.5
Antigenicidad Específica (ELISA) (UA/μg Antígeno)	37.5
C.E. (mS/cm)	2.5
pH	6.9
Rendimiento por Etapa (%)	83.7
Recobro por etapa (%)	96.6
Factor de Purificación	1.2

Cromatografía de Intercambio Iónico

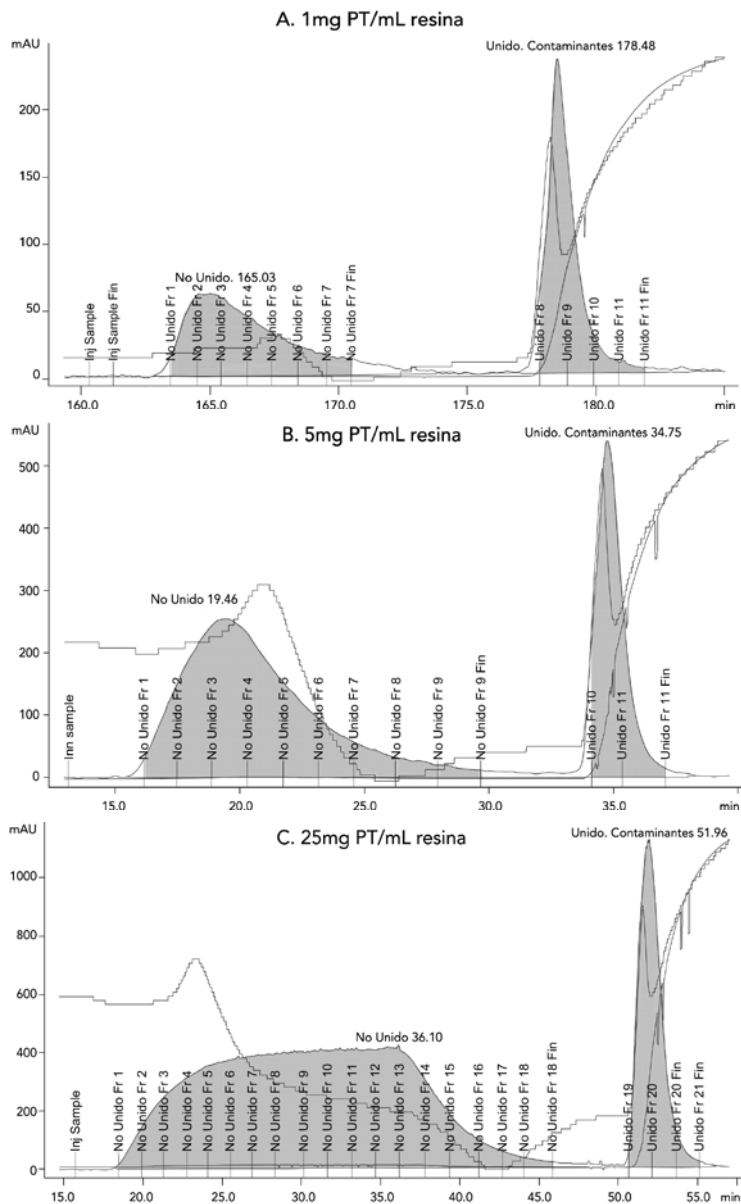
El producto obtenido del desalado, ya con una conductividad promedio entre 2 y 3 mS/cm, fue usado para determinar la capacidad de carga de la resina DEAE Sepharose FF de GE, además se probaron otras resinas de intercambio iónico para determinar si no existe otra con grupo funcional diferente y se encontraron resultados interesantes.

Capacidad de carga de la resina DEAE

Se utilizó una columna comercial empacada de 1 mL de resina DEAE Sepharose FF de GE, probando 3 concentraciones de proteína total de 1, 5 y 25 mg/mL de resina. En la figura 14 se muestran los perfiles cromatográficos de estas concentraciones.

Perfiles cromatográficos

Figura 14. Perfiles cromatográficos (A, B y C) del intercambio iónico para la resina DEAE Sepharose FF



La integración del área y altura, el pool de fracciones y la conductividad eléctrica de cada uno de los perfiles cromatográficos son presentados en la tabla 10.

Tabla 10. Datos de integración de la capacidad de la resina DEAE

Cromatograma	Muestra	Fracciones	% Área	Altura (UA)	CE (mS/cm)
A	1 mg PT	No Unido	47.1	0.06	2.0 - 2.0
B	5 mg PT	No Unido	68.5	0.26	2.0 - 2.0
C	25 mg PT	No Unido	79.2	0.42	2.0 - 2.0

Parámetros de proceso y rendimiento

La cantidad de proteína total, la absorbancia a 492nm de ELISA para detección de antígeno, la conductividad eléctrica, el pH y el rendimiento por etapas, son mostrados en la tabla 11.

Tabla 11. Datos de la capacidad de carga de la resina DEAE-IEC

Parámetros	1mg PT/mL Resina	5mg PT/mL Resina	25mg PT/mL Resina
Proteína Total (mg)	0.9	2.8	9.5
Antigenicidad Específica (ELISA) (UA/μg Antígeno)	24.3	41.7	56.9
C.E. (mS/cm)	2.1	2.1	2.1
pH	7.0	7.1	7.1
Rendimiento por Etapa (%)	84.1	54.4	38.0
Recobro por etapa (%)	62.9	69.8	66.5
Factor de Purificación	0.7	1.3	1.8
mg Proteína Total/mL Resina	1	5	25

Es importante señalar que aunque la prueba con 25mg de proteína total/mL de Resina muestra el menor rendimiento, es el que presenta tanto el valor más grande de antigenicidad por ELISA como el número de veces de purificación. El recobro es semejante entre las tres pruebas por lo que podremos sugerir utilizar la condición de 25mg PT/mL de resina para intercambio en un proceso a escala por los volúmenes que representa

no obstante, por presentar la de 5mg PT/mL resina el mayor recobro, se harán pruebas para determinar si efectivamente la resina DEAE de GE es la ideal o puede ser reemplazada por otras de la misma marca.

Otras resinas de intercambio iónico de GE

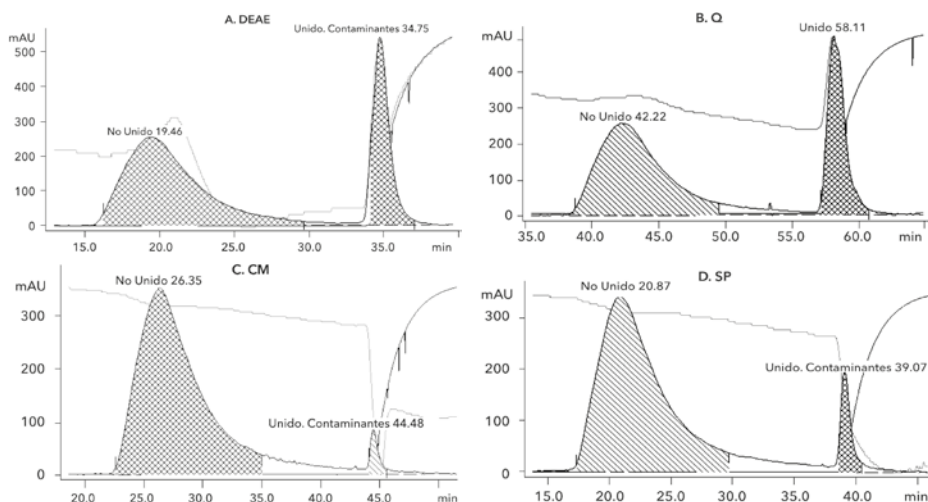
Se utilizaron otras tres columnas comerciales empacadas de 1mL de resina también de la marca GE. Las resinas son Q, CM y SP y en la tabla 12 se muestra el tipo de ligando y carga de cada una de ellas. En la figura 15 se muestran los perfiles cromatográficos de estas resinas.

Tabla 12. Datos de otras resinas de la marca GE

Resina	Ligando	Carga Parcial	Tipo de ligando
DEAE	Dietilaminoetil	+	Débil
Q	Cuaternario de amonio	+	Fuerte
CM	Carboximetil	-	Débil
SP	Sulfopropil	-	Fuerte

Perfiles cromatográficos

Figura 15. Perfiles cromatográficos (A, B, C y D) de otras resinas de intercambio iónico en comparación con la resina DEAE Sepharose FF



La integración del área y altura, el pool de fracciones y la conductividad eléctrica de cada uno de los perfiles cromatográficos son presentados en la tabla 13.

Tabla 13. Datos de integración del perfil cromatográfico para el antígeno de intercambio

Cromatograma	Muestra	Fracciones	% Área	Altura (UA)	CE (mS/cm)
A	DEAE	No Unido	68.5	0.26	2.0 - 2.0
		Unido	31.5	0.54	3.5 - 68.1
B	Q	No Unido	65.8	0.26	2.0 - 2.0
		Unido	34.2	0.51	2.0 - 70.8
C	CM	No Unido	96.9	0.35	2.0 - 2.0
		Unido	3.1	0.08	2.3 - 39.3
D	SP	No Unido	91.8	0.34	2.0 - 2.0
		Unido	8.2	0.20	2.2 - 46.9

Parámetros de proceso y rendimiento

La cantidad de proteína total, la absorbancia a 492nm de ELISA para detección de antígeno, la conductividad eléctrica, el pH y el rendimiento por etapas, son mostrados en la tabla 14.

Tabla 14. Comparación de datos experimentales entre resinas de diferente ligando

Parámetros	DEAE		Q		CM		SP	
	No Unido	Unido	No Unido	Unido	No Unido	Unido	No Unido	Unido
Proteína Total (mg)	2.8	1.4	2.5	2.4	3.5	0.3	3.7	0.5
Antigenicidad Específica (ELISA) (UA/μg Antígeno)	41.7	10.4	52.2	7.9	27	16.9	28.1	35
C.E. (mS/cm)	2.0	22.4	2.0	24.5	2.0	12.7	2.0	18.5
pH	7.1	7.5	7.1	7.5	7.1	7.5	7.1	7.5
Rendimiento por Etapa (%)	54.4	28.0	49.7	46.3	69.8	5.7	72.0	10.6
Recobro por etapa (%)	69.8	9.0	79.9	11.3	58.0	3.0	62.3	11.5
Factor de de Purificación	1.3	0.3	1.6	0.2	0.8	0.5	0.9	1.1

Se encontraron dos situaciones importantes, la primera es que la resina Q muestra un mayor recobro del producto de interés en la parte no unida que la resina DEAE, además presentó el mayor valor del número de veces de purificación aunque el rendimiento fue menor, y la segunda situación es que la resina SP en el producto unido presentó un valor interesante en el número de veces de purificación, por lo que debemos de estudiar en otros experimentos este efecto por que podría ser utilizado como un paso de captura.

Concentración en celda con membrana de 10kDa

Se concentró el producto no unido del intercambio iónico obtenido de la condición de 25mg PT/mL de resina y los datos de rendimiento y recobro son mostrados en la tabla 15.

Tabla 15. Datos de concentración en celda con membrana de polietersulfona de 10kDa

Parámetros	Inicial (Mezcla No Unido-DEAE-IEC)	Concentrado 10 kDa
Proteína Total (mg)	9.5	4.5
Antigenicidad Específica (ELISA) (UA/μg Antígeno)	56.9	130.5
C.E. (mS/cm)	2.1	2.1
pH	7.1	7.1
Rendimiento por Etapa (%)	100	47.4
Recobro por etapa (%)	100	98.7
Factor de Purificación	1	2.3

Pureza por SDS-PAGE-Densitometría

Para analizar la pureza desde la captura por cromatografía de interacción hidrofóbica hasta la concentración en celda se realizó un SDS-PAGE al 15%, cargando por duplicado 5μg de antígeno por carril del gel. Después de la tinción con Plata –la figura 16 muestra las bandas de las etapas de purificación– observando que la intensidad de la proteína de 18kDa es mayor que de la forma glicosilada de 23 kDa y en la tabla 16 se muestra el orden de muestras por carril en el gel.

A la figura 16 se le realizó densitometría para calcular la pureza de las bandas, determinando que por SDS PAGE la pureza será igual a la suma de la banda de 18 y 23kDa y así tener solo una pureza total, tal como se muestra en la tabla 17.

Figura 16. Pureza por SDS PAGE en el proceso de purificación

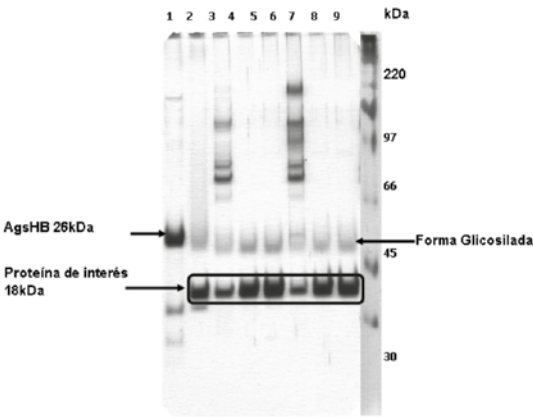


Tabla16. Orden de las muestras colocadas en el SDS PAGE de la figura 16

Carril	Muestra
1	r-AgsHB
2	r-AgHE Hepatitis E (Previa Purificación)
3,6	Pool de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica Pico 2a
4,7	Pool de Cromatografía de Intercambio Iónico No Unido
5,8	Pool de Concentrado en celda 10 kDa

Tabla 17. Pureza Total por Densitometría para las bandas de 18 y 23kDa

Parámetro	Mezcla de Interacción Hidrofóbica Pico 2a		Mezcla de Intercambio Iónico No Unido		Mezcla de Concentrado en celda de 10 kDa	
	1	2	1	2	1	2
Pureza en la banda de 18kDa (%)	42.3	25.0	84.5	86.4	81.9	81.6
Pureza en la banda de 23kDa (%)	8.5	5.6	15.5	13.6	18.2	18.4

Western Blot

Para demostrar que el producto purificado tiene antigenicidad se realizó un western blot con anticuerpos policlonales anti-Hepatitis E colocando el pool no unido de intercambio iónico y el pool de concentrado en celda de 10kDa. La figura 17 muestra las imágenes de los geles antes y después de ser transferidos y en la tabla 18 se muestra el orden de las muestras.

Figura 17. Análisis por SDS PAGE del pool de intercambio y del concentrado en celda

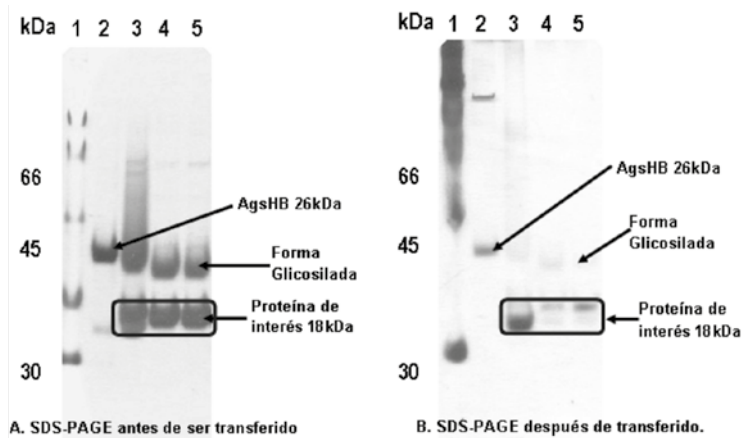


Tabla 18. Orden de las muestras colocadas en el SDS PAGE de la figura 17

Carril	Muestra
1	Marcador de peso molecular
2	r-AgsHB control (-)
3	r-AgHE control (+) (Previa Purificación)
4	Pool de Cromatografía de Intercambio Iónico No Unido
5	Pool Concentrado en celda 10kDa

En la figura 18 se muestra la membrana de PVDF revelada por DAB y la película de rayos X revelada por el Kit de ECL, mostrando el orden de las muestras en la tabla 19.

Figura 18. Análisis por Western blot del producto final por duplicado del concentrado en celda

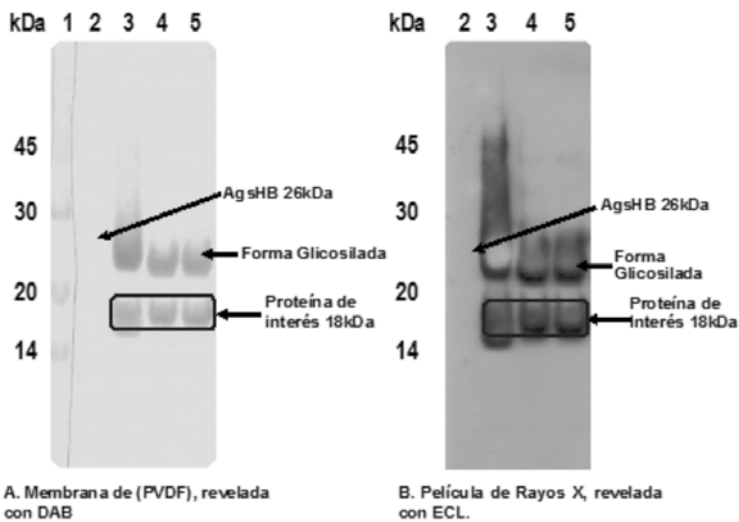


Tabla 19. Orden de las muestras colocadas en el SDS PAGE de la figura 18

Carril	Muestra
1	Marcador de peso molecular
2	r-AgsHB control (-)
3	r-AgHE control (+) (Previa Purificación)
4	Pool de Cromatografía de Intercambio Iónico No Unido
5	Pool Concentrado en celda 10kDa

Pureza por HPLC-SEC

25µg por inyección de las muestras se corrieron en un HPLC con una columna de Exclusión Molecular, mostrando en la figura 19 los perfiles cromatográficos y en la tabla 20 se describen los tiempos de retención para los picos integrados, así como sus áreas y alturas. Se encontró que ambas bandas de 18 y 23 kDa eluyen juntas y no se observa una partición del pico (figura 19 A), por eso la pureza es del 100%. Para el producto proveniente de intercambio iónico, la pureza es del 94% (figura 19 B); para el de captura por interacción hidrofóbica es del 43% (figura 19 C) y el inicial solo el 5.8% (figura 19 D).

Figura 19. Perfiles cromatográficos por HPLC-SEC

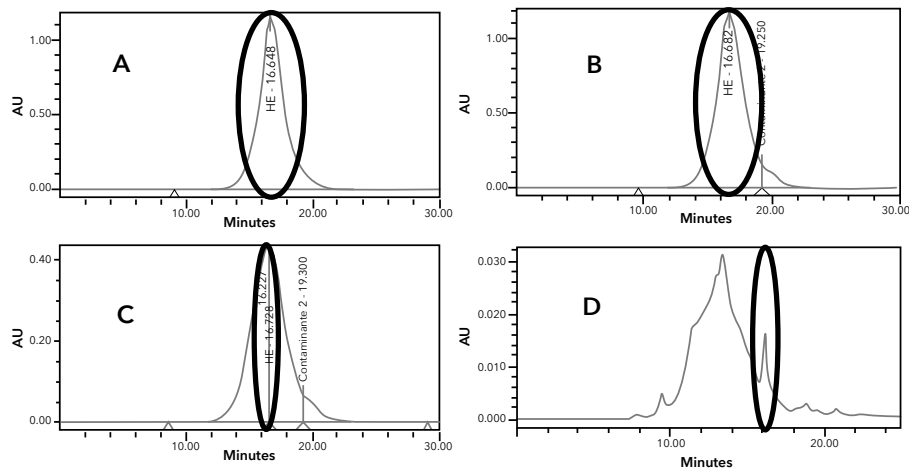


Tabla 20. Datos de integración de los perfiles cromatográficos para los antígenos puros

Cromatograma	Muestra	Tiempo de Retención (min)	% Área	Altura (UA)
A	Pool Concentrado en celda de 10kDa	16.65	100.00	1.123
B	Pool de Cromatografía de Intercambio Iónico No Unido	16.68	94.00	1.151
C	Pool de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica Pico 2a	16.22	42.84	0.409
D	Sobrenadante de cosecha de fermentación	16.32	5.8	0.018

6. Conclusiones

Se estudió la estabilidad del sobrenadante de cosecha de fermentación a diferentes valores de pH y concentraciones de sulfato de amonio y se encontró que es estable a pH 6.5 y 7.0, y a concentraciones de 2.0M a 2.2M.

Se desarrolló una cromatografía de interacción hidrofóbica como etapa de captura usando la resina Phenyl 650M de Tosoh y se encontró que el

intervalo de concentraciones de 1.8M a 2.2M de sulfato de amonio son las mejores, logrando rendimientos del 42% y recobros del 81%.

Se caracterizó la capacidad de carga de la resina Phenyl 650M de Tosoh y se encontró que se puede cargar hasta 40VC, soportando concentraciones de hasta 10 mg de proteína total por cada mililitro de resina.

En la cromatografía de interacción hidrofóbica se probó de un volumen de 100 mL equivalente a 20VC se escaló hasta un volumen de sobrenadante de cosecha de fermentación de 2200 mL que equivale a 13VC, encontrando resultados reproducibles ya que se obtuvo un rendimiento del 39% y un recobro del 91%.

Se caracterizó la capacidad de carga de la resina DEAE de intercambio iónico encontrando que soporta hasta 25mg de proteína total de la etapa de desalado por mililitro de resina.

Se probaron otras resinas de intercambio iónico y se encontró que la resina Q Sepharose FF de GE tiene mayor capacidad de carga que la de DEAE Sepharose FF sin embargo, es necesario realizar otros experimentos con mayor volumen de resina.

Se analizó la pureza del concentrado en celda por membrana de 10 kDa por SDS PAGE en condiciones desnaturizantes y se encontró que para la banda de 18 kDa la pureza es del 82% y para la de 23 kDa de 18%. Sin embargo por HPLC-SEC la pureza es del 100% porque ambas eluyen al mismo tiempo.

7. Referencias

- Amini-Bavil-Olyaei, S., Trautwein, C. and Tacke, F. (2009). Hepatitis E Vaccine: Current Status and Future Prospects. *Future Virol.* 4: 143-154.
- Bonner, P.L.R. (2007). *Chapter 3. Nonaffinity adsorption techniques for purifying Proteins. Protein Purification.* Taylor and Francis Group. pp 77.
- Degelmann, A. (2004). *Methods.* En: Gerd, G. Ed. Hansenula Polymorpha.
- Deshmukh, T.M., Lole, K.S., Tripathy, A.S. y Arankalle, V.A. (2007). Immunogenicity of Candidate Hepatitis E Virus DNA Vaccine Expressing Complete and Truncated ORF2 in Mice. *Vaccine.* 25: 4350-4360.

- Dohmen, R.J., Strasser, A.W., Honer, C.B. and Hollenberg, C.P. (1991). An Efficient Transformation Procedure Enabling Long-Term Storage of Competent Cells of Various Yeast Genera. *Yeast*. 7: 691-702.
- Dong, C., Dai, X. y Meng, J.H. (2007). The First Experimental Study on a Candidate Combined Vaccine Against Hepatitis A and Hepatitis E. *Vaccine*. 25: 1662-1668.
- Dong, M.W. (2006). *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Hoboken, N.J., Wiley-Interscience.
- Emerson, S.U. y Purcell, R.H. (2003). Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 13: 145-154.
- Harrison, T.J. (1999). Hepatitis E virus-An Update: Review. *Liver Int.* 19: 171-176.
- He, J., Hayes, C., Binn, L., Seriwatana, J., Vaughn, D., Kuschner, R. and Innis, B. (2001). Hepatitis E Virus DNA Vaccine Elicits Immunologic Memory in Mice. *J. Biomed. Sci.* 8: 223-226.
- He, J., Hoffman, S.L. and Hayes, C.G. (1997). DNA Inoculation with a Plasmid Vector Carrying the Hepatitis E Virus Structural Protein Gene Induces Immune Response in Mice. *Vaccine*. 15: 357-362.
- Hong, Y., Ruan, B., Yang, L.H., Chen, Y., Jing, L., Wang, Y.T. y Hu, H. J. (2005). Hepatitis E Virus Chimeric DNA Vaccine Elicits Immunologic Response in Mice. *World J. Gastroenterol.* 11: 6713-6725.
- Im, S.W. K., Zhang, J.Z., Zhuang, H., Che, X.Y., Zhu, W.F., Xu, G.M., Li, K., Xia, N.S. y Ng, M.H. (2001). A Bacterially Expressed Peptide Prevents Experimental Infection of Primates by the Hepatitis E Virus. *Vaccine*: 19: 3726-3732.
- Kamili, S., Spelbring, J., Carson, D. and Krawczynski, K. (2004). Protective Efficacy of Hepatitis E Virus DNA Vaccine Administered by Gene Gun in the Cynomolgus Macaque Model of Infection. *J. Infec. Dis.* 189: 258-264.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Li, F., Loke, P., Healy, A., Lightowlers, M.W., Gauci, C.G., Purcell, D.F.J. and Anderson, D.A. (2006). The Effect of Antigen Targeting Sequences on Antibody Responses to Hepatitis E Virus DNA Vaccines in Rats And Sheep. *Vaccine*. 24: 1367-1377.

- Li, F., Riddell, M.A., Seow, H.F., Takeda, N., Miyamura, T. y Anderson, D.A. (2000). Recombinant Subunit ORF2.1 Antigen and Induction of Antibody Against Immunodominant Epitopes in the Hepatitis E Virus Capsid Protein. *J. Med. Virol.* 60: 379-386.
- Li, F., Torresi, J., Locarnini, S.A., Zhuang, H., Zhu, W., Guo, X. y Anderson, D.A., 1997a. Amino-Terminal Epitopes are Exposed When Full-Length Open Reading Frame 2 of Hepatitis E Virus is Expressed in *Escherichia Coli*, But Carboxy-Terminal Epitopes are Masked. *J. Med. Virol.* 52: 289-300.
- Li, S.W., Zhang, J., Li, Y.M., Ou, S.H., Huang, G.Y., He, Z.Q., Ge, S.X., Xian, Y.L., Pang, S.Q., Ng, M.H. and Xia, N.S. (2005). A Bacterially Expressed Particulate Hepatitis E Vaccine: Antigenicity, Immunogenicity and Protectivity on Primates. *Vaccine.* 23: 2893-2901.
- Li, T., Yamakawa, Y., Suzuki, K., Tatsumi, M., Razak, M., Uchida, T., Takeda, N. and Miyamura, T. (1997b). Expression and Self-Assembly of Empty Virus-Like Particles of Hepatitis E Virus. *J. Virol.* 71: 7207-7213.
- Li, T.C., Suzaki, Y., Ami, Y., Dhole, T.N., Miyamura, T. and Takeda, N., 2004. Protection of Cynomolgus Monkeys Against HEV Infection by Oral Administration of Recombinant Hepatitis E Virus-Like Particles. *Vaccine.* 22: 370-377.
- Li, T.C., Takeda, N. and Miyamura, T. (2001). Oral Administration of Hepatitis E Virus-Like Particles Induces A Systemic and Mucosal Immune Response in Mice. *Vaccine.* 19: 3476-3484.
- Ling, L., Chunhua, L. y Curt, H.H. (2006). Phylogenetic Analysis of Global Hepatitis E Virus Sequences: Genetic Diversity, Subtypes and Zoonosis. *Rev. Med. Virol.* 16: 5-36.
- Lu, F., Zhuang, H., Zhu, Y. and Zhu, X. (1996). A Preliminary Study on Immune Response to Hepatitis E Virus DNA Vaccine in Mice. *Chin. Med. J. (Engl)*. 109: 919-921.
- Maloney, B.J., Takeda, N., Suzaki, Y., Ami, Y., Li, T. C., Miyamura, T., Arntzen, C.J. y Mason, H.S. (2005). Challenges in Creating a Vaccine to Prevent Hepatitis E. *Vaccine.* 23: 1870-1874.
- Mayo, M.A. (2005). Changes to Virus Taxonomy 2004. *Arch.Virol.* 150: 189-198.

- Meng, J., Dai, X., Chang, J.C., Lopareva, E., Pillot, J., Fields, H.A. y Khudya-
kov, Y.E. (2001). Identification and Characterization of the Neutral-
ization Epitope(s) of the Hepatitis E Virus. *Virology*. 288: 203-211.
- Meng, X.J. (2010). Recent Advances in Hepatitis E Virus. *J. Viral Hepatitis*.
17: 153-161.
- Niikura, M., Takamura, S., Kim, G., Kawai, S., Saijo, M., Morikawa, S., Ku-
rane, I., Li, T.-C., Takeda, N. y Yasutomi, Y. (2002). Chimeric Recom-
binant Hepatitis E Virus-like Particles as an Oral Vaccine Vehicle
Presenting Foreign Epitopes. *Virology*. 293: 273-280.
- Okamoto, H. (2007). Genetic Variability and Evolution of Hepatitis E Virus.
Virus Res. 127: 216-228.
- Panda, S.K., Thakral, D. y Rehman, S. (2007). Hepatitis E virus. *Rev. Med.*
Virol. 17: 151-180.
- Paul, C. (2004). *Protein Purification Protocols*, Humana Press.
- Pierce, J. and Suelter, C.H., 1977. An Evaluation of the Coomassie Brilliant
Blue G-250 Dye-Binding Method for Quantitative Protein Deter-
mination. *Anal. Biochem*. 81: 478-480.
- Pitre, K. S. (2000). Electrophoresis Theory of Electrophoresis. En: IAN, D.
W. (ed.). *Encyclopedia of Separation Science*. Oxford: Academic
Press.
- Purcell, R.H., Nguyen, H., Shapiro, M., Engle, R.E., Govindarajan, S., Black-
welder, W.C., Wong, D.C., Prieels, J.P. y Emerson, S.U. (2003).
Pre-Clinical Immunogenicity and Efficacy Trial of a Recombinant
Hepatitis E Vaccine. *Vaccine*. 21: 2607-2615.
- Purdy, M. A., Mccaustland, K. A., Krawczynski, K., Spelbring, J., Reyes, G.R.
y Bradley, D.W. (1993). Preliminary Evidence that a Trpe-HEV Fu-
sion Protein Protects Cynomolgus Macaques Against Challenge
with Wild-Type Hepatitis E Virus (HEV). *J. Med. Virol*. 41: 90-94.
- Renoux, V.M.G., Fleury, M.J.J., Bousarghin, L., Gaitan, J., Sizaret, P.Y., Tou-
zé, A. y Coursaget, P. (2008). Induction Of Antibody Response
Against Hepatitis E Virus (HEV) with Recombinant Human Papil-
lomavirus Pseudoviruses Expressing Truncated HEV Capsid Pro-
teins in Mice. *Vaccine*. 26: 6602-6607.

- Robinson, R.A., Burgess, W.H., Emerson, S.U., Leibowitz, R.S., Sosnovtseva, S.A., Tsarev, S. y Purcell, R.H. (1998). Structural Characterization of Recombinant Hepatitis E Virus ORF2 Proteins in Baculovirus-Infected Insect Cells. *Protein Expr. Purif.* 12: 75-84.
- Saleem, K., John, S. y Krzysztof, K. (2002). DNA Vaccination Against Hepatitis E Virus Infection in Cynomolgus Macaques. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 17: S365-S369.
- Schofield, D.J., Glamann, J., Emerson, S.U. y Purcell, R.H. (2000). Identification by Phage Display and Characterization of Two Neutralizing Chimpanzee Monoclonal Antibodies to the Hepatitis E Virus Capsid Protein. *J. Virol.* 74: 5548-5555.
- Tam, A.W., White, R., Yarbough, P.O., Murphy, B. J., Mcatee, C.P., Lanford, R.E. and Fuerst, T.R. (1997). In Vitro Infection and Replication of Hepatitis E Virus in Primary Cynomolgus Macaque Hepatocytes. *Virology.* 238: 94-102.
- Tsarev, S.A., Tsareva, T.S., Emerson, S.U., Govindarajan, S., Shapiro, M., Gerin, J.L. y Purcell, R.H. (1997). Recombinant Vaccine against Hepatitis E: Dose Response and Protection against Heterologous Challenge. *Vaccine.* 15: 1834-1838.
- Tsarev, S.A., Tsareva, T.S., Emerson, S.U., Kapikian, A.Z., Ticehurst, J., London, W. y Purcell, R.H. (1993). ELISA for Antibody to Hepatitis E virus (HEV) Based on Complete Open-reading Frame-2 Protein Expressed in Insect Cells: Identification of HEV Infection in Primates. *J. Infect, Dis.* 168: 369-378.
- Tyagi, S., Korkaya, H., Zafrullah, M., Jameel, S. y Lal, S.K. (2002). The Phosphorylated form of the ORF3 Protein of Hepatitis E Virus Interacts With its Non-Glycosylated form of the Major Capsid Protein, ORF2. *J. Biol. Chem.* 277: 22759-22767.
- Yu-Pin, T., Sheng-Li, B., Jiang Yong-Zhen y Mei-Yun, Z. (2001). Intracellular Expression of Hepatitis E Virus ORF2 Protein in pichia pastoris and Its Purification. *Chin. J. Virol.* 17:34-37.
- Zhang, J.Z., Ng, M.H., Xia, N.S., Lau, S.H., Che, X.Y., Chau, T.N., Lai, S.T. y Im, S.W.K. (2001a). Conformational Antigenic Determinants Generated by Interactions between a Bacterially Expressed Recombinant Peptide of the Hepatitis E Virus Structural Protein. *J. Med. Virol.* 64: 125-132.

- Zhang, M., Emerson, S.U., Nguyen, H., Engle, R., Govindarajan, S., Blackwelder, W.C., Gerin, J. y Purcell, R. H. (2002). Recombinant Vaccine against Hepatitis E: Duration of Protective Immunity in Rhesus Macaques. *Vaccine*. 20: 3285-3291.
- Zhang, M., Emerson, S.U., Nguyen, H., Engle, R.E., Govindarajan, S., Gerin, J.L. y Purcell, R.H. (2001b). Immunogenicity and Protective Efficacy of a Vaccine Prepared from 53 Kda Truncated Hepatitis E Virus Capsid Protein Expressed in Insect Cells. *Vaccine*. 20: 853-857.
- Zhou, Y.X., Lee, M.Y., Ng, J.M., Chye, M.L., Yip, W.K., Zee, S.Y. y Lam, E. (2006). A Truncated Hepatitis E Virus ORF2 Protein Expressed in Tobacco Plastids is Immunogenic in Mice. *World J. Gastroenterology*. 12: 306-12.

Capítulo VIII

Estrés oxidativo producido por antiinflamatorios no esteroideos sobre el bioindicador *Hyalella azteca*

Leobardo Manuel Gómez Oliván^{1 *}

Marcela Galar Martínez²

Nadia Neri Cruz¹

Hariz Islas Flores¹

Arturo Colín Cruz¹

Patricia Vieyra Reyes³

Nely San Juan Reyes¹

Octavio Dublán García¹

Leticia Xóchitl López Martínez¹

1. Introducción

La contaminación ambiental es definida como cualquier modificación indeseable de la composición natural del medio, debida a la introducción de agentes biológicos, químicos o físicos que no pertenecen al mismo. Es una consecuencia indeseable de los procesos productivos que presenta formas muy diversas, así como asociaciones y sinergismos difíciles de prever, que afectan no sólo a la salud humana sino también a la integridad de los ecosistemas, ocasionando daños ecológicos a veces irreversibles tales como la pérdida de la biodiversidad. Quizás el deterioro ambiental se hace más acuciante en el agua, pues es un insumo básico para la subsistencia de todo organismo vivo y para las actividades productivas del hombre (Albert y Namihira, 2004).

La contaminación del agua es ocasionada por diversos factores, entre los que destaca la introducción de diversos xenobióticos por actividades antropogénicas. Entre los más importantes y de los cuales existen muchos estudios encontramos a los metales pesados y compuestos orgánicos tales como los plaguicidas, hidrocarburos clorados, bifenilos policlorados, los productos del petróleo (particularmente hidrocarburos poliaromáticos), etc. (Burger y Gochfeld, 2004). Sin embargo, recientemente los científicos han comenzado a centrar su atención sobre un grupo de tóxicos denominados emergentes, los fármacos y los productos de higiene personal (Snyder *et al.*, 2005; Montforts *et al.*, 2007; Spindler *et al.*, 2007).

Los fármacos son productos prevenir, curar o mitigar las enfermedades. Durante miles de años, la humanidad utilizó una gran variedad de com-

puestos de origen vegetal, animal y mineral con este fin. No fue sino a partir del siglo XX, que con el desarrollo de la síntesis química, se obtuvieron nuevas sustancias de utilidad terapéutica, permitiendo el desarrollo de la industria farmacéutica, prolongando y mejorando la calidad de vida humana y animal. Sin embargo, estos fármacos y sus metabolitos, pueden incorporarse a los cuerpos de agua por diferentes vías, tales como efluentes provenientes de plantas farmacéuticas, desechos humanos (orina y heces) y desechos orgánicos provenientes de granjas, entre otros (Larsen *et al.*, 2004), lo que ha llevado en los últimos años a discutir los posibles efectos de estos xenobióticos sobre la biota acuática (Fent *et al.*, 2006).

1.1 Efectos sobre especies acuáticas

El mejoramiento de las técnicas analíticas han dado lugar a una mayor conciencia de la presencia de los productos farmacéuticos en el medio ambiente, la preocupación ahora se está centrando en cuanto a los posibles efectos adversos que estos compuestos pueden tener sobre los organismos que habitan estos ecosistemas, especialmente en condiciones de exposición crónica (Madden *et al.*, 2009). Los fármacos son abundantes a concentraciones de ng/L a µg/L en sistemas acuáticos naturales (Schreiber *et al.*, 2008). Por esta razón existen diversos estudios realizados sobre la presencia de AINES en medios acuáticos y los efectos tóxicos que provocan sobre las especies que ahí habitan. A continuación (tabla 1) se presentan algunos antecedentes de este tipo de estudio.

Tabla 1. Antecedentes del efecto de AINES sobre organismos acuáticos

Autor (Año)	Medicamento	Conclusión
Marques <i>et al.</i> (2004a)	Ac. Gentísico (GEN), Ácido O- hidroxihipúrico (HDP), otros metabolitos del AAS (SAL).	Evaluaron toxicidad aguda y crónica en <i>D. magna</i> y <i>D. longispira</i> , encontrando que la toxicidad del GEN>SAL>HDP, el HDP no presenta toxicidad aguda, pero en exposición crónica produce neonatos anormales y abortos. El SAL y GEN producen cambios en la reproducción y crecimiento. <i>D. longispira</i> es la más sensible a estos fármacos.
Richards <i>et al.</i> (2004)	Ibuprofeno, fluoxetina, ciprofloxacino	Hay poca respuesta a concentraciones de 6, 10 y 10 µg/L respectivamente, a concentraciones de 60, 100 y 100 µg/L (Concentración Media) y de 600, 1000 y 1000 µg/L se produce muerte de peces.
Marques <i>et al.</i> (2004b)	AAS	Estudiaron la toxicidad crónica en cladóceros, encontrando que afecta la reproducción a concentraciones de 1.8 mg/L.

Continúa...

Autor (Año)	Medicamento	Conclusión
Cleuvers (2004)	Diclofenaco, Ibuprofeno, Naproxeno, AAS	Encontraron que la toxicidad es relativamente baja. La CE_{50} es 68-166 mg en <i>Daphnidos</i> y 72-626 mg en algas. Entre mayor es el log Kow mayor es la toxicidad. La toxicidad de mezclas de estos compuestos pueden predecirse usando el concepto de adición de concentración. La toxicidad de la mezcla fue considerable incluso a concentraciones que las sustancias simples no muestran efectos.
Yamamoto <i>et al.</i> (2005)	Ibuprofeno, acetaminofen, atenolol, fluoxentina	Determinaron el coeficiente de sorción encontrando que el de fluoxentina es mayor que el del atenolol y del ibuprofeno.
Isidori <i>et al.</i> (2005)	Naproxeno	Los fotoproductos son más tóxicos que el compuesto original en pruebas agudas y crónicas. No se encontraron efectos genotóxicos o mutagénicos.
Richards y Cole (2006)	14 medicamentos	Expusieron <i>Xenopus</i> durante 96 h a una concentración comúnmente prescrita de inhibidores selectivos de serotonina, reguladores de lípidos en sangre, AINES, antibióticos, un estimulante y un antiepiléptico. Se determinó la toxicidad, teratogenicidad, concentración mínima para inhibir el crecimiento, tipos y severidades de malformaciones y se encontró que la toxicidad varía entre las clases de fármacos analizados, así los fluoroquinolonas, cafeína, acetaminofen, carbamazepina y antibióticos son reportados no teratogénicos a exposiciones de 100 mg/L durante 96 h.
Brun <i>et al.</i> (2006)	Paracetamol, Ibuprofeno, Naproxeno, Ácido salicílico	No encontraron ningún efecto negativo en concentraciones de 32 a 500 µg/L en la evaluación de la toxicidad aguda para <i>Daphnia magna</i> y <i>Vibrio fischeri</i> respectivamente. En cuanto a la toxicidad crónica únicamente se apreció en la alga <i>Selenastrum capricornutum</i> con el ibuprofeno.
Gravel y Vijayan (2007)	AAS	Encontraron que no hay cambios significativos en la hexocinasa del hígado, glucocinasa, lactato deshidrogenasa, piruvato cinasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa y alanina amino transferasa.
Felis <i>et al.</i> (2007)	Ibuprofeno	Encontraron que la CE_{50} en <i>D. magna</i> es 10-100 mg/L en 14 días, disminuye el crecimiento y la supervivencia se afecta a 80 mg/L. La reproducción se afecta a 13.4 mg/L y se inhibe completamente a 80 mg/L.
Flipin <i>et al.</i> (2007)	Ibuprofeno	Encontraron que una mayor exposición a ibuprofeno provoca aumento del número de huevos de <i>Oryzias latipes</i> por evento reproductivo, pero disminuye el número de desoves pro semana La exposición crónica puede modificar el patrón de reproducción.
Kim <i>et al.</i> (2007)	Acetaminofen Carbamazepina Diltiazem Sulfonamida	Encontraron que <i>D. magna</i> es más susceptible que <i>D. longipira</i> . El diltiazem es el más tóxico (CL 8.2 mg/L en daphnidos) La concentración de los fármacos va de 0.14 - 16.5 µg/L en el medio ambiente.
Khetan y Collins (2007)	AAS	Estudiaron la toxicidad aguda en <i>D. magna</i> , a 48 horas la CE_{50} es de 88.1 mg/L, también realizaron la prueba de inhibición de crecimiento con el alga verde <i>D. Subspicatus</i> a 3 días reportándose la CE_{50} de 106.7 mg/L.

Continúa...

Autor (Año)	Medicamento	Conclusión
Hayashi <i>et al.</i> (2008)	Ibuprofeno	Realizaron una exposición de 10 días en <i>D. magna</i> , encontraron que en la mayor concentración la descendencia es menor, dando 10 días de recuperación la descendencia es igual al control, ya que se recuperan teniendo descendencia más rápido.
Quinn <i>et al.</i> (2008)	Farmacéuticos	Realizaron un ensayo de regeneración de <i>Hydra attenuata</i> para conocer el potencial teratogénico de 10 farmacéuticos identificados de un efluente de una PTAR. Se inhibió la regeneración con concentraciones de 1, 5 y 1 mg/L de gemfibrozil, ibuprofeno y naproxeno, y concentraciones más altas de 50 mg/L para bezafibrato y trimetropin. Carbamacepina y antibióticos (sulfapiridina, oxitetraciclina y novobiocin) incrementan la regeneración a 25, 5, 50 y 50 mg/L respectivamente. Tienen potencial teratogénico: Gemfibrozil, Ibuprofeno, naproxeno y bezafibrato. El que tiene menor potencial es la carbamacepina.
Parolini <i>et al.</i> (2009)	Diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol	Encontraron que el potencial de citogenotoxicidad es mayor para el paracetamol, le sigue el diclofenaco y por último el ibuprofeno usando biomarcadores <i>in vitro</i> .
Quinn <i>et al.</i> (2009)	Ibuprofeno, naproxeno, gemfibrozil, bezafibrato, carbamacepina, sulfapiridina, oxitetraciclina, novobiocin, trimetropin, sulfametoxazol.	Encontraron que los fármacos actúan aditivamente en una mezcla, con efectos subletales a concentraciones relevantes en el medio ambiente (ng/L a µg/L).
Yamamoto <i>et al.</i> (2009)	Acetaminofen, atenolol, carbamacepina, indometacina, ac.mefenámico, propanolol	Encontraron que la biodegradación es lenta (> 24 h) y depende del lugar de muestreo y el tiempo. Propanolol, indometacina e ifenpradil son fácilmente fotodegradados.
Marco Urrea <i>et al.</i> (2009)	Ibuprofeno, ácido mefenámico, carbamacepina.	El ibuprofeno es degradado a 1-hidroxibuprofeno y 2-hidroxibuprofeno por los hongos <i>Trametes versicolor</i> , <i>Irpex lacteus</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Ganoderma lucidum</i> .

1.2. Concentraciones de aines en cuerpos de agua

Los estudios relativos a la detección de fármacos se han realizado mayormente en países como Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU), Alemania, Suiza, Dinamarca, Holanda y Francia, en zonas de alta densidad poblacional, aunque también se han detectado en el Mar del Norte y la Antártida (Fent *et al.*, 2006). En estos estudios fueron encontradas concentraciones por arriba de mg/L de antibióticos, hormonas, antihipertensivos y antiinflamatorios/analgésicos (Seiler, 2002; Carlsson *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2009). En el Valle de México, se encontraron concentraciones

nes considerables de fármacos como: trimetropina, claritromicina, clindamicina, eritromicina, metropolol, ibuprofeno, gemfibrozil, diclofenaco, sulfasalazina, bezafibrato y naproxeno (Siemens *et al.*, 2008).

Los AINES son de particular interés, debido a su amplio consumo y a que en algunos países, tales como México, no cuentan con una regulación apropiada para su venta, uso y desecho (Gómez-Oliván *et al.*, 2009). Estos fármacos tienen efectos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos, siendo los miembros más comunes de este grupo de agentes terapéuticos el ácido acetilsalicílico, el paracetamol, el diclofenaco, el ibuprofeno y el naproxeno (Furst *et al.*, 2007). Además son de los fármacos detectados más frecuentemente en los cuerpos de agua a nivel mundial. Forman parte de los seis fármacos más vendidos en el mundo y usualmente se encuentran en cantidades significativas en los efluentes municipales (Parolini *et al.*, 2009). Esto ha sido comprobado mediante diversos estudios alrededor del mundo (tabla 2).

Tabla 2. Antecedentes de la presencia de AINES en ecosistemas acuáticos

Autor (Año)	Medicamento
Ferrari <i>et al.</i> (2003)	Midieron la ocurrencia en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en Francia, Grecia, Italia y Suiza de los fármacos carbamacepina, ácido clofíbrico y diclofenaco, además hicieron bioensayos en bacterias, algas, microcrutáceos y peces encontrando que la carbamacepina es el más peligroso.
Asthon <i>et al.</i> (2004)	Investigaron la incidencia de 12 compuestos farmacéuticos y sus metabolitos en PTAR y agua superficial en el Reino Unido. Diez fueron detectados en muestras de PTAR de los que destacan las concentraciones de diclofenaco 424 ng/L e ibuprofeno 3086 ng/L.
Ferrari <i>et al.</i> (2004)	Encontraron que las concentraciones predecibles y las medidas en un efluente exceden los 10 ng/l para los fármacos: carbamacepina, ácido clofíbrico, diclofenaco, ofloxacina, propanolol y sulfametoxazol, además que la toxicidad aguda es baja.
Zuccato <i>et al.</i> (2005)	En efluentes de Italia identificaron ofloxacina, furesemida, atenolol, hidroclorotiazida, carbamacepina, ibuprofeno, bezafibrato, eritromicina y claritromicina.
Lindqvist <i>et al.</i> (2005)	Estudiaron el tratamiento del agua en 7 PTAR para ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, diclofenaco y bezafibrato. La remoción fue mayor para ibuprofeno (92% +/-8%) y menor para el diclofenaco (26% +/-17%), encontraron que en los ríos y puntos de descarga de estas PTAR las concentraciones son más bajas por estar más diluidas y a las concentraciones encontradas en el agua superficial no se encuentran riesgos de toxicidad aguda.
Stülten <i>et al.</i> (2008)	Analizaron 6 efluentes de PTAR y encontraron cantidades de diclofenaco y sus metabolitos: 4'-hidroxidiclofenaco y 5'-hidroxidiclofenaco a concentraciones de 0-0.6 mg/L de diclofenaco y de sus metabolitos de 1.3 - 3.3 mg/L.

Continúa...

Autor (Año)	Medicamento
Corneau <i>et al.</i> (2008)	Estudiaron la incidencia de fármacos en el efluente de una PTAR en Atlantic, Canadá. El naproxeno, ibuprofeno y la cafeína fueron los más predominantes. El naproxeno, ibuprofeno y el ácido salicílico se detectaron en rangos bajos de ng/l en aguas tratadas y no tratadas.
Letzel <i>et al.</i> (2009)	Encontraron diclofenaco en concentraciones mayores a 2200 ng/L en efluentes de Alemania, a estas concentraciones pueden ocurrir efectos adversos crónicos en las poblaciones de peces.

1.3 Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

Son sustancias químicas con efecto analgésico, antipirético y antiinflamatorio. El término no-esteroideo se refiere a que los efectos clínicos son similares a los de los corticoides pero no las acompañan las consecuencias secundarias que los caracterizan. Como analgésicos se diferencian por no pertenecer a la clase de los narcóticos y actúan bloqueando la síntesis de prostaglandinas.

Las prostaglandinas son las encargadas de producir la sensación de dolor, ya que potencian a las sustancias algésicas, como las bradisininas, que estimulan las terminaciones nerviosas de las fibras C. En ocasiones, cuando existe la presencia de inflamación esta sensibiliza los receptores del dolor a estímulos mecánicos o químicos que regularmente son indolores. El dolor que acompaña a la inflamación y lesión tisular quizá sea consecuencia de la estimulación local de las fibras del dolor y a una mayor sensibilidad a él (hiperalgesia), en parte, como consecuencia de una mayor excitabilidad de las neuronas centrales de la médula espinal (sensibilización central) (Gómez-Moreno *et al.*, 2009).

Los AINE no modifican la hiperalgesia ni el dolor causado por la acción directa de las prostaglandinas, por lo cual se dice que los efectos analgésicos sí provienen de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Intervienen en la regulación del centro hipotalámico cuando la fiebre es causa por infección, lesión tisular, inflamación, rechazo de injerto y cáncer, donde hay formación de citocinas IL-1 beta, IL6, interferón alfa, beta y factor de necrosis tumoral alfa. Cabe señalar que los AINE no influyen en la temperatura corporal a casusa de factores como ejercicio o incremento de la temperatura ambiental, ni tampoco inhiben la fiebre causada por las prostaglandinas, si estas se aplican de manera directa sin embargo, si inhiben la generada por agentes que estimulas la síntesis de IL1 y otras citocinas como ya se mencionó.

En la mayoría de los casos, los agentes que originan dolor y aumento de la temperatura también dan lugar a la inflamación, la cual presenta como signos característicos; eritema y edema espontáneos. La respuesta inflamatoria surge en tres fases diferentes, y cada una es medida por mecanismos distintos: fase transitoria aguda (vasodilatación local y mayor permeabilidad capilar), subaguda tardía (ocurre infiltración de leucocitos y fagocitos) y proliferativa crónica (se observa degradación y fibrosis tisular).

Los miembros más prolíficos de esta clase de medicamentos son el ácido acetilsalicílico, paracetamol (acetaminofen), ibuprofeno, naproxeno, entre otros (Katzung, 2007).

1.4. Mecanismos de acción de los AINE

Los efectos antipiréticos y antiinflamatorios de los AINEs se deben al bloqueo de la síntesis de prostaglandinas en los centros termorreguladores del tálamo e hipotálamo y sus sitios periféricos blancos. Más aún, al disminuir la síntesis de prostaglandinas, previene también la sensibilización de los receptores del dolor a los estímulos tanto mecánicos como químicos. La acción analgésica es debido a la disminución de la síntesis de prostaglandinas, reprimiendo la sensación de dolor. Los AINEs se utilizan para tratar el dolor de intensidad baja a moderada en donde participa la inflamación. Debido a que la membrana de las células está formada por fosfolípidos, cualquier estímulo (lesiones, microorganismos o alérgenos) produce ácido araquidónico con la ayuda de la fosfolipasa, iniciando una cascada de acciones que resulta en la formación de prostaglandinas (causantes de la inflamación).

La generación de prostaglandinas (PG) a partir del ácido araquidónico, está mediada por la ciclooxigenasa presente alrededor de las articulaciones y sobre todo en la membrana interna del retículo endoplasmático. Esta enzima está presente de dos formas: una constitutiva (COX-1) e inducible (COX-2). Ambas enzimas son sensibles a la inhibición por los AINE.

1.5. Datos de consumo

Como se mencionó, los AINE son un grupo heterogéneo de fármacos frecuentemente utilizados debido a sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas. Un estudio efectuado por Langman (1988) estimó que las prescripciones de AINE en EUA superaban los 100 millones

anuales, si se toma en consideración que los AINE son comercializados como especialidades farmacéuticas publicitarias, en 1999 se estimó que uno de cada 7 sujetos en los EUA toma un AINE diariamente (Bjorkman, 1999). En este mismo año en España se vendieron más de 31 millones de envases de AINE, excluyendo el ácido acetilsalicílico (Sistema Nacional de Salud, 2000) En el Reino Unido se prescriben 24 millones de recetas anuales, un 15% de su población mayor toma AINE y en 2004 fue el sexto grupo farmacológico más importante en volumen de ventas, actualmente se refiere que treinta millones de personas en el mundo consumen diariamente AINE (Salas *et al.*, 2007).

En México, y en particular en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), sistema de seguridad social que atiende a población empleada en el sector formal y que representa 40% de la población del país, se otorgan un número importante de consultas a pacientes que requieren AINE (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2006). Sin embargo, se carece de información real sobre el consumo de este tipo de medicamentos en el país debido principalmente a que se trata de fármacos de libre venta, son de amplio consumo y no cuentan con una regulación apropiada para su venta, uso y desecho (Gómez-Oliván *et al.*, 2009).

1.6. Bioindicadores (*Hyalella azteca*)

La sostenibilidad de cualquier sistema especialmente de los ecosistemas, requiere en su operación, de indicadores que puedan servir como herramientas de información para la evaluación de las consecuencias ambientales derivadas de las actividades sociales y económicas (Bittermann y Haberl, 1998; Vázquez *et al.*, 2006).

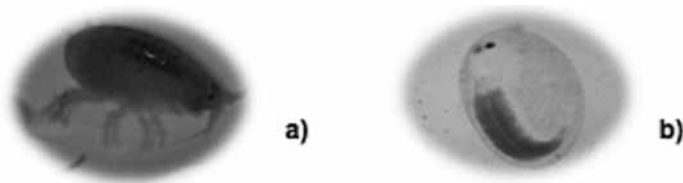
A una especie se le considera bioindicadora cuando es sensible a cambios en el medioambiente reflejándolos en la salud de sus poblaciones; éstas proveen información esencial y temprana que advierten de posibles daños en el ambiente, como son la presencia de patógenos infecciosos emergentes y contaminantes, lo que proporciona un rápido diagnóstico del riesgo (Godínez *et al.*, 2007).

En caso de la evaluación toxicológica del agua, el organismo centinela indicado es *Daphnia magna* o bien *Moina macrocopa*, por otra parte para la valoración de sedimentos se emplea a *Hyalella azteca* (Fournier *et al.*, 2001). En todos los casos, la utilización de seres vivos como indicado-

res del estado de ecosistemas acuáticos provee una información integral que permite respaldar la toma de decisiones en su manejo y control.

Las *Hyalella azteca* (figura 1) son organismos que presentan cuerpo pequeño (3 a 8 mm, los machos son más grandes que las hembras), tienen 2 o 3 dientes (como en una sierra y no en una boca) en la parte posterior del cuerpo. El segundo tramo de los machos es mucho más grande y más amplio que el de la hembra, en general son buenos nadadores. El color es variable (blanco, verde o marrón), se alimentan principalmente de algas filamentosas y diatomeas, pero también puede comer la materia orgánica en descomposición (Espina y Vanegas, 1996).

Figura 1. a) *Hyalella azteca* adulto, b) *Hyalella azteca* neonato



Debido a sus ventajas como indicador biológico, los científicos lo emplean como indicador de la calidad ambiental y del agua, así como de sedimentos debido a su alta sensibilidad a diversos xenobióticos, ya que son organismos bentónicos facultativos, pudiendo vivir tanto en la columna de agua como en los sedimentos superficiales (Galar, 2003; Brun *et al.*, 2006).

1.7. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es el desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la defensa antioxidante (Figura 6), que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan deterioro y muerte (Rodríguez *et al.*, 2001).

1.8. Radicales libres

Los radicales libres (RL) son moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una inestabilidad, alta reactividad y una gran capacidad de combinarse inespecíficamente con biomolécu-

las como carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos. Son producidos continuamente como parte del metabolismo normal de la célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de captura). Durante el proceso metabólico una pequeña parte (2-3%) de los radicales libres pueden evadir el mecanismo redox y causar daño oxidativo a los componentes celulares (Rodríguez *et al.*, 2001; Hangsber, 2002; Valavanidis *et al.*, 2006).

1.9. Especies reactivas de oxígeno

Se consideran especies reactivas de oxígeno (ERO) al oxígeno atómico (O), al ozono (O₃), al oxígeno singulete (¹O₂) que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados del O₂, al superóxido (O₂^{·-}), al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y al radical hidroxilo (·OH), estas últimas consideradas especies parcialmente reducidas. Las ERO en bajas concentraciones estimulan el crecimiento de las células, de algunas bacterias y otros microorganismos, además de que son indispensables para diferenciación celular y la muerte celular programada (Königsberg, 2008).

El O₂ reacciona con la mayoría de los compuestos celulares, con la membrana plasmática, los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos muy cerca del sitio donde se forma. Interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos siendo el producto principal la 8-hidroxiguanidina (Königsberg, 2008).

El O₂^{·-} es a la vez un anión y un radical, se produce principalmente en la cadena respiratoria. Es tóxico para la célula porque a partir de él se puede originar el ¹O₂ y el H₂O₂ (Valavanidis *et al.*, 2006; Königsberg, 2008).

El H₂O₂ se forma cuando uno de los dos electrones de O₂ se ha apareado con un electrón de giro contrario. Puede formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas. Es tóxico ya que puede formar ¹O₂ y ·OH, aunado a la reacción con algunos metales de transición con los que se produce el radical ·OH el cual interacciona de forma irreversible con proteínas y DNA (Königsberg, 2008).

El ·OH se produce principalmente por la reacción de Fenton. Es uno de los compuestos más reactivos que existen, puede oxidar tanto las bases púricas como las pirimídicas y también la desoxirribosa, además puede producir rupturas en el DNA. También reacciona con cualquier aminoá-

cido en el sitio que se origina, incluso con los ácidos grasos poliinsaturados (Valavanidis *et al.*, 2006).

Otras fuentes endógenas de ERO dentro de las células son las enzimas oxidativas como triptófano dioxigenasa, xantino oxidasa y citocromo P450 reductasa, que pueden producir , mientras que la enzima guanidilciclasa y glucosa oxidasa generan peróxido de hidrógeno. Los contaminantes químicos son una fuente importante para la generación de ERO en los organismos, tal es el caso de los metales de transición, los herbicidas, las quinolonas y los componentes nitroaromáticos, ampliamente conocidos por su potencial para causar estrés oxidativo (2006).

2. Metodología

2.1. Obtención, cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba

El organismo de prueba (*Hyalella azteca*) se recolectó de su hábitat natural en la Laguna de San Miguel de Almaya, municipio de Capuluac, Estado de México y fue trasladado al laboratorio de Toxicología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, en bolsas de plástico con aireación constante.

Para su cultivo la *Hyalella azteca* fue mantenida en agua reconstituida ($\text{NaHCO}_3 = 174 \text{ mg/L}$, $\text{MgSO}_4 = 120 \text{ mg/L}$, $\text{KCl} = 8 \text{ mg/L}$ y $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 120 \text{ mg/L}$) con un intervalo de pH 7.5 - 8.5, a temperatura ambiente, con oxigenación constante (6.4-6.6 mg/L O_2) y fotoperiodos de 16 h luz/ 8 h oscuridad, fue alimentada *ad libitum* con lechuga molida. Los organismos empleados en los ensayos de toxicidad fueron neonatos de la tercera generación por reproducción sexual, de un cultivo de cuatro meses.

2.2. Preparación del sedimento artificial

La composición del sedimento artificial fue; 70 % arena (0.2 mm), 20 % caolinita (< 0.002 mm) y 10 % materia orgánica (0.2 mm). Se utilizó como fuente de materia orgánica composta de borrego, la cual fue inactivada por calor seco en un intervalo de temperatura de 55-60 °C durante un periodo de 3 días. El sedimento artificial fue esterilizado en autoclave durante 3 ciclos de 15 minutos a 121 °C y 15 lb de presión, con intervalos separados de una hora. Fue medido el pH con un potenciómetro cuando se prepararon los sistemas.

2.3. Determinación de concentración letal media (CL₅₀) y estrés oxidativo

Los sistemas de prueba consistieron en recipientes de polietileno de 150 mL de capacidad, conteniendo agua reconstituida y sedimento artificial en una proporción de 3:1, provistos de oxigenación continua, fotoperiodos de 16h luz/ 8 h oscuridad y temperatura ambiente. Los sistemas de intoxicación fueron estáticos y no se proporcionará alimento a los organismos durante los periodos de exposición.

A fin de establecer la concentración destinada para la evaluación del estrés oxidativo, se determinó la concentración letal media (CL₅₀) del diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico sobre *H. azteca*. Para ello, se utilizaron 5 sistemas de prueba, que se adicionaron con diferentes concentraciones de los fármacos ya mencionados, así como un sistema control libre de fármaco y se colocaron 10 organismos de prueba. El tiempo de exposición fue de 72 h y posteriormente se cuantificará el número de muertos (inmovilización).

Una vez establecida la CL₅₀ del diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico sobre *H. azteca*, se realizó el estudio de toxicidad subletal. A los sistemas de prueba se les adicionó una concentración correspondiente a 1/10 CL₅₀ de las mezclas binarias de diclofenaco con paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico, en forma de sedimento asimismo, se les agregaron 150 mg de *Hyalella azteca* (peso húmedo), los tiempos de exposición fueron de 72 h; después de los cuales, el organismo de prueba se separaron y se suspendieron en 1 mL de solución amortiguadora de tris pH 7. La mezcla se mantuvo en un baño de hielo durante todo el procedimiento y se homogenizó. El sobrenadante se centrifugo a 12500 rpm durante 15 min a -4° C. Posteriormente se evaluaron los siguientes biomarcadores: Grado de LPX, y contenido de CPO para valorar la concentración de proteínas oxidadas, así como la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX. Las pruebas bioquímicas se realizaron con el sobrenadante, excepto para evaluar el grado de lipoperoxidación en la que se empleó el paquete celular.

2.3.1. Determinación del grado de lipoperoxidación

La determinación de LPX se realizó mediante el método de Buege y Aust (1979). Se tomaron 100 mL de sobrenadante y se completaron a 1 mL con la solución amortiguadora Tris-HCl pH 7.4, se incubó a 37°C durante

30 min, se agregaron 2 mL del reactivo TCA-TBA (ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.375 % en ácido tricloroacético (TCA) al 15 %) y se agitó en un vórtex. Posteriormente se calentó a ebullición durante 45 min, se dejó enfriar y se removió el precipitado por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Se determinó la absorbancia de la muestra a 535 nm contra un blanco de reactivo. Se calculó la concentración de MDA por medio de su coeficiente de extinción molar ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.3.2. Determinación del contenido de proteínas carboniladas

La determinación del PCC se realizó utilizando el método Levine *et al.* (1994). Las proteínas solubles se obtuvieron por centrifugación de las muestras a 12500 rpm durante 15 min a -4°C . A 100 μL de este sobrenadante se añadieron 150 μL de 10mM DNPH/2M HCl, antes de la incubación a temperatura ambiente durante 1 h en la oscuridad. Posteriormente, se le adicionaron 500 μL de ácido tricloroacético 20% y se dejó reposar (15 minutos a 4°C). A continuación, ésta se centrifugo a 11000 rpm durante 5 min. El botón se enjuaga tres veces con etanol-acetato de etilo 1:1, se disolvió en 1 mL de una solución de 6M guanidina pH 2.3 y se incubo a 37°C durante 30 minutos. La absorbancia fue leída a 366 nm y los resultados se expresarán en mM o nM de carbonilos reactivos ($\text{C}=\text{O}$)/mg proteínas, sobre la base de su coeficiente de extinción molar de $21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.3. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa

La determinación de la actividad de la SOD se realizó mediante el método de Misra y Fridorich, 1972. Se adicionaron 40 μL del sobrenadante a una celda de 1 cm, se agregaron 260 μL de la solución amortiguadora de carbonatos (50 mM de carbonato de sodio y 0.1 mM de EDTA) a pH 10.2 y 200 μL de adrenalina 30 mM. Se determinó la absorbancia a 480 nm a los 30 s y 5 min. La actividad de la SOD se determinó por medio del su coeficiente de extinción molecular ($21 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.3.4. Determinación de la actividad de la catalasa

La determinación de la actividad de la CAT se realizó mediante el método de Radi *et al.*, (1991). Se tomaron 20 mL del sobrenadante y se le agrego 1 mL de la solución amortiguadora de aislamiento (0.3 M de sacarosa, 1 mM de EDTA, 5 mM de HEPES y 5 mM de KH_2PO_4) y 0.2 mL de la solución de peróxido de hidrógeno 20 mM, se determinó la absorbancia a 240

nm, a 0 y 60 s. Los resultados se obtuvieron sustituyendo la absorbancia de ambos tiempos en la siguiente fórmula: (Concentración de catalasa = $(A_0 - A_{60})/CEM$). Donde el CEM del H_2O_2 equivale a $0.043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; los datos se expresaron en mM de $H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}$ de tejido húmedo⁻¹.

2.3.5. Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa

La actividad de GPx se determinó mediante el método de Gunzler y Flohe-Clairborne, 1985, modificado por Stephensen *et al.*, 2000. A 100 μL de sobrenadante se añaden 10 μL de glutatión reductasa (2 U de glutatión reductasa) se le adicionaron 290 μL de la solución amortiguadora de reacción (K_2HPO_4 50mM, KH_2PO_4 50mM (pH7.0), glutatión reducido 3.5 mM, azida de sodio 1 mM, NADPH 0.12mM) y 100 μL de H_2O_2 0.8 mM. La absorbancia fue leída a 340 nm después de 0 y 60 s. La actividad de la enzima se calculó utilizando la siguiente ecuación; (Concentración de glutatión peroxidasa = $(A_0 - A_{60})/CEM$). Donde el CEM del NADPH = $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; los datos fueron expresados en mM de NADPH/min/g tejido húmedo.

3. Resultados

3.1. Toxicidad aguda del diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico a las 72 horas sobre *Hyalella azteca*

Se presentan los resultados de CL_{50} (tabla 3), donde los organismos tratados presentaron disminución de movilidad, pérdida de la coloración característica, seguido por la inmovilización total y contracción del cuerpo formando un semicírculo.

Tabla 3. Concentración letal media (CL_{50}) de AINE

Fármaco	* CL_{50} (mg/Kg)	**IC 95%	***ID
Ibuprofeno	1.7	1.25-2.729	1.2-2.7
Ácido acetilsalicílico	2.6	2.348- 2.867	2.5-3.2
Diclofenaco	4.6	3.4-5.7	4.2-27.0
Naproxeno	7.6	6.4-8.1	2.5-9.5
Paracetamol	7.7	4.770-17.055	2.4-15.1

* Concentración Letal Media, **Intervalo de Confianza, ***Intervalo de Dosis. Las concentraciones fueron obtenidas mediante el programa computarizado de análisis PROBIT EPA, versión 1.5.

Las condiciones que se consideraron para llevar a cabo las determinaciones de efecto de los AINE se presentan a continuación (tabla 4).

Tabla 4. Condiciones del estudio subletal para determinar los efectos de los fármacos sobre *Hyalella azteca*

Condición	Parámetros
Volumen de los recipientes de prueba	150 mL
Volumen de prueba	10 g sedimento artificial y 30 mL de agua sintética
Número de organismos por prueba	150 mg
Temperatura	20°C +/- 2°C
Agua de dilución	Agua semidura
Iluminación	Fotoperiodos de 16 h luz y 8 h oscuridad
Duración del bioensayo	72 h
Tipo de ensayo	Estático, sin renovación del medio

3.1.1. Discusión de datos de toxicidad aguda

Como se menciona en los antecedentes, actualmente los medicamentos se han convertido en una fuente importante de contaminación en el medio acuático a nivel mundial (Spindler *et al.*, 2007; Montforts *et al.*, 2007). Muchos de estos compuestos son tóxicos y causan daños letales o crónicos en los hidrobiontes.

Siendo así que la concentración letal media varía dependiendo a las características propias de los fármacos en este caso los AINE utilizados, pudiéndose observar en los resultados que el ibuprofeno presenta la concentración letal media más baja y el paracetamol la más alta; teniendo como referente la clasificación de la toxicidad de productos farmacéuticos en el ambiente acuático realizada por Jones *et al.* (2002), quien reporta que produce efectos dañinos en peces y crustáceos.

El interés de conocer los efectos ecológicos debido a la presencia de los medicamentos en el medio ambiente acuático, surgió como resultado de un crecimiento gradual en el número de reportes de presencia de fármacos en bajas concentraciones en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y superficiales, y en menor proporción, en las de tipo subterráneas, potables y sedimentos.

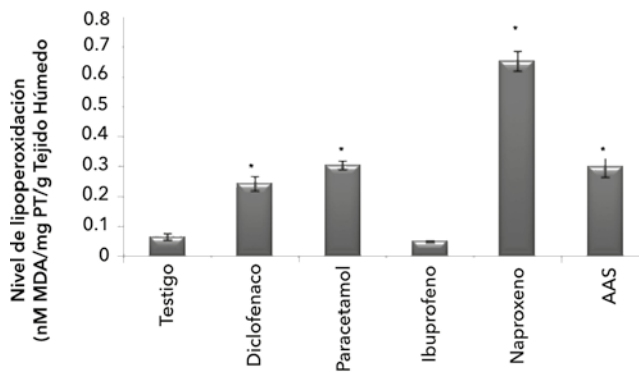
La respuesta de los organismos a los contaminantes es valorada con "bioensayos". Una de las ventajas que presentan estas pruebas es el empleo bajo condiciones rigurosamente controladas que puede establecer una relación causal entre la exposición al agente y el efecto producido de forma concluyente. Además, es posible identificar el mecanismo de acción de los tóxicos por el análisis del daño producido tanto a los animales de ensayo como a sus tejidos (Moreno, 2003). Los niveles de toxicidad están en función directa de las concentraciones de xenobiótico que se alcancen en los tejidos del organismo; se relacionan con la concentración del compuesto en el medio, la cual a su vez depende, tanto del tipo de contaminante, como del organismo y del tiempo de exposición (Espina y Vanegas, 1996). Los bioensayos se llevan a cabo en especies aisladas que se eligen considerando su distribución geográfica, su importancia ecológica y económica, la duración de su ciclo de vida, su talla máxima, así como la sensibilidad de su respuesta (O'Connor, 1994). Existen varios tipos de estudios de toxicidad en función del tiempo de exposición y las concentraciones probadas: ensayos de toxicidad aguda y subletal (subaguda, subcrónica y crónica). Además se realizan pruebas especiales para determinar el posible cambio funcional y estructural ocasionado por tal exposición.

En la primera etapa de este proyecto se determinó la toxicidad aguda (CL_{50}) a las 72 horas en las condiciones presentadas, obteniendo los siguientes resultados; 1.7 mg/Kg para ibuprofeno, 2.6 mg/Kg para AAS, 4.6 mg/Kg para diclofenaco, 7.6 mg/Kg para naproxeno y de 7.7 mg/Kg para paracetamol. Siendo los resultados de toxicidad aguda sobre *Hyaella azteca* explicados debido a que se conoce que los AINE actúan bloqueando a la enzima ciclooxigenasa la cual es responsable de catalizar la reacción de ácido araquidónico para la producción de prostaglandinas (Roberts y Morrow, 2001). Se sabe además, que estos mediadores celulares están involucradas en una gran variedad de funciones fisiológicas en anfibios, incluyendo su papel en la neurotransmisión y en el transporte de iones a través de las membranas celulares. Estos mecanismos fueron los que posiblemente produjeron la muerte de los organismos de prueba. Asimismo en la observación de *Hyaella azteca* en las 72 horas de exposición a los fármacos presentaban una coloración blanquecina con respecto al testigo, además de una disminución en la movilidad posiblemente al no haber un buen proceso de transmisión neuronal.

3.2. Resultados de estrés oxidativo

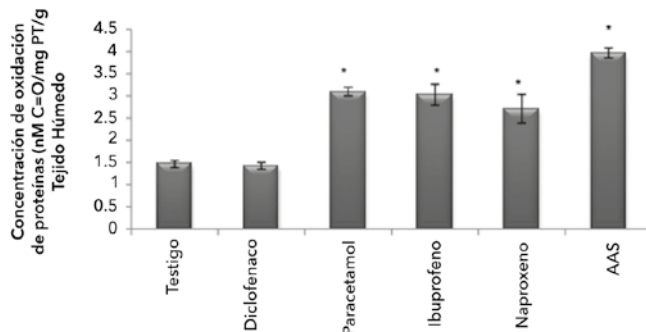
En la segunda etapa de este proyecto se evaluó el estrés oxidativo a través de la determinación del grado de lipoperoxidación (figura 2), proteínas oxidadas (figura 3) y las actividades enzimáticas de la superóxido dismutasa (figura 4), catalasa (figura 5) y glutatión peróxidasa (figura 6), exponiendo a los organismos a 1/10 Cl_{50} para observar el cambio ocasionado por los fármacos y los resultados se presentan en los siguientes gráficos:

Figura 2. Grado de lipoperoxidación en *H. azteca* expuesta a AINE



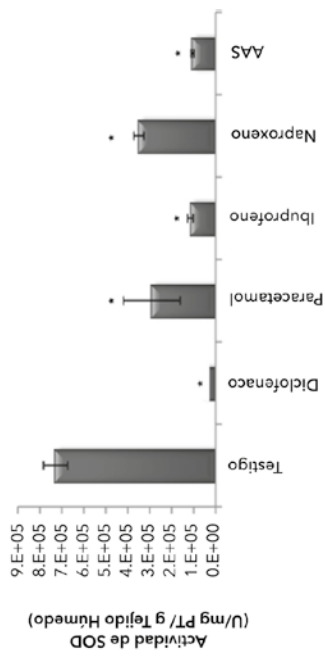
(*) indica diferencia estadística, $p < 0.05$ con respecto al testigo

Figura 3. Concentración de proteínas oxidadas en *H. azteca* expuesta a AINE



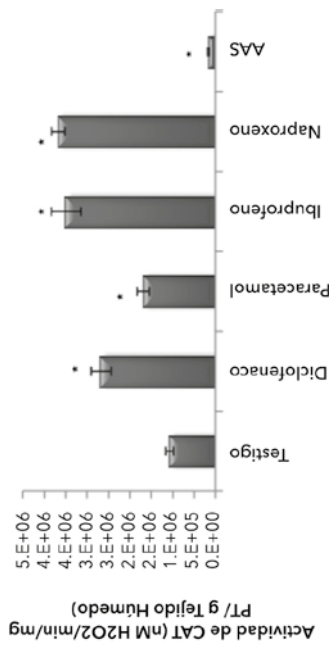
(*) indica diferencia estadística, $p < 0.05$ con respecto al testigo.

Figura 4. Actividad de SOD en *H. azteca* expuesta a AINE



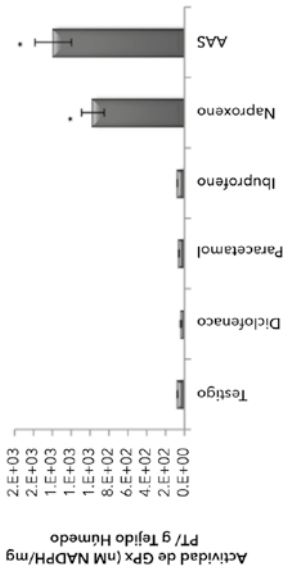
(*) indica diferencia estadística, $p < 0.05$ con respecto al testigo.

Figura 5. Actividad de CAT en *H. azteca* expuesta a AINE



(*) indica diferencia estadística, $p < 0.05$ con respecto al testigo.

Figura 6. Actividad de GPX en *H. azteca* expuesta a AINE



(*) indica diferencia estadística, $p < 0.05$ con respecto al testigo.

3.2.1. Discusión de datos de estrés oxidativo

Muchos contaminantes, entre ellos los medicamentos pueden ejercer un efecto tóxico relacionado con el estrés oxidativo, producto de la toxicidad del oxígeno donde la citotoxicidad de las especies reactivas de oxígeno y los radicales de oxígeno son capaces de reaccionar con macromoléculas celulares, ocasionando inactivación enzimática, lipoperoxidación (LPOX), daño genotóxico al ácido desoxirribonucleico (ADN) y muerte celular (Wills, 1987).

La lipoperoxidación es un proceso complejo que involucra la formación de radicales lipídicos entre el oxígeno molecular y los ácidos grasos insaturados (Di Giulio *et al.*, 1989; Porter *et al.*, 1995); la propagación de éstos, aunado al rearrreglo de las dobles ligaduras en los lípidos insaturados, dan origen a dienos conjugados y productos carbonilos de la peroxidación (cetonas, esterres, alcoholes, y aldehídos) siendo difundidos fuera del sitio de producción (daño indirecto). Así como a la destrucción de los lípidos membranosos produciendo una pérdida en la fluidez de la membrana permitiendo la liberación de productos reactivos siendo este un daño directo (Sevanian y McLeod, 1997; Díaz *et al.*, 1998).

Los datos presentados en esta investigación con los biomarcadores grado de lipoperoxidación y proteínas oxidadas (figuras 2 y 3), muestran que existe daño oxidativo, lo cual supone que una fracción de los radicales libres generados en *Hyalella azteca*, son capaces de alcanzar sus dianas moleculares antes de que puedan ser eliminados por mecanismos antioxidantes. Sin embargo, la mayor parte de los radicales libres -al menos en muchas partes de la célula- son eliminados mediante antioxidantes. De hecho, el mantenimiento de la homeostasis redox del tejido sólo es posible mediante un equilibrio entre la intensidad de generación y eliminación de radicales libres. Este equilibrio, se puede dar con altos niveles de generación y destrucción, y viceversa como ocurre en las distintas especies animales. También se dan dentro de una misma especie en distintas condiciones. Así, cuando aumenta la producción de radicales libres debido a causas exógenas o endógenas se puede dar una regulación compensadora a la alza en las defensas antioxidantes (figuras 4, 5 y 6). Cuando este equilibrio entre generación y destrucción de radicales libres se ve alterado la célula entra en un proceso degradativo a patológico.

Los sistemas de defensa que tienden a inhibir la formación de oxiradicales incluyen enzimas antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRED), que participan principalmente en la detoxificación de radicales en moléculas no reactivas. Otros antioxidantes de bajo peso molecular son GSH, β -caroteno (vitamina B), ascorbato (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) y ubiquinol (Barja, 1996).

La SOD pertenece al grupo de la metaloenzimas que catalizan la conversión de aniones superóxido reactivos (O_2^-) para originar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) el cual es una importante especie reactiva de oxígeno (Keller *et al.*, 1991). El H_2O_2 es subsecuentemente detoxificado por dos enzimas: CAT y GPOX. La SOD se encuentra presente en todos los organismos aeróbicos por lo que se considera fundamental en la ruta antioxidante. Además la velocidad de SOD para catalizar el O_2^- dismutado, cerca de limitar la difusión, la hace una de las enzimas más activas.

La CAT es una enzima que se encuentra contenida en la hematina, facilita la remoción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es metabolizado a O_2 y agua. A diferencia de algunas peroxidases que reducen varios lipoperóxidos como el H_2O_2 , CAT puede únicamente reducir H_2O_2 . Las CAT se localizan en los peroxisomas de la mayoría de las células y están involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos.

Las peroxidases son enzimas que reducen una variedad de peróxidos a sus correspondientes alcoholes. Mientras CAT emplea una molécula de H_2O_2 como dador en la reducción de otra molécula H_2O_2 , las peroxidases utilizan otros reductores. GPx cataliza el metabolismo de H_2O_2 en agua, involucrando una oxidación concomitante de glutatión reducido (GSH) a su forma oxidada (GSSG). GPx son considerados importantes en la protección de membranas a daño debido a lipoperoxidación (Winkler *et al.*, 1994).

Al observar en los gráficos de SOD, CAT y GPx (figuras 4, 5 y 6) que existe una alteración de la actividad de las enzimas antioxidantes como producto de los cambios ocasionados por la presencia de AINEs. Siendo así que causa preocupación la presencia tanto de los AINES debido a que causan cambios importantes en los organismos a lo largo de la cadena trófica, lo cual en un futuro no muy lejano estará afectando a los humanos como consecuencia de la dinámica de los xenobióticos (farmacéuticos) en el ambiente.

4. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio de toxicidad aguda y a la clasificación europea, que considera peligroso ambientalmente a aquellos fármacos cuya concentración letal media sea menor a 100 mg/L, los AINE; diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico, pueden ser considerados dañinos para los ecosistemas acuáticos.

Los AINE (diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno, naproxeno y ácido acetilsalicílico) son capaces de producir estrés oxidativo sobre *Hyalella azteca*, reflejándose en los incrementos de lipoperoxidación y del contenido de proteínas carboniladas, y en los cambios producidos en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx.

5. Referencias

- Albert, L., Namihira, D. (2004). Conceptos básicos en ecología y su relación con la toxicología ambiental" y "Contaminación ambiental y criterios de evaluación. *Toxicología ambiental*. Universidad de la Ciudad de Juárez. Chihuahua, México, pp. 52-54, 154-160.
- Araújo, J., Gonzalez, E., Egea, M.A., Garcia, M.L., Souto, E.B. (2009). Nanomedicines for Ocular NSAIDs: Safety on Drug Delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 5 (4): 394-401.
- Ashton, D., Hilton, M. y Thomas, K. (2004). Investigating the Environmental Transport of Human Pharmaceuticals to Streams in the United Kingdom". *Sci. Total Environ*. 33: 131-140.
- Barja, G. (1996). Los Radicales Libres mitocondriales como factores principales determinantes de la velocidad del envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 31 (3): 153-161.
- Bendz, D., Paxéus, N.A., Ginn, T.R. y Loge, F.J. (2005). Occurrence and Fate of Pharmaceutically Active Compounds in the Environment, a Case Study: Høje River in Sweden. *J Hazard Mater*. 122 (3): 195-204.
- Bittermann, W., Haberl, H. (1998). Landscape-Relevant Indicators for Pressures on the Environment. *Innov Eur J Soc Sci Res*. 11 (1): 87-106.

- Bjorkman, D.J. (1999). Current Status of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAID) Use in the United States: Risk Factors and Frequency of Complications. *Am J Med.* 107: S3-S10.
- Brun, L., Bernier, M., Losier, R., Doe, K., Jackman, P. y Lee, H. (2006). Pharmaceutically Active Compounds in Atlantic Canadian Sewage Treatment Plant Effluents and Receiving Waters and Potential for Environmental effects as Measured by Acute and Chronic Aquatic Toxicity. *Environ. Toxicol, Chem.* 26 (8): 2163-2176.
- Büege, J.A., Aust, S.D. (1979). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol.* 52: 302-310.
- Burger, J. y Gochfeld, M., 2004. Marine Birds as Sentinels of Environmental Pollution. *EcoHealth.* 1 (3): 263-274.
- Carlsson, C., Johansson, A.K., Alvan, G., Bergman, K., Kühler, T. (2006). Are Pharmaceuticals Potent Environmental Pollutants?: Part I: Environmental Risk Assessments of Selected Active Pharmaceutical ingredients". *Sci. Total Environ.* 364(1): 67-87.
- Cleuvers, M. (2004). Mixture Toxicity of the Anti-Inflammatory Drugs Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, and Acetylsalicylic Acid. *Ecotox Environ Safe.* 59 (3): 309-315.
- Corneau, F., Surette, C., Brun, G.L. y Losier, R. (2008). The Occurrence of Acidic Drugs and Caffeine in Sewage Effluents and Receiving Waters from Three Coastal Watersheds in Atlantic Canada. *Sci. Total Environ.* 396 (2-3): 132-46.
- Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G. W. y Jewell, C.S. (1989). Biochemical Responses in Aquatic Animals: a Review of Determinants of Oxidative Stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8 (12): 1103-1123.
- Díaz, J., Sánchez, M.J. y Navarro, A. (1998). Peroxidación lipídica en neonatología. *Pedriátrica.* 8 (6): 221-232.
- Espina, S. y Vanegas, C. (1996). Ecotoxicología y Contaminación En: A. V. Botello, J. L. Rojas Galaviz, J. A. Benítez y D. Zárate Lomelí (Eds.) *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias.* EPOMEX, pp. 69-106.

- Felis, E., Marciocha, D., Surmacz-Gorska, J. y Miksch, K. (2007). Photochemical Degradation of Naproxen in the Aquatic Environment". *Water Sci. Technol.* 55 (12): 281-286.
- Fent, K., Weston, A.A. y Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of Human Pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76 (2): 122-159.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo-Giudice, R., Pollio, A. y Garric. J. (2004). Environmental Risk Assessment of Six Human Pharmaceuticals: Are the Current Environmental Risk Assessment Procedures Sufficient for the Protection of the Aquatic Environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(5): 1344-1354.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Lo-Giudice R., Pollio, A. y Garric, J. (2003). Ecotoxicological Impact of Pharmaceuticals Found in Treated Wastewaters: Study of Carbamazepine, Clofibric Acid, and Diclofenac". *Ecotox. Environ. Safe.* 55 (3): 359-370.
- Flippin, J.L., Huggett, D. y Foran, C.M. (2007). Changes in the Timing of Reproduction Following Chronic Exposure to Ibuprofen in Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. *Aquat. Toxicol.* 81 (1): 73-78.
- Fournier, M., Pellerin, J., Clermont, Y., Morin, Y. y Brousseau, P. (2001). Effects of in Vivo Exposure of *Mya Arenaria* to Organic and Inorganic Mercury on Phagocytic Activity of Hemocytes. *Toxicology.* 161(3): 201-211.
- Furst, D.E., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Burmester, G.R., Sieper, J. y Weinblatt, M.E. (2007). Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases, 2007. *Ann Rheum Dis*, 66 (suppl. 3): iii2-iii22.
- Galar M. (2003). *Estudio comparativo del efecto tóxico producido por zinc sembrado en sedimentos de la presa Ignacio Ramírez en tres sistemas aislados y en microcosmo de tres organismos bentónicos*. Tesis doctoral. ENCB, IPN. México D.F.
- Gagné, F., Blaise, C., André, C. (2005). Occurrence of Pharmaceutical Products in a Municipal Effluent and Toxicity to Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Hepatocytes. *Ecotox. Environ. Safe.* 64: 329-336.
- Godínez, C., Santos del Prado, K., Zepeda, H., Aguirre, A., Anderson, D. (2007). Monitoreo de poblaciones y condición de salud de aves marinas y lobos marinos en la isla del Norte del Golfo de Cali-

- fornia, México. *Gaceta ecológica*. Instituto Nacional de Ecología: 240-267.
- Gómez-Moreno, G., Guardia, J., Cutando, A. y Calvo-Guirado, J.L. (2009). Pharmacological Interactions of Anti-Inflammatory-Analgesics in Odontology. *Med Oral Patol. Oral Cir. Bucal*. 14 (2): E81-E89.
- Gómez-Oliván, L.M., Carmona-Zepeda, F.A., Galar-Martínez, M., Téllez-López, A.M., Amaya-Chávez, A. (2009). Estudio de automedicación en una farmacia comunitaria de la ciudad de Toluca. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* 40 (1): 5-11.
- Gravel, A. y Vijayan, M.M. (2007). Salicylate Impacts the Physiological Responses to an Acute Handling Disturbance in Rainbow Trout". *Aquat. Toxicol.* 85 (2): 87-95.
- Gunzler, W., Flohe-Clairborne, A. (1985). Glutathione Peroxidase. En: R. A. Green-Wald (Ed.). *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton: CRC Press. 285-290.
- Hangsber, W. (2002). *Biología de las especies de oxígeno reactivas*. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F, pp. 19-54.
- Hayashi, Y., Heckmann, L.H., Callaghan, A. y Sibly, R.M. (2008). Reproduction Recovery of the Crustacean *Daphnia Magna* after Chronic Exposure to Ibuprofen. *Ecotoxicology*. 17 (4): 246-51.
- Instituto Mexicano del Seguro Social (2006). Información estadística en salud. *Consultas de Medicina Familiar*. Artículo en línea, disponible en: http://www.imss.gob.mx/dpm/dties/Celula.aspx?ID=SC06_00_00_01_06&OPC=opc07&SRV=A2006. Consultado el 28 de junio de 2011.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtera, L. y Rubino, M. (2005). Ecotoxicity of Naproxen and Its Phototransformation Products". *Sci. Total Environ.* 348 (1-3): 93-101.
- Jones, O.A., Voulvoulis, N. y Lester, J.N. (2002). Aquatic Environmental Assessment of Top 25 English Prescription Pharmaceuticals. *Water Res.* 36 (20): 5013-5022.
- Katzung, B., (2007). Farmacología Básica y Clínica. *Manual Moderno*. 9ª ed. México.

- Keller, G.A., Warner, T.G., Steimer, K.S., Hallewell, R.A. (1991). Cu, Zn Superoxide Dismutase is a Peroxisomal Enzyme in Human Fibroblasts and Hepatoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88 (16): 7381-7385.
- Khetan, S.K. y Collins, T.J. (2007). Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: a Challenge to Green Chemistry". *Chem. Rev.* 107 (6): 2319-2364.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P.G. y Park, J. (2007). Aquatic Toxicity of Acetaminophen, Carbamazepine, Cimetidine, Diltiazem and Six Major Sulfonamides, and Their Potential Ecological Risks in Korea". *Environ. Int.* 33 (3): 370-375.
- Konigsberg, M. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones médicas. El Manual Moderno*. México, D.F.
- Kosjek, T., Heath, E., Krbavcic, A. (2005). Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug (NSAIDs) Residues in Water Samples. *Environ. Int.* 31 (5): 679-685.
- Langman, M. (1988). Ulcer Complications and Nonsteroidal Antinflammatory Drugs. *Am. J. Med.* 84 (2A): 15-9.
- Larsen, T.A., Lienert, J., Joss, A. y Siegrist, H. (2004). How to Avoid Pharmaceuticals in the Aquatic Environment. *J. Biotechnol.* 113 (1): 295-304.
- Letzel, M., Metzner, G., Letzel, T. (2009). Exposure Assessment of the Pharmaceutical Diclofenac Based on Long-Term Measurements of the Aquatic Input. *Environ Int.* 35(2): 363-368.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R. y Shacter, E. (1994). Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol.* 233: 346-357.
- Lin, A.Y. y Reinhard, M. (2005). Photodegradation of Common Environmental Pharmaceuticals and Estrogens in River Water". *Environ. Toxicol Chem.* 24 (6): 1303-1309.
- Lindqvist, N., Tuhkanen, T. y Kronberg, L. (2005). Occurrence of Acidic Pharmaceuticals in Raw and Treated Sewages and in Receiving Waters". *Water Res.* 39 (11): 2219-2228.

- Madden, J.C., Enoch, S.J., Hewitt, M. y Cronin, M.T. (2009). Pharmaceuticals in the Environment: Good Practice in Predicting Acute Ecotoxicological Effects". *Toxicol. Lett.* 185(2): 85-101.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T. y Caminal, G. (2009). Ability of White-Rot Fungi to Remove Selected Pharmaceuticals and Identification of Degradation Products of Ibuprofen by *Trametes Versicolor*". *Chemosphere*. 74 (6): 765-772.
- Marques, C.R., Abrantes, N., Gonçalves, F. (2004a). Life-History Traits of Standard and Autochthonous Cladocerans: II. Acute and Chronic Effects of Acetylsalicylic Acid Metabolites". *Environ. Toxicol*, 19 (5): 527-540.
- Marques, C.R., Abrantes, N. y Gonçalves, F. (2004b). Life-History Traits of Standard and Autochthonous Cladocerans: I. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid". *Environ Toxicol*, 19 (5): 518-526.
- Misra, H.P., Fridovich, I. (1972). The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Super-Oxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 247 (10): 3170-3175.
- Montforts, M.H., Brandt, I. y Hutchinson, T.H. (2007). Summary of Workshop on Environmental Assessment of Human Medicines: Development and Use of Aquatic Toxicity Data. *Drug Inf. J.* 41 (2): 203-209.
- Moreno, G. (2003). *Toxicología ambiental evaluación de riesgo para la salud humana*. España: McGraw Hill.
- O'connor, D. (1994). Toxic Pollution and Its Impact on Receiving Waters. En: Novorty V., Olem H. *Water. Quality Prevention Identification and Management of diffuse Pollution*. Nueva York: Van Nostrand Reinhold, pp. 1054.
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D. Riva, C. y Provini, A. (2009). An Invitro Biomarker approach for the evaluation of the ecotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS)". *Toxicol Vitro*, 23(5): 935-942.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E. y Mills, K.A. (1995). Mechanisms of Free Radical Oxidation of Unsaturated Lipids. *Lipids*, 30 (4): 277-290.

- Quinn, B., Gagné, F. y Blaise, C. (2008). The Effects of Pharmaceuticals on the Regeneration of the Cnidarian, *Hydra attenuate*. *Sci. Total Environ.* 402 (1): 62-69.
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C. (2009). Evaluation of the Acute, Chronic and Teratogenic Effects of a Mixture of Eleven Pharmaceuticals on the Cnidarian, *Hydra attenuate*. *Sci. Total Environ.* 407 (3): 1072-1079.
- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D. y Freeman, B.A. (1991). Detection of Catalase in Rat Heart Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266 (32): 22028-22034.
- Richards, S., Cole, S. (2006). A Toxicity and Hazard Assessment of Fourteen Pharmaceuticals to *Xenopus Laevis* Larvae. *Ecotoxicol.* 15: 647-656.
- Richards, S.M., Wilson, C.J., Johnson, D.J., Castle, D.M., Lam, M., Mabury, S.A., Sibley, P.K. y Solomon, K.R. (2004). Effects of Pharmaceutical Mixtures in Aquatic Microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (4): 1035-1042.
- Roberts, L.J., Morrow, J.D. (2001). Analgesic-Antipyretic and Antiinflammatory Agents and Drugs Employed in the Treatment of Gout. *Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9 ed. Nueva York: McGraw-Hill, pp. 687-731.
- Rodríguez, J.M., Menéndez, J.R., Trujillo, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar.* 30 (1): 15-20.
- Salas, M.M., Llanos, A.A., Salazar, Y.X. y Pérez, P.B. (2007). Consumo de anti-inflamatorios no esteroideos en atención primaria en Costa Rica: evolución y variabilidad geográfica. *Gac. Sanit.* 21 (6): 458-464.
- Schreiber, F., Szewzyk, U. (2008). Environmentally Relevant Concentrations of Pharmaceuticals Influence the Initial Adhesion of Bacteria. *Aquat. Toxicol.* 87 (4): 227-233.
- Seiler, J.P. (2002). Pharmacodynamic Activity of Drugs and Ecotoxicology—Can the Two Be Connected? *Toxicol. Lett.* 131 (1): 105-115.
- Sevanian, A. y Mcleod, L. (1997). Formation of Biological Reactivity of Lipid Peroxidation Products. *Free Radical Toxicology*. Taylor and Francis, Washington DC, pp. 47-70.

- Siemens, J., Huschek, G., Siebe, C. y Kaupenjohann, M. (2008). Concentrations and Mobility of Human Pharmaceuticals in the World's Largest Wastewater Irrigation System, Mexico City-Mezquital Valley. *Water Res*, 42(8): 2124-2134.
- Sistema Nacional de Salud (2000). *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Monografía en línea, disponible en: <https://www.msssi.gob.es>
- Snyder, E.M., Pleus, R.C. y Snyder, S.A. (2005). Pharmaceuticals and EDCs in the US Water Industry-an Update. *J. Am. Water Works Assoc*, 97 (11): 32-36.
- Spindler, P., Montforts, M., Olejniczak, K., Koschorreck, J., Vidal, J.M., Johansson, A.K. y Van der Laan, J.W. (2007). Environmental Assessment for Human Medicines in the European Union. *Drug Inf. J.* 41 (2): 149-153.
- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson- Erics, M. y Förlin, L. (2000). Biochemical Indicators of Pollution Exposure in Shorthorn Sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), Caught in Four Harbours on the Southwest Coast of Iceland. *Aquat. Toxicol.* 48 (4): 431-442.
- Stuer-Lauridsen, F., Birkved, M., Hansen, L.P., Lützhøft, H.C. y Halting-Sørensen, B., (2000). Environmental Risk Assessment of Human Pharmaceuticals in Denmark after Normal Therapeutic Use. *Chemosphere*, 40(7): 783-793.
- Stülten, D. Zühlke, S., Lamshöft, M. y Spiteller, M. (2008). Occurrence of Diclofenac and Selected Metabolites in Sewage Effluents. *Sci. Total Environ.* 405 (1-3): 310-316.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., y Scoullou, M. (2006). Molecular Biomarkers of Oxidative Stress in Aquatic Organisms in Relation to Toxic Environmental Pollutants. *Ecotox. Environ. Safe.* 64 (2): 178-189.
- Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M. J., Esteban, E., Peñalosa, J. M. y Carpena, R. (2006). Use of White Lupin Plant for Phytostabilization of Cd and as Polluted Acid Soil. *Water Air Soil Pollut.* 177: 349-365.

- Wills, E. (1987). Evaluation of Lipid Peroxidation in Lipids and Biological Membranes. En: Snell, K., Mullock, B (Eds.). *Biochem Toxicol. A Practical Approach*. Estados Unidos: IRL Press, pp. 127-150.
- Winkler, B.S., Orselli, S.M. and Rex, T.S., 1994. "The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective". *Free Radic Biol Med*, 17: 333-349.
- Yamamoto, H., Hayashi, A., Nakamura, Y., Sekizawa, J. (2005). Fate and Partitioning of Selected Pharmaceuticals in Aquatic Environment. *Environ. Sci.* 12 (6): 347-58.
- Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Honda, Y., Tamura, I., Hirata, Y., Hayashi, A. y Sekizawa, J. (2009). Persistence and Partitioning of Eight Selected Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: Laboratory Photolysis, Biodegradation, and Sorption Experiments. *Water Res*, 43 (2): 351-362.
- Zhang, Y., Geissen, S.U. y Gal, C. (2008). Carbamazepine and Diclofenac: Removal in Wastewater Treatment Plants and Occurrence in Water Bodies. *Chemosphere*, 73 (8): 1151-1161.
- Zuccato, E., Castiglioni, S. y Fanelli, R. (2005). Identification of the Pharmaceuticals for Human Use Contaminating the Italian Aquatic Environment. *J. Hazard Mater.* 122 (3): 205-209.

Capítulo IX

Evaluación de la utilización de Herceptin® (trastuzumab) como tratamiento adyuvante de cáncer de mama tipo HER2 en el Centro Oncológico Estatal del ISSEMYM

Gerardo Daniel Miranda Mendoza¹
Leobardo Manuel Gómez Oliván^{1 *}
Marcela Galar Martínez²
Paula Anel Cabrera Galeana⁴
Patricia Vieyra Reyes³
Octavio Dublán García¹
Leticia Xóchitl López Martínez¹

1. Introducción

1.1. Farmacoepidemiología

El término farmacoepidemiología se conceptualiza como la aplicación de los conocimientos, métodos y razonamientos de la epidemiología al estudio de los efectos (benéficos y adversos) así como el uso de los medicamentos en poblaciones humanas (Secretaría de Salud, 2000; Hartzema y Martini, 1991; López *et al.*, 2005; Montemurro *et al.*, 2004; Altamiras *et al.*, 1995).

Los objetivos principales de la farmacoepidemiología son la evaluación de la eficacia, seguridad y eficiencia de las intervenciones y programas de salud en torno a la utilización de los medicamentos como prevención o tratamiento, así como analizar sus patrones de utilización para conseguir su uso racional. Esta disciplina tiene dos áreas de estudio: la farmacovigilancia y los estudios de utilización de medicamentos, que sirven para analizar la situación del uso de éstos con el objetivo de promover su racionalidad (Secretaría de salud, 2000; Hartzema *et al.*, 1991; Montemurro *et al.*, 2004; Álvarez F, 2004).

1.2. Farmacovigilancia

Los estudios de farmacovigilancia, se encargan de recopilar, monitorear, investigar, valorar la causalidad y evaluar la información que proporcionan tanto los profesionales de la salud, como los pacientes acerca de

las reacciones adversas (RA) de los medicamentos, productos biológicos, herbolarios, así como aquellos empleados en medicina tradicional, buscando identificar información nueva relacionada con sus efectos indeseados y prevenir el daño en los pacientes, su principal objetivo es la determinación de los riesgos que implica el uso de los medicamentos en los seres humanos, así como establecer la gravedad y significancia clínica de éstos, con la finalidad de prevenirlos o minimizarlos (Gómez-Oliván y Amaya, 2006; World Health Organization, 2002).

1.3. Estudios de utilización de medicamentos

La OMS define los estudios de utilización de medicamentos (EUM) como aquellos que se ocupan de “la comercialización, distribución, prescripción y uso de los medicamentos en una sociedad, con acento especial sobre las consecuencias médicas, sociales y económicas resultantes”. La utilización de medicamentos se considera un indicador sociosanitario, siendo los estudios de utilización de medicamentos, la herramienta que permite su evaluación y posterior diseño de estrategias de intervención (Álvarez, 2004).

El proceso de evaluación de la utilización de cualquier medicamento incluye tres pasos complementarios:

- 1) La evaluación de los beneficios de los medicamentos, por ejemplo la evaluación cualitativa y cuantitativa de su eficacia.
- 2) El estudio del riesgo de los medicamentos, tanto en estudios controlados como en condiciones normales de cuidado.
- 3) La evaluación del impacto de los tratamientos en la historia natural de la enfermedad y en la sociedad.

Los programas para la evaluación del uso de los medicamentos (Drug Use Evaluation [DUE]) son procesos de control de calidad continuos, estructurados, sistemáticos y validados, diseñados para asegurar que los medicamentos son utilizados correctamente, de forma segura, efectiva y eficiente. Se trata de un proceso que incluye la recolección y evaluación sistemática de la información relativa a su utilización en un ámbito determinado, con el objetivo de identificar oportunidades de mejora y de resolver problemas relacionados con el uso de los mismos. En ellos

deben estar implicados todos los actores que intervienen en el proceso de utilización: médicos, farmacéuticos y enfermeros.

Generalmente, se establecen para monitorear y evaluar el uso de determinados medicamentos individuales o grupos de fármacos, según los siguientes criterios:

- Frecuencia de utilización: al monitorear el uso de los fármacos más prescritos, se asegura la correcta utilización de una gran parte de los recursos farmacológicos.
- Probabilidad de aparición de reacciones adversas y otros problemas relacionados con el uso de los medicamentos (interacciones, incompatibilidades): la focalización de los esfuerzos en aquellos fármacos que tienden a producir problemas, sobre todos los más graves, para introducir criterios de eficiencia en la utilización de los recursos de control.

La evaluación debe estar basada en criterios objetivos, universalmente aceptados, que reflejan el conocimiento científico actual (Bautista, 2000; Meneu y Calderón, 2005).

1.4. Clasificación de los Estudios de Utilización de Medicamentos

La clasificación de los métodos empleados en los estudios de utilización de medicamentos es la siguiente (Strom, 2000; Altimiras y Segu, 1992; Figueiras *et al.*, 2000; Domínguez-Gil y Bonal, 1990).

1.4.1. Estudios de oferta

Proporcionan una descripción cuantitativa y cualitativa de la oferta de los medicamentos, ya sea de un país, centro hospitalario o en el medio ambulatorio, y permiten su comparación en tiempo y espacio. Los elementos que se describen acostumbran ser respecto al número de principios activos ofertados, el número de especialidades o formas farmacéuticas, número de asociaciones medicamentosas y el grado de calidad farmacológica de las especialidades ofertadas, en base a la documentación de su eficacia y seguridad. La fuente principal de información de estos estudios, son los vademécum de especialidades comercializadas en el país o en guías o formularios farmacoterapéuticos de las unidades hospitalarias.

1.4.2. Estudios de consumo

Los hay de dos tipos cualitativos y cuantitativos.

- a) Los estudios de consumo cualitativos; tomando como base los estudios cuantitativos. Éstos suponen otro nivel de análisis, centrado en indicadores de tipo cualitativo, sean de la calidad farmacológica intrínseca, de la idoneidad en el nivel de uso, y de la calidad terapéutica. Cuando en éstos, se utilizan datos de consumo provenientes únicamente de prescripciones se convierten en estudios específicos de prescripción.
- b) Los estudios de consumo cuantitativos: en los que se describen las tendencias temporales de consumo de los fármacos y permiten comparaciones entre países, regiones, centros o instituciones. Las fuentes de información, pueden ser las cifras de ventas del mercado, los servicios de farmacia de los hospitales y las registradas por grupos de investigación. En función de las fuentes de datos, éstos pueden indicar el consumo total o pueden convertirse en estudios de prescripción o de automedicación.

1.4.3. Estudios cualitativos

Son estudios en los que las fuentes de datos son distinta de la que proporcionan los datos generales de consumo y en los que el nivel de análisis se centra en aspectos cualitativos. Según el nivel de la cadena terapéutica que se estudia pueden ser:

- a) Estudios de prescripción: en los que se analiza la relación entre la indicación y la prescripción. En el medio comunitario se elaboran los perfiles farmacoterapéuticos de cada prescriptor a partir de los datos de las recetas de las instituciones de seguridad social (IMSS, ISSSTE, Sistema DIF, SEDENA, Servicios Estatales de Salud).
- b) Estudios de dispensación: en los que se estudia la calidad de la dispensación, de la información al paciente, entre otras.
- c) Estudios de uso-administración: permiten valorar la calidad de uso de los medicamentos por el personal de enfermería, el cumplimiento por parte del paciente y la autoprescripción, por mencionar algunas.

- d) Estudios orientados a problemas: dentro de éstos cabe mencionar a las auditorías terapéuticas en las que se analiza el uso de los fármacos de acuerdo con criterios estándar de uso correcto.

1.4.4 Estudios cuantitativos

Tienen tres funciones: disponer de un indicador socio-sanitario, pueden ser útiles para estimar la prevalencia de ciertas enfermedades y pueden proporcionar datos que permitan estimar la exposición a un determinado fármaco y por ello, servir de denominador para los estudios de farmacovigilancia.

1.5. Uso racional de los medicamentos y sus requisitos

La OMS en la conferencia de expertos sobre el uso racional de los medicamentos (URM) que tuvo lugar en Nairobi, Kenia en 1985, estableció que para que haya un URM, es necesario que se prescriba el medicamento apropiado, que se disponga de este oportunamente y a un precio asequible; que se dispense en las condiciones debidas y que se tome en dosis indicadas en los intervalos establecidos y durante el tiempo prescrito, además éste debe ser eficaz, de calidad y seguridad aceptable (Iñesta, 1995).

Los requisitos para que exista un uso racional de los medicamentos son fundamentalmente (Iñesta, 1995; Arias, 1999):

- 1) Diagnóstico preciso.
- 2) Conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad.
- 3) Conocimiento de la farmacocinética y farmacodinamia de los medicamentos en enfermos e individuos sanos.
- 4) Aplicación de los conocimientos de los medicamentos en beneficio de la mejora del paciente.
- 5) Expectativas razonables de estas relaciones, de tal modo que se puedan anticipar los efectos de los medicamentos.
- 6) Un plan que revele la eficacia y toxicidad, donde se establezca el curso de la terapia continúa.

1.6. Antecedentes

Cada fármaco tiene indicaciones precisas en las que ha demostrado eficacia y se debe administrar a dosis específicas durante un período de tiempo concreto; además determinadas circunstancias del paciente (edad, enfermedades concomitantes u otros tratamientos) pueden condicionar la forma de administración del medicamento o incluso, contraindicarlo (Figueras *et al.*, 2003).

La información sobre un fármaco reunida durante la fase de precomercialización, es inevitablemente incompleta con respecto a las posibles reacciones alérgicas y secundarias. Las pruebas en animales son insuficientemente predictivas para valorar la seguridad en los seres humanos. En los ensayos clínicos, los pacientes se seleccionan y se limitan en el número, en las condiciones de uso difieren de las de la práctica médica habitual y la duración de los ensayos. La información, a menudo, es incompleta o no ésta disponible, se presentan reacciones adversas graves e infrecuentes, se manifiesta toxicidad crónica, uso en grupos especiales (niños, ancianos o mujeres embarazadas), y pueden generarse interacciones farmacológicas (World Health Organization, 2001).

Los efectos tóxicos de los medicamentos se han observado desde los tiempos en que los seres humanos usaron por primera vez diferentes sustancias como medicinas. Se hace referencia de estos efectos tóxicos en los escritos de varios médicos de la antigüedad. El balance entre los efectos benéficos y tóxicos de los medicamentos ha sido una continua preocupación a medida que la medicina ha progresado. Aún más, el interés por la detección y prevención de las reacciones adversas graves de los medicamentos, se acentuó después de que ocurrió el desastre de la talidomida en 1961 (Naranjo y Busto, 1992).

Estos eventos llevaron a la reevaluación de la metodología para estudiar efectos adversos y las regulaciones aplicadas a la investigación de la seguridad de los medicamentos nuevos. Como consecuencia en varios países, se establecieron requisitos más estrictos, con el objeto de mejorar la detección de toxicidad grave antes de que un medicamento sea administrado a los seres humanos. Lo sucedido con la talidomida, cambió de forma fundamental el desarrollo de la investigación farmacológica. Se introdujeron nuevas y más exhaustivas pruebas de toxicidad en animales, se exigieron ensayos clínicos controlados, como prueba ne-

cesaria de eficacia y seguridad de los medicamentos para autorizar su comercialización. La OMS (1969) creó a nivel internacional el programa de farmacovigilancia que fue definido como la “notificación, el registro y la evaluación sistémica de las reacciones adversas de los medicamentos que se surten con o sin receta” (Naranjo, 1992; Glaxo, 1991; López-Valcárcel *et al.*, 2004).

1.7. Cáncer de mama y el gen Her2

El gen Her2 es una parte del código genético que todos tenemos. También conocido como Her2/neu y c-erbB2, este desempeña un papel clave en la regulación del crecimiento de las células de los oncogenes normales; ayuda a las células a crecer, dividirse y repararse. En una célula normal, existe una copia del mismo en cada cromosoma y, normalmente, una persona tiene dos copias de este por cada célula. Sin embargo, durante el desarrollo del cáncer, este gen se amplifica, es decir, crea numerosas copias de sí mismo, debido a un mecanismo aún desconocido. Si aparecen copias extra de Her2 en una célula, los genes causan demasiadas proteínas del mismo (receptores) que aparecen en la superficie celular. A este fenómeno se le conoce como sobreexpresión de proteínas. Se estima que aproximadamente del 15 al 30% de los carcinomas de mama tienen demasiadas copias del mismo, lo que provoca una sobreproducción de receptores de proteínas que se encuentran en la superficie de las células cancerosas. Estas proteínas especiales, junto con otros factores de crecimiento, provocan el crecimiento descontrolado de las células cancerosas. Los tumores de mama positivos para esta proteína tienden a crecer rápidamente (Montemurro *et al.*, 2004).

1.8. Monografía de Herceptin®

1.8.1 Aplicaciones terapéuticas

1. Cáncer de mama metastásico (CMM)

Herceptin® está indicado para el tratamiento del cáncer de mama metastásico con sobreexpresión de la proteína Her2 (Genetech Inc, 2008a):

- a) Como monoterapia para el tratamiento de las pacientes que han recibido uno o más regímenes quimioterapéuticos para la enfermedad metastásica.

- b) En combinación con paclitaxel o docetaxel para el tratamiento de las pacientes que no han recibido quimioterapia previa para la enfermedad metastásica.
- c) En combinación con un inhibidor de aromatasa para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastático positivo a receptores hormonales.

2. Cáncer de mama temprano (CMT)

Herceptin® está indicado para el tratamiento del cáncer de mama temprano Her2 positivo tras la cirugía, la quimioterapia (neoadyuvante o adyuvante) y/o la radioterapia.

1.8.2. Dosis

Para la administración de Herceptin® se deben cumplir con las siguientes características:

- a) La prueba positiva para Her2 es mandatoria para el comienzo de la terapia con Herceptin®.
- b) El Herceptin® debe administrarse por infusión intravenosa.
- c) El Herceptin® no debe administrarse en inyección intravenosa rápida o en bolo IV.
- d) El Herceptin® se administra siguiendo los siguientes esquemas de dosificación semanal y cada tres semanas como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Esquemas de Dosificación de Herceptin®

Medicamento	Dosis inicial - Tiempo de infusión	Dosis semanal - Tiempo de infusión	Dosis cada tres semanas - Tiempo de infusión
Herceptin	4 mg/kg 90 min	2 mg/kg 30 min	
Herceptin	8 mg/kg 90 min		6 mg/kg 90 min

Nota: Si el paciente pierde una dosificación semanal o cada tres semanas, se le debe administrar una nueva dosis inicial.

1.8.3. Farmacocinética

- 1) Absorción: El Herceptin® se administra por infusión intravenosa no teniendo una absorción como tal.
- 2) Distribución: El Herceptin® se distribuye a todas las células mediante un mecanismo activo, en la totalidad del volumen serico.
- 3) Biotransformación: No se tiene información del proceso de Biotransformación de Herceptin®.
- 4) Excreción: Por orina.

Se ha estudiado la farmacocinética de trastuzumab en pacientes con cáncer de mama metastásico y cáncer de mama temprano. En los estudios de Fase I, la farmacocinética dependiente de la dosis quedó demostrada por infusiones intravenosas de corta duración de 10, 50, 100, 250 y 500 mg de trastuzumab una vez a la semana. Observándose que al incrementar la dosis, aumenta también la vida media promedio y disminuye el aclaramiento renal.

1.8.4. Farmacodinamia

Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal derivado de ADN recombinante humano, dirigido de forma selectiva al sitio de acción extracelular de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2). Este anticuerpo es una IgG₁ que contiene regiones estructurales humanas que se complementan con las regiones determinantes de un anticuerpo anti-p185-Her2 murino que se enlaza al receptor Her2. El proto-oncogen Her2 o c-erbB2 codifica para una única proteína transmembranal receptora de 185 kDa, que se encuentra estructuralmente relacionada con el receptor del factor de crecimiento epidérmico. En un 25 - 30% de los cánceres de mama primarios, se ha encontrado sobreexpresión del gen Her2 con el uso del marcador tumoral CA 15.3 usado para la identificación de tumores mamarios. Una consecuencia de la amplificación del gen Her2 es un incremento en la expresión de la proteína Her2 en la superficie de las células tumorales, lo cual da como resultado un receptor Her2 constitutivamente activo. Los estudios indican que las pacientes cuyos tumores presentan una amplificación o sobreexpresión de Her2 tienen una supervivencia, libre de enfermedad, más corta que la de aquellos que presentan tumores sin amplificación o sobreexpresión de Her2.

1.8.4.1. Interacciones

1.8.4.1.1. Interacciones farmacológicas

No se han realizado estudios formales de interacciones medicamentosas con Herceptin® en el ser humano. No se han observado interacciones clínicamente significativas con la medicación concomitante utilizada en los ensayos clínicos.

1.8.4.1.2. Interacciones con pruebas de laboratorio

Se han observado alteraciones hematológicas como Neutropenia, leucocitopenia, trombocitopenia y leucemia.

1.8.5. Reacciones adversas medicamentosas (RAM)

Reacciones adversas graves descritas con poca frecuencia (del 1 a menos del 10% de los pacientes) a la infusión de Herceptin® son: Disnea, hipotensión, sibilancias, broncoespasmo, taquicardia y reducción en la saturación de oxígeno.

1.8.5.1. Reacciones asociadas a la infusión

Durante la primera infusión con Herceptin®, se observa habitualmente (del 21 al 40%) en las pacientes escalofríos y/o fiebre. Otros signos y/o síntomas pueden incluir náusea, vómito, dolor, escalofríos, cefalea, tos, mareos, erupción cutánea, astenia e hipertensión. Esos síntomas son generalmente de intensidad media a moderada y ocurren con poca frecuencia en las infusiones subsecuentes con Herceptin®.

1.8.5.2. Reacciones adversas de Sistemas y Aparatos

- a) Sistema cardiovascular: Bradicardia, miocardiopatía, hipotensión y disminución de la fracción de eyección.
- b) Aparato digestivo: Diarrea, vómitos, dispepsia, nasuseas, anorexia e ictericia.
- c) Aparato locomotor: Artralgia y mialgia.

- d) Sistema sanguíneo y linfático: Neutropenia, leucocitopenia, trombocitopenia y leucemia.
- e) Sistema nervioso: Parestesias, somnolencias y neuropatías, principalmente sensitivas.
- f) Aparato respiratorio: Asma, epistaxis, faringitis, tos, derrame pleural y rinitis.

1.8.6. Antecedentes de estudios de utilización de Herceptin®

Estudios realizados acerca del Herceptin®, en los que se ha mostrado el impacto en el tratamiento de cáncer de mama tipo Her2 y que han permitido establecer intervenciones farmacéuticas, para apoyar el uso racional de este medicamento son:

Un estudio sobre la seguridad de medicamento en una revista especializada de notas sobre farmacovigilancia, publicado en el año 2002, mostró que la administración de antraciclinas, tras la suspensión del tratamiento con trastuzumab, implicaba un aumento del riesgo de cardiotoxicidad. Por tanto, la EMEA (The European Medicines Agency) emite una nota informativa destacando que en el uso de antraciclinas tras la administración de trastuzumab, deben tenerse en cuenta los siguientes aspectos (Moreno, 2002):

- a) Se incrementa el riesgo de cardiotoxicidad.
- b) Debe evitarse durante 22 semanas tras el tratamiento con trastuzumab.
- c) Si es necesario, administrar la antraciclina antes de ese periodo, debe monitorizarse la función cardíaca del paciente muy estrechamente.

En 2003, este estudio retrospectivo sugiere que la continuación con trastuzumab después de la progresión de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama metastásico her2 sobreexpresado es factible y seguro, además de prolongar la supervivencia de los pacientes (George, 2003).

Un estudio realizado en octubre de 2005, aportó que el trastuzumab administrado después de la terapia primaria, la quimioterapia, redujo la

tasa de reaparición de tumores, en particular la recurrencia de tumores diseminados, aproximadamente 50 por ciento. Este grado de beneficio en el cáncer de mama tipo Her2 es el más grande que se informó desde la introducción de tamoxifeno en la hormona-receptor-positivo del cáncer de mama tipo Her2. Como conclusión se llegó a que un año de tratamiento con trastuzumab como adyuvante, después de la quimioterapia, mejora significativamente la supervivencia libre de enfermedad entre las mujeres con cáncer de mama Her2 (Martínez, 2005).

En el año 2005 se realizó un estudio acerca de la prolongación de la supervivencia de los pacientes que recibieron trastuzumab después de la progresión del cáncer de mama metastásico Her2 sobreexpresado, indica un efecto benéfico del trastuzumab, administrándose después de la progresión de la enfermedad. Trastuzumab es muy eficaz en el tratamiento de cáncer de mama metastásico tipo Her2. En comparación con los controles históricos, la supervivencia global parece que se prolonga notablemente, en pacientes que recibieron trastuzumab como tratamiento adyuvante de la enfermedad (Hans-Joachim, 2005).

Un análisis de la relación costo-eficacia de trastuzumab como adyuvante en humanos con cáncer de mama tipo Her2, llevó a la conclusión de que en el subgrupo de pacientes de alto riesgo con cáncer de mama Her2-positivo, el trastuzumab da una amplia ventaja clínica como quimioterapia adyuvante a un costo general que se considera apropiado para el valor añadido que produce el trastuzumab, este estudio se llevó a cabo en 2006 (Nicola, 2007).

2. Metodología

2.1 Diseño metodológico

2.1.1 Diseño del estudio

Los cuatro principales criterios de clasificación del estudio fueron:

- Finalidad del estudio: analítico
- Secuencia temporal: longitudinal

- Control de la asignación de los factores de estudio: observacional
- Inicio de acción de la cronología de los hechos: retrospectivo

2.1.2. Población de estudio

Este estudio se realizó en el Centro Oncológico Estatal del Instituto de Seguridad Social del Estado de México y Municipios (ISSEMyM), que es un hospital de 3^{er} nivel, dependiente del Sistema de Salud del Estado de México.

La población de estudio fueron todos los pacientes con cáncer de mama tipo Her2, ingresados al Centro Oncológico Estatal del ISSEMyM que recibieron la prescripción de Herceptin® durante el periodo del 01 de enero de 2007 a 15 de Septiembre de 2008.

2.1.3. Selección y tamaño muestral

En este estudio, el tamaño muestra fue a conveniencia, pues se incluyeron la totalidad de prescripciones realizadas durante el periodo de estudio, por lo tanto no existió técnica de muestreo.

2.2. Procedimientos

2.2.1. Realización del diagnóstico situacional

Se elaboró el diagnóstico situacional del Centro Oncológico Estatal ISSEMyM, así como del servicio de quimioterapia, considerando los siguientes aspectos:

- 1) Principales 10 causas de morbilidad.
- 2) Principales 10 causas de mortalidad.
- 3) Principales medicamentos empleados en el área de Quimioterapia.
- 4) Población atendida.
- 5) Profesionales de la salud, a cargo del servicio de Quimioterapia
- 6) Cobertura de atención.

2.2.2. Caracterización de la muestra objeto de estudio

Se realizó la caracterización de la muestra objeto de estudio, tomando en cuenta: grupo étnico, sexo y tratamientos concomitantes, dichos datos fueron obtenidos y registrados de la historia clínica del paciente.

2.2.3. Evaluación de la utilización de Herceptin®

En pacientes con cáncer de mama tipo Her2 en el servicio de quimioterapia del Centro Oncológico Estatal del ISSEMyM. Se revisaron los expedientes clínicos, valorando los siguientes criterios de uso adecuado de Herceptin®:

- a) Indicación: Se consideró que se prescribiera el medicamento con base en la patología presente en el paciente.
- b) Dosis: Se consideró que se prescribiera el medicamento en las dosis indicadas en los referentes bibliográficos.
- c) Individualización de la terapia: En este parámetro se tomaron en cuenta el estado nutricional, las alteraciones renales y alteraciones hepáticas.
- d) Intervalo de dosificación: se consideró como el tiempo que transcurre entre una y otra administración del medicamento en un régimen de dosis múltiples.
- e) Tiempo de infusión: es el tiempo que transcurre durante la administración del medicamento.
- f) Duración del tratamiento: fue considerado como el tiempo necesario para la aplicación del tratamiento según los referentes bibliográficos

Con base en todos los criterios empleados, se determinó que se trata de:

Prescripción adecuada: Sí se cumplía con todos los indicadores de forma correcta, respecto a la información indicada en la literatura.

Prescripción inadecuada: Sí no se cumplía con al menos uno de los indicadores de forma correcta, respecto a la información indicada en la literatura.

2.2.4. Determinación de la imputabilidad, prevalencia y significancia clínica de las reacciones adversas

2.2.4.1. Determinación de la imputabilidad

Registradas las RAM, se estableció la imputabilidad de las sospechas de estos efectos adversos producidos por Herceptin®. Se determinó a través del algoritmo de Naranjo y colaboradores, el cual es un cuestionario codificado que permite establecer la relación de causalidad entre el medicamento y el efecto adverso presentado.

2.2.4.2. Determinación de la prevalencia

Después de que las reacciones adversas de Herceptin®, en pacientes con cáncer de mama tipo Her2, fueran detectadas y registradas se determinó la prevalencia relativa a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Número de pacientes que presentaron reacciones adversas}}{\text{Número total de pacientes expuestos al medicamento}}$$

2.2.4.3. Determinación del tipo de las reacciones adversas detectadas

Una vez registradas las reacciones adversas, se determinó el tipo estas, según el algoritmo de Naranjo, como:

- 1) A: Reacciones adversas esperadas.
- 2) B: Reacciones adversas inesperadas.

2.2.4.4. Determinación de la gravedad y significancia clínica de las reacciones adversas detectadas

Una vez registradas las reacciones adversas, se determinó la gravedad y significancia clínica, establecida por la OMS, en las categorías siguientes:

- a) Leve: no necesitaba antídoto, tratamiento o prolongación de la hospitalización.

- b) Moderada: requería de cambios en el tratamiento farmacológico, aunque no necesariamente demanda la suspensión del medicamento causante de la reacción.
- c) Grave: cuando constituía una amenaza para la vida del paciente, y requería la suspensión del medicamento causante de la reacción y la administración de un tratamiento específico para tratar este efecto.
- d) Letal: cuando contribuyó directa o indirectamente en la muerte del paciente.

2.3. Consideraciones éticas

Atendiendo a las características del estudio, para la identificación de los pacientes que utilizaron Herceptin®, así como del personal del equipo de salud que atendió a dichos pacientes. Se utilizaron sólo las iniciales de los nombres y apellidos de cada paciente, con la finalidad de guardar los datos en total CONFIDENCIALIDAD, dando cumplimiento a uno de los principios generales de la ética en los estudios clínicos (autonomía), logrando de esta forma una serie de procedimientos de disociación que rompieron el vínculo entre la identificación personal y los datos hospitalarios relativos a la salud.

3. Resultados

Se realizó la revisión de 47 expedientes clínicos provenientes del servicio de Quimioterapia de pacientes diagnosticados con cáncer de mama Her2 positivo durante el periodo de 01 de enero de 2007 al 15 de septiembre de 2008, de los cuales en 46 expedientes clínicos se prescribió Herceptin®, por lo que la muestra de estudio fue la totalidad de 47 expedientes.

3.1. Caracterización de la muestra objeto de estudio

3.1.1. Caracterización de la muestra objeto de estudio según el grupo etáreo

En la tabla 2 se observa que el grupo etáreo 2, de 41 a 50 años predomina con el 42.55% del total de la población.

Tabla 2. Grupos etáreos

Grupo etáreo	Edades (años)	Porcentajes (%)	Frecuencia
1	31-40	23.4	11
2	41-50	42.55	20
3	51-60	19.14	9
4	61-80	14.89	7

3.1.2. Caracterización de la muestra objeto de estudio según el género

El sexo que predominó en la muestra de estudio fue el femenino con el 100%.

3.1.3. Caracterización de la muestra objeto de estudio según los medicamentos concomitantes

Se encontró que de la muestra en estudio el 61.71% recibió dos fármacos en su tratamiento, y el 38.29% recibió monoterapia con Herceptin® (Tabla 3), es decir 61.71 % de los pacientes, dentro del estudio, tuvieron una politerapia en su farmacoterapia sin aumentar la posibilidad de presentarse interacciones medicamentosas, ya que no se han reportado estos casos en los estudios realizados con el Herceptin® donde se vea alterada su farmacocinética ni su farmacodinamia sin aumentar la posibilidad de que el paciente presente ineficacia terapéutica o sufra de reacciones adversas (Slamon *et al.*, 2001; Marty *et al.*, 2005; Burstein *et al.*, 2001; Jahanzeb *et al.*, 2002; Burstein *et al.*, 2003; Wolff y Bonetti, 2003; Wardley *et al.*, 2006; Robert *et al.*, 2006; Mackey and Kaufman, 2006).

Tabla 3. Caracterización de la muestra objeto de estudio según los medicamentos concomitantes

Prescripción	%
Herceptin®	38.29
Herceptin® - Ac. Zoledronico	4.25
Herceptin® - Carboplatino	2.12
Herceptin® - Docetaxel	40.42
Herceptin® - Gemcitabine	2.12

Continúa...

Prescripción	%
Herceptin® - Paclitaxel	2.12
Herceptin® - Taxol	2.12
Herceptin® - Vinorelbine	8.51

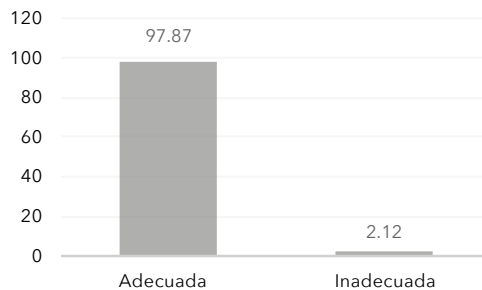
3.2. Evaluación de la utilización de Herceptin®

Se valoraron los siguientes criterios de uso adecuado de Herceptin®:

3.2.1. Indicación

De acuerdo a la evaluación de la adecuación de la prescripción que se realizó, se obtuvo como resultado que el 2.12% de la indicación fue inadecuada, esto principalmente a que se atendió un paciente con cáncer de mama tipo Her2 al cual solo se le administró docetaxel, en la historia clínica no existía referencia de la prescripción de Herceptin®, mientras que el 97.87% fue adecuada como se muestra en la figura 1.

Figura 1. Evaluación de la indicación

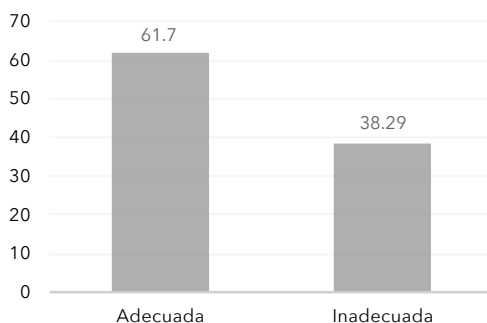


3.2.2. Dosis

En lo referente a la dosis prescrita (Figura 2), el 38.29% fue inadecuada y en un 67.71% fue adecuada. La dosis del medicamento en estudio puede seguir dos esquemas, uno semanal y otro cada tres semanas (como se muestra en la tabla 1) con distintas dosis iniciales, así como distintas dosis semanales según el esquema elegido. Con dosis inicial de 4 mg/kg y semanales de 2 mg/kg se obtienen concentraciones estables de 66 mg/l y concentraciones máximas de 110 mg/L en la semana 20. Por otro lado, con una dosis inicial de 8 mg/kg y cada tres semanas de 6 mg/kg

se obtienen concentraciones estables de 63 mg/l en la administración 13 (semana 39). Teniendo así dos esquemas donde podemos elegir una concentración estable a distintos tiempos según se requiera.

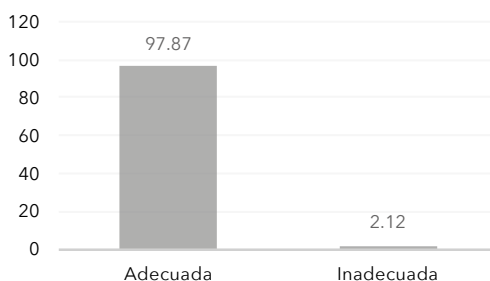
Figura 2. Evaluación de dosis



3.2.3. Individualización de la terapia

En un 97.87% la individualización de la terapia fue adecuada, ya que los médicos tomaron en cuenta las características de cada paciente (estado nutricional, alteraciones renales o hepáticas) y el 2.12% de la individualización de la terapia fue inadecuada debido a la no administración de Herceptin® bajo las condiciones antes mencionadas (figura 3).

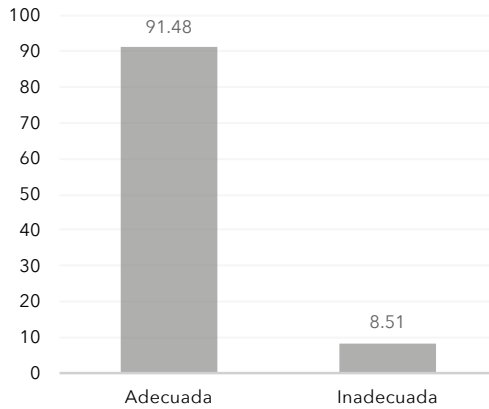
Figura 3. Evaluación de la individualización de la terapia



3.2.4. Intervalo de dosificación

Para el intervalo de dosificación, el 91.48% fue adecuado considerando el intervalo de tiempo semanal o cada tres semanas entre una administración y otra. Como se observa en la figura 4.

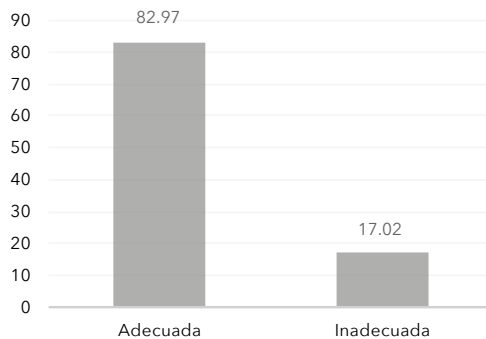
Figura 4. Evaluación del intervalo de dosificación



3.2.5. Tiempo de infusión

Como se observa en la figura 5, el 82.97% del tiempo de infusión fue adecuada, en contraste el 17.02% fue inadecuada.

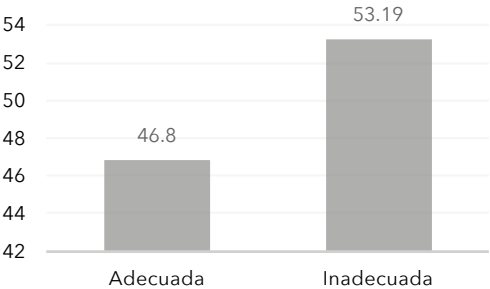
Figura 5. Evaluación del tiempo de infusión



3.2.6. Prescripción

Después de analizar los indicadores de prescripción, se obtuvo como resultado que el 46.8% de la prescripción fue adecuada, cumpliendo correctamente con los indicadores evaluados; mientras que en un 53.19% la prescripción fue inadecuada (figura 6), ya que no se cumplió correctamente con un indicador.

Figura 6. Evaluación de la prescripción



3.3. Determinación de la imputabilidad, prevalencia y significancia clínica de las reacciones adversas medicamentosas

Del total de la población de estudio se detectaron 39 reacciones adversas a Herceptin® (como se observa en la tabla 4) predominando la leucocitopenia, astenia, mialgia, trombocitopenia y la neuropatía sensitiva, con el 11.82%, 11.57%, 8.62%, 8.12% y 6.40%.

Tabla 4. Reacciones adversas medicamentosas predominantes

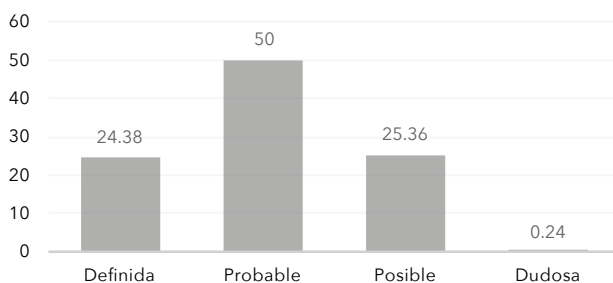
RAM	%
Artralgia	6.15
Astenia	11.57
Diarrea	6.15
Leucocitopenia	11.82
Mialgia	8.62
Nauseas	4.67
Neuropatía Sensitiva	6.40
Rinitis	5.66
Tos	3.69
Trombocitopenia	8.12
Otras	27.15

3.3.1. Determinación de la imputabilidad de las RAM

Se determinó la imputabilidad de las RAM mediante el algoritmo de Naranjo y colaboradores, el cual es un cuestionario codificado que permite establecer la causalidad entre el medicamento y el efecto adverso presentado y permite categorizar las RAM en cuatro variables: definida, probable, posible y dudosa.

En la figura 7 se observa la imputabilidad de las reacciones adversas causadas por el Herceptin®, donde predomina el tipo probable con el 50%.

Figura 7. Imputabilidad de las reacciones adversas detectadas de Herceptin®



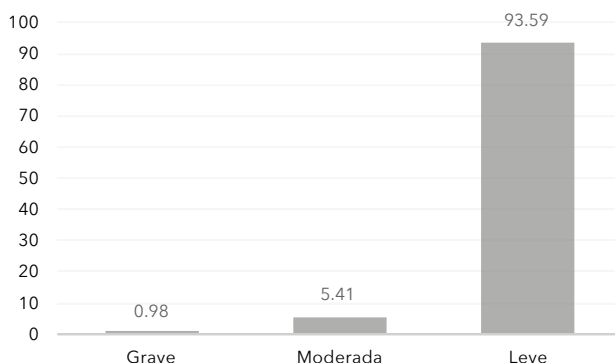
3.3.2. Determinación de la prevalencia de las RAM

De los 39 pacientes que presentaron reacciones adversas de Herceptin®, se determinó la prevalencia, la cual fue de 84.78%.

3.3.3. Determinación de gravedad y significancia clínica de las reacciones adversas detectadas

En la figura 8 se observa la gravedad y significancia clínica de las reacciones adversas registradas, en donde se puede apreciar que las reacciones del tipo leve fueron las que predominaron en un 93.59%.

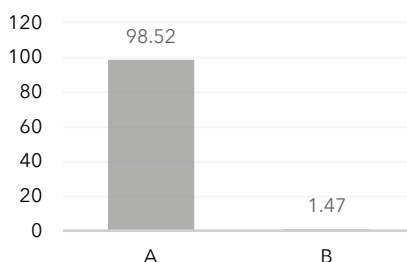
Figura 8. Gravedad y significancia clínica de las reacciones adversas medicamentosas de Herceptin®



3.4. Determinación del tipo de las reacciones adversas medicamentosas detectadas

En la figura 9 se observa la determinación del tipo de las reacciones adversas medicamentosas, detectadas donde se puede apreciar que las reacciones del tipo A (esperadas) fueron las que predominaron en un 98.52%; en contraste el 1.47% de las reacciones fueron del tipo B (inesperadas).

Figura 9. Tipo de reacciones adversas medicamentosas de Herceptin®



3.5. Establecimiento de la correlación existente entre los factores de riesgo y los indicadores de prescripción inadecuada del Herceptin®

Después de evaluar la utilización del Herceptin®, se realizó un análisis bivariado que permitió tener datos de la relación de criterios valorados que predisponen a la utilización inadecuada del medicamento en estudio.

Como se puede observar en la tabla 5, la dosis, el intervalo de dosificación y el tiempo de infusión son factores que están relacionados significativamente con la presencia de una utilización inadecuada ($P < 0.05$), la indicación, individualización de la terapia y duración del tratamiento, no presentó una diferencia significativa.

Tabla 5. Análisis bivariado de la prescripción inadecuada del Herceptin® respecto a los indicadores de utilización

Indicador de la evaluación de la utilización de Herceptin®	Significancia estadística
Indicación	0.095
Dosis	0.008**
Individualización de la terapia	0.087
Intervalo de dosificación	0.001**
Tiempo de infusión	0.002**
Duración del tratamiento	0.079

** $p < 0.05$ Diferencia significativa.

En la tabla 6, se puede observar que el modelo empleado es significativo, este es un indicador de que las variables analizadas influyen para la utilización inadecuada del Herceptin®.

Tabla 6. Valores de significancia del modelo logístico

	Chi cuadrada	Significancia
Modelo	42.23	0.000

Se realizó una regresión logística por el método Enter de los tres parámetros que presentaron una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el análisis bivariado (tabla 7).

En la tabla 7, se observa que con la variable dosis, es 12.8 veces mayor la predisposición para que se presente una utilización incorrecta cuando ésta es inadecuada, en comparación con las dosis adecuadas que son 1.6 veces mayores, presentando ambas diferencia significativa ($p < 0.05$). El intervalo de dosificación predispone a una utilización incorrecta sólo si éste es inadecuado con una probabilidad de 0.028 y un riesgo relativo de 26.3. En referencia al tiempo de infusión, tanto las infusiones adecua-

das como inadecuadas pueden asociarse a una utilización incorrecta del Heceptin®. Sin embargo, la que predispone con una mayor contribución son las infusiones inadecuadas en 17.5 veces ($p < 0.05$).

Tabla 7. Valores del modelo logístico respecto a los indicadores de utilización del Herceptin® (método Enter)

Variable	Significancia	RR
Dosis	0.013*	
Adecuada	0.027*	1.6
Inadecuada	0.015*	11.8
Intervalo de dosificación	0.007*	
Adecuada	0.721	0.2
Inadecuada	0.028*	26.3
Tiempo de infusión	0.031*	
Adecuada	0.011*	4.5
Inadecuada	0.023*	17.6

* $P < 0.05$ Diferencia significativa RR = Riesgo relativo

4. Conclusiones

El diagnóstico situacional mostró que las principales causas de morbilidad en el centro oncológico ISSEMyM, durante el año 2007 y primer semestre de 2008, corresponden principalmente a tumor maligno de mama, tumor maligno de ovario, tumor maligno de cérvix y tumor maligno de próstata.

Los medicamentos más utilizados en el área de quimioterapia durante el año 2007 al 15 de septiembre de 2008 en el centro oncológico estatal ISSEMyM fueron: en primer lugar cisplatino, seguido del fluoracilo, el carboplatino ocupa el tercer lugar y docetaxel en cuarto; el trastuzumab (Herceptin®) ocupó el lugar décimo tercero en esta lista.

En cuanto a la caracterización de la muestra objeto de estudio, los pacientes que en mayor proporción recibieron la prescripción de Herceptin® fueron los del grupo etáreo 2 (pacientes de entre 41 a 50 años) en un 42.55%, el género femenino predominó con un 100% y el 38.29% de

la población analizada fue prescrita con monoterapia, predominando la politerapia con Herceptin® - Docetaxel con el 40.42%.

El 53.19 % de la prescripción fue inadecuada. Un análisis bivariado mostró que la dosis, el intervalo de dosificación y el tiempo de infusión son factores que están relacionados significativamente con la presencia de una utilización inadecuada ($P < 0.05$).

5. Referencias

- Altamiras, J., Bautista, J. y Puigventos, F. (1995). Farmacoepidemiología y Estudios de Utilización de Medicamentos. *Farm. Hosp.* 1: 541-574.
- Altamiras, J. y Segu, J.L. (1992). Farmacoepidemiología y Estudios De Utilización de Medicamentos. 2ª Ed. Médica Internacional SA. *Farm. Hosp.* 412-421.
- Álvarez, L.F. (2004). Farmacoepidemiología. Estudios de Utilización de Medicamentos. Parte I: Concepto Y Metodología. *Seguim Farmacoter.* 3 (2):129-136. Artículo en línea, disponible en: http://www.farmacare.com/revista/n_6/129-136.pdf. Consultado el 23 de agosto de 2008.
- Arias, T.D. (1999). *Glosario de Medicamentos: Desarrollo, Evaluación y Uso. Organización Panamericana de la Salud (OPS)*. Washington, D. C., Estados Unidos. 1999: 223.
- Bautista, P.J. (2000). Evaluación de la eficacia, seguridad y eficiencia en la utilización de fármacos. *Farmacoepidemiología Combino-pharm*, 1-34.
- Burstein, H.J., Harris, L.N. y Marcom, P.K. (2003). Trastuzumab and Vinorelbine as First-Line Therapy for HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer: Multicenter Phase II Trial with Clinical Outcomes, Analysis of Serum Tumor Markers as Predictive Factors, and Cardiac Surveillance Algorithm. *J. Clin. Oncol.* 21: 2889-2895.
- Burstein, H.J., Kuter, I., Campos, S.M. (2001). Clinical Activity of Trastuzumab and Vinorelbine in Women with HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 17: 2639 -48.

- Domínguez-Gil, A. y Bonal, F.J. (1990). *Farmacia Hospitalaria*. Ed Médico Internacional. Madrid, España, 1-33.
- Figueiras, A., Caama, F. y Gestal, J. (2000). Metodología de los Estudios de Utilización de Medicamentos n Atención Primaria. *Gaceta Sanitaria*. 14 (3): 7-19.
- Figueras, A., Vallano, A. y Narváez, E. (2003). *Fundamentos Metodológicos de los EUM, una Aproximación Práctica para los Estudios de Ámbito Hospitalario, Nicaragua*. Artículo en línea, disponible en: http://kinesio.med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia_ori/proyecto_adscripcion_web/biblio/manual-eum.pdf. Consultado el 27 de octubre de 2008.
- Forbes, J.F., Pienkowski, T. y Valero, V. (2006). BCIRG007: Randomized Phase III Trial of Trastuzumab Plus Docetaxel with or Without Carboplatin First Line in HER2 Positive Metastatic Breast Cancer (MBC). *Proc Am Soc Clin. Oncol*. 24: 516.
- Genetech Inc. (2008a). *Herceptin (trastuzumab). Diccionario de Especialidades Farmacéuticas PLM*. México. Ed. Thompson. 54: 1903-1908.
- Genetech, Inc., (2008b). *Full Prescribing Information Herceptin (Trastuzumab)*. South San Francisco. Artículo en línea, disponible en: <http://www.gene.com/gene/products/information/pdf/herceptin-prescribing.pdf>. Consultado el 21 de Agosto de 2008.
- George, F. (2003). Continuation of Trastuzumab beyond Disease Progression is Feasible and Safe in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*. 4 (2): 120-125.
- Glaxo, (1991). *Farmacovigilancia: una Responsabilidad Compartida*. Churchill Livingstone. Madrid, España, 13-34.
- Gómez, O.M. y Amaya, C.A. (2006). Generalidades acerca de la Farmacovigilancia. 2006 *Infarmate, Revista Electrónica*. Artículo en línea, disponible en: http://www.infarmate.org/pdfs/Septiembre_octubre/farmacovig_num3.pdf. Consultado el 25 de septiembre de 2008.
- Gómez, O.M y Amaya, C.A. (2006). Farmacovigilancia en el Ámbito Hospitalario. 2006 *Infarmate, Revista Electrónica*. Artículo en línea, disponible en: http://www.infarmate.org/pdfs/noviembre_diciembre/farmacovigilancia.pdf. Consultado el 25 de septiembre de 2008.

- Hans-Joachim, S. (2005). Prolonged Survival of Patients Receiving Trastuzumab beyond Disease Progression for HER2 Overexpressing Metastatic Breast Cancer (MBC). *Onkologie*. 28: 582-586 Artículo en línea, DOI: 10.1159/000088296.
- Hartzema, G.A. y Martini, N. (1991). Pharmacoepidemiology: the Role of the Clinical Pharmacist. *Cont Pharm Issues*. 1: 1-29.
- Iñesta, A. (1995). Uso Racional de los Medicamentos en Atención Primaria y en el Hospital: Criterios y Requisitos. *Seminario "Uso Racional de Medicamentos, Implicaciones en la Formación Pre y Posgraduada, Experiencia Española"*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- López-Valcárcel, G.B, Cabeza, M.A., López, C.A., Díaz, B.J., Santana, F. y Ortún, R.V. (2004). Evolución de los Estudios de Utilización de Medicamentos: del Consumo a la Calidad de Prescripción. *Revista ICE* 67: 161-189. Artículo en línea, disponible en: <http://www.revistasice.com/Estudios/Documen/cice/67/CICE670401.PDF>. Consultado el 29 de octubre de 2008.
- Jahanzeb, M., Mortimer, J.E. y Yunus, F. (2002). Phase II Trial of Weekly Vinorelbine and Trastuzumab as First-Line Therapy in Patients with HER2+ Metastatic Breast Cancer. *Oncologist*. 7: 410 -417.
- López, M.R., Cabañas, P.M., Oliveras, A.M. y Clemente, B.S. (2005). Utilización de Medicamentos en una UCI Neonatal: Estudio Prospectivo. *Farm. Hosp.* 1:26-29.
- Mackey, J.R., Kaufman, B. y Clemens, M. (2006). Trastuzumab Prolongs Progression-Free Survival in Hormone-Dependent and HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *29th San Antonio Breast Cancer Symposium*, 100, 3.
- Marty, M., Cognetti, F. y Maraninchi, D. (2005). Randomized Phase II Trial Of the Efficacy and Safety of Trastuzumab Combined with Docetaxel in Patients with Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer Administered as First-Line Treatment: the M77001 Study Group. *J. Clin Oncol.* 23: 4265-4274.
- Martinez, J.P.G. (2005). Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 353, 1659-1672.

- Meneu, R. y Calderón, S. (2005). La Incertidumbre sobre la Efectividad y Seguridad de los Fármacos. Relevancia de los Estudios de Utilización de Medicamentos. *Farm. Hosp.* 29: 221-224.
- Montemurro, F., Valabrega, G. y Aglietta, M. (2004). Terapia Combinada para el Cáncer de mama basada en Trastuzumab. *Expert Opin. Pharmacother.* 1(5): 81-96.
- Moreno, A. (2002). *Seguridad de Medicamentos. Agencia Española del Medicamento.* 26: 62-65.
- Naranjo, C. y Busto, U. (1992). Farmacología Clínica: Métodos en Farmacología Clínica, Programa Regional de Medicamentos Esenciales. *OPS. Washington*, 14: 330-331.
- Nicola, L. (2007). Cost Effectiveness of Adjuvant Trastuzumab in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. Artículo en línea, DOI: 10.1200/JCO.2006.06.4220.
- Robert, N., Leyland-Jones, B. y Asmar, L. (2006). Randomized Phase III Study of Trastuzumab, Paclitaxel, and Carboplatin Compared with Trastuzumab and Paclitaxel in Women with HER-2 Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *J. Clin Oncol.* 24: 2786 -2792.
- Slamon, D.L., Lejlend-Jones, B. y Shak, S. (2001). Use of Chemotherapy Plus Monoclonal Antibody Against HER2 for Metastatic Breast Cancer that Overexpresses HER2. *N. Engl. J Med*, 344: 783 -792.
- Secretaría de Salud (2000). *Boletín Informativo*. Centro Nacional de Farmacovigilancia. S.S.A. México, D.F., 2: 1-3.
- Secretaria de Salud (2000). *Manual de Procedimientos. Centros Estatales e Institución de Farmacovigilancia*. Centro Nacional de Farmacovigilancia. SSA. México, D.F. 2.
- Strom, B.L. (2000). *Pharmacoepidemiology*. 3ra Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone.
- Wardley, A., Anton-Torres, A. y Pivot, X. (2007). Evaluation of Trastuzumab, Docetaxel and Capecitabine as First-Line Therapy for HER2-Positive Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer. *30th San Antonio Breast Cancer Symposium*. 106: 309.

- Wolff, A.C., Bonetti, M. y Sparano, J.A. (2003). Cardiac Safety of Trastuzumab (H) in Combination with Pegylated Liposomal Doxorubicin (D) and Docetaxel (T) in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer: Preliminary Results of ECOG 3198. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 22: 18.
- World Health Organization, 2001. The Uppsala Monitoring Centre. Vigilancia de la Seguridad de los Medicamentos, guía para la Instalación y Puesta en Funcionamiento de un Centro de Farmacovigilancia. *WHO*, 4.
- World Health Organization (WHO) (2002). *Collaborating Centre for International Drug Monitoring. Viewpoint Part 1. The Uppsala Monitoring Centre*. WHO. Uppsala, Sweden. 5-48.

Capítulo X

IMC, niveles de adiponectina e IL-6 como factores interrelacionados en la carcinogénesis mamaria, implicación de la vía de señalización de leptina y adiponectina en la respuesta al tratamiento*

Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez^{1*}

Juan Juventino Torres Juárez²

Hugo Mendieta Zerón^{1, 2}

Leobardo Manuel Gómez Oliván¹

1. Introducción

1.1. Cáncer mamario

La mama es una glándula que reposa sobre el músculo pectoral en la pared torácica superior y está formada por epitelio especializado y estroma que da lugar a lesiones benignas y malignas específicas de este órgano. Del pezón se originan de seis a diez sistemas principales de conductos, las ramificaciones sucesivas de los conductos principales finalmente dan lugar a la unidad ductal terminal (Kumar *et al.*, 2010).

La neoplasia maligna no cutánea es más común de glándula mamaria en mujeres. Se dice que conforme envejece el aumento del *baby boom*, se espera que la cifra absoluta de mujeres con cáncer aumente aproximadamente un tercio en los próximos 20 años por efecto de del envejecimiento de la población.

1.2. Carcinogénesis

Un modelo general de carcinogénesis postula que una célula normal debe alcanzar siete nuevas funciones como la inestabilidad genética, pérdida de apoptosis, crecimiento autosuficiente, pérdida de inhibición del crecimiento, replicación ilimitada, angiogénesis e invasión tisular para ser maligna.

En el carcinoma hereditario una o más de estas alteraciones se ven facilitadas por la herencia de mutaciones de línea germinal. Cada una de las nuevas funciones puede alcanzarse por el cambio de uno o muchos genes, por ejemplo, los cambios en Receptor de estrógenos (RE), receptor de factor de crecimiento epidérmico, RAS o HER2/neu pueden producir una autosuficiencia en las señales de crecimiento y la otra línea que se muestra en esta investigación es la de la Leptina. Por otro lado, una alteración celular (p.ej., un cambio en un gen como el p53 con un papel central en el control del ciclo celular, la reparación de DNA y la apoptosis) puede afectar a más de una de estas aptitudes.

Las alteraciones morfológicas de la mama asociadas al aumento de riesgo menor de cáncer son lesiones con un mayor número de células epiteliales (alteraciones proliferativas). Estas alteraciones precoces se relacionan con la evasión de señales inhibitoras del crecimiento, la evasión de la apoptosis y la autosuficiencia de las señales de crecimiento. Existen datos de que incluso en esta fase precoz hay una expresión anormal de receptores hormonales y una regulación anormal de la proliferación asociada a la positividad para los receptores hormonales (Kumar *et al.*, 2010).

1.3. Obesidad y cáncer de mama

El sobrepeso y la obesidad se caracterizan por la acumulación anormal y excesiva de grasa corporal. Ambas se acompañan de alteraciones metabólicas que incrementan el riesgo para desarrollar comorbilidades tales como: hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, así como algunas neoplasias en mama, endometrio, colon y próstata, entre otras (NOM-008-SSA3-2010).

El Índice de masa corporal es el criterio diagnóstico que se obtiene dividiendo el peso en kilogramos, entre la talla en metros elevada al cuadrado (IMC) (NOM-008-SSA3-2010). La obesidad es la enfermedad caracterizada por el exceso de tejido adiposo en el organismo, la cual se determina cuando en las personas adultas existe un IMC igual o mayor a 30 kg/m² y las personas adultas de estatura baja igual o mayor a 25 kg/m². Asimismo el sobrepeso, ha caracterizado al estado por la existencia de un IMC igual o mayor a 25 kg/m² y menor a 29.9 kg/m² y en las personas adultas de estatura baja, igual o mayor a 23 kg/m² y menor a 25 kg/m² (NOM-008-SSA3-2010).

La obesidad es un factor de riesgo independiente para el cáncer de mama y los pacientes obesos con esta neoplasia presentan un riesgo mayor de tumores más grandes y de la presencia de metástasis. Además la obesidad, asociada con el síndrome metabólico, se traduce en un aumento del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF), que actúa como mitógeno. Se ha documentado ampliamente que los niveles de leptina están incrementados en caso de obesidad pero el conocimiento del mecanismo por el cual se asociaría a cáncer aún no está esclarecido del todo.

La obesidad es un factor para el desarrollo de cáncer de mama, recientes hipótesis sugieren que las adipocinas adiponectina y leptina están involucradas. Con estos hallazgos investigamos el papel de estas moléculas en pacientes con cáncer de mama (Jardé *et al.*, 2009).

1.4. Adiponectina y Cáncer de mama

También referida como *gelatin-binding protein-28*, adipoQ o proteína complementaria, relacionada con el adipocito de 30 kDa (Maeda *et al.*, 1996). Es una proteína de 244 aminoácidos, producto del gen apM1 el cual es específica y altamente expresada en células adiposas humanas (1996). Tiene homología estructural con el colágeno VIII y X y el factor de complemento C1q (Kishore *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 1996; Takahashi *et al.*, 2000). Se le atribuyen propiedades anti-aterogénicas y anti-inflamatorias (Yokota *et al.*, 2000).

En humanos, la adiponectina actúa a través de dos receptores: AdipoR1 y AdipoR2, que comparten 67% de identidad con el gen de ratón (Yamauchi *et al.*, 2002). AdipoR1 está expresado ampliamente en diversos tejidos, incluyendo músculo, hígado y páncreas y une la forma globular de la adiponectina con gran afinidad (Wu *et al.*, 2003). AdipoR2 se encuentra más abundantemente en hígado (Yamauchi *et al.*, 2003) y une principalmente la forma *full-length*. Recientemente, ambos, AdipoR1 y AdipoR2 se encontraron expresados abundantemente en las células beta pancreáticas de humanos y rata (Karroubi *et al.*, 2003). Por estudios de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) se ha sugerido que mutaciones de AdipoR1 pudieran estar implicadas en el síndrome metabólico al disminuir la sensibilidad a insulina. Las concentraciones de adiponectina correlacionan negativamente con la glucosa plasmática, insulina, triglicéridos, índice de masa corporal (IMC) y positivamente con HDL (Hotta *et al.*, 2000). Se ha reforzado la evidencia de la relación entre hipoadipo-

nectinemia y síndrome metabólico (Matsuzawa *et al.*, 1999). También hay evidencia de que la pérdida de peso induce un incremento en los niveles de adiponectina. Arita *et al.* (1999) demostraron que los niveles promedio de adiponectina plasmática son de 3.7 mg/mL en pacientes obesos, mientras que en no obesos fueron de 8.9 mg/mL.

La adiponectina tiene una respuesta antiproliferativa al unirse a genes involucrados en la regulación del ciclo celular MAPK3 y ATM, mientras que la leptina induce expresión de mRNA del receptor de progesterona.

Los péptidos de leptina derivados de adipocitos actúan a través de uniones específicas a receptores de membrana, de los cuales han sido identificadas 6 isoformas (obRa-obRf) el dominio extracelular de cinco formas es idéntico; hasta ahora se cree que las formas cortas no tienen la capacidad completa de receptor las cuales incluye a obRa, obRc, obRd, obRf. Sólo la isoforma obRb tiene el potencial de señalización completo (Cirillo, *et al.*, 2008).

La expresión de leptina y sus receptores se presenta en líneas celulares de cáncer de mama y en carcinoma de mama humano primario. La leptina es capaz de inducir el crecimiento de las células de cáncer de mama a través de la activación de las vías Jak2/STAT3, ERK1/2 y PI3K, pudiendo mediar la angiogénesis por inducción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). La leptina puede afectar también el crecimiento del receptor de estrógenos (ER)-positivo, de las células de cáncer de mama, por estimulación de la expresión de aromatasa, incrementando los niveles de estrógenos a través de la aromatización de andrógenos y por inducción de la activación de MAPK-(ER) dependiente (Oh *et al.*, 2011).

Existe una interacción entre las vías de señalización de leptina y de adiponectina en la línea celular de cáncer de mama MCF-7, en la que se observa que la estimulación de leptina es suprimida por adiponectina (Jardé *et al.*, 2009).

1.4. Interleucina 6 y cáncer mamario

La interleucina 6 (IL-6) es una citocina proinflamatoria producida por monocitos, macrófagos, células endoteliales involucradas en la activación de linfocitos T, B y células Natural Killer dirigidas a fagocitar células patógenas, además de que la IL-6 produce efectos multifuncionales y pleiotrópicos (Lukaszewicz *et al.*, 2007). Está involucrada en la respues-

ta inmune, estado inflamatorio y de hematopoyesis. La producción de esta interleucina es estimulada por interleucina 1 (IL-1), interferon (INF), Factor de necrosis, lipopolisacárido, virus de ADN y ARN. El papel de esta citocina proinflamatoria en la activación y diferenciación de linfocitos T citotóxicos y NK es bien conocido, la vía de efectos anticancerígenos de IL-6 fue usado en terapia contra cáncer. Algunos investigadores han reportado que esta citocina se sobre expresa e incrementa al antígeno carcinoembrionario y antígenos HLA tipo I en la superficie de células de cáncer colorectal. Esto condujo al uso de IL-6 para inhibición directa de proliferación celular de cáncer. Desafortunadamente, en algunos tumores sólidos, IL-6 puede crecer estimulada vía autocrina y paracrina como por ejemplo en carcinoma mamario.

2. Metodología

2.1. Diseño de estudio

Se planteó un estudio observacional, prospectivo y transversal en el que se seleccionaron por criterios de inclusión, pacientes con mastografía previa, las cuales fueron candidatas a biopsia, previo a la toma de sangre, firmaron consentimiento informado. De la muestra de biopsia se obtuvo reporte histopatológico por tinción de hematoxilina y Eosina, con el cual las pacientes se clasificaron en pacientes con cáncer y sin cáncer. El tamaño de muestra fue por conveniencia, mínimo 30 incluyendo los dos grupos en un período de 6 meses (Diciembre 2010 - Junio 2011). En total fueron 37 pacientes. Como criterios de exclusión fueron pacientes con tratamiento antineoplásico u hormonal y pacientes embarazadas, así como de eliminación: pacientes cuyo seguimiento se pierda. El diseño de estudio fue aprobado por comité de Ética del Hospital y del Centro de Investigación en Ciencias Médicas, sitio donde se realizó el análisis de muestras sanguíneas.

2.2. Determinación de medidas antropométricas IMC y evaluación bioquímica

Evaluación antropométrica: La circunferencia de la cintura se midió con una medición de cero de la cinta en el punto más alto de la cresta ilíaca al final de la expiración normal, a el más cercano 0,1 cm. El peso de los participantes se evaluó sobre un mínimo de ropa con una escala TANI-

TA electrónica previamente calibrada. La estatura se midió con un estadiómetro convencional. El IMC fue calculado como el peso (Kg) dividido por la estatura en metros al cuadrado (m^2). La Evaluación bioquímica se obtuvo mediante concentración de algunos marcadores bioquímicos, se obtuvieron niveles de colesterol, triglicéridos, hemoglobina, glucosa basal, así como de adiponectina.

La química sanguínea y biometría hemática se procesarán de manera automatizada en aparatos Becton **Dickinson**. Los niveles glucosa serán determinados con el método de glucosa oxidasa, mientras que los triglicéridos serán determinados con un método colorimétrico después de la hidrólisis enzimática con una técnica de lipasas y el colesterol HDL por la eliminación de posterior de quilomicrones y catalasa.

2.3. Determinación de Adiponectina

La asociación entre adiponectina y cáncer mamario en este estudio, se midieron en suero de las pacientes por la técnica de inmunoensayo, ELISA la concentración de este biomarcador, en el cual no se aprecia significancia en ambos grupos en la cual se espera un valor normal o menor de la concentración de adiponectina. En este caso se propone medir también la leptina a fin de encontrar la asociación de estos factores en la carcinogénesis mamaria (Ver figura 2).

2.4. Determinación de interleucina 6

Se empleó el equipo Modular Roche, por técnica de electroquimioluminiscencia para la determinación de interleucina 6.

2.5. Análisis estadístico

Para evaluar la interrelación entre los grupos se utilizará la prueba de U de Mann Whitney para pruebas no paramétricas, una vez analizadas por el método kolmogorov-Smirnov, se determinó media, desviación estándar y error. Se obtuvieron Intervalos de Confianza al 95% (I.C. al 95%). Se consideraron como significativos los valores de $p < 0.05$. Todos los análisis serán realizados usando el software SPSS versión 19. Se obtuvieron gráficas tipo bigote para la comparación entre los dos grupos.

3. Resultados y discusión

3.1. Resultados de evaluación antropométrica IMC y bioquímica

La interrelación existente entre varios parámetros antropométricos se ha reportado en distintos estudios, en el presente se encontró que el IMC entre los grupos hay significancia debido al aumento de peso y talla disminuida en las pacientes, a mayor masa corporal aumenta la concentración de adipocitos o el tamaño de éstos, lo cual sugiere el aumento de la leptina y la disminución de la adiponectina; esta última confiere un factor protector. En este grupo de pacientes también se aprecia significancia en los niveles de ácido úrico, lo cual sugiere intervención de algunas otras vías de señalización como de proteínas (ver tabla 1), estos datos muestran la asociación de sobrepeso y obesidad en pacientes con cáncer mamario como se observa en la figura 1.

En este estudio se puede observar que con el análisis estadístico empleado no se observa significancia entre interleucina 6 y adiponectina, por lo que se observó que el valor de p en pacientes sin cáncer es de 0.07 y 0.095 respectivamente. Sin embargo, se sugiere que al aumentar el número de pacientes en estudios posteriores o en un estudio de meta-análisis se podría comprobar que efectivamente existe una interrelación ya que en las gráficas de bigote si se alcanza a observar mínima asociación.

Tabla 1. Descripción de los factores en pacientes con y sin cáncer de mama

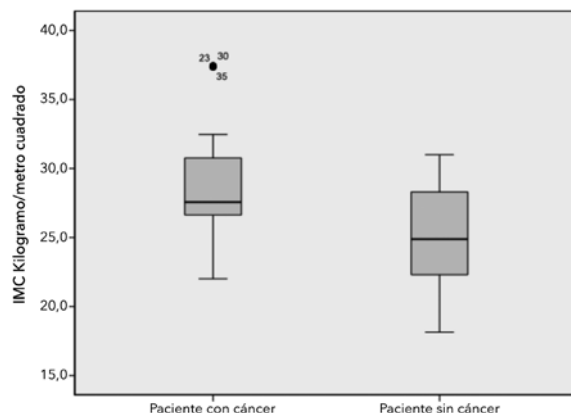
Factor	Diagnóstico	N	Media	Desviación Std.	Media error Std.	P	IC 95%	
IMC (Kg/m2)	Con cáncer	29	28,70	4,00	0,74	0,010	0,9323	6,3933
	Sin cáncer	13	25,04	4,17	1,16	0,014		
Cintura (cm)	Con cáncer	25	93,98	11,03	2,21	0,021	1,367	15,978
	Sin cáncer	13	85,31	9,46	2,62	0,017		
Glucosa (mg/dL)	Con cáncer	27	93,81	26,23	5,05	0,289	-7,8982	25,8355
	Sin cáncer	13	84,85	20,94	5,81	0,253		
Colesterol (mg/dL)	Con cáncer	28	201,24	37,66	7,12	0,146	-7,4726	48,4199
	Sin cáncer	13	180,77	48,13	13,35	0,192		
Triglicéridos (mg/dL)	Con cáncer	28	164,65	78,22	14,78	0,705	-105,4761	72,0140
	Sin cáncer	13	181,38	204,39	56,69	0,779		

Continúa...

Factor	Diagnóstico	N	Media	Des- viación Std.	Media error Std.	P	IC 95%	
HDLc (mg/dL)	Con cáncer	27	45,76	10,30	1,98	0,940	-7,0377	6,5328
	Sin cáncer	13	46,02	9,08	2,52	0,938		
LDLc (mg/dL)	Con cáncer	27	125,16	26,79	5,15	0,058	-,6506	37,8848
	Sin cáncer	13	106,54	31,03	8,61	0,078		
IL-6 (pg/mL)	Con cáncer	19	4,58	3,59	0,82	0,139	-,5934	4,0250
	Sin cáncer	11	2,86	1,27	0,38	0,071		
Adiponectina (mg/mL)	Con cáncer	20	21,96	11,46	2,56	0,151	-2,2704	13,9734
	Sin cáncer	10	16,11	6,99	2,21	0,095		
Acido úrico (mg/dL)	Con cáncer	27	4,22	1,05	0,20	0,021	0,1409	1,6133
	Sin cáncer	13	3,34	1,14	0,32	0,029		
Peso (Kg)	Con cáncer	29	69,53	11,59	2,15	0,071	-,5920	14,0729
	Sin cáncer	13	62,79	8,98	2,49	0,050		
Talla (m)	Con cáncer	29	1,55	0,06	0,01	0,093	-,07093	,00571
	Sin cáncer	13	1,59	0,06	0,02	0,101		
Edad (años)	Con cáncer	33	51,33	12,061	2,100	0,005	3,395	18,146
	Sin cáncer	16	40,56	11,978	2,994	0,006		

La obesidad en las mujeres posmenopáusicas se asocia con mayor riesgo de cáncer mamario, el desarrollo de los tumores más agresivos y la resistencia a determinados tratamientos contra el cáncer de mama (Rahmati-Yamchi *et al.* 2011). Algunos de estos efectos pueden estar mediados por la hormona leptina, actuando de forma independiente o a través de la modulación de otras vías de señalización. La coexpresión del receptor tipo 2, del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), y del sistema leptina/ObR podrían contribuir a la mayor actividad de HER2 y la sensibilidad disminuida de los tratamientos anti HER2 (Perera *et al.*, 2008). Esto se pudo observar en pacientes con cáncer de alto riesgo o clasificados en estadios avanzados de cáncer mamario, además de estar relacionado con receptores hormonales en las células de estas pacientes como lo son receptores de estrógenos y receptores de progesterona, al igual que el HER2, datos no mostrados.

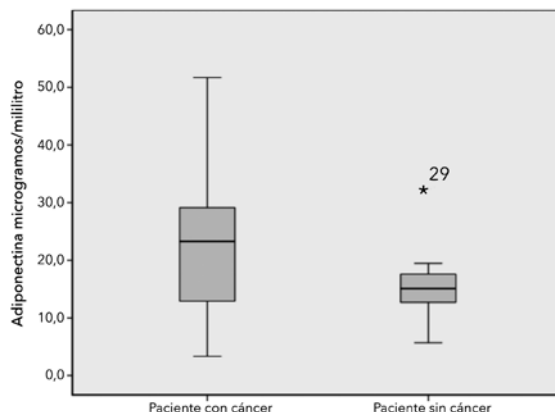
Figura 1. Resultados de IMC pacientes con y sin cáncer



3.2. Resultados de Adiponectina

Los datos disponibles sugieren que la adiponectina podría reducir la gluconeogénesis e incrementar la utilización de la glucosa en el músculo, posiblemente al aumentar la oxidación de los lípidos y por lo tanto, reduciendo los niveles de ácidos grasos no esteroideos y su consecuente acumulación intramiocelular. En los resultados obtenidos de este trabajo no se observa asociación significativa pero, en la figura 2 se aprecia un rango amplio de las variaciones entre los resultados de las pacientes con cáncer en comparación con las que no tienen cáncer lo cual propone también un efecto protector por parte de la adiponectina en las pacientes sin cáncer, como se reporta en estudios recientes (Jardé *et al.*, 2009).

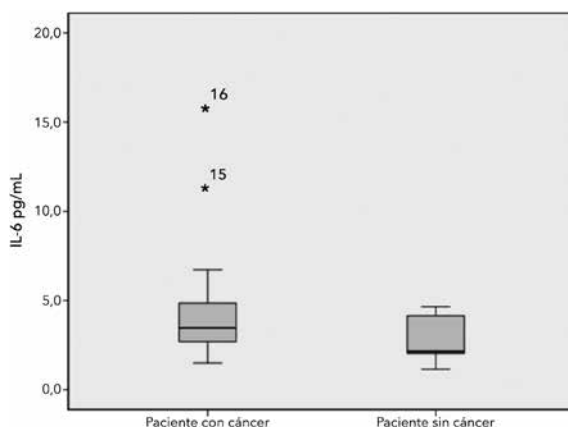
Figura 2. Resultados de Adiponectina en pacientes con y sin cáncer



3.3. Resultados de Interleucina 6

Cuando los niveles séricos de IL-6 aumentan, esto se asocia con estado avanzado, malignidad, tamaño del tumor y corta sobrevivencia en pacientes con este tipo de cáncer; en nuestra investigación empleamos electroquimioluminiscencia para la medición en suero de pacientes con diagnóstico de cáncer y sin cáncer en la que de acuerdo a los valores de referencia, un valor normal es hasta 7 pg/mL. Nuestras pacientes parecen todas tener buen pronóstico, debido a que no se encuentran valores fuera del límite superior y a que han acudido a tiempo a realizarse estudios exploratorios por imagenología (Abe *et al.*, 2007, Bitterman *et al.*, 2002, Bray, 2004, Lukaszewicz *et al.*, 2007, Purohit *et al.*, 2002, Ravishankaran y Karunanithi, 2011, Zhao *et al.*, 2011, Zhou *et al.*, 2011).

Figura 3. Resultados de IL-6 pacientes con y sin cáncer.



4. Tratamiento empleado en el tratamiento de Cáncer de mama

En este artículo, se analiza también las posibilidades de tratamiento que tienen las pacientes con cáncer mamario el cual está determinado por las siguientes características de acuerdo a lo reportado en la literatura.

El tratamiento tiene un doble objetivo:

- a) Regional (sobre el tumor y áreas ganglionares): En este sentido actúa las radioterapias y la cirugía.

- b) General o sistémico: sobre la enfermedad metastásica visible o subclínica en forma de micrometástasis, con este propósito se administra la quimioterapia y hormonas (Duce *et al.*, 2004).

4.1. Tratamiento Sistémico

Debido a la estructura del estudio nos enfocaremos al tratamiento sistémico el cual consta de fármacos antineoplásicos los cuales destruyen las células tumorales malignas. En general su mecanismo de acción afecta la integridad de las cadenas de los ácidos nucleicos, especialmente el DNA, impidiendo la replicación normal. Desafortunadamente, ciertas células sanas también son destruidas en este proceso, lo cual lleva a que se presenten efectos tóxicos secundarios (Duce *et al.*, 2004).

Si al tratamiento regional operable del cáncer de mama, se añade quimioterapia u hormonoterapia adyuvantes, se aumenta el periodo libre de enfermedad y la supervivencia. Los esquemas más utilizados de quimioterapia para cáncer de mama son: CMF (ciclofosfamida, metrotexate y 5-fluorouracilo), CAF (ciclofosfamida, adriamicina y 5-fluorouracilo), AC (adriamicina y ciclofosfamida), combinaciones de taxanos como el Paclitaxel y Docetaxel, y Cisplatino (Duce *et al.*, 2004).

De manera específica, el mecanismo de acción de los fármacos más utilizados en el cáncer de mama son:

Ciclofosfamida: Profármaco perteneciente al grupo de los agentes alquilantes. Es activado por la oxidación del carbono 4 por medio de la vía hepática del citocromo p450 cuyo resultado es el 4-hidroxíciclofosfamida, el cual es rápidamente convertido en el aldehído acíclico aldofosfamida, que espontáneamente se convierte a acroleína y mostaza fosforamida, los cuales son productos activos de la citotoxicidad de células neoplásicas, siendo la mostaza fosforamida el que produce oxidación lipídica y enlaces entre la posición N7 de las guaninas del DNA (Hansen J, 2007). El 4-hidroxíciclofosfamida sufre una deshidratación reversible para generar immuno ciclofosfamida, que es conjugado con glutatión intracelular por medio de la catalización de varias glutatión S-transferasas (GSTA1, GSTM1, GSTT1 y GSTP1) (Zhong *et al.*, 2006). Se sabe que la ciclofosfamida es un agente inmunomodulador y la disminución de GSH y/o el aumento del estrés oxidativo, pudiendo afectar la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial, principal factor angiogénico durante la

carcinogénesis en muchos tipos de cáncer y del crecimiento del tejido maligno. (Wu *et al.*, 2009).

Doxorrubicina: Antibiótico del grupo de las antraciclinas producido por el *Streptococcus peucetis* con actividad antineoplásica inhibiendo y bloqueando el proceso de transcripción (Gallego-Rubio, 2006).

Metrotexate: Fármaco antineoplásico que interfiere en la síntesis *de novo* de bases púricas y pirimidínicas, altamente dependientes de ácido fólico por inhibición de la enzima dihidrofolato-reductasa, generando imposibilidad de síntesis de ácidos nucleicos. Probablemente la acción principal es acumulación intracelular de derivados tóxicos del ácido fólico. Este fármaco sólo actúa en la fase S del ciclo celular (Quiñones, L., 2000).

5-fluorouracilo: Ampliamente utilizado en el tratamiento de cáncer, se comporta inhibiendo la enzima productora de Timidinmonofosfato y procesos de transformación alterando el proceso de síntesis del DNA y RNA o en su traducción (Longley *et al.*, 2003).

Paclitaxel: Quimioterapéutico altamente utilizado del grupo de los taxanos, proveniente del árbol de tejo pacífico; se une a la β -tubulina de los microtúbulos, que forman el huso mitótico, haciendo que exista la estabilización de los microtúbulos aumentando la polimerización de éstos y creando un efecto antitumoral interrumpiendo la mitosis en la transición de metafase a anafase, induciendo la apoptosis (Flatters *et al.*, 2006).

Docetaxel: Uno de los fármacos antineoplásicos más efectivos, del grupo de los taxanos, su actividad citotóxica se da por la promoción la polimerización y estabilización de la tubulina, dicha estabilización crea detención del ciclo celular en las fases de G2 a M, el cual da como resultado final la apoptosis (Mizumachi, T., 2008; Brunsvig, P., 2007; Rouzier, R., 2005)

Cisplatino: Se han sugerido varios mecanismos por los que el cisplatino produce citotoxicidad, mal proceso de reparación del DNA y el incremento de especies reactivas, las cuales contribuyen a la muerte celular en varias vías. Al ser activado este tipo de fármacos, quedan libres dos valencias del ión platino, que forman dos enlaces estables con componentes del DNA; usualmente con dos moléculas de guanina adyacentes en la misma cadena, pero también formando puentes entre las cadenas. El resultado es la producción de errores de transcripción y la imposibilidad de que las cadenas se separen para generar la replicación celular (Lu, Y., 2007).

La Quimioterapia es utilizada bajo varias modalidades, que son la terapia neoadyuvante, adyuvante y paliativa, las cuales se describen a continuación.

La terapia neoadyuvante, cuyo término se introdujo en 1982 por Frei, se caracteriza por la administración de quimioterapia antes de la cirugía para crear una citoreducción del tumor en pacientes con etapas clínicas avanzadas (Gómez *et al.*, 2003; Inciura A., 2006). Las observaciones de mejoría de sobrevida después de la administración de quimioterapia en su uso neoadyuvante, sugieren que la administración de quimioterapia como tratamiento primario, puede minimizar la emergencia de clones quimioresistentes y por tanto reducir o erradicar la enfermedad metastásica. Las razones para el uso de tratamiento preoperatorio están basadas en su potencial beneficio clínico, mejorando el control local de la enfermedad y permitiendo la cirugía conservadora de la mama. Este tipo de terapia se ha convertido en el tratamiento estándar para pacientes con tumores iguales o mayores a 3 cm y en cáncer de mama local avanzado T3, T4, N2 (Cortés *et al.*, 2008). La terapia adyuvante está dada por la administración de quimioterapia o terapia endocrina después de la cirugía primaria en etapas tempranas de la enfermedad, con el objetivo de eliminar la posible existencia de la enfermedad residual microscópica y disminuir el riesgo de recidiva local o diseminada a distancia y aumentar la supervivencia en etapas tempranas de cáncer de mama (Hickey *et al.*, 2009).

La hormonoterapia incluye antiestrógenos (tamoxifeno), ablación ovárica, inhibidores de aromatas, progestágenos, etc (Duce *et al.*, 2004) también son fármacos que se pueden utilizar en el terreno neoadyuvante o adyuvante de acuerdo a las características de las pacientes y factores predictivos de respuesta al tratamiento.

La terapia blanco, también llamada terapia biológica, es la herramienta más reciente para el tratamiento para el cáncer. Esta terapia utiliza drogas antineoplásicas especiales que van dirigidas a ciertos receptores que se encuentran activados en una célula maligna. Una de estas drogas es el trastuzumab. Para las mujeres con cáncer de mama positivo para HER2 en etapa IV, el trastuzumab más la quimioterapia han demostrado que funcionan mejor que la quimioterapia sola. Otros estudios también han demostrado que en mujeres con cáncer de mama positivo para HER2, en etapa precoz, al utilizar este medicamento más la quimioterapia adyuvante reducen el riesgo de recaída en un 33% (Duce *et al.*, 2004; Wichester, 2001, Cortés *et al.*, 2008).

5. Conclusiones

Los resultados de este trabajo sugieren que debería emplearse como parte de diagnóstico y seguimiento del cáncer mamario, el IMC y la adiponectina, que podrían funcionar como biomarcadores, si se amplía el tamaño de muestra y se realiza en otros hospitales en los que se atienden a pacientes con estas patologías, lo cual podría ofrecer información en el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad y el esclarecimiento de las vías de señalización para implementar terapias específicas aúadas al tratamiento estándar.

5.1. Implicación de la vía de señalización de la leptina y adiponectina en el tratamiento

Por otro lado, una vez conocido el tratamiento sistémico empleado para cáncer de mama nos podemos dar cuenta que el objetivo principal estriba en el bloqueo de mecanismos de señalización, tal es el de la leptina, la cual una vez unida a su receptor, activa dos vías según el sustrato que fosforile en este caso, es la cinasa de Janus 2 (JAK-2), esta activa al traductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT-3), en esta vía actúa un mecanismo de supresión el supresor de la señalización de citocinas 3 (SOCS-3) inhibe este mecanismo de señalización. En diferentes estudios se han probado molécula que suprimen esta vía impidiendo que se active MAPK (Murray *et al*, 2007).

6. Referencias

- Abe, H., Schmidt, R.A., Sennett, C.A., Shimauchi, A. y Newstead, G.M. (2007). US-Guided Core Needle Biopsy of Axillary Lymph Nodes in Patients with Breast Cancer: Why and How to Do It. *Radiographics*. 27: 91-99.
- Arita, Y., Kiharas, S. y Ouchi, N. (1999). Paradoxical Decrease of an Adipose-specific Protein, Adiponectin in Obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 79-83.
- Bitterman, A., Bleicher, R.J., Cabot, M.C., Liu, Y.Y. y Giuliano A.E. (2002). Sentinel Lymphadenectomy: A New Alternative for Managing Early Breast Cancer. *Isr. Med. Assoc. J.* 4: 803-809.

- Bray, G.A. (2004). Medical Consequences of Obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 2583-2589.
- Brunsvig, P. y Andersen, A. (2007). Pharmacokinetic Analysis of two Different Docetaxel Dose Levels in Patients with Non Small Cell Lung Cancer Treated with Docetaxel as Monotherapy or with Concurrent Radiotherapy. *BMC Cancer.* 7:197.
- Cirillo, D., Rachiglio, A.M., La Montagna, R., Giordano, A. y Normanno, N. (2008). Leptin Signaling in Breast Cancer: An Overview. *J. Cell. Biochem.* 105: 956-964.
- Cortés, A., Morgan, G. y Castro, J.M. (2008). Tratamiento Neoadyuvante del Cáncer de Mama Localmente Avanzado. Comparación de dos Esquemas a Base de Doxetacel-Epirrubicina Versus, 5-Fluourouraciloepirrubicina-Ciclofosfamida. *Cirugía y cirujanos.* 76: 23-28.
- Duce, M. (2004). *Patología Quirúrgica*, Editorial Elsevier, España, 41-452.
- Flatters, S. y Bennett, G. (2006). Studies of Peripheral Sensory Nerves in Paclitaxel-Induced Painful Peripheral Neuropathy: Evidence for Mitochondrial Dysfunction. *Pain.* 122: 245-257.
- Gallego-Rubio, O., Montesinos-Muñoz, J. y Loza-Gaspar, F. (2006). Estudio Fase II: Doxorubicina Liposomal Pegilada y Ciclofosfamida en pacientes con cáncer de ovario avanzado platinoresistentes. *Oncología.* 29:114-123.
- Hansen, R., Ludeman, S. y Paikoff, S. (2007). Role of MGMT in Protecting against Cyclophosphamide-Induced Toxicity in Cells and Animals. *DNA Repair.* 6: 1145-1154.
- Hickey, M., Peate, M. y Saunders, C.M. (2009). Breast Cancer in Young Women and Its Impact on Reproductive Function. *Human reproduction Update.* 15:323-339.
- Hotta, K., Funahashi, T. y Arita, Y. (2000). Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, In Type 2 Diabetic Patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:1595-1599.
- Inciura, A., Simavicius, A. and Jouzaityte, E., 2006. Comparison of Adjuvant and Neoadjuvant Chemoterapy in the Managment of Advanced Ovarian Cancer: A Retrospective Study of 547 Patients. *BMC Cancer.* 6: 153.

- Jardé, T., Caldefie-Chézet, F., Goncalves-Mendes, N., Mishellany, F., Buechler, C., Penault-Illorca, F. y Vasson, M. (2009). Involvement of Adiponectin and Leptin in Breast Cancer: Clinical and in Vitro Studies. *Endocrine-Related Cancer*. 16:1197-1210.
- Kharroubi, i., rasschaert, j., eizirik, d.l. y cnop, M. (2003). Expression of Adiponectin Receptors in Pancreatic Beta Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312: 1118-1122.
- Kishore, U. and Reid, K.B. (2000). C1q: Structure, Function, and Receptors. *Immunopharmacology*. 49: 159-70.
- Kumar, V., Cotran, R.S. y Robbins, S. (2010). *Patología Humana*. 10ª Ed. España: Edit Elsevier.
- Longley, D., Harkin, P. y Johnston, P. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nature Reviews Cancer*. 3:330-338.
- Lu, Y. y Cederbaum, A. (2007). The Mode of Cisplatin-induced Cell Death in CYP2E1-overexpressing HepG2 Cells: Modulation by ERK, ROS, Glutathione, and Thioredoxin. *Free Radic. Biol. Med.* 43: 1061-1075.
- Lukaszewicz, M., Mroczko, B. y Szmítowski, M. (2007). Clinical Significance of Interleukin-6 (IL-6) as a Prognostic Factor of Cancer Disease. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 117:247-251.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. y Matsubara, K. (1996). cDNA Cloning and Expression of a Novel Adipose Specific Collagen-like Factor, apM1 (AdiPose Most Abundant Gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 286-289.
- Matsuzawa, Y., Funahashi, T. y Nakamura, T. (1999). Molecular Mechanism of Metabolic Syndrome X: Contribution of Adipocytokines Adipocyte-derived Bioactive Substances. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 892: 146-154.
- Mizumachi, T. y Suzuki, S. (2008). Increased Mitochondrial DNA induces Acquired Docetaxel Resistance in Head and Neck Cancer Cells. *Oncogene*. 27:831-838.
- Murray, P.J. (2007). The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. *J. Immunol.* 178: 2623-2629.

NORMA Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2010, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la obesidad.

Oh, S.W., Park, C.Y., Lee, E.S., Yoon, Y.S., Park, S.S., Kim, Y., Sung, N.J., Yun, Y.H., Lee, K.S., Kang, H.S., Kwon, Y. y Ro, J. (2011). Adipokines, Insulin Resistance, Metabolic Syndrome, and Breast Cancer Recurrence: a Cohort Study. *Breast Cancer Res.* 13: R34.

Perera, C.N., Chin, H.G., Duru, N. and Camarillo, I.G. (2008). Leptin-regulated Gene Expression in MCF-7 Breast Cancer Cells: Mechanistic Insights into Leptin-regulated Mammary Tumor Growth and Progression. *J. Endocrinol.* 199: 221-233.

Purohit, A., Newman, S.P. y Reed, M.J. (2002). The Role of Cytokines in Regulating Estrogen Synthesis: Implications for the Etiology of Breast Cancer. *Breast Cancer Res.* 4:65-69.

Quiñones, L., Lee, K., Varela, F. y Nelson (2006). Farmacogénica del cáncer: Estudio de Variaciones Genéticamente Determinadas en la Susceptibilidad a Cáncer por Exposición a Xenobióticos. *Rev. Med. Chile.* 134: 459-515.

Rahmati-Yamchi, M., Zarghami, N., Rahbani, M. y Montazeri, A. (2011). Plasma Leptin, hTERT Gene Expression, and Anthropometric Measures in Obese and Non-Obese Women with Breast Cancer. *Breast Cancer (Auckl).* 5: 27-35.

Ravishankaran, P. y Karunanithi, R. (2011). Clinical Significance of Preoperative Serum Interleukin-6 and C - reactive protein Level in Breast Cancer Patients. *World J. Surg. Oncol.* 9:18.

Takahashi, M., Arita, Y. y Yamagata, K. (2000). Genomic Structure and Mutations in Adipose-Specific Gene, Adiponectin. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24: 861-8.

Wu, X., Motoshima, H., Mahadev, K., Stalker, T.J., Scalia, R. y Goldstein, B.J. (2003). Involvement of AMP-Activated Protein Kinase in Glucose Uptake Stimulated by the Globular Domain of Adiponectin in Primary Rat Adipocytes. *Diabetes.* 52: 1355-1363.

Yamauchi, T., Kamon, J. e Ito, Y., 2003. Cloning of Adiponectin Receptors that Mediate Antidiabetic Metabolic Effects. *Nature.* 423: 762-769.

- Yamauchi, T., Kamon, J. y Minokoshi, Y., 2002. Adiponectin Stimulates Glucose Utilization and Fatty-acid Oxidation by Activating AMP-activated Protein Kinase. *Nat Med.* 8: 1288-95.
- Yokota, T., Oritani, K. y Takahashi, I. (2000). Adiponectin, a New Member of the Family of Soluble Defense Collagens, Negatively Regulates the Growth of Myelomonocytic Progenitors and the Functions of Macrophages. *Blood.* 96: 1723-1732.
- Zhao, X., Sun, X., Gao, F., Luo, J. y Sun, Z. (2011). Effects of Ulinastatin and Docataxel on Breast Tumor Growth and Expression of IL-6, IL-8, and TNF-alpha. *J. Exp Clin Cancer Res.* 30: 22.
- Zhong, S., Huang, M. y Yang, X. (2006). Relationship of glutathione S-transferase genotypes with side-effects of pulsed cyclophosphamide therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 62:457-72.
- Zhou, W., Guo, S. y Gonzalez-Perez, R.R. (2011). Leptin Pro-angiogenic Signature in Breast Cancer is linked to IL-1 signalling. *Br. J. Cancer.* 104: 128-137.

Capítulo XI

Farmacología de la nicotina y sus efectos en sistema nervioso central*

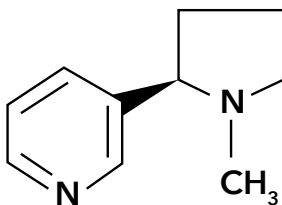
Patricia Vieyra Reyes¹
Clementina Jiménez Garcés¹
Margarita Hernández González¹
Leobardo Manuel Gómez Oliván^{2 *}

1. Antecedentes y Aportaciones

1.1 Farmacología de nicotina

La nicotina es una amina terciaria compuesta por una piridina y un anillo de pirrolidina (Figura 1).

Figura 1. Estructura de la Nicotina.



Cuando el tabaco es fumado la nicotina es absorbida rápidamente, aunque la cantidad absorbida depende del volumen e intensidad de succión, la dilución con el aire y la profundidad de la inhalación. Después de la primer bocanada o succión, se alcanzan altos niveles de nicotina en el cerebro en 10 o 20 segundos, mas rápido que con administración intravenosa (Benowitz, 2009). Las concentraciones de nicotina en la sangre arterial, después de fumar un cigarro, son usualmente entre 20 y 60 ng/ml y las concentraciones después de la primer bocanada son 7 ng/ml (Lunell et al., 2000).

La absorción de nicotina a través de las membranas biológicas depende del pH. La absorción es rápida en pulmones, presumiblemente por la amplia área que presentan los alveolos y el pH pulmonar (7.4). Cerca de 1 mg (0.3 - 2 mg) de nicotina es absorbido al momento de fumar un cigarrillo (Gori y Lynch, 1985; Lee *et al.*, 2004).

Las terapias de reemplazo de nicotina (TRN) tales como la goma de mascar, parches transdermales, spray nasal y tabletas sublinguales tienen pH alcalino para facilitar la absorción de nicotina a través de las membranas biológicas sin embargo, la absorción es baja e incrementa los niveles de nicotina más gradualmente que con el fumar.

Posterior a su absorción, la nicotina entra en el torrente sanguíneo donde a un pH de 7.4 el 69% es ionizada, el 31% es desionizada y el 5% se une a proteínas plasmáticas (Benowitz *et al.*, 1982). Evidencias provenientes de estudios animales muestran que los tejidos con mayor afinidad para la nicotina son el riñón, hígado, pulmón, cerebro y corazón, en este orden; el músculo esquelético tiene moderada afinidad para la nicotina y el tejido adiposo tiene la mas baja afinidad (Benowitz, 1990). No obstante, basados en muestras de autopsias de fumadores, la nicotina tiene mayor afinidad por el hígado, seguida por riñón, bazo y pulmones y la más baja afinidad es por el tejido adiposo (Urakawa *et al.*, 1994) denotando que la afinidad depende de la vía de administración.

Con la administración transdermal de nicotina, las concentraciones de esta sustancia en jugo gástrico son 60 veces más altas que en plasma; pero en saliva son 11 veces más altas que en plasma. Más aún, debemos tomar en cuenta que con la administración de nicotina, al fumar, las concentraciones en jugo gástrico son 53 veces más altas que en plasma y 87 veces más altas en saliva. (Lindell *et al.*, 1996). La nicotina tiene un bajo volumen de absorción en estomago porque es ionizada en el jugo gástrico pero es mejor absorbida en intestino delgado porque tiene un pH más alcalino y posee una gran superficie de absorción. La nicotina también se acumula en la leche materna, además de que cruza la barrera placentaria fácilmente y existe evidencia de acumulación de nicotina en suero fetal y líquido amniótico, en concentraciones mayores que en el suero materno (Dempsey y Benowitz, 2001).

1.2. Metabolismo de nicotina

Los niveles más altos de nicotina en sangre se alcanzan al terminar de fumar un cigarrillo y declinan rápidamente en los siguientes 20 minutos por la amplia distribución en los tejidos corporales. El volumen de distribución en humanos es 2.6 veces el peso corporal (Rose *et al.*, 1999).

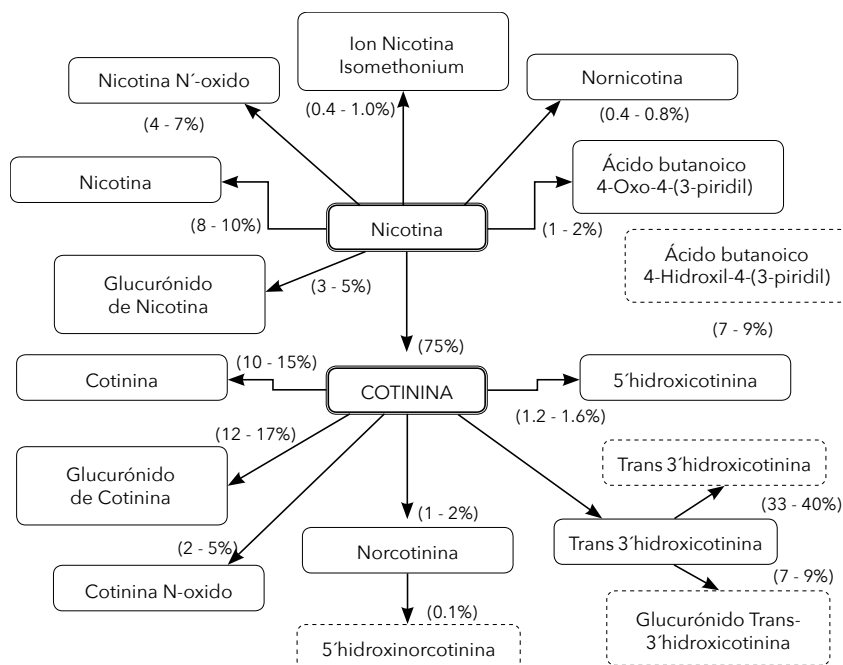
La nicotina es metabolizada por el hígado y se han identificado al menos seis metabolitos primarios, siendo cuantitativamente el más importante la cotinina. Otros metabolitos primarios son la nicotina-N'-óxido y el glucurónido de nicotina. Los metabolitos de cotinina son los siguientes: glucurónido de cotinina, trans-3'-hidroxicotinina y glucurónido trans-3'-hidroxicotinina (figura 2).

Nicotina y cotinina forman glucurónidos *N*-cuaternarios, mientras que trans-3'-hidroxycotinina forma principalmente *O*-glucurónido.

La exposición crónica a nicotina puede aumentar 15 veces los niveles plasmáticos de cotinina, mientras que los niveles plasmáticos de trans-3'-hidroxicotinina aumentan de tres a cinco veces más que los niveles de nicotina en plasma (Benowitz, 1990). Especies animales como ratones, perros, conejos y monos, metabolizan la nicotina de la misma manera que los humanos; por el contrario, las ratas y cuyos metabolizan tanto nicotina-N'-óxido como cotinina y 3'-hidroxicotinina (debido a diferencias en el citocromo P450 predominante (CYP); enzima enzimas presentes en estas especies), por tal motivo, no son los modelos animales óptimos para investigar el metabolismo humano de la nicotina.

La nicotina es rápidamente metabolizada por el hígado y se excreta alrededor del 5% sin cambios por el riñón. La vida media ($t_{1/2}$) de la nicotina es de 2 h en seres humanos. Con el consumo regular de tabaco, los niveles de nicotina en sangre se pueden mantener por 8 horas, incluso después de un periodo de abstinencia durante la noche, importantes niveles de nicotina están presentes en la sangre de un fumador por la mañana, por lo general 4-5 ng/ml⁻¹ (0.03 μM). Cuando se estudió la eliminación de nicotina en fumadores crónicos, se detectaron niveles constantes durante 20 h; esto probablemente refleja la liberación lenta de nicotina proveniente de sitios de unión en tejido profundo (Benowitz, 1990; Benowitz y Jacob, 2001).

Figura 2. Nicotina y principales metabolitos.



La nicotina se excreta vía renal por filtración glomerular y tubular con reabsorción variable, dependiendo del pH de la orina. En orina ácida, la nicotina se ioniza y la reabsorción tubular se minimiza; en orina alcalina, una mayor cantidad de nicotina se desioniza, seguida por la reabsorción tubular. La excreción de cotinina está poco influida por el pH urinario debido a que es más básica y además, es dependiente de la tasa de flujo urinario (Benowitz y Jacob, 2001). Un estudio demostró, por medio de nicotina marcada radiativamente, que al menos el 1% de la nicotina consumida se excreta en heces (Armitage *et al.*, 1975). Se han observado también mayores cantidades de nicotina que de cotinina en sudor de fumadores; sin embargo, las cantidades no se han contabilizado (Kintz *et al.*, 1998).

Se especula que el continuo consumo de cigarro adicionalmente al uso de terapias de reemplazo (parches transdérmicos, aerosol, goma de mascar) puede provocar una sobredosis, que se manifiesta por la presencia de náuseas, vómitos y el posible fallecimiento; incluso, no existe evidencia de efectos tóxicos serios cuando se combina cualquier terapia de reemplazo o varias terapias juntas (p. ej. uso de múltiples parches) (Benowitz, 1988).

1.2.1. Metabolismo de nicotina y función de enzimas citocromo P450

La enzima CYP2A6 del hígado es la principal responsable del metabolismo humano de nicotina a cotinina y del metabolismo de cotinina a 3'-hidroxicotinina (Matta *et al.*, 2007). CYP2B6 también pueden contribuir al metabolismo de nicotina. La N-oxidación es mediada por la flavoproteína FMO3. La glucuronidación de nicotina y cotinina parecen estar mediados por UGT1A9, 1A4 y 2B7.

Una serie de polimorfismos genéticos en CYP2A6 se han asociado con alteración del metabolismo de la nicotina en humanos. Estos polimorfismos se asocian con ausencia de actividad de CYP2A6 e incluyen la supresión de CYP2A6 * 4, CYP2A6 * 2 y CYP2A6 * 5; y la reducida actividad de los alelos CYP2A6 * 6 * 7 * 9, * 10, * 11 y * 12 (Matta *et al.*, 2007). Por el contrario, un polimorfismo duplicado (CYP * 1 × 2) se ha asociado con el rápido metabolismo de nicotina en seres humanos. Polimorfismos en CYP2B6 también han sido identificados, pero su impacto sobre el metabolismo de nicotina no ha sido determinado (Matta *et al.*, 2007). Los polimorfismos identificados de FMO3 dan lugar a menor oxidación de la nicotina, mientras que ciertos polimorfismos de CYP2A6 se asocian con el metabolismo más lento o más rápido de nicotina; la mayoría de estos son relativamente poco comunes en la población general. Incluso entre las personas sin polimorfismos identificados, existe una amplia variabilidad en la tasa de metabolismo de nicotina (Swan *et al.*, 2005). Esto puede deberse a nuevas variantes genéticas no identificadas como inductores o supresores. Para mas detalles relacionados con el citocromo P450, la nicotina y el tabaquismo consultar (Malaiyandi *et al.*, 2005).

1.2.2. Tasa de metabolismo de nicotina

La tasa de metabolismo de nicotina se determina midiendo los niveles en sangre a intervalos de tiempo específicos después de la administración de dosis conocidas de nicotina. El aclaramiento total de la nicotina (es decir, la cantidad de sangre que se ha liberado de la droga por intervalo de tiempo) se obtiene en un promedio de 1.200 ml/min⁻¹ en humanos, aunque el tabaquismo crónico afecta este parámetro. El aclaramiento no renal o metabólico representa alrededor del 70% del flujo sanguíneo hepático (Hukkanen *et al.* 2005). Como la mayoría de la nicotina se metaboliza en hígado, cerca del 70% de la sustancia se extrae de la sangre,

posterior a su paso por este órgano, independientemente de la vía de administración, ya sea oral o intravenosa. Sólo un 30% de la nicotina administrada por vía oral va directamente al torrente circulatorio, el otro 70% se metaboliza principalmente a cotinina antes de llegar al torrente sanguíneo (Matta *et al.*, 2007).

Al llevar a cabo investigaciones donde la nicotina se administra por vía oral o intraperitoneal (ya sea en humanos o modelos animales) se deben tomar en cuenta algunos datos, entre ellos: el metabolismo de primer paso, el efecto sobre la exposición de nicotina y los niveles resultantes de cotinina. En este sentido, los niveles de cotinina obtenidos al fumar o por vía intravenosa, son indicativos de una exposición substancialmente superior del cerebro y la circulación sistémica a nicotina en comparación con niveles de cotinina como resultado de administración oral o intraperitoneal (Benowitz y Jacob, 1990).

El metabolismo de los primates es comparable al de los humanos, pero otros animales metabolizan la nicotina más rápidamente (Seaton *et al.*, 1993). Por ejemplo, aunque el CYP2A5 de ratón es un homólogo del CYP2A6 humano, el CYP1B1 / 2 de la rata, es responsable del metabolismo de la nicotina y el CYP2A6 es inactivo (Hammond *et al.*, 1991). Como se indicó anteriormente, esto hace que la rata sea un modelo no propicio para investigaciones centradas en el metabolismo de la nicotina en humanos.

La $t_{1/2}$ de la nicotina plasmática en roedores es generalmente más corta que en los primates (45 min en la rata y 6-7 min en el ratón, frente a 2 h en los seres humanos y los primates no humanos), haciendo necesario el uso de dosis diarias más elevadas de nicotina en modelos de roedores para alcanzar las concentraciones de nicotina en sangre similares a los observados en los fumadores. También hay diferencias significativas en la tasa del metabolismo, incluso dentro de cada especie. Debido a la variabilidad metabólica de la nicotina en animales de experimentación, los autores aconsejan a los investigadores medir las concentraciones de nicotina en sangre durante la dosificación en las diferentes especies animales y cepas.

1.2.3. Factores que afectan el metabolismo de nicotina

Edad, sexo, raza y estados patológicos afectan al metabolismo de la nicotina en humanos. El aclaramiento total de la nicotina es 23% más lento

en ancianos (edad, 65-76 años) en comparación con fumadores adultos jóvenes (edad, 22-43 años) (Matta *et al.*, 2007). Esto puede ser debido a la disminución del metabolismo mediado por CYP2A6; reducción del flujo sanguíneo hepático o disminución del aclaramiento renal. Las mujeres metabolizan nicotina y cotinina más rápidamente que los hombres, con 13 y 26% tasas mayores de aclaramiento, respectivamente (Benowitz *et al.*, 2009). En mujeres que toman anticonceptivos orales, las tasas de metabolismo de la nicotina y cotinina son 30 y 33% superiores, respectivamente, en comparación con aquellos que no lo hacen. Además, durante el embarazo, hay una marcada aceleración en el metabolismo de la nicotina, aumenta a un 60% y el de cotinina aumenta a un 140% en comparación con los niveles posparto (Dempsey *et al.*, 2002). Los niveles de nicotina y cotinina en el líquido amniótico se correlacionan con los de la sangre materna, con tasas promedio en líquido amniótico-plasma de 1.54 - 0.72, respectivamente (Matta *et al.*, 2007). También existe una alta correlación entre las concentraciones de nicotina en la leche materna y el suero, aunque en la leche materna la concentración de nicotina es 2.5 - 2.9 veces mayor, debido a que la leche es más ácida (pH 6.8 a 7.0) que el suero (pH 7.4) (2007). También debemos tomar en cuenta que la leche materna y la placenta poseen un alto contenido de lípidos, los cuales retienen tanto a nicotina como a cotinina.

Al tomar en cuenta etnias humanas, se encontró que los asiáticos metabolizan más lentamente la nicotina que los caucásicos, esto es en parte debido a la alta prevalencia de los alelos CYP2A6, asociados con la actividad enzimática reducida o nula (Benowitz *et al.*, 2002). No hay diferencias significativas en el metabolismo de la nicotina entre caucásicos y latinos sin embargo, los afroamericanos metabolizan la nicotina y cotinina más lentamente que los caucásicos (Benowitz, 1999). En los afroamericanos, tanto el aclaramiento total y no renal de cotinina son significativamente menores (por ejemplo, el aclaramiento es de 0.57 en comparación a 0.76 ml min⁻¹ kg⁻¹ en caucásicos), aunque la base genética para este efecto étnico no ha sido establecida. Esta diferencia en el metabolismo da como resultado mayores niveles de cotinina en afroamericanos que en caucásicos con consumos similares de nicotina.

La enfermedad renal crónica se asocia con reducido aclaramiento renal de nicotina y cotinina, así como una reducción del 50% en el aclaramiento metabólico de la nicotina que puede ser atribuible a la inhibición de la actividad de CYP2A6 o a la baja regulación de su expresión en el hí-

gado (Matta *et al.*, 2007). Aunque muchos trastornos hepáticos como la enfermedad hepática alcohólica y la hepatitis A se asocian con una disminución del metabolismo mediado por CYP2A6; la infección por fasciola hepática parasitaria lo induce (Satarug *et al.*, 1996). Algunos inductores enzimáticos conocidos, tales como los medicamentos anticonvulsivos, rifampicina y los anticonceptivos orales aceleran el metabolismo de la nicotina CYP2A6, la cual es inhibida por metoxsaleno y tranilcipromina. El primero retarda el metabolismo de la nicotina y afecta la conducta de fumar. Además, el fumar reduce la tasa de metabolismo de la nicotina, posiblemente a través de la baja regulación de CYP2A6; esta es una consideración importante cuando se comparan efectos de la nicotina entre los fumadores y no fumadores, así como en algunos modelos animales con exposición crónica aguda. Para encontrar mas información al respecto puede buscar a (Hukkanen *et al.*, 2005)

El estrés es un factor ambiental importante ya que influye en las respuestas a nicotina, sobre todo en modelos animales porque no sólo altera el metabolismo general, sino también la liberación de varios neurotransmisores (Takahashi *et al.*, 2000). Debido a esto, se debe disminuir el estrés antes de la exposición del sujeto a los procedimientos experimentales, por ejemplo, si se va a inyectar, adaptar al animal a las inyecciones, primero colocando solución salina y posteriormente la nicotina.

1.2.4. Metabolitos de nicotina y su función en sistema nervioso central

Poco se sabe sobre el metabolismo de nicotina en el cerebro humano. Estudios farmacocinéticos han determinado la cantidad de nicotina en el cerebro después de diferentes vías de administración en diversas especies animales (Plowchalk *et al.*, 1992). Es importante señalar que en los últimos estudios, los metabolitos de nicotina *N*-desmetilados como nornicotina y norcotinina no pudieron ser detectados por radiocromatografía porque la forma de nicotina utilizada contenía un radioligando en el grupo *N*-metilo.

Se han llevado a cabo diversos estudios para identificar y cuantificar nicotina, cotinina y metabolitos *N*-desmetilados en cerebro para determinar su localización después de la administración periférica aguda de nicotina [29-14C] en ratas (Ghosheh *et al.*, 1999). Estos estudios han demostrado que, además de la nicotina, la cotinina en productos de biotransformación, nor-

nicotina, norcotinina y dos metabolitos no identificados menores aparecen en el cerebro después de una sola dosis de nicotina. Las $t_{1/2}$ de nornicotina, cotinina, y norcotinina en cerebro fueron 6, 3, y 4 veces más altas, respectivamente, que la $t_{1/2}$ de 52 minutos determinada para nicotina (Ghosheh *et al.*, 1999). Esto demuestra que los productos de biotransformación tienen mayores tiempos de permanencia en cerebro que la nicotina.

La inhalación intermitente al fumar, genera picos de nicotina sobre los niveles plasmáticos constantes (Jacob *et al.*, 1992). Teniendo en cuenta la cronicidad de exposición a nicotina al fumar y el mayor tiempo de permanencia de sus productos de biotransformación en cerebro (Ghosheh *et al.*, 1999), existe la posibilidad de que tras la administración repetida de nicotina periférica, los metabolitos puedan acumularse en cerebro y alcanzar farmacológicamente concentraciones significativas. En este sentido, la cotinina y nornicotina tienen mayor actividad farmacológica en estudios conductuales y neuroquímicos (Ghosheh *et al.*, 2001; Matta *et al.*, 2007).

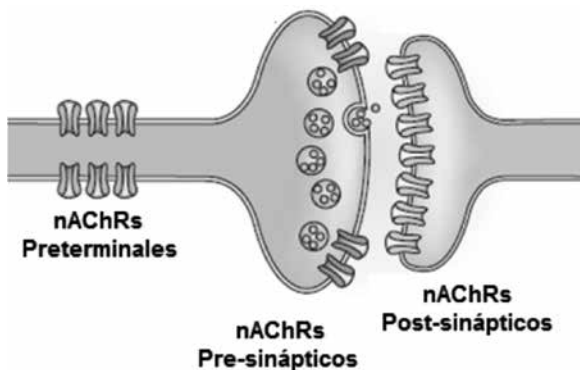
La administración continua de drogas ofrece condiciones de equilibrio entre los compartimentos central y periférico y elimina los picos y valles de los niveles circulantes en sangre por inyecciones intermitentes. Este método se ha utilizado en modelos animales de exposición a nicotina crónica y evita el estrés, así como los efectos potenciales de acondicionamiento debido a inyecciones repetidas (por ejemplo (Rowell y Li, 1997). Sin embargo, la infusión continua de nicotina difiere del patrón intermitente de suministro de nicotina al fumar (Benowitz *et al.*, 1994).

1.3. Receptores nicotínicos

Los receptores acetilcolina-nicotínicos (nAChRs), son receptores presinápticos en su mayoría, pero también los hay postsinápticos (Figura 3); son de tipo canal, de naturaleza catiónica (Na^+ o Ca^{++}) [38] y de conformación pentamérica, con al menos dos sitios de unión-ligando en la interfaz entre las subunidades (Vieyra-Reyes *et al.*, 2009).

Cuando la acetilcolina o la nicotina se unen a estos sitios, se produce un cambio estructural de las subunidades que lo forman y el canal se abre, lo que permite el flujo de iones y la liberación de neurotransmisores (Figura 4).

Figura 3. Localización de los receptores acetilcolina - nicotínicos (nAChRs). Los nAChRs son localizados en el soma, en terminales presinápticas y postsinápticas



Se ha notificado que la unión nicotina-receptor induce la liberación de dopamina, ácido γ -aminobutírico (GABA), glutamato, serotonina y péptidos opioides (Vieyra-Reyes *et al.*, 2009). Los genes que codifican para las diferentes subunidades que forman el receptor nicotínico se han identificado y clonado.

Se han caracterizado varias subunidades, entre las que encontramos: $\alpha 1$ - $\alpha 10$ y $\beta 1$ - $\beta 9$. Algunas de estas subunidades se expresan en el sistema nervioso central: $\alpha 2$ - $\alpha 7$ y $\beta 2$ - $\beta 4$ (tabla 1).

Tabla 1. Distribución de subtipos de nAChRs en el cerebro

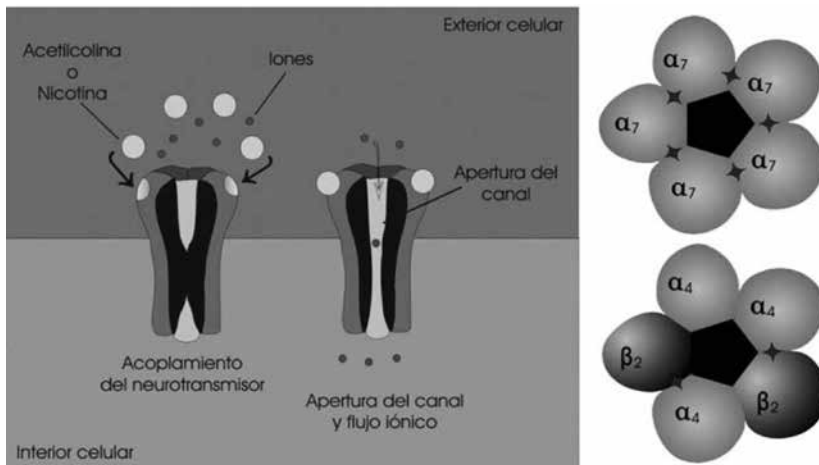
Área cerebral	Subunidades
Corteza cerebral	$\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$
Hipocampo	$\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$
Cuerpo Estriado	$\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$, $\alpha 4\alpha 6$
Núcleo del rafé dorsal	$\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$
Hábenula	$\alpha 3\beta 4$
Locus coeruleus	$\alpha 3\beta 4$
Cerebelo	$\alpha 3\beta 4$
Núcleo accumbens	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$
Núcleo interpeduncular	$\alpha 3\beta 4$

Continúa...

Área cerebral	Subunidades
Hipotálamo	$\alpha 7$
Septum	$\alpha 7$
Substancia negra	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$
Tracto óptico	$\alpha 3\beta 4$

El ensamblaje de estas subunidades determina diferentes subtipos de receptores nicotínicos (heteropentámeros), que difieren en sus propiedades farmacológicas y biofísicas (Figura 4). Las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ y ϵ se consideran que representan el receptor muscular; $\alpha 2$ - $\alpha 6$ y $\beta 2$ - $\beta 4$ representan el receptor neuronal, y $\alpha 7$ - $\alpha 10$ el receptor neuronal homopentamérico (figura 4). La activación del receptor $\alpha 4\beta 2$ se ha asociado a la presencia de depresión y conductas adictivas, como el consumo de tabaco. Los subtipos $\alpha 6$ y $\beta 3$ regulan la liberación de dopamina.

Figura 4. Esquema que representa un receptor nicotínico. El panel A muestra el mecanismo de acción del receptor nicotínico tipo canal ante el acoplamiento de nicotina o de acetilcolina. En el panel B se muestra un esquema de un receptor nicotínico homopentamérico ($\alpha 7$) con cinco sitios de unión para acetilcolina o nicotina. En el panel C se ilustra un receptor heteropentamérico ($\alpha 4\beta 2$) con dos sitios de unión. Las estrellas señalan los sitios de unión.



Sin embargo, las funciones de estos nAChR no se conocen del todo. Los nAChR no sólo existen en los cuerpos de las células neuronales y las dendritas, también están ubicados en los terminales del axón (figura 3) y es-

tán implicados en la modulación de la liberación de transmisión múltiple. La aplicación de nicotina en cuerpo estriado produce aumento en los niveles extracelulares de glutamato (Vieyra-Reyes *et al.*, 2008b). Se ha demostrado que la nicotina aumenta la liberación de dopamina estriatal en ratas *in vivo* y ha sido reportado que el canal de Ca_2^+ tipo N y los canales de sodio dependientes de voltaje están involucrados en la liberación de neurotransmisores tras la estimulación de nAChR (Matta *et al.*, 2007).

La liberación de dopamina inducida por nAChR, es inhibida por antagonistas de la subunidad $\alpha 3\beta 2$ pero no por antagonistas de $\alpha 3\beta 4$. Por otro lado, la liberación de dopamina por nicotina parece estar mediada *in vivo* por el sistema glutamatérgico ya que el ácido kinurenico es capaz de prevenir casi por completo el efecto de la nicotina sobre la liberación de ácido glutámico (Vieyra-Reyes *et al.*, 2008b).

Los antagonistas de N-Metil-D-Aspartato (NMDA) pueden modular los efectos de nicotina en neuronas dopaminérgicas del área tegmentaria ventral (VTA) (Benowitz, 2009). En la proyección de neuronas dopaminérgicas mesolímbicas, la nicotina puede modular la liberación de glutamato y ejercer un efecto excitatorio indirecto sobre estas neuronas. Por lo menos una parte de los efectos nicotínicos en el sistema dopaminérgico mesolímbico son similares a los observados en estriado.

1.4. Sistema Límbico

El termino límbico proviene del latín *limbus* que significa borde o frontera, y fue empleado por primera vez por Pierre Paul Broca en 1878 para referirse a la estructura cortical que forma un borde, el cual incluye el cíngulo y el giro parahipocampal. Para 1937 es propuesto por el fisiólogo James Papez, como un circuito neuronal que controla la experiencia emocional o sentimientos subjetivos y la conducta; este modelo anatómico es referido como el circuito de Papez. Para mayores detalles consultar (Rajmohan y Mohandas, 2007).

1.4.1. Estructuras y funciones del Sistema Límbico

Las estructuras principales que conforman el sistema límbico se dividen en regiones corticales (giro parahipocampal, giro cíngulo, corteza prefrontal, corteza orbitofrontal) y regiones subcorticales (hipocampo, amíg-

dala, núcleo septal, núcleo *accumbens*, estriado, cuerpo mamilar, hipotálamo, tálamo, área tegmentaria ventral, núcleo raphe, *locus ceruleus*, sustancia *nigra*) (Rajmohan y Mohandas, 2007).

A continuación se mencionan en la tabla 2 las principales funciones de estructuras que componen el sistema límbico.

Tabla 2. Principales funciones de estructuras que componen el Sistema Límbico

Área límbica	Función
Amígdala	Modula la atención, el estado de ánimo, memoria emocional (Haas y Canli, 2008). Expresión emocional (Ferris <i>et al.</i> , 2008). Miedo, recompensa, novedad, expectativa positiva (Kober <i>et al.</i> , 2008). Ansiedad, agresión, cognición social, elección de alimentos (Rajmohan y Mohandas, 2007).
Giro parahipocampal	Memoria espacial (Rajmohan y Mohandas, 2007).
Giro cingulado	Estados de ánimo (Haas y Canli, 2008). Experiencia emocional (Ferris <i>et al.</i> , 2008). Memoria, generación y regulación de emociones, resolución de conflictos emocionales, modulación del sentimiento de dolor (Kober <i>et al.</i> , 2008). Funciones autónomas: presión sanguínea, gasto cardiaco (Rajmohan y Mohandas, 2007).
Hipocampo	Memoria a largo plazo (Rajmohan y Mohandas, 2007), aprendizaje (Laviolette, 2007; Haas y Canli, 2008). Experiencia emocional (Ferris <i>et al.</i> , 2008).
Corteza prefrontal	Toma de decisiones (Haas y Canli, 2008). Funciones integrativas y cognitivas (Kober <i>et al.</i> , 2008).
Corteza orbitofrontal	Valoración de los estímulos, recompensa y castigo (2008).
Núcleo accumbens	Regulación de la motivación, recompensa (Laviolette, 2007). Adicciones (Rajmohan y Mohandas, 2007).
Estriado	Recompensa y castigo (Kober <i>et al.</i> , 2008). Motivación, adicciones (Rajmohan y Mohandas, 2007).
Cuerpo mamilar	Memoria (Rajmohan y Mohandas, 2007).
Área Tegmentaria Ventral	Regulación de la motivación y recompensa (Laviolette, 2007).
Tálamo	Procesa información emocional (Laviolette, 2007). Componentes motores y conductuales de la respuesta emocional (Ferris <i>et al.</i> , 2008).

Continúa...

Área límbica	Función
Hipotálamo	Control neuroendocrino (Guillemin y Perrin, 2008). Expresión emocional (Ferris <i>et al.</i> , 2008). Regulación del sistema nervioso autónomo. Efectos en presión sanguínea, gasto cardíaco, hambre, saciedad, conducta sexual, ritmo circadiano (Rajmohan y Mohandas, 2007).
Sustancia <i>nigra</i>	Coordinación de movimientos (Lin <i>et al.</i> , 2010).

1.5. Efectos de la nicotina en desórdenes cognitivos

La incidencia del consumo de tabaco es mayor en sujetos con problemas mentales (Glassman, 1993).

El 90% de sujetos esquizofrénicos consumen tabaco en comparación con 33% de sujetos control. El uso de tabaco en la esquizofrenia es excesivamente alto y por lo general son grandes fumadores (Schlaepfer *et al.*, 2010). De hecho, los esquizofrénicos parecen extraer más nicotina por cigarrillo que los fumadores control, posiblemente debido a la inhalación profunda (Olinck *et al.*, 1997).

Ha sido reportado que pacientes con esquizofrenia o trastorno bipolar fuman más y beben menos que los sujetos con depresión. No se sabe por qué el consumo de alcohol puede ser menos en la esquizofrenia y el trastorno bipolar, aunque la respuesta a la medicación podría estar involucrada.

Por otro lado, dejar de fumar favorece la presencia de síndrome depresivo (Glassman, 1993) y esto ha ocasionado que el uso de antidepresivos como tratamiento para dejar de fumar se esté extendiendo (Holm y Spencer, 2000). No obstante, la terapia con antidepresivos para dejar de fumar no ha aumentado la tasa de abstinencia. La razón puede estar relacionada con la interacción de estos agentes con receptores nicotínicos. Varios, incluyendo bupropión y fluoxetina, han demostrado que son inhibidores no competitivos de los receptores nicotínicos (Fryer y Lukas, 1999). Todavía no se sabe si estos agentes aumentan el número de receptores al igual que otros ligandos del receptor nicotínico (Almeida *et al.*, 2000), ni tampoco si la continua sobrerregulación del receptor por estos agentes pueden sustituir el uso del tabaco, hay poca información al respecto.

A continuación se detalla por separado cada uno de los principales desórdenes cognitivos en los que incide la nicotina.

1.5.1. Efectos de la nicotina durante el desarrollo perinatal

Los nAChR juegan un papel crucial en el desarrollo neurológico. Por ejemplo, estudiando los efectos de la nicotina durante la gestación en ratas, se encontró una menor cantidad del contenido total de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) en el cerebro al principio y fin de la gestación. Esta disminución en el ADN refleja una reducción en el número total de células y sugiere que la nicotina inhibe o retarda el aumento del número de células durante el periodo de maduración temprana del cerebro (Slotkin *et al.*, 1987). En el periodo postnatal temprano, la nicotina gestacional induce la regulación positiva de la ornitina decarboxilasa (ODC), enzima esencial para la biosíntesis durante la replicación y diferenciación celular. El aumento de actividad de ODC es indicativo de la maduración anormal celular y se ha sugerido que la estimulación temprana de nAChR con nicotina puede desencadenar cambios aberrantes en la proliferación y diferenciación neuronal (Slotkin *et al.*, 1987).

Pese a ello, la nicotina también produce cambios en la síntesis de hormonas gonadales y suprarrenales. Las dosis bajas de nicotina prenatal (2 mg/kg / día) son suficientes para causar un aumento de corticosterona en plasma de fetos masculinos. Además, inhibe la producción de testosterona en hombres durante el periodo crítico para el desarrollo del dimorfismo sexual en cerebro (Sarasín *et al.*, 2003). La nicotina también inhibe la actividad de aromatasa en la placenta humana, lo que puede interferir con la diferenciación sexual del cerebro en el hombre. Esta interferencia con la diferenciación sexual puede tener consecuencias funcionales posteriores por ejemplo, el tratamiento con nicotina durante gestación elimina las diferencias de sexo en pruebas de preferencia por sacarina en ratas y se correlaciona con alteraciones al inicio de la pubertad en hombres (Fried *et al.*, 2001).

La exposición a nicotina durante gestación aumenta la afinidad de nAChR en cerebro de fetos y neonatos (Pentel *et al.*, 2006). Este patrón cambia durante el desarrollo postnatal en ratas, donde están sobre-regulados los sitios de unión de alta afinidad en el día postnatal (DPN) 18, específicamente en la capa 1 de la corteza somatosensorial y visual (Tizabi y Perry,

2000). En la adolescencia (DPN 35-38), se manifiesta menor expresión de los sitios de alta afinidad en sustancia nigra, área tegmental ventral, corteza prefrontal y núcleo accumbens (Chen *et al.*, 2005). También se disminuye la expresión del nAChR $\alpha 7$ en la circunvolución dentada y región CA1 en hipocampo (Tizabi y Perry, 2000). Este patrón muestra la complejidad del desarrollo del sistema colinérgico y el impacto que tiene la limitada exposición a nicotina durante el desarrollo temprano del cerebro.

Por otro lado, la nicotina también repercute sobre el sistema catecolaminérgico, el cual está constituido por dopamina, norepinefrina y epinefrina. Este sistema regula numerosas funciones neuronales integrativas como: emoción, motivación, cognición y motricidad (Nieoullon y Coquerel, 2003). Estas vías nerviosas son funcionales desde etapas tempranas del desarrollo cerebral y tienen un papel importante en la maduración neuronal y en comportamientos críticos para la supervivencia neonatal (Moriceau y Sullivan, 2005).

Estudios clínicos han demostrado que fumar durante el embarazo conduce a disfunción de catecolaminas, lo que origina déficits neuroconductuales en niños (Porath y Fried, 2005). La hiperactividad-impulsividad y la conducta de oposición están significativamente asociadas con polimorfismos del transportador de dopamina en hijos de embarazadas fumadoras (Todd *et al.*, 2003). La evidencia reciente sugiere que la exposición materna al humo de cigarro, también está asociada significativamente con vulnerabilidad a la externalización de psicopatologías en jóvenes (Gatzke-Kopp y Beauchaine, 2007).

Estudios en animales han demostrado que células catecolaminérgicas expresan nAChRs funcionales en el desarrollo temprano (Azam *et al.*, 2002). Las propiedades de los nAChR en terminales dopaminérgicas estriatales cambian con la edad, lo que sugiere que estos receptores pueden tener importantes funciones en el desarrollo del sistema catecolaminérgico (2002). Los estudios en animales han proporcionado evidencia experimental sobre alteraciones a largo plazo en vías catecolaminérgicas en sujetos expuestos a nicotina durante la gestación. Por ejemplo, los mecanismos de recompensa que son críticamente dependientes de las vías dopaminérgicas se alteran en los animales adolescentes o adultos que han estado expuestos a nicotina *in utero*.

Aunque hembras expuestas prenatalmente a nicotina se auto-administran vía oral cantidades similares de nicotina a hembras control, ingieren cantidades mayores después de un periodo de abstinencia (Levin *et al.*, 2010). La exposición prenatal a nicotina también aumenta la recompensa por cocaína en ratones machos y hembras y disminuye el impulso inicial por obtener gratificación a través del consumo de alimento o sacarosa. Por lo tanto, la modificación de los mecanismos hedónicos, como resultado de interrupciones en la transmisión dopaminérgica, puede ser la base del aumento en el consumo de drogas y obesidad en hijos adolescentes provenientes de madres fumadoras.

1.5.2. Nicotina y Esquizofrenia

Estudios epidemiológicos han demostrado que existe alto porcentaje de fumadores en la población esquizofrénica (90%) en comparación con la población general (33%) y una baja tasa de abandono del tabaquismo entre las personas con esquizofrenia (Araki *et al.*, 2002). Se ha sugerido que las altas tasas de tabaquismo se derivan de los efectos de la nicotina sobre los problemas de atención que sufren los esquizofrénicos o es utilizada como reductor de efectos colaterales por medicación antipsicótica. Por ejemplo, la nicotina reduce la acatisia (incapacidad para mantenerse quieto) y el deterioro cognitivo psicomotriz asociado al tratamiento con haloperidol. Por otro lado, los esquizofrénicos muestran déficit auditivo de respuesta evocada (P50) a estímulos repetidos y la nicotina lo normaliza (Adler *et al.*, 1992), al igual que los movimientos oculares suaves de persecución.

Curiosamente la clozapina, pero no los neurolépticos típicos antidopaminérgicos, normalizan el déficit P50 en los esquizofrénicos que muestran una respuesta terapéutica favorable a esta sustancia (1992). El hábito de fumar disminuye cuando los pacientes cambian los típicos medicamentos neurolépticos antidopaminérgicos a la clozapina (1995), y los fumadores muestran una mayor respuesta terapéutica a la clozapina que los no fumadores (McEvoy *et al.*, 1995). A partir de estas observaciones, se sugiere que la nicotina puede tener efectos terapéuticos en los pacientes con esquizofrenia.

Recientemente se examinó el efecto de la nicotina sobre la interrupción de la inhibición prepulso (PPI) de sobresalto acústico inducido por apomorfina en ratas. El haloperidol inhibe la interrupción del PPI inducida por la apomorfina. La nicotina también inhibe la interrupción de la PPI,

sin cambiar el PPI. El efecto inhibitor de la nicotina fue abolido por la administración de mecamilamina, pero no hexametonio. Además, el efecto inhibitor de la nicotina fue antagonizado por metilcaconitina, el antagonista del receptor nicotínico $\alpha 7$, pero no dihidro β eritroidina, el antagonista de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$. Estos resultados sugieren que la nicotina bloquea la interrupción del PPI inducida por apomorfina y los receptores nicotínicos $\alpha 7$ están involucrados en este fenómeno (Suemaru *et al.*, 2004). GTS-21, un agonista selectivo del receptor nicotínico $\alpha 7$, también normaliza la inhibición de la respuesta auditiva en ratones DBA / 2, una cepa que muestra a la esquizofrenia como déficit en la inhibición sensorial (Stevens *et al.*, 1998). Además, las recientes investigaciones en humanos y animales han sugerido una alteración de la expresión y función de los nAChR $\alpha 7$ que puede ser responsable del déficit auditivo característico en pacientes con esquizofrenia (Adler *et al.*, 1998).

1.5.3. Nicotina y Depresión

Estudios clínicos retrospectivos y prospectivos reportan una relación entre el fumar y la depresión mayor.

Se ha sugerido que la nicotina puede jugar un papel importante como antidepresivo (Mihailescu *et al.*, 2002; Salin-Pascual y Drucker-Colin; 1998; Salin-Pascual *et al.*, 1996; Semba *et al.*, 1998). Varios estudios epidemiológicos han mostrado la existencia de una fuerte comorbilidad entre depresión y el fumar, en efecto, el tiempo de prevalencia de depresión es directamente correlacionada con la prevalencia de dependencia a nicotina (Breslau *et al.*, 1991; Breslau *et al.*, 1998). La incidencia del consumo de cigarro es mucho mayor en pacientes con depresión o cuando los síntomas depresivos están presentes (Breslau *et al.*, 1998). Además, los fumadores con historia depresiva tienen mas problemas para dejar de fumar (Covey, 1999). Sobre todo cuando dejan de fumar frecuentemente precipita síntomas depresivos (síndrome de abstinencia) que pueden ser revertidos con la reintroducción del fumar (Stage *et al.*, 1996) o con el uso de antidepresivos.

Estudios clínicos reportan que la aplicación de parches transdermales de nicotina mejora el estado de ánimo de pacientes deprimidos no fumadores e incrementa la latencia al primer periodo del sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) el cual está alterado en esta patología (Salin-Pascual *et al.*, 1995; Salin-Pascual *et al.*, 1996).

Sin embargo, es difícil evaluar las propiedades antidepresivas de la nicotina en los fumadores; debido a lo difícil que es separar el efecto antidepresivo *per se* de la reducción de la depresión que sigue a la abstinencia de nicotina. En estudios de comportamiento con roedores, la nicotina administrada crónicamente ha demostrado que tiene efectos similares a los antidepresivos. Además, los estudios de comportamiento en ratas genéticamente depresivas (línea de ratas Flinders sensibles) han marcado un efecto antidepresivo de la nicotina en el modelo de nado forzado, utilizado para estudiar agudamente sustancias antidepresivas (Tizabi *et al.*, 2000). También se comprobó que tiene efecto antidepresivo en el modelo animal de bulbectomía olfatoria, donde además se comparó su acción con la terapia de campos magnéticos transcraneales, obteniendo como resultado un mayor y sostenido efecto antidepresivo con la nicotina (Vieyra-Reyes *et al.*, 2008a).

1.5.4. Nicotina y Ansiedad

Varios estudios han informado una asociación entre los trastornos de ansiedad y el tabaquismo. Las personas con dependencia a la nicotina tienen mayores tasas de trastornos de ansiedad, y los pacientes con trastornos de pánico tienen también tasas elevadas de consumo de cigarro (Breslau y Klein, 1999).

Sin embargo, los pacientes con trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) tienen una baja prevalencia del hábito de fumar (Bejerot y Nylander, 2003); aunque la evidencia clínica sugiere que la nicotina reduce la ansiedad en situaciones de estrés, la administración de nicotina ha mostrado efectos ansiolíticos o ansiogénicos en algunos modelos animales. Los efectos ansiolíticos se han reportado en varias pruebas, entre ellas el laberinto en T, la cámara de espejos, el cuadro blanco/negro, el paradigma de sobresalto potenciado y la prueba de la interacción social. La acción ansiolítica de la nicotina en el laberinto en T puede ser bloqueada por el antagonista de nAChR mecamilamina pero no por hexametonio, lo que indica la participación de receptores nicotínicos centrales (Brioni *et al.*, 1993). En adición a esta benzodicepina, el agonista inverso flumazenil también bloquea los efectos ansiolíticos inducidos por nicotina en seres humanos y en modelos animales de ansiedad. Esto sugiere que la acción ansiolítica inducida por la nicotina se produce por una mayor liberación del neurotransmisor inhibitorio GABA, que actúa en el complejo central de los receptores GABA-benzodiazepinas (Paterson y Nordberg, 2000).

Por otro lado, la administración sistémica de dosis bajas de nicotina tiene efectos ansiolíticos, mientras que dosis más altas tienen efectos ansiogénicos en pruebas de interacción social en ratas.

La administración de nicotina directamente en el hipocampo dorsal y lateral produce efectos ansiogénicos en las pruebas de interacción social, pero la administración de nicotina en el hipocampo dorsal tiene efectos ansiolíticos en el laberinto elevado (un modelo de fobia específica) en ratas (File *et al.*, 2000).

Así, el sistema colinérgico septo-hipocampal ha sido implicado en el control de la ansiedad, pero poco se sabe sobre los subtipos de nAChR específicos implicados en las acciones de la nicotina. Recientemente, Ross *et al.*, (2000) informó que el comportamiento de los ratones mutantes homocigotos (knock-out de subunidad $\alpha 4$) en la prueba de laberinto elevado presentaron aumento de los niveles basales de ansiedad. Lo que confirma el importante papel de los receptores nicotínicos en esta patología.

2. Referencias

- Adler, L.E., Hoffer, L.J., Griffith, J., Waldo, M.C. y Freedman, R. (1992). Normalization by Nicotine of Deficient Auditory Sensory Gating In the Relatives of Schizophrenics. *Biol. Psychiatry*. 32: 607-16.
- Adler, L.E., Olincy, A., Waldo, M., Harris, J.G., Griffith, J., Stevens, K., Flach, K., Nagamoto, H., Bickford, P., Leonard, S. y Freedman, R. (1998). Schizophrenia, Sensory Gating, and Nicotinic Receptors. *Schizophr. Bull.* 24: 189-202.
- Almeida, L.E., Pereira, E.F., Alkondon, M., Fawcett, W.P., Randall, W.R. y Albuquerque, E.X. (2000). The Opioid Antagonist Naltrexone Inhibits Activity And Alters Expression of Alpha7 and Alpha4beta2 Nicotinic Receptors in Hippocampal Neurons: Implications for Smoking Cessation Programs. *Neuropharmacol.* 39: 2740-55.
- Araki, H., Suemaru, K. y Gomita, Y. (2002). Neuronal Nicotinic Receptor and Psychiatric Disorders: Functional and Behavioral Effects of Nicotine. *Jpn. J. Pharmacol.* 88: 133-8.
- Armitage, A.K., Dollery, C.T., George, C.F., Houseman, T.H., Lewis, P.J. y Turner, D.M. (1975). Absorption and Metabolism of Nicotine from Cigarettes. *Br. Med. J.* 4: 313-6.

- Azam, L., Winzer-Serhan, U.H., Chen, Y. y Leslie, F.M. (2002). Expression of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Mrnas within Midbrain Dopamine Neurons. *J. Comp. Neurol.* 444: 260-74.
- Bejerot, S. y Nylander, L. (2003). Low Prevalence of Smoking in Patients with Autism Spectrum Disorders. *Psychiatry Res.* 119: 177-82.
- Benowitz, N. L. (1988). Toxicity of Nicotine: Implications with Regard to Nicotine Replacement Therapy. *Prog. Clin. Biol. Res.* 261: 187-217.
- Benowitz, N. L. (1990). Clinical Pharmacology of Inhaled Drugs of Abuse: Implications in Understanding Nicotine Dependence. *NIDA Res. Monogr.* 99:12-29.
- Benowitz, N.L. (1999). The Biology of Nicotine Dependence: from the 1988 Surgeon General's Report to the Present And Into The Future. *Nicotine Tob. Res.* 1 Suppl. 2. S159-63.
- Benowitz, N.L. (2009). Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49: 57-71.
- Benowitz, N.L., Hukkanen, J. and Jacob, P. (2009). Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. *Handb Exp Pharmacol.* 29-60.
- Benowitz, N.L. y Jacob, P. (1990). Intravenous Nicotine Replacement Suppresses Nicotine Intake from Cigarette Smoking. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254: 1000-1005.
- Benowitz, N.L. y Jacob, P. (2001). Trans-3'-Hydroxycotinine: Disposition Kinetics, Effects and Plasma Levels During Cigarette Smoking. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 51:53-9.
- Benowitz, N.L., Jacob, P., Fong, I. y Gupta, S. (1994). Nicotine Metabolic Profile in Man: Comparison of Cigarette Smoking and Transdermal Nicotine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 296-303.
- Benowitz, N.L., Jacob, P., Jones, R.T. y Rosenberg, J. (1982). Interindividual Variability in the Metabolism and Cardiovascular Effects of Nicotine in Man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221: 368-72.
- Benowitz, N.L., Perez-Stable, E.J., Herrera, B. y Jacob, P. (2002). Slower Metabolism and Reduced Intake of Nicotine from Cigarette Smoking In Chinese-Americans. *J. Natl. Cancer Inst.* 94: 108-15.

- Breslau, N., Kilbey, M. y Andreski, P. (1991). Nicotine Dependence, Major Depression, and Anxiety in Young Adults. *Arch Gen Psychiatry*. 48:1069-74.
- Breslau, N. and Klein, D.F. (1999). Smoking and Panic Attacks: An Epidemiologic Investigation. *Arch. Gen. Psychiatry*. 56:1141-7.
- Breslau, N., Peterson, E.L., Schultz, L.R., Chilcoat, H.D. y Andreski, P. (1998). Major Depression and Stages of Smoking. A Longitudinal Investigation. *Arch. Gen. Psychiatry*. 55: 161-6.
- Brioni, J.D., O'Neill, A.B., Kim, D.J. y Decker, M.W. (1993). Nicotinic Receptor Agonists Exhibit Anxiolytic-Like Effects on the Elevated Plus-Maze Test. *Eur. J. Pharmacol.* 238: 1-8.
- Covey, L.S. (1999). Tobacco Cessation among Patients with Depression. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 26: 691-706.
- Chen, H., Parker, S.L., Matta, S.G. y Sharp, B.M. (2005). Gestational Nicotine Exposure Reduces Nicotinic Cholinergic Receptor (Nchr) Expression in Dopaminergic Brain Regions of Adolescent Rats. *Eur. J. Neurosci.* 22: 380-8.
- Dempsey, D., Jacob, P. y Benowitz, N.L. (2002). Accelerated Metabolism of Nicotine and Cotinine in Pregnant Smokers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301:594-8.
- Dempsey, D.A. and Benowitz, N.L. (2001). Risks and Benefits of Nicotine to Aid Smoking Cessation in Pregnancy. *Drug Saf.* 24: 277-322.
- Ferris, C.F., Stolberg, T., Kulkarni, P., Murugavel, M., Blanchard, R., Blanchard, D.C., Febo, M., Brevard, M. y Simon, N. G. (2008). Imaging the Neural Circuitry and Chemical Control of Aggressive Motivation. *BMC Neurosci.* 9:111.
- File, S.E., Cheeta, S. y Kenny, P.J. (2000). Neurobiological Mechanisms by Which Nicotine Mediates Different Types of Anxiety. *Eur. J. Pharmacol.* 393: 231-6.
- Fried, P.A., James, D.S. y Watkinson, B. (2001). Growth and Pubertal Milestones During Adolescence in Offspring Prenatally Exposed to Cigarettes and Marihuana. *Neurotoxicol. Teratol.* 23: 431-6.
- Fryer, J.D. y Lukas, R.J. (1999). Antidepressants Noncompetitively Inhibit Nicotinic Acetylcholine Receptor Function. *J. Neurochem.* 72: 1117-24.

- Gatzke-Kopp, L.M. y Beauchaine, T.P. (2007). Direct and Passive Prenatal Nicotine Exposure and the Development of Externalizing Psychopathology. *Child Psychiatry Hum. Dev.* 38: 255-69.
- Ghosheh, O., Dwoskin, L.P., Li, W.K. y Crooks, P.A. (1999). Residence Times and Half-Lives of Nicotine Metabolites in Rat Brain After Acute Peripheral Administration of [2'-(14)C]Nicotine. *Drug Metab. Dispos.* 27: 1448-55.
- Ghosheh, O.A., Dwoskin, L.P., Miller, D.K. y Crooks, P.A. (2001). Accumulation of Nicotine and Its Metabolites in Rat Brain After Intermittent or Continuous Peripheral Administration of [2'-(14)C]Nicotine. *Drug Metab. Dispos.* 29:645-51.
- Glassman, A.H. (1993). Cigarette Smoking: Implications for Psychiatric Illness. *Am. J. Psychiatry.* 150: 546-53.
- Gori, G.B. y Lynch, C.J. (1985). Analytical Cigarette Yields as Predictors of Smoke Bioavailability. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 5: 314-26.
- Guillemin, R. y Perrin, M.H. (2008). Neuroendocrinology: Past, Present and Future. *Ann. Endocrinol.* 69: 160.
- Haas, B.W. y Canli, T. (2008). Emotional Memory Function, Personality Structure and Psychopathology: A Neural System Approach to the Identification of Vulnerability Markers. *Brain Res. Rev.* 58: 71-84.
- Hammond, D.K., Bjercke, R.J., Langone, J.J. y Strobel, H.W. (1991). Metabolism of Nicotine by Rat Liver Cytochromes P-450. Assessment Utilizing Monoclonal Antibodies to Nicotine and Cotinine. *Drug Metab. Dispos.* 19: 804-8.
- Holm, K. J. and Spencer, C.M. (2000). Bupropion: A Review of Its Use in the Management of Smoking Cessation. *Drugs.* 59: 1007-24.
- Hukkanen, J., Jacob, P. y Benowitz, N.L. (2005). Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. *Pharmacol. Rev.* 57: 79-115.
- Jacob, P., Shulgin, A.T., Yu, L. y Benowitz, N.L. (1992). Determination of the Nicotine Metabolite Trans-3'-Hydroxycotinine in Urine of Smokers Using Gas Chromatography with Nitrogen-Selective Detection or Selected Ion Monitoring. *J. Chromatogr.* 583: 145-54.

- Kintz, P., Henrich, A., Cirimele, V. y Ludes, B. (1998). Nicotine Monitoring In Sweat with a Sweat Patch. *J Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 705: 357-61.
- Kober, H., Barrett, L.F., Joseph, J., Bliss-Moreau, E., Lindquist, K. y Wager, T.D. (2008). Functional Grouping and Cortical-Subcortical Interactions in Emotion: A Meta-Analysis of Neuroimaging Studies. *Neuroimage.* 42: 998-1031.
- Laviolette, S. R. (2007). Dopamine Modulation of Emotional Processing In Cortical and Subcortical Neural Circuits: Evidence for a Final Common Pathway in Schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 33: 971-81.
- Lee, E.M., Malson, J.L., Moolchan, E.T. y Pickworth, W.B. (2004). Quantitative Comparisons between a Nicotine Delivery Device (Eclipse) and Conventional Cigarette Smoking. *Nicotine Tob. Res.* 6:95-102.
- Levin, E.D., Hampton, D. y Rose, J.E. (2010). IV Nicotine Self-Administration in Rats Using the Consummatory Operant Licking Response. *Physiol. Behav.* 101: 755-8.
- Lin, B., Levy, S., Raval, A.P., Perez-Pinzon, M.A. y Defazio, R.A. (2010). Forebrain Ischemia Triggers Gabaergic System Degeneration in Substantia Nigra at Chronic Stages in Rats. *Cardiovasc. Psychiatry. Neurol.* 506952: 1-17.
- Lindell, G., Lunell, E. y Graffner, H. (1996). Transdermally Administered Nicotine Accumulates In Gastric Juice. *Eur J Clin Pharmacol.* 51: 315-8.
- Lunell, E., Molander, L., Ekberg, K. y Wahren, J. (2000). Site of Nicotine Absorption from a Vapour Inhaler--Comparison with Cigarette Smoking. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 55: 737-41.
- Malaiyandi, V., Sellers, E.M. and Tyndale, R.F. (2005). Implications of CYP2A6 Genetic Variation for Smoking Behaviors and Nicotine Dependence. *Clin. Pharmacol. Ther.* 77: 145-58.
- Matta, S.G., Balfour, D.J., Benowitz, N.L., Boyd, R.T., Buccafusco, J.J., Caggiula, A.R., Craig, C.R., Collins, A. C., Damaj, M.I., Donny, E.C., Gardiner, P.S., Grady, S.R., Heberlein, U., Leonard, S.S., Levin, E.D., Lukas, R. J., Markou, A., Marks, M.J., Mccallum, S.E., Parameswaran, N., Perkins, K.A., Picciotto, M.R., Quik, M., Rose, J. E., Rothen-

- fluh, A., Schafer, W.R., Stolerman, I.P., Tyndale, R.F., Wehner, J.M. and Zirger, J.M. (2007). Guidelines on Nicotine Dose Selection for In Vivo Research. *Psychopharmacology*. 190: 269-319.
- Mcevoy, J., Freudenreich, O., Mcgee, M., Vanderzwaag, C., Levin, E. y Rose, J. (1995). Clozapine Decreases Smoking In Patients with Chronic Schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. 37: 550-2.
- Mihailescu, S., Guzman-Marin, R., Dominguez M.C. y Drucker-Colin, R. (2002). Mechanisms of Nicotine Actions on Dorsal Raphe Serotonergic Neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 452: 77-82.
- Moriceau, S. y Sullivan, R.M. (2005). Neurobiology of Infant Attachment. *Dev. Psychobiol.* 47: 230-242.
- Nieoullon, A. y Coquerel, A. (2003). Dopamine: a Key Regulator to Adapt Action, Emotion, Motivation and Cognition. *Curr. Opin. Neurol.* 16, Suppl 2: S3-9.
- Olincy, A., Young, D.A. y Freedman, R. (1997). Increased Levels of The Nicotine Metabolite Cotinine in Schizophrenic Smokers Compared to Other Smokers. *Biol. Psychiatry*. 42: 1-5.
- Paterson, D. y Nordberg, A. (2000). Neuronal Nicotinic Receptors in the Human Brain. *Prog. Neurobiol.* 61: 75-111.
- Pentel, P.R., Dufek, M.B., Roiko, S.A., Lesage, M.G. y Keyler, D.E. (2006). Differential Effects of Passive Immunization with Nicotine-Specific Antibodies on the Acute and Chronic Distribution of Nicotine to Brain in Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317: 660-666.
- Plowchalk, D.R., Andersen, M.E. y DeBethizy, J.D. (1992). A Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Nicotine Disposition in the Sprague-Dawley Rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 116: 177-188.
- Porath, A. J. y Fried, P. A. (2005). Effects of Prenatal Cigarette and Marijuana Exposure on Drug Use among Offspring. *Neurotoxicol. Teratol.* 27: 267-277.
- Rajmohan, V. y Mohandas, E. (2007). The Limbic System. *Indian J. Psychiatry*. 49: 132-139.
- Rose, J.E., Behm, F.M., Westman, E.C. y Coleman, R.E. (1999). Arterial Nicotine Kinetics during Cigarette Smoking and Intravenous Nicotine Administration: Implications for Addiction. *Drug Alcohol Depend.* 56: 99-107.

- Ross, S.A., Wong, J.Y., Clifford, J.J., Kinsella, A., Massalas, J.S., Horne, M.K., Scheffer, I.E., Kola, I., Waddington, J.L., Berkovic, S.F. y Drago, J. (2000). Phenotypic Characterization of an Alpha 4 Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Knock-Out Mouse. *J. Neurosci.* 20: 6431-6441.
- Rowell, P. P. y Li, M. (1997). Dose-Response Relationship for Nicotine-Induced Up-Regulation of Rat Brain Nicotinic Receptors. *J. Neurochem.* 68: 1982-1989.
- Salin-Pascual, R.J., De La Fuente, J.R., Galicia-Polo, L. y Drucker-Colin, R. (1995). Effects of Transderman Nicotine on Mood and Sleep in Nonsmoking Major Depressed Patients. *Psychopharmacology (Berl)*. 121: 476-479.
- Salin-Pascual, R.J. y Drucker-Colin, R. (1998). A Novel Effect of Nicotine on Mood and Sleep in Major Depression. *Neuroreport*. 9: 57-60.
- Salin-Pascual, R.J., Rosas, M., Jimenez-Genchi, A., Rivera-Meza, B.L. y Delgado-Parra, V. (1996). Antidepressant Effect of Transdermal Nicotine Patches in Nonsmoking Patients with Major Depression. *J. Clin. Psychiatry*. 57: 387-389.
- Sarasin, A., Schlumpf, M., Muller, M., Fleischmann, I., Lauber, M.E. y Lichtensteiger, W. (2003). Adrenal-Mediated Rather than Direct Effects of Nicotine as a Basis of Altered Sex Steroid Synthesis in Fetal and Neonatal Rat. *Reprod. Toxicol.* 17: 153-162.
- Satarug, S., Lang, M.A., Yongvanit, P., Sithithaworn, P., Mairiang, E., Mairiang, P., Pelkonen, P., Bartsch, H. y Haswell-Elkins, M.R. (1996). Induction of Cytochrome P450 2A6 Expression in Humans by the Carcinogenic Parasite Infection, Opisthorchiasis Viverrini. *Cancer Epidemiol. Biomarkers*. 5: 795-800.
- Schlaepfer, T. E., George, M. S. y Mayberg, H. (2010). WFSBP Guidelines on Brain Stimulation Treatments in Psychiatry. *World J. Biol. Psychiatry*. 11: 2-18.
- Seaton, M.J., Kyrematen, G.A. y Vesell, E.S. (1993). Rates of Excretion of Cotinine, Nicotine Glucuronide, and 3-Hydroxycotinine Glucuronide in Rat Bile. *Drug Metab. Dispos.* 21: 927-932.
- Semba, J., Matakai, C., Yamada, S., Nankai, M. y Toru, M. (1998). Antidepressantlike Effects of Chronic Nicotine on Learned Helplessness Paradigm in Rats. *Biol. Psychiatry*. 43: 389-391.

- Slotkin, T.A., Orband-Miller, L., Queen, K.L., Whitmore, W.L. y Seidler, F.J. (1987). Effects of Prenatal Nicotine Exposure on Biochemical Development of Rat Brain Regions: Maternal Drug Infusions via Osmotic Minipumps. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240: 602-611.
- Stage, K.B., Glassman, A.H. y Covey, L.S. (1996). Depression after Smoking Cessation: Case Reports. *J. Clin. Psychiatry.* 57: 467-469.
- Stevens, K.E., Kem, W.R., Mahnir, V.M. y Freedman, R. (1998). Selective Alpha7-Nicotinic Agonists Normalize Inhibition of Auditory Response in DBA Mice. *Psychopharmacology Berl.* 136: 320-327.
- Suemaru, K., Yasuda, K., Umeda, K., Araki, H., Shibata, K., Choshi, T., Hibi-no, S. y Gomita, Y. (2004). Nicotine Blocks Apomorphine-Induced Disruption of Prepulse Inhibition of the Acoustic Startle in Rats: Possible Involvement of Central Nicotinic Alpha7 Receptors. *Br. J. Pharmacol.* 142: 843-850.
- Swan, G.E., Benowitz, N.L., Lessov, C.N., Jacob, P., Tyndale, R.F. y Wilhelmsen, K. (2005). Nicotine Metabolism: The Impact of CYP2A6 on Estimates of Additive Genetic Influence. *Pharmacogenet Genomics.* 15: 115-125.
- Takahashi, H., Takada, Y., Nagai, N., Urano, T. y Takada, A. (2000). Previous Exposure to Footshock Stress Attenuates Nicotine-Induced Serotonin Release in Rat Striatum During the Subsequent Stress. *Brain Res. Bull.* 52: 285-290.
- Tizabi, Y. y Perry, D.C. (2000). Prenatal Nicotine Exposure is Associated with an Increase in [125I]Epibatidine Binding in Discrete Cortical Regions in Rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67: 319-323.
- Tizabi, Y., Rezvani, A.H., Russell, L.T., Tyler, K.Y. y Overstreet, D.H. (2000). Depressive Characteristics of FSL Rats: Involvement of Central Nicotinic Receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66: 73-77.
- Todd, R.D., Lobos, E.A., Sun, L.W. y Neuman, R.J. (2003). Mutational Analysis of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Alpha 4 Subunit Gene in Attention Deficit/Hyperactivity Disorder: Evidence for Association of an Intronic Polymorphism with Attention Problems. *Mol. Psychiatry.* 8: 103-108.
- Urakawa, N., Nagata, T., Kudo, K., Kimura, K. e Imamura, T. (1994). Simultaneous Determination of Nicotine and Cotinine in Various Human Tissues Using Capillary Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Int. J. Legal Med.* 106: 232-236.

- Vieyra-Reyes, P., Mineur, Y. S., Picciotto, M. R., Tunez, I., Vidaltamayo, R. y Drucker-Colin, R. (2008a). Antidepressant-Like Effects of Nicotine and Transcranial Magnetic Stimulation in the Olfactory Bulbectomy Rat Model of Depression. *Brain Res. Bull.* 77: 13-8.
- Vieyra-Reyes, P., Picciotto, M.R. y Mineur, Y.S. (2008b). Voluntary oral nicotine intake in mice down-regulates GluR2 but does not modulate depression-like behaviors. *Neurosci. Lett.* 434: 18-22.
- Vieyra-Reyes, P., Venebra-Munoz, A., Rivas-Santiago, B. y Garcia-Garcia, F. (2009). Nicotine as an Antidepressant and Regulator of Sleep in Subjects with Depression. *Rev. Neurol.* 49: 661-667.

Capítulo XII

**Actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* del
extracto acuoso de pérsimo (*Diospyros kaki* L.),
maracuyá (*Passiflora edulis* var Sims)
y flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

Tania Andrómeda Romero Herrera¹
María Dolores Hernández Navarro^{1*}

1. Introducción

Estudios epidemiológicos, han demostrado que algunas enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes y la artritis reumatoide, entre otros padecimientos, están asociados con la producción de radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) (Sun *et al.*, 2002; Aruoma 1998; Drago *et al.*, 2006). En la última década, se sugirió que el consumo de fitoquímicos presentes en frutas y vegetales reduce el riesgo a padecer enfermedades crónicas degenerativas. Estos metabolitos activos tienen la capacidad de modular la actividad de enzimas antioxidantes, actuar como atrapador de especies reactivas y ejercer un efecto quelante frente a la presencia de metales pesados como el cadmio, cobre, hierro, mercurio y zinc (Ferrari *et al.*, 2003; Procházková *et al.*, 2011).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios producidos por el reino vegetal. En algunas especies son los fitoquímicos mayoritarios que participan en diversos procesos de regulación del crecimiento a partir del control del nivel de auxina por la luz solar, así como en la diferenciación y polinización debido a que este tipo de compuestos le confiere coloración a las plantas. Químicamente están conformados por anillos bencénicos con uno o más sustituyentes hidroxilos que les permite actuar como antioxidantes frente a radicales hidroxilo, superóxido y peroxil, pues son capaces de donar un hidrógeno, terminando con ello la reacción en cadena e inhibiendo la generación de nuevos radicales (Manach *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2009). No obstante, se han identificado otros

mecanismos de acción mediante la activación de enzimas antioxidantes e inhibición de oxidasas y quelación de minerales (Gordon, 2001; Cadeña 2002; Procházková *et al.*, 2011).

El pèrsimo (*Diospyros kaki* L.) es un fruto perteneciente a la familia de las *Ebanáceas* de recién introducción comercial a México. Se reconocen dos variedades frutales por su grado de astringencia, esta propiedad es conferida por la presencia de taninos que además de producir el efecto contráctil y el sabor característico, provee características antioxidantes (Park *et al.*, 2006), siendo las especies Rojo Brillante, Triumph, Tomatero, y Hachiya, frutos astringentes y las Fuyu, Hana-Fuyo, Jiro, no astringentes (Morton, 1987). Izuchi *et al.*, (2009) identificaron compuestos polifenólicos como la quercetina, kaempferol, ácido gálico, ácido *p*-hidroxi-benzoico, ácido elágico y miricetina, con actividad antiradicalaria (Jang *et al.*, 2011).

Otro fruto apreciado por su agradable sabor, aroma y propiedades farmacológicas, es la fruta de la pasión o maracuyá (*Passiflora edulis*). Existen dos variedades de amplio consumo: la forma amarilla (*P. edulis* var. *flavicarpa*) y la forma púrpura (*P. edulis* var. *Sims*). La *var. flavicarpa* ha sido utilizada en la medicina tradicional Sudamericana como antiepiléptico, hipnótico, sedante, antiinflamatorio y analgésico (Dhawan *et al.*, 2004; Zibadi *et al.*, 2004; Rudnicki *et al.*, 2007), atribuyendo sus efectos a la presencia de alcaloides, terpenoides y flavonoides glicosilados (Zibadi *et al.*, 2004).

En nuestro país tradicionalmente se emplean los cálices de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) para la elaboración de bebidas típicas de las regiones sin embargo, desde la medicina alternativa prehispánica, era utilizada por sus propiedades diuréticas, antihipertensivas e hipolipemiantes (Odigie *et al.*, 2003). En años recientes se han identificado algunos componentes polifenólicos activos, entre ellos la delphinidina-3-glucósido, sambubiosida, cianidina-3-sambubiosida, gosipetina e hibiscetina, así como ácido protocatecuico, eugenol, β -carotenos, esteroides, ácido cítrico y málico, con potencial antioxidante (Márquez *et al.*, 2007; Sáyo *et al.*, 2007).

Es bien conocido que los frutos *per se* poseen ciertos metabolitos activos con potencial antioxidante no obstante, poco se sabe del comportamiento de mezclas vegetales. Por esta razón el interés del presente trabajo fue evaluar la actividad antioxidante *in vitro* y el efecto antioxidante *in vivo* de los extractos acuosos de pèrsimo (*Diospyros kaki* L), maracuyá (*Passiflora edulis* var *Sims*) y flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) así como su mezcla.

2. Material y Métodos

2.1. Reactivos

Acido L-ascórbico (Vitamina C), ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico (ABTS), persulfato de potasio, ácido tricloroacético (ATC), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), Azul G brillante y el ácido tiobarbitúrico (Sigma Co. St. Louis, MO, USA). Reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

2.2. Obtención de los extractos de pérsimo, maracuyá y flor de jamaica

2.2.1. Frutos

Los frutos de pérsimo (*Diospyros kaki* L) y la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) fueron adquiridos en un supermercado de la Ciudad de Toluca, mientras que el maracuyá (*Passiflora edulis* var Sims) se obtuvieron de un cultivar de Ixtapan de la Sal, Estado de México. La flor de jamaica y el maracuyá fueron identificados y autenticados en el Herbario del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D. F. Los vouchers de los especímenes fueron depositados en esta institución (ICN 15665 para *Passiflora edulis* var Sims e ICN 15663 para *Hibiscus sabdariffa* L).

Los extractos acuosos de pérsimo (P) y maracuyá (M) se obtuvieron pesando tres muestras de 0.5, 1.0 y 2.0 g de pulpa previamente homogenizada con un procesador de alimentos a máxima velocidad por 2 min, las cuales se transfirieron por separado a vasos de precipitados y se añadieron 5 mL de agua a cada uno de acuerdo los procedimientos tradicionales de preparación de bebidas en México. Posteriormente, las muestras fueron filtradas y colectadas para llevar a un aforo de 10 mL con agua. La flor de jamaica fue triturada hasta obtener un tamaño de partícula de 100 mesh y muestras de 0.5, 1.0 y 2.0 g fueron pesadas. Cada una se colocó un papel filtro Whatman # 1 y se adicionaron 5 mL de agua a 60°C hasta obtener un filtrado que se colectó y aforó a 10 mL.

2.3. Fenoles totales

El ensayo se efectuó de acuerdo a modificaciones realizadas por Singleton *et al.*, (1999) del método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Para lo cual se

elaboró una curva patrón de ácido gálico. A 100 µL de extracto acuoso de pèrsimo, maracuyá y jamaica respectivamente, se le adicionó 0.75 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y fue incubada durante 5 min, posteriormente se agregó 750 µL de solución de Na₂CO₃ (80 % p/v) y se mezclaron durante 10s utilizando un vórtex marca 2-Genie (Scientific Industries, USA). Las mezclas se dejaron reaccionar durante 5 min, a temperatura ambiente y en obscuridad. Posteriormente se realizó la lectura a 725 nm empleando un espectrofotómetro marca Génesis 10 UV (Thermoelectron Corporation, USA). Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG)/g muestra.

2.4. Actividad atrapadora del radical libre ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)

La actividad atrapadora del radical fue medida a través del ensayo ABTS con modificaciones al método descrito por Re *et al.* (1999), el cual consistió en la generación del radical ABTS^{•+} mediante la reacción del ABTS (7 mmol) con persulfato de potasio (2.45 mmol) preparado en la obscuridad a temperatura ambiente y con reposo de 12 a 16 h antes de ser utilizado. Una vez generado el radical ABTS^{•+} se diluyó con metanol hasta obtener absorbancia de 0.70 ± 0.20 a 734 nm. Ya estabilizado el radical, se tomó una alícuota de 10 µL del extracto frutal y se mezcló con 990 µL de solución ABTS^{•+}. El registro de la absorbancia se llevó a cabo al 1° y 6° minuto de la reacción. Los resultados obtenidos fueron extrapolados a una curva patrón de Trolox elaborada previamente. La actividad atrapadora del radical fue expresada en µmol Trolox equivalente (TEAC)/100g muestra.

2.5. Actividad antioxidante *in vivo*

2.5.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones de la cepa ICR con un peso entre 20-25 g, se acondicionados durante una semana en un cuarto cerrado bajo condiciones controladas de humedad relativa ($50 \pm 10\%$), temperatura (22 ± 1 °C) y periodos de luz-obscuridad de 12 h cada uno, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-064-ZOO-1999 *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. Posteriormente, se distribuyeron en 10 grupos de experimentación con seis animales cada uno, como se describe a continuación: (I) control (CT), administra-

do con el vehículo (agua); (II) control antioxidante (CA) administrado con 200 mg/kg de ácido L-ascórbico. Los lotes III al X fueron tratados con dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto acuoso respectivamente, por vía intragástrica durante 30 días; donde el lote III y IV recibieron el extracto acuoso de pérsimo, mientras que los grupos V y VI se trataron con el extracto acuoso de maracuyá, los grupos VII y VIII se administraron con el extracto acuoso de flor de jamaica y por último los grupos IX y X recibieron una mezcla de extracto acuoso de pérsimo, maracuyá y flor de jamaica como se describió con anterioridad.

Al final del tratamiento se administró una dosis única de tetracloruro de carbono (CCl_4) (0.7 mL/kg) y se mantuvieron en ayuno durante 12 h; inmediatamente los animales fueron anestesiados en una cámara con éter etílico y se procedió a obtener una muestra de sangre por punción retroorbital, misma que fue colectada en solución de fosfatos 50 mM a pH 7.0 (1:3 w/v) (PBS). Posteriormente, mediante eutanasia, se disectó el hígado y se conservó en una solución de PBS a -20°C hasta su análisis.

2.5.1.1. Preparación de las muestras biológicas

La sangre fue sonicada (Transsonic digital, Alemania) durante 10 minutos para la determinación del grado de lipoperoxidación. Posteriormente se centrifugaron (Eppendorf 5904 R, USA) a 3,500 rpm durante 15 min a -4°C , donde el sobrenadante fue utilizado para determinar el contenido total de proteína y la actividad de la enzima catalasa (CAT).

El tejido hepático fue homogeneizado a 5,000 rpm (Pro Scientific, USA) y centrifugados a 12,500 rpm por 15 min a -4°C . El homogenizado fue utilizado para la determinación del grado de lipoperoxidación, mientras que en el sobrenadante se evaluó el contenido total de proteína y la actividad de la enzima catalasa (CAT).

2.5.2. Determinación del grado de lipoperoxidación

El ensayo se realizó de acuerdo al método descrito por Büege y Aust (1978). Se tomó una alícuota de 200 μL de sangre o hígado homogeneizado, se agregó con 800 μL de buffer de Tris HCl, pH 7.4 a 150 mM. Posteriormente, se mezcló con 1 mL de solución ATB-ATC (0.375 % ácido tiobarbitúrico en 15 % ácido tricloroacético). Las muestras se colocaron en un baño de agua caliente durante 40 min, al término del choque térmico.

mico se enfriaron en un baño de hielo; se procedió a centrifugar a 3,500 rpm por 10 minutos para realizar la lectura del sobrenadante a 535 nm. El resultado fue calculado en nmol de Malondialdehído (MDA/mL en sangre) o (MDA/mg proteína en hígado), usando el coeficiente de extinción molar de $1.58 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

2.5.3. Cuantificación de proteínas

Se tomó una alícuota de 25 μL del sobrenadante obtenido por homogeneización, adicionando 75 μL de agua destilada y 2.5 mL de reactivo de Bradford (0.5 g de azul de Coomassie en 25 mL de etanol al 96% y 50 mL de H_3PO_4 en 500 mL de agua desionizada). Las muestras se agitaron durante 30 segundos y se dejaron reposar en obscuridad durante 5 min, posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm (Bradford, 1976). Los valores obtenidos se extrapolaron a una curva patrón elaborada con albúmina bovina sérica.

2.5.4. Actividad de la enzima catalasa

La enzima catalasa (CAT) fue determinada por el método de Radi *et al.*, (1991), se llevó una alícuota de 60 μL de sobrenadante a 1000 μL con 840 μL de solución amortiguadora de aislamiento (0.3 M sucrosa, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES y 5 mM KH_2PO_4), se agregó 600 μL de una solución de H_2O_2 a 20 mM. Posteriormente se determinó la absorbancia a 240 nm a los tiempos de 0 y 60 s. La actividad de la CAT fue expresada en mmol $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ proteína.

2.6. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (DE), se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y prueba de Tukey-Kramer. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$ empleando el programa estadístico SSPS versión 18 (SPSS Inc, Chicago IL).

3. Resultados y Discusión

3.1. Contenido de Fenoles Totales (CFT)

Estudios recientes han reconocido que la actividad antioxidante está determinada en gran medida por la presencia de compuestos fenólicos presentes en frutos y vegetales (Manach *et al.*, 2004), por lo que en la presente investigación se determinó el contenido de CFT en pérsimo, maracuyá, flor de jamaica y su mezcla en base seca (b.s.) y base húmeda (b.h.). Los resultados muestran que la concentración de CFT en la jamaica es significativamente mayor ($p < 0.05$) (1044.82 ± 1.70 mgEAG/100 g b.h.) con respecto a los extractos acuosos de maracuyá (38.35 ± 0.97 EAG/100 g b.h.), la mezcla (32.8 ± 2.24 EAG/100 g b.h.) y pérsimo (2.59 ± 0.27 EAG/100 g b.h.) (tabla 1).

Tabla 1. Contenido de fenoles totales en extractos acuosos de pérsimo, maracuyá, flor de jamaica y su mezcla

Muestra	Ext. Ac. Pérsimo (mg EAG/100g)	Ext. Ac. Maracuyá (mg EAG/100g)	Ext. Ac. Jamaica (mg EAG/100g)	Ext. Ac. Mezcla (mg EAG/100g)
Base seca (b.s.)	$13.29 \pm 2.59a$	$173.06 \pm 3.85a$	$1170.14 \pm 1.9b$	$75.27 \pm 5.14c$
Base húmeda (b.h.)	$2.59 \pm 0.27a$	$38.35 \pm 0.97a$	$1044.82 \pm 1.70b$	$32.84 \pm 2.24c$

Media $\pm$ Desviación Estándar (n=3) Datos analizados con ANOVA y prueba de Tukey. ($p < 0.05$) Diferencias significativas entre (a) Pérsimo; (b) Maracuyá; (c) Jamaica y (d) Mezcla.

Sáyago *et al.*, (2007) realizaron la determinación de CFT en cálices de *Hibiscus sabdariffa* L, donde encontraron una concentración de 2.17 ± 0.04 gEAG/100g en b.s. correspondiente a 1.85 veces mayor a la reportada en este estudio. Vasco *et al.*, (2008) utilizaron mezclas 50:50 v/v de metanol-agua y acetona-agua para la extracción de fenoles totales en maracuyá fresco, donde la cantidad encontrada fue de 61.0 ± 32.0 mgEAG/100g b.h, mientras que Isabelle *et al.*, (2010) determinaron el contenido de fenoles totales de los extractos cetónicos de *Passiflora edulis* var flavicarpa y *Diospyros kaki* L., determinando concentraciones de 1.34 mgEAG/100g b.h. de maracuyá y 1.16 mgEAG/100g b.h. en pérsimo, respectivamente. Estos resultados evidencian que la influencia del uso de solventes orgánicos (etanol, metanol, acetona), son menos eficaces que las mezclas acuosas (Jang *et al.*, 2011, Mungole *et al.*, 2011).

3.2 Actividad atrapadora del radical ABTS^{•+}

El extracto de flor de jamaica mostró una actividad antioxidante significativamente estadística ($p < 0.05$) ($4044.0 \pm 26.87 \mu\text{mol Trolox}/100\text{g b.h.}$) con respecto a la mezcla p rsimo-maracuyá-flor de jamaica ($1419.11 \pm 50.2 \mu\text{mol Trolox}/100\text{g b.h.}$); al maracuyá ($627.0 \pm 12.73 \mu\text{mol Trolox}/100\text{g b.h.}$) y al p rsimo ($464.5 \pm 13.43 \mu\text{mol Trolox}/100\text{g b.h.}$) (Tabla 2). Estas variaciones guardan una estrecha relación con la proporción de compuestos fenólicos presentes en los productos naturales y de acuerdo a Celik *et al.*, (2008) y Chen *et al.*, (2008) evidencian estos con las condiciones de cultivo, suelo, humedad y variedad del fruto como variables que determinan en la concentración de los compuestos fitoquímicos con capacidad antioxidante en los frutos.

Tabla 2. Actividad antioxidante in vitro de p rsimo, maracuyá, flor de jamaica y su mezcla

Muestra	Ext. Ac. P�rsimo ($\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$)	Ext. Ac. Maracuyá ($\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$)	Ext. Ac. Jamaica ($\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$)	Ext. Ac. Mezcla ($\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$)
Base seca (b.s.)	2384.49 ± 68.96	2559.18 ± 51.95	$4529.06 \pm 30.09\text{ab}$	$1061.94 \pm 37.55\text{ab}$
Base húmeda (b.h.)	$464.50 \pm 13.43\text{a}$	$627.00 \pm 12.73\text{b}$	$4044.00 \pm 26.87\text{c}$	$1419.00 \pm 50.20\text{d}$

Media $\pm$ Desviación Estándar ($n=3$). Datos analizados con ANOVA y prueba de Tukey. ($p < 0.05$) Diferencias significativas entre (a) P rsimo; (b) Maracuyá; (c) Jamaica y (d) Mezcla.

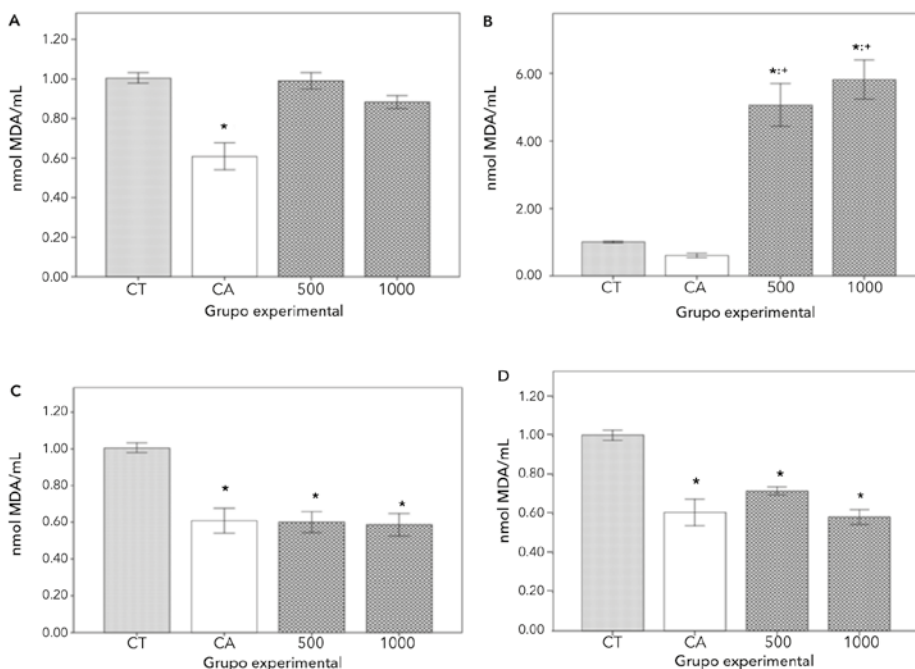
3.3 Actividad antioxidante in vivo

El estrés oxidativo es una condición fisiológica que define la existencia de un desbalance entre las especies reactivas de oxígeno (ERO), n tr geno (ERN) y los mecanismos de defensa antioxidantes con los que cuenta el organismo, ocasionando que los radicales libres interaccionen con los componentes celulares de los tejidos, promoviendo de esta forma el desarrollo de enfermedades degenerativas (Ming *et al.*, 2009). La peroxidación lipídica se inicia cuando existe una interacción entre las especies reactivas oxidantes y los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas biológicas, produciendo como residuo al malondialdehído (MDA), considerado un biomarcador biológico de daño membranaral. La determinación del grado de lipoperoxidación se cuantifica mediante la reacción del MDA con ácido tiobarbitúrico (TBA) para obtener un compuesto cromóforo (Mansour y Mossa, 2009). En el presente estudio, se empleó

como agente inductor de daño oxidativo al tetracloruro de carbono (CCl_4) ya que promueve la formación del radical triclorometilo ($\bullet\text{CCl}_3$) y triclorometil peroxilo (presencia de oxígeno) ($\bullet\text{OOC}\text{Cl}_3$) mediante el proceso de biotransformación por el citocromo CYP2E1 (Atmaca *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2011).

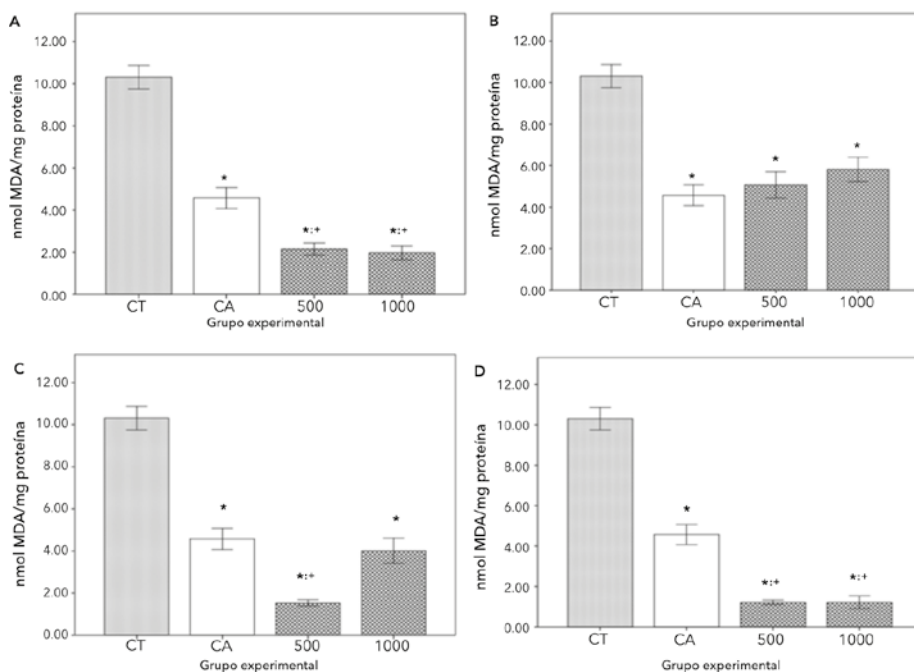
En la figura 1, se muestra el grado de lipoperoxidación en sangre total. Los extractos de flor de jamaica y la mezcla, ejercieron un efecto protector frente al daño inducido por el tetracloruro de carbono (figuras 1C y 1D) mostrando una disminución significativamente estadística ($p < 0.05$) de la formación de malondialdehído (MDA). Los resultados sugieren que a pesar de observar actividad antioxidante *in vitro* en los extractos de pérsimo (figura 1A) y maracuyá (figura 1B), respectivamente, no se correlacionó con el modelo biológico empleado sin embargo, es posible que la dosis no fue suficiente para contrarestar el daño oxidativo del CCl_4 .

Figura 1. Protección del grado de lipoperoxidación en sangre bajo tratamiento subagudo con extractos acuosos de (A) pérsimo, (B) maracuyá, (C) flor de jamaica y (D) Mezcla de pérsimo, maracuyá y flor de jamaica. Los valores son expresados como media $\pm$ Desviación Estándar; $n=6$. Los datos fueron analizados con prueba de ANOVA y método de Tukey-Kramer ($p < 0.05$) Diferencias significativas entre *Grupo control (CT); + Control antioxidante (CA).



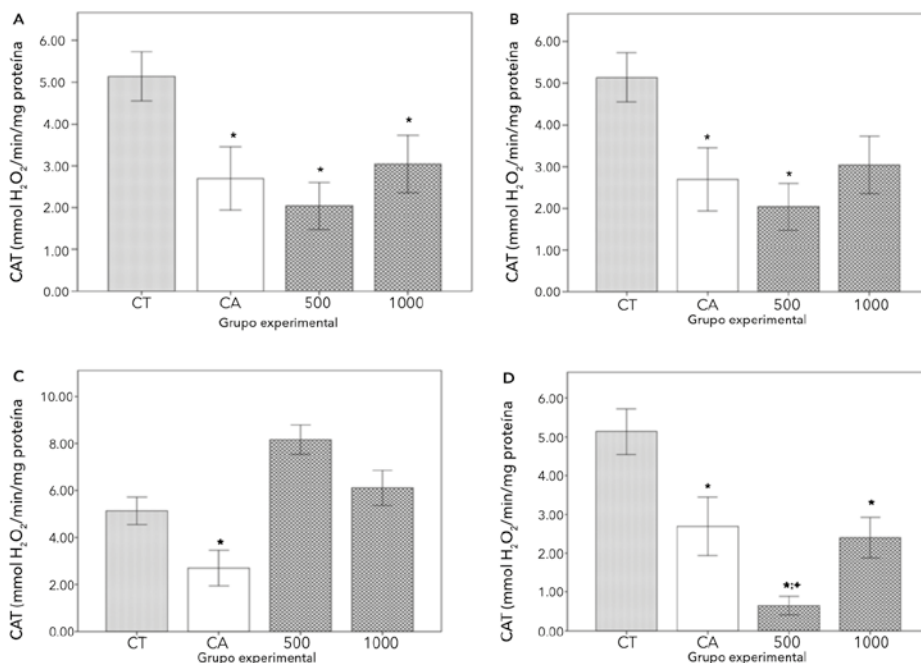
En la figura 2 se muestra la influencia de los extractos acuosos y su mezcla sobre el posible daño hepático producido por el tetracloruro de carbono. Se observó que los extractos acuosos de p rsimo, maracuyá y la flor de jamaica, así como su mezcla ejercen un efecto protector sobre el tejido hepático estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto a los grupos controles (CT y CA respectivamente) (figura 2 A-D), lo que sugiere un efecto antioxidante debido a la presencia de compuestos fenólicos taninos, catequinas, ácido cafeico y ferúlico, antocianinas, catequinas, kaempferol presentes en p rsimo, maracuyá y flor de Jamaica (Talcott *et al.*, 2003; Izuchi *et al.*, 2009; Dembitsky *et al.*, 2011).

Figura 2. Efecto subagudo de los extractos acuosos de (A) p rsimo, (B) maracuyá, (C) flor de jamaica y (D) su mezcla sobre el grado de lipoperoxidación hepática. Los valores son expresados como media $\pm$ Desviación Estándar; $n=6$. Los datos fueron analizados con prueba de ANOVA y método de Tukey-Kramer ($p < 0.05$) Diferencias significativas entre *Grupo control (CT); +Control antioxidante (CA).



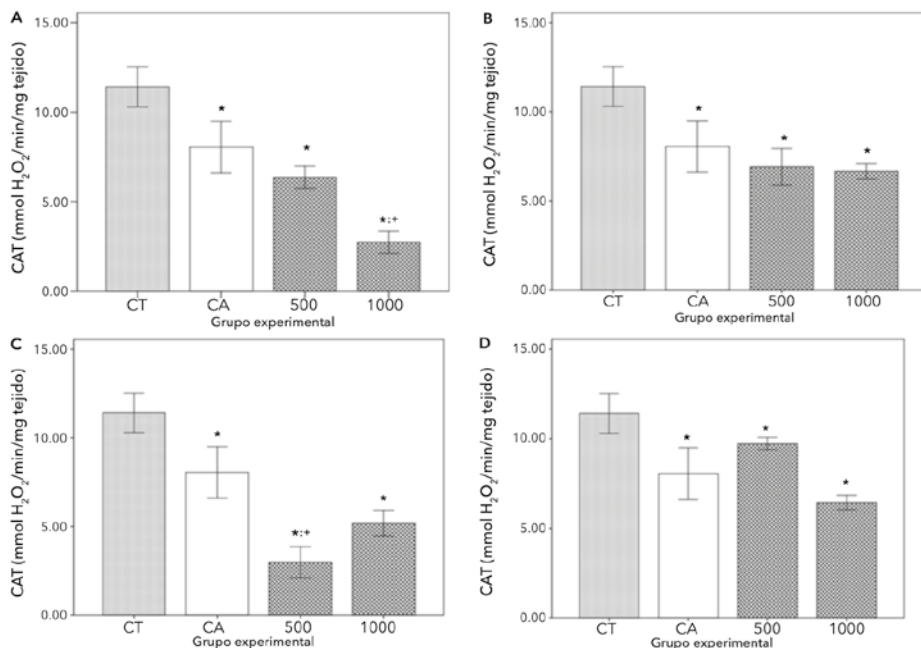
Por otro lado, la exposición a CCl_4 , no solo genera peroxidación lipídica, sino que también ocurre la activación de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) que son generalmente reconocidas como marcadores de exposición y de daño causado por agentes xenobióticos (Datta *et al.*, 2010). La catalasa es una enzima tetramérica capaz de descomponer peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en CO_2 y agua a razón aproximada de 10^7 M/s y se encuentra en células de órganos donde la demanda de oxígeno es mayor como en el hígado, riñón y eritrocitos (Mansour *et al.*, 2009; Goyal *et al.*, 2010). Los resultados mostraron que la actividad de la enzima catalasa en sangre (figura 3) disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en los grupos previamente administrados con pérsimo, flor de jamaica y la mezcla en dosis de 500 y 1000 mg/kg (figura 3A, 3C y 3D) con relación al grupo control (CT) y el control antioxidante (CA), respectivamente.

Figura 3. Efecto antioxidante de los extractos acuosos de (A) pérsimo, (B) maracuyá, (C) flor de jamaica y (D) su mezcla sobre la actividad enzimática de la catalasa en sangre total. Los valores son expresados como media $\pm$ Desviación Estándar; $n=6$. Datos analizados con prueba de ANOVA y método de Tukey-Kramer ($p < 0.05$)
Diferencias significativas entre *Grupo control (CT); *Control antioxidante (CA).



En el hígado, también se observó un decremento significativo ($p<0.05$) en todos los grupos tratados con los frutos individuales y la mezcla, sugiriendo una relación dosis-respuesta (figura 4A, 4B, 4C y 4D).

Figura 4. Actividad enzimática de la catalasa en hígado vs. extractos acuosos de (A) pèrsimo, (B) maracuyá, (C) flor de jamaica y (D) su mezcla pèrsimo, maracuyá y flor de jamaica. Los valores son expresados como media $\pm$ Desviación Estándar; $n=6$. Datos analizados con prueba de ANOVA y método de Tukey-Kramer ($p<0.05$). Diferencias significativas entre *Grupo control (CT); *Control antioxidante (CA).



4. Conclusión

Las dosis administradas al modelo murino de 500 y 1000 mg/kg de extractos acuosos de pèrsimo, maracuyá y flor de jamaica son equivalentes a 35 y 70 g respectivamente. Para consumo de un individuo de 70 kg de peso corporal tomando en cuenta el periodo de 30 días de tratamiento, así como la mezcla, se puede concluir que de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, la ingesta diaria podría ser beneficiosa para la salud, ya que se observó una disminución significativa del daño membranar provocado por las especies oxidantes del CCl_4 , así como una

baja actividad de la enzima catalasa, lo que denota que posiblemente los compuestos fenólicos presentes en los extractos y en su mezcla brindaron cierta protección principalmente en el tejido hepático contra la producción de especies reactivas y de peróxidos.

5. Referencias

- Aruoma, I, O. (1998). Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *JAOCS*. 75 (2): 199-212.
- Atmaca, M., Bilgin, H.M., Obay, B.D., Diken, H., Kelle, M., y Kale, E. (2011). The hepatoprotective Effect of Coumarin and Coumarin Derivates on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Injury by Antioxidative Activities in Rats. *J. Physiol. Biochem*. 67 (4): 569-76.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method of the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*. 72 (1-2): 248-254.
- Büege, J.A. y Aust, S.D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods. Enzymol*. 52: 302-310.
- Cadena, E. y Packer, L. (2002). *Handbook of Antioxidant*. Estados Unidos: Ed Mercel Dekker, 1-5.
- Celik, A. y Ercisli, S. (2008). Persimmon cv. Hachiya (*Diospyros kaki* Thunb.) Fruit: Some Physical, Chemical and Nutritional Properties. *Int. J Food. Sci. Nutr*. 59 (7-8): 599-606.
- Chen, X.N., Fan, J.E., Yue, X., Wu, X.R. y Li, L.T. (2008). Radical Scavenging Activity and Phenolic Compounds in Persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Mopan). *J. Food. Sci*. 73 (1): C-24-C28.
- Dhawan, K., Dhawan, S. y Sharma A. (2004). *Passiflora*: A Review Update. *J. Ethnopharmacol*. 94: 1-23.
- Datta, S., Dhar, P., Mukherjee, A. y Ghosh, S. (2010). Influence of Polyphenolic Extracts from *Enydra Fluctuans* on Oxidative Stress Induced by Acephate in Rats. *Food. Chem. Toxicol*. 48: 2766-2771.
- Dembitsky, V.M., Poovarodom, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Vearasilp, S., Trakhtenberg, S. y Gorinstein, S. (2011). The Multiple Nutrition Properties of Some Exotic Fruits: Biological Activity and Active Metabolites. *Food Res Int*. 44: 1671-1701.

- Diario Federal de la Nación. Norma Oficial Mexicana. NOM-064-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Drago, S.M.E., López, L.M. y Saíenz E.T. del R. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 37 (4): 58-68.
- Ferrari, C.K.B. y Torres, E.A.F.S. (2003). Biochemical Pharmacology of Functional Foods and Prevention of Chronic Diseases of Aging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 57: 251-260.
- Gordon, M. H. (2001). The Development of Oxidate Rancidity in Foods. En: Pokorny J., Yanishlieva, N. y Gordon, M. *Antioxidant in Food*. Estados Unidos: CRC Press, 7-21.
- Goyal, M.A. y Basak, A. (2010). Human Catalase: Looking for Complete Identify. *Protein Cell*. 1 (10): 888-897.
- Isabelle, M., Lee, B.L., Lim, M.T., Koh, W.P., Huang, D. y Ong, C.N. (2010). Antioxidant Activity and Profiles of Common Vegetables in Singapore. *Food Chem*. 123: 77-84.
- Izuchi, R., Takahaski, H. and Inada, H. 2009. Preparing a Carotenoid Polyphenol-Enriched Extract from the Peel of Persimmon, Diospyros kaki L.f. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (12): 2793-2795.
- Jang, I.C., Oh, W.G., Ahn, G.H., Lee, J.H. y Lee, S.C. (2011). Antioxidant Activity of 4 Cultivars of Persimmon Fruit. *Food Sci. Biotechnol.* 20 (1): 71-77.
- Kumar, J.N., Lodhi, S., Jain, A., Nahata, A. y Singahi, A.K. (2011). Effects of Phyllanthus acidus (L.) Skeels Fruit on Carbon Tetrachloride-Induced Acute Oxidative Damage in Livers of Rats and Mice. *Chin. J. Integrat. Med.* (9) 1: 49-56.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. y Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *Am. J. Clin Nutr.* 79: 727-747.
- Mansour, S.A. y Mossa, A.T.W. (2009). Lipid Peroxidation and Oxidative Stress in Rat Erythrocytes Induced by Chlorpyrifos and the Protective Effect of Zinc. *Pestic. Biochem. Phys.* 93: 34-39.
- Márquez, V.R.L., De la Rosa, T.C., Rivero, C.A. y Medina, M.M. (2007). Actividad diurética del extracto total acuoso de los cálices de Hibis-

- cus sabdariffa L administrado en ratas albinas. *Wistar. Sci. Tech. XII.* (33): 377-381.
- Ming, M., Guanhua, L., Zhanhia, Y., Guang, C. y Xuan, Z. (2009). Effect of the Lycium barbarum Polysaccharides Administration on Blood Lipid Metabolism and Oxidative Stress of Mice Fed High-Fat Diet in vivo. *Food Chem.* 113: 872-877.
- Morton, J. (1987). Japanese Persimmon. En: Morton, J. *Fruits of Warm Climates*. Estados Unidos: Julia F. Morton, 411-416.
- Mungole, A. y Chaturvedi, A. (2011). Hibiscus sabdariffa L A Rich Source of Secondary Metabolites. *Int. J. Pharmac. Sci. Rev. Res.* 6 (18): 83-87.
- Odigie, I.P., Ettarh, R.R. y Adigun, S.A. (2003). Chronic Administration of Aqueous Extract of Hibiscus sabdariffa Attenuates Hypertension and Reverses Cardiac Hypertrophy in 2K-1C Hypertensive Rats. *J. Ethnopharmacol.* 86: 181-85.
- Park, T.S., Jung, S.T., Kang, S.G., Delgado, L.E., Martínez, A.A.L., Tapia, O.M.S., Belloso, M.S., Trakhtenberg, S. y Gorinstein, S. (2008). Drying of Persimmons (*Diospyros kaki* L) and the Following Changes in the Studied Bioactive Compounds and the Total Radical Scavenging Activities. *LWT.* 39: 748-55.
- Pereira, D.M., Vlentão, P., Pereira, J.A. y Andrade, A.B. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules.* 14: 2202-2211.
- Procházková, D., Bousova, I. y Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids. *Fitoterapia.* 82: 513-523.
- Radi, R., Turrens, J.F., Bush, M.J., Crapo, J.D. y Freeman, B.A. (1991). Detection of Catalase in Rat Heart Mitochondrial. *J. Bio Chem.* 266 (32): 22028-22034.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant Activity Applying An Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free. Rad. Bio. Med.* 26: 1231-1237.
- Rudnicki, M., de Oliveira, M.R., Veiga, P.T.D., Reginatto, F.H., Dal, P.F. y Fonseca, M.J.C. (2007). Antioxidant and Antiglycation Properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* Extracts. *Food Chem.* 100: 719-724.

- Sáyago-Ayerdi, S.G., Arranz, S., Serrano, J. y Goñi, I. (2007). Dietary Fiber Content and Associated Antioxidant Compounds in Roselle Flower (*Hibiscus sabdariffa* L) Beverage. *J. Agric. Food Chem.* 55: 7886-7890.
- Singleton, V.L., Orhofer, R. y Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidant by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Method Enzymol.* 299: 152-158.
- SPSS Institute Inc. (2009). *SPSS for Windows: version 18*. Chicago.
- Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X. y Lui, H. R. (2002). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Common Fruits. *J. Agric. Food. Chem.* 50: 7449-7454.
- Talcott, S., Percival, S.S., Pittet, M.J. y Celoria, C. (2003). Phytochemical Composition and Antioxidant Stability of Fortified Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis*). *J. Agric. Food Chem.* 51: 935-941.
- Vasco, C., Ruales, J. y Kamal, E.A. (2008). Total Phenolic Compounds and Antioxidant Capacities of Major Fruit from Ecuador. *Food Chem.* 111: 816-823.
- Zibadi, S. y Watson, R.R. (2004). Passion Fruit (*Passiflora edulis*): Composition, Efficacy and Safety. *Evid. Based. Integrative. Med.* 3:183-187.

Capítulo XIII

Cinética del daño al DNA por la incorporación del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT (49-57) Lys3-BN}$ empleando el ensayo cometa en linfocitos humanos*

Myrna Alejandra Luna Gutiérrez¹
Julieta Castillo Cadena*¹
Guillermina Ferro Flores²
Rafael Valencia Quintana²

1. Introducción

1.1. Radiofármacos

Los radiofármacos pueden ser definidos como toda sustancia que contiene un átomo radiactivo dentro de su estructura y que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación, pueden ser administrados en seres humanos con fines diagnósticos o terapéuticos (Kowalsky *et al.*, 2004). Los primeros sirven para realizar un estudio fisiológico del órgano. Están compuestos por un radionúclido emisor de radiación gamma procedente del núcleo del átomo, el cual se une a un ligante formando un complejo estable que a su vez se une a una molécula cuyo comportamiento biológico dentro del organismo es el adecuado para el estudio (Fini *et al.*, 2001). Los radiofármacos de diagnóstico utilizan emisiones de rayos gamma con una energía entre 0.1 y 0.2 Megabequerels (MeV) que permiten su detección externa (Burke, 2001). Una vez administrados, los radiofármacos de terapia, la radioactividad se acumula sobre el tejido y ejerce un efecto terapéutico, generalmente los radionúclidos escogidos transmiten una radiación no penetrante emisión beta (β) que por lo general se emplean radionúclidos con una energía máxima de 1 y 2 MeV, los cuales penetran unos milímetros al tejido maligno (Welch *et al.*, 2003).

1.1.1. Radiofármacos según su especificidad

Actualmente los radiofármacos están teniendo mayor relevancia médica y con el tiempo han evolucionado, debido a esto se han clasificado según la generación a la que pertenecen:

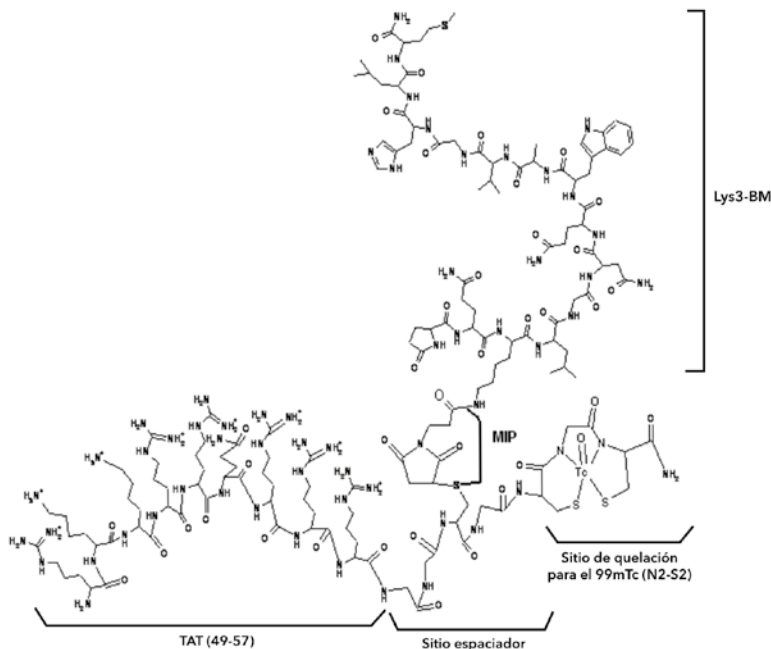
Los de primera generación marcan compuestos que pueden ser capturados por un órgano determinado sin receptor específico, donde se administran radiopartículas captadas aprovechando procesos fisiológicos que se llevan a cabo normalmente en el cuerpo (Anderson *et al.*, 1982).

Los de segunda generación son el resultado del desarrollo de compuestos de coordinación bien caracterizados, donde un metal se une a un ligando en una geometría bien definida (Ferro *et al.*, 2006).

Los radiofármacos de tercera generación se emplean en medicina nuclear para obtener imágenes de blancos moleculares específicos y son únicos en su capacidad para detectar in vivo sitios bioquímicos tales como, receptores y enzimas. Se compone de tres partes: el radionúclido, el agente quelante o bifuncional (BFCA), y el fragmento bioactivo (Vera, 1998; Verdura, 2007).

Uno de los radiofármacos de tercera generación, es el $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT(49-57)-Lys}^3\text{-BN}$ cuya estructura se muestra en la figura 1, tiene una pureza radioquímica mayor al 90%, alta estabilidad en suero humano y rápida internalización en células PC-3 en comparación con otros péptidos radiomarcados análogos a la bombesina. Se han realizado las pruebas de biodistribución en ratones, a los cuales se les administró el radiofármaco y demostró que este se excreta por vía renal y en un lapso de 24 horas es eliminado totalmente del organismo (Ferro *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2009). Este radiofármaco tiene un peso molecular de 3779.5 g/mol y su fórmula es: $\text{C}_{151} \text{H}_{261} \text{N}_{63} \text{O}_{41} \text{S}_4$.

Figura 1. Estructura del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT}$ (49-57)-Lys³-BN



Se estima que el radiofármaco $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT}$ (49-57) Lys³-BN podría permitir la proyección de imagen clínica específica de tumores de pecho y próstata debido a los receptores y a los componentes que contiene (Ferro et al, 2006). Los receptores del péptido liberador de la gastrina (GRP-r) se encuentran distribuidos en muchos órganos, pero se sobre expresan en la membrana de las células malignas, especialmente en las de cáncer de mama y próstata (Gugger et al., 1999; Varvarigou et al., 2002; Varvarigou et al., 2004). Los GRP-r se unen específicamente a la bombesina y este fuerte enlace es el fundamento para marcar la bombesina (BN) con radionúclidos emisores de radiación gamma, para la obtención *in vivo* de imágenes de receptores GRP por técnicas de medicina nuclear molecular (Scopinaro et al., 2003).

Es importante señalar que después de la interacción receptor-ligando (GRP-r-BN), el compuesto queda anclado en la membrana celular (Reubi, 2003; Lin et al., 2005; Nock et al., 2003; Nock et al., 2005). Por otro lado, se sabe que el dominio básico de la proteína TAT del HIV-1, es decir el TAT (49-57), es un péptido que penetra o atraviesa fácilmente la membra-

na celular por lo que, conjugado a diferentes fármacos, proteínas, péptidos y nanopartículas, actúa como un “caballo de Troya” al incrementar de forma significativa la internalización celular de los diferentes fármacos o biomoléculas (Dietz *et al.*, 2004).

En las cinéticas de inducción de daño al ADN, el efecto genotóxico, producido por el péptido TAT-BN, está dado por la capacidad que tiene la proteína TAT de penetrar al núcleo celular, esto fue reportado en las investigaciones realizaron por Green y Frankel (1988), quienes observaron que un péptido de 86 aminoácidos del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) llamado TAT penetraba a las células y activaba la transcripción. Subsecuentemente, encontraron que una región básica de la proteína en los residuos 49-57, era la responsable de la habilidad de penetrar a las células. Por otro lado, Futaki (2005) realizó una revisión de cómo actúa el TAT en la internalización celular y concluyó que el segmento de la proteína TAT en los residuos de 48-60 contiene seis argininas y dos lisinas, las cuales son responsables del carácter hidrofílico y naturaleza básica del péptido, y que conjugándose a proteínas de fusión se internalizan eficientemente en las células y existe una influencia en las funciones de la célula, como es la duración del ciclo celular.

1.2. Ensayo cometa

La técnica de electroforesis de células únicas o ensayo cometa es una de las pruebas capaces de detectar daños en el ADN. Se caracteriza por ser un método sensible, rápido, sencillo, de bajo costo y aplicable a varios tipos de células. La versión de Singh *et al.* (1988), bajo condiciones de lisis y electroforesis alcalina (pH >13), permite analizar la migración del ADN debido a rupturas en la hebra simple del ADN y sitios álcali lábiles. El ensayo cometa se utiliza ampliamente para detectar en células individuales, el daño *in vitro* o *in vivo* causado por agentes genotóxicos, ya sean químicos o físicos. Con algunas modificaciones pueden evaluarse la inducción de enlaces cruzados, los mecanismos de reparación celular y de apoptosis (Singh *et al.*, 1988; Singh *et al.*, 1994).

1.2.1 Fundamento del ensayo cometa

Esta técnica consiste en embeber células en agarosa para darles soporte sobre una laminilla. Posteriormente, las células se sumergen en una solución de lisis, la cual tiene un alto contenido de detergentes y sales para

lisar la membrana celular. Consecutivamente, las laminillas se sumergen en una solución amortiguadora por un determinado tiempo para permitir que se desenrolle la doble hélice del ADN. Al término de este proceso, las laminillas se exponen a una corriente eléctrica y dependiendo del grado de daño o fragmentación del ADN, se observará una mayor o menor migración del mismo. Después de exponer las laminillas a una corriente eléctrica, se neutraliza la laminilla con una solución amortiguadora de pH 7.5. Finalmente la laminillas se tiñen con un fluorocromo, como el bromuro de etidio para poder analizarlas en el microscopio de fluorescencia (Speit *et al.*, 1999).

El ADN fragmentado migra al ser expuesto a la corriente eléctrica, por ello las células al ser observadas al microscopio, semejan un cometa con cabeza altamente fluorescente (ADN enrollado) y una cola (ADN fragmentado) que incrementa su longitud dependiendo del daño (Singh *et al.*, 1994).

1.2.2. Aplicaciones y ventajas de la utilización del ensayo cometa

La técnica de ensayo cometa se utiliza ampliamente para evaluar el potencial genotóxico de diversas sustancias químicas, se aplica *in vivo* e *in vitro*, detecta niveles bajos de daño, emplea pequeñas cantidades de muestra, evalúa el daño en células que no se encuentran proliferando, detecta rompimiento de cadenas sencillas y doble, sitios álcali lábiles y sitios de reparación por escisión de bases nitrogenadas, además de que permite el análisis del daño genético a nivel de células individuales (1994).

El ensayo cometa se puede aplicar a diferentes tipos celulares, con lo cual permite su uso en diferentes estudios, tales como de genotoxicidad, reparación, biomonitoreo ambiental, biomonitoreo humano y en la clínica (1994).

1.3. Ensayos de internalización

Una de las técnicas que se utiliza para evaluar la internalización celular en medicina nuclear es el conteo de radioactividad, el cual consiste en incubar células a diferentes tiempos con un radiofármaco. Posteriormente, las células son lavadas por varias ocasiones, enseguida se le añade una solución de NaOH para lisar las células y se realiza el conteo radiactivo

por medio de un detector de centelleo. Los resultados se expresan en porcentajes de actividad (Ferro *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2009).

Otra forma para realizar estudios de internalización es con técnicas de genotoxicidad, por medio de los cuales se evalúa el daño al ADN, ejemplo de esto es el ensayo cometa. Por tal razón el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del TAT sobre la cinética de internalización a la célula del $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT(49-57)-Lys}^3\text{-BN}$, medido a través de la inducción de daño al ADN con el ensayo cometa en sangre periférica.

2. Metodología

2.1 Obtención de la muestra

Se extrajeron de 2 a 3 mL de sangre periférica de 3 individuo clínicamente sanos, por punción venosa en un tubo con 0.1 mL de heparina por cada mL de sangre. Se realizaron 3 réplicas del ensayo cometa por actividad radiactiva. Se sometieron a los siguientes tratamientos: a) péptido TAT-BN; b) $^{99m}\text{Tc-BN}$; c) $^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$ y d) sin tratamiento, el cual fue tomado como grupo control.

2.2. Marcado de Radiofármacos

Preparación de $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT(49-57)-Lys}^3\text{-BN}$ o ($^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$): en un vial se colocó 1 mg de $\text{N}_2\text{S}_2\text{-TAT(49-57)-BN}$ disuelto en 1 mL de solución salina. A 10 μL de esta solución se le adicionaron 4 μL de buffer de tartrato de sodio (50 mg/mL de tartrato de sodio en $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COOH}$ 0.1 M, pH 9.5), 4 μL de solución SnCl_2 (10 mg de SnCl_2 en 10 μL HCl concentrado diluido en 10 mL de agua inyectable) y 25 μL de pertecneciato de Sodio ($^{99m}\text{TcO}_4\text{-Na}$). Finalmente, se mezcló y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las actividades empleadas para el marcado fueron 2.9, 6.6, 9.0 y 14.8 MBq. La pureza radioquímica fue evaluada por cromatografía de capa fina (ITLC).

Preparación del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-Lys}^3\text{-BN}$ o ($^{99m}\text{Tc-BN}$): se realizó colocando 1 mg de HYNIC-BN en 200 μL de etanol al 10%, y 800 μL de agua inyectable previamente nitrogenada. A 20 μL de esta solución se le adicionaron 500 μL de una solución EDDA/TRICINA (30 mg de ácido N, N'-etilendiaminodiacético y 60 mg de tricina en 3.0 mL buffer

de fosfatos 0.2 M, pH 7) 500 μL de pertecneciato ($^{99m}\text{TcO}_4\text{-Na}$) y 20 μL de solución de SnCl_2 (10 mg de SnCl_2 en 10 μL HCl concentrado diluido en 10 mL de agua inyectable), y se colocó en baño seco a 90°C durante 15 minutos. Las actividades empleadas para el marcado fueron 2.9, 6.6, 9.0 y 14.8 MBq. La pureza radioquímica fue evaluada de la misma manera que el radiofármaco con TAT-BN.

Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis con una $p \leq 0.05$, para la búsqueda de diferencias significativas entre los tratamientos y el control, con el paquete Sigma Stat 3.5.

3. Resultados

3.1. Evaluación de la pureza radioquímica de los radiofármacos $^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$ y $^{99m}\text{Tc-BN}$ por cromatografía de capa fina (ITLC)

La pureza radioquímica de $^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$ y $^{99m}\text{Tc-BN}$ (Tabla 1), se presentan los promedios obtenidos con actividades 2.9, 6.6, 9.0 y 14.8 MBq por triplicado.

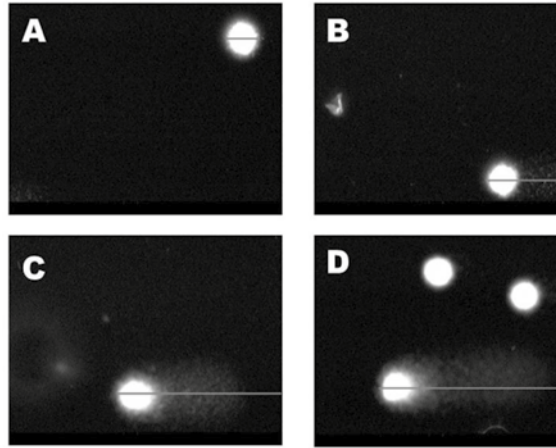
Tabla 1. Purezas radioquímicas de los radiofármacos con cromatografía de capa fina (ITLC)

Actividad (MBq)	$^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$ Pureza Radioquímica (%)	$^{99m}\text{Tc-BN}$ Pureza Radioquímica (%)
2.9	98.61	96.9
6.6	98.52	95.7
9.0	99.67	95.4
14.8	98.83	96.0

3.2. Cinética de internalización del radiofármaco

Se observaron núcleos redondos y bien definidos en los controles (A), mientras que en presencia de los radiofármacos, hubo daño a diferente grado, lo que se evidencia por la migración de los fragmentos del ADN fuera del núcleo, como se muestra en la figura 2 B,C,D.

Figura 2. Células con diferente grado de daño al DNA



Los resultados no mostraron diferencias al ser evaluado el daño con la longitud de la cauda y el Tail Moment, por lo cual se decidió presentar los datos de las cinéticas evaluadas con este último. El daño al ADN por los diferentes tratamientos en los linfocitos con una actividad de radiación de 2.9 MBq hasta los 15 min fue homogéneo, sin diferencia significativa entre los mismos. Hubo un incremento significativo por los dos radiofármacos y el péptido a los 30 y 60 min (tabla 2).

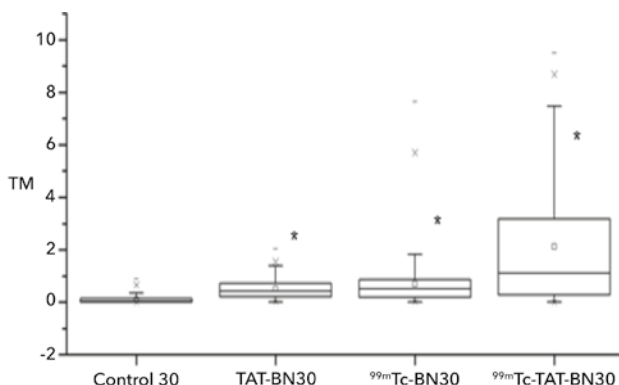
Tabla 2. Cinética de inducción de daño al ADN con el ensayo cometa con una actividad de 2.9 MBq

Tiempo (min)	Control $\bar{x}$	TAT-BN $\bar{x}$	^{99m}Tc -BN $\bar{x}$	^{99m}Tc -TAT-BN $\bar{x}$
0	0.12	0.05	0.01	0.02
5	0.13	0.06	0.05	0.15
10	0.14	0.16	0.06	0.31
15	0.13	0.17	0.15	0.37
30	0.14	0.41	0.50	1.11
60	0.10	0.81	0.89	0.27

Se buscaron diferencias entre los tratamientos y tiempos, para ello se aplicó Kruskal-Wallis seguida de método de Dunn's, con $p \leq 0.05$, y se encontraron significativas al minuto 30, como se muestra en la figura 3.

Para la actividad de 6.6 MBq, se encontraron incrementos discretos a lo largo de todos los tiempos en la cinética, llamando la atención el TAT-BN, en donde el incremento mayor fue a las 30 minutos, con respecto al $^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$. Se observó un incremento del daño conforme transcurrió el tiempo, llegando al máximo a los 30 minutos y un decremento muy importante a los 60 minutos, posiblemente, debido a una mayor internalización al núcleo celular y por la emisión de electrones Auger (tabla 3).

Figura 3. Resultados del análisis estadístico a los 30 min con 2.9 MBq



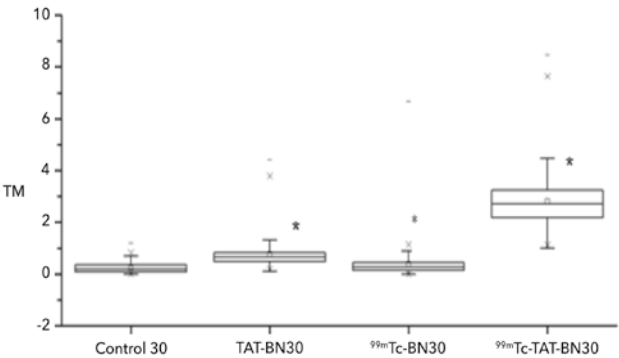
* Diferencia significativa vs control

Tabla 3. Cinética de internalización de los diferentes tratamientos con 6.6 MBq

Tiempo (min)	Control $\bar{x}$	TAT-BN $\bar{x}$	$^{99m}\text{Tc-BN}$ $\bar{x}$	$^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$ $\bar{x}$
0	0.63	0.25	0.65	0.18
5	0.63	0.28	0.22	0.40
10	0.64	0.31	0.28	0.48
15	0.42	0.36	0.26	0.85
30	0.70	0.50	0.22	0.88
60	0.60	0.26	0.17	0.33

El análisis estadístico mostró diferencia significativa a los 30 minutos entre TAT-BN, $^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$, respecto al control, ver figura 4.

Figura 4. Comparación del daño al ADN con los diferentes tratamientos y 6.6 MBq a los 30 min.



* Diferencia significativa vs control

Con una actividad de 9.0 MBq, se incrementó el tiempo de la cinética de internalización hasta 90 min, para determinar si se mantenía el daño o existía un proceso de reparación. El radiofármaco ^{99m}Tc -TAT-BN indujo un incremento desde el minuto 5 hasta el 30, en comparación de los otros tratamientos. Los tratamientos con el péptido TAT-BN y ^{99m}Tc -TAT-BN mostraron diferencia significativa con respecto al control desde el min 5 hasta alcanzar el valor máximo de daño a los 30 minutos sin embargo, al minuto 60 hubo una disminución del efecto genotóxico, pero continuó siendo diferente significativamente, hasta llegar el min 90, donde ya no lo fue. Cabe destacar que el daño inducido por el radiofármaco ^{99m}Tc -BN durante los primeros 15 minutos no fue diferente con respecto al control, pero comenzó a incrementar el daño a los 30 y 60 minutos, donde alcanzó su punto máximo y después disminuyó a los 90 min (Ver tabla 4).

Tabla 4. Cinética de daño al ADN con los diferentes los tratamientos a 9.0 MBq

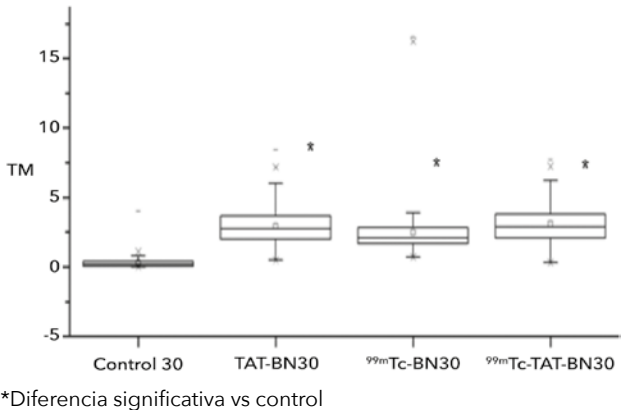
Tiempo (min)	Control $\bar{x}$	TAT-BN $\bar{x}$	^{99m}Tc -BN $\bar{x}$	^{99m}Tc -TAT-BN $\bar{x}$
0	0.84	0.30	0.19	0.46
5	0.85	0.43	0.26	2.88
10	0.98	1.32	0.40	3.71
15	0.85	2.58	0.55	6.11
30	0.80	3.28	2.17	7.00

Continúa...

Tiempo (min)	Control $\bar{x}$	TAT-BN $\bar{x}$	$^{99m}\text{Tc-BN}$ $\bar{x}$	$^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$ $\bar{x}$
60	0.87	2.73	3.15	3.94
90	0.79	0.43	1.12	0.38

En la figura 5 se muestran los resultados de la comparación de los tratamientos en la inducción de daño al ADN con un actividad de 9.0 MBq a los 30 min.

Figura 5. Comparación del daño al ADN a los 30 min con 9.0 MBq



Los resultados de la cinética de internalización con 14.8 MBq se muestran en la tabla 5, a los 15 min mostraron un comportamiento homogéneo. Se encontró un incremento del daño al ADN por $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT}$ (49-57)-BN y $^{99m}\text{Tc-BN}$ a los 30 y 60 min. Por otro lado, con $^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$, existió mayor daño al ADN, ocasionado por la internalización del TAT y por la emisión en mayor número de electrones Auger del ^{99m}Tc .

Tabla 5. Cinética de internalización de los 3 tratamientos con 14.8 MBq

Tiempo (min)	Control $\bar{x}$	TAT-BN $\bar{x}$	$^{99m}\text{Tc-BN}$ $\bar{x}$	$^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$ $\bar{x}$
0	0.93	1.42	0.57	1.04
5	0.97	1.45	0.79	2.45
10	0.70	2.45	1.24	3.98

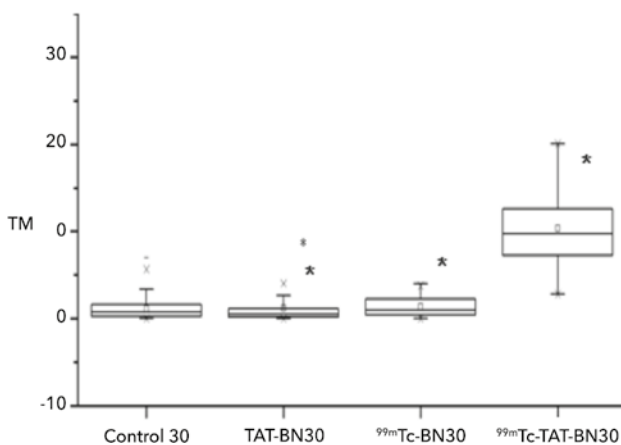
Continúa...

Tiempo (min)	Control $\bar{X}$	TAT-BN $\bar{X}$	^{99m}Tc -BN $\bar{X}$	^{99m}Tc -TAT-BN $\bar{X}$
15	0.71	2.64	1.43	4.49
30	0.73	1.60	3.44	5.79
60	0.82	1.99	1.21	12.61

De acuerdo a Kruskal-Wallis, todos los resultados obtenidos con los tres tratamientos a los 30 minutos, mostraron una diferencia significativa respecto al control $p \leq 0.05$ (ver figura 6).

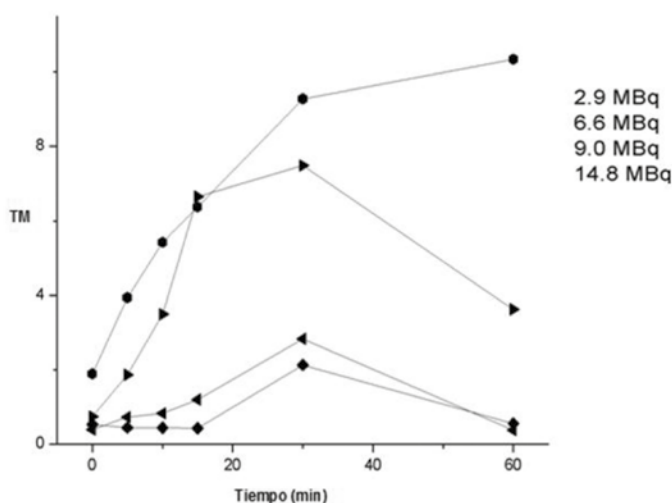
De manera integral, se encontró que la molécula completa del radiofármaco ocasiona el mayor daño al ADN a los 30 min, con las diferentes actividades de radiación probadas. En la figura 7 se muestra la cinética de internalización del radiofármaco ^{99m}Tc -TAT-BN con las diferentes actividades, encontrando equivalencias del daño al ADN, a tiempos muy cortos y actividades mayores. Como se observa con 2.9 MBq, con un tratamiento durante 30 min, se obtiene el mismo daño que con 14.8 MBq en el tiempo 0. Se observó que a los 60 min el daño al ADN con las diferentes actividades probadas disminuye, excepto con 14.8 MBq en donde este aumenta.

Figura 6. Resultados del daño al ADN a los 30 minutos con 14.8 MBq



*Diferencia significativa vs control

Figura 7. Daño al ADN por el radiofármaco $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT}$ (49-57)-Lys³-BN con las diferentes actividades de radiación



4. Discusión

Existen diversas formas para la evaluación del daño al ADN, en esta investigación utilizamos el ensayo cometa que fue descrito primeramente por Singh (1988), por ser una técnica que permite detectar de manera fácil y rápida el daño genotóxico que puede existir en el ADN a nivel de células individuales, el cual fue evaluado con el Tail Moment. Los radiofármacos han adquirido gran importancia en la práctica clínica sin embargo, son pocas las investigaciones que han empleado el ensayo cometa para conocer su acción. En este estudio, evaluamos la incorporación del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT}$ (49-57) Lys3-BN al núcleo celular, midiendo la internalización al núcleo y como consecuencia la fragmentación del ADN con esta técnica.

Pedraza *et al.* (2001), evaluaron el efecto genotóxico inducido por la incorporación de los radiofármacos de ^{99m}Tc en la célula, determinado por el ensayo cometa en linfocitos de ratón *in vitro*, utilizando $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ y $^{99m}\text{Tc-gentisico}$ con una actividad de radiación de 15.9 MBq dándoles un pulso de 10 min, lo cual indujo 98% y 94% de células con daño al ADN respectivamente. Concluyen que el daño fue producido por la acción de los electrones Auger, producto del decaimiento de ^{99m}Tc depositando toda la

energía en la célula, donde ^{99m}Tc -HMPAO se incorporó en el citoplasma, y ^{99m}Tc -gentisico se unió a la membrana celular. Por lo tanto, los electrones Auger pueden causar daño importante al ADN cuando el radionúclido se incorpora en el radio de acción de algunos micrones del núcleo. En este estudio, tras la exposición de los linfocitos a los radiofármacos ^{99m}Tc -BN y ^{99m}Tc -TAT-BN demostramos una inducción de daño al ADN con el ensayo cometa, utilizando cuatro actividades de radiación, así como varios tiempos, el cual fue evaluado con el TM. Ambos trabajos están indicando un efecto positivo, sobre la internalización de los radiofármacos dado por la presencia del ^{99m}Tc .

Con relación al ^{99m}Tc -BN sin TAT, Ferro *et al.* (2006) realizaron un ensayo de internalización de este radiofármaco utilizando células PC-3, las cuales dividieron en dos grupos: a) con receptores GRP bloqueados; y b) sin receptores bloqueados. Las células fueron expuestas a ^{99m}Tc -EDDA/HY-NIC-BN en diferentes tiempos de incubación, midieron la actividad internalizada, obteniendo el 8% a las 2 h; y el 11.5% a las 4 horas en el grupo sin bloquear, mostrando diferencia significativa en comparación con las bloqueadas. Nuestros resultados muestran la mayor internalización del radiofármaco a los 30 minutos medido con el ensayo cometa a las condiciones probadas, estos resultados sugieren que este biomarcador puede ser una mejor estrategia para detectar la internalización celular al núcleo.

Con relación a el efecto de los electrones Auger, Faraggi *et al.* (1994), probaron que el ^{111}In emite 14.7 electrones Auger por decaimiento con una energía de 6.75 KeV, y que la radiación de dosis absorbida en el núcleo es de 2 a 35 veces del doble o mayor del decaimiento en el núcleo, comparado con el decaimiento ocurrido dentro del citoplasma o en la membrana celular. Estas propiedades hacen que el ^{111}In y otros emisores de electrones Auger, sean altamente citotóxicos y dañen al ADN cuando decaen cerca del núcleo de la célula, haciéndolas altamente selectivas para matar a las células cancerosas.

Buchegger *et al.* (2006), reportaron que la doble hélice de ADN presenta un diámetro aproximado de 2 nanómetros, y que en un decaimiento típico de la radiación de los electrones Auger, la energía más alta ocurre en rangos de 1 y 2 nanómetros. Esto significa que la energía local calculada por un emisor de electrones Auger incorporado al ADN, afecta a la doble hélice con una energía de 1.6 MGy o más; esta energía de radiación es en gran parte, suficiente para dañar a la doble hélice del ADN sobre las distancias de varios nucleótidos.

Volkert *et al.* (1991), demostraron que la incorporación de los electrones Auger dentro del núcleo de las células producen una alta radiotoxicidad. Esto, debido a la deposición de una gran cantidad de energía emitida en forma de lluvia por los electrones Auger, en un volumen extremadamente pequeño dentro del núcleo celular, ellos sugirieron que los agentes radioterapéuticos basados en emisores de electrones Auger, requieren de la incorporación del radiofármaco en toda la población de células del tumor y que por ello, la búsqueda de métodos que permitan selectivamente incorporar estos radionúclidos en el núcleo de las células tumorales tienen una importancia relevante porque pueden producir una mayor eficacia terapéutica.

Constantini *et al.* (2008), propusieron el mecanismo a través del cual atraviesa el TAT la membrana celular y transporta su carga dentro de la célula. Hipotetizaron que existe una interacción inicial de la carga entre los grupos catiónicos de la guanidina y residuos de arginina con las proteínas y fosfolípidos de la célula de superficie, que están cargados negativamente por los grupos fosfato y sulfato. Con relación al $^{99m}\text{Tc-TAT-BN}$, el mayor efecto se produjo a los 30 min con todas las actividades empleadas en esta investigación, debido a la internalización del TAT al núcleo celular y posiblemente por la emisión de electrones Auger producidos por ^{99m}Tc .

Los hallazgos en esta investigación destacan por un lado, la evidencia de la fragmentación del ADN con diferentes actividades de radiación ocasionando un efecto genotóxico en el linfocito. Estos resultados sugieren que el radiofármaco podría ser útil en el diagnóstico. Por otra parte, con relación a la actividad empleada para su administración en un estudio diagnóstico, esta puede variar entre 37-370 MBq por vía endovenosa, lo cual está en relación al peso (Casado *et al.*, 2004). Nuestros resultados sugieren que para fines diagnósticos se puede emplear una actividad de 2.9 MBq en 30 min de exposición. Por lo tanto, en esta investigación, de acuerdo a los resultados obtenidos y según lo reportado en la literatura, existe una mayor internalización del radiofármaco $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2\text{-TAT}$ (49-57)-BN al núcleo celular por los diferentes componentes que tiene, uno es la penetración, favorecida por la acción del TAT y posiblemente por la emisión de electrones Auger de baja energía.

Es conveniente evaluar el efecto genotóxico en células cancerosas y determinar el daño al ADN, ya que las células poseen receptores GRP en la membrana y esto puede permitir que exista una mayor internalización al

núcleo y aunado a la emisión de los electrones Auger, se lisen las células cancerosas más eficientemente, proponiendo entonces que sea una opción para el diagnóstico y posiblemente el tratamiento en un futuro.

5. Conclusiones

Se demostró que el ensayo cometa es una alternativa para evaluar la cinética de internalización mediante el daño producido al ADN.

Por otro lado, el radiofármaco ^{99m}Tc -TAT-BN se internalizó eficientemente en los linfocitos al min 30 con todas las actividades probadas, medido por el daño al ADN.

El radiofármaco ^{99m}Tc -TAT-BN produjo el mayor daño al DNA y este fue diferente significativamente respecto al control, al ^{99m}Tc -BN y al TAT-BN. El daño al ADN en linfocitos producido por el radiofármaco ^{99m}Tc -TAT-BN está dado por la internalización favorecida por el TAT al núcleo celular y posiblemente por la emisión de electrones Auger producto del decaimiento del ^{99m}Tc . Se evaluó la internalización del radiofármaco N_2S_2 -TAT (49-57)-Lys³-BN en linfocitos, con la técnica del ensayo cometa, buscando con ello su posible empleo en el diagnóstico de cáncer de mama, ya que el uso de radiofármacos específicos reducirá en un futuro el número de biopsias y si su farmacocinética es adecuada, podrían marcarse con un emisor de radiaciones beta, y utilizarse en la radioterapia de blancos moleculares.

6. Referencias

- Anderson, R.G. y Wyden, J.S. (1982). Nuclear Medicine Factors Influencing the Choice and Use of Radionuclides in Diagnostic and Therapy. *Nat. Council. Rad. Protect Measure.* 70: 105-110.
- Buchegger F., Perillo, F., Dupertuis, Y. y Bischof A. (2006). Auger Radiation Targeted into ADN: A Therapy Perspective. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 33: 1352-1363.
- Burke, J. (2001). Advances in ^{99m}Tc Radiopharmaceuticals Chemistry. *Ann. Nucl. Med.* 16: 79-93.
- Casado, C. y Chavarría, M. (2004). *Técnicas de exploración en medicina nuclear.* México: Masson, 104-112.

- Constantini, D., Meiduo, H. y Reilly R. (2008). Peptide Motifs for Insertion of Radiolabeled Biomolecules into Cell and Routing to the Nucleus Cancer Imaging or Radiotherapeutic Applications. *Cancer Biotherapy Radiophar.* 23: 3-24.
- Cossio M., Gonzales, Y., García J., y Prieto, C. (2004). Uso del ensayo cometa para evaluar el efecto de la temperatura sobre la reparación del daño genético inducido por peróxido de hidrógeno y radiación ultravioleta en células sanguíneas humanas. *Acta Farm. Bonaerense.* 23: 277-284.
- Dietz G.P. y Bähr M. (2004). Delivery of Bioactive Molecules into the Cell: the Trojan Horse Approach. *Mol. Cell. Neurosci.* 27: 85-131.
- Faraggi M., Gardin, I. y Labriolle, C. (1994). The Influence of Tracer Localization on Electron Dose Rate Derived to the Cell Nucleus. *J. Nucl. Med.* 35: 1-35.
- Ferro G., Arteaga, C. y Meléndez, M. (2006). Preparation and Evaluation of Third Generation Technetium 99m Radiopharmaceuticals. *Curr. Pharm. Anal.* 21: 339-352.
- Ferro, G., Arteaga, C., Rodríguez, J., Pedraza, M. y Ramírez, M.T. (2006). Preparation and Evaluation of $^{99m}\text{Tc-EDDA/HYNIC-[Lys3]-Bombesin}$ for Imaging Gastrin-Releasing Peptide Receptor-Positive Tumors. *Nuclear Medical Communications.* 27: 371-376.
- Fini, A. y González, A. (2001). Aplicaciones farmacológicas de la radioactividad, Centro de Química Farmacéutica. *Biother Radiopham.* 1: 1-7.
- Futaki, S. (2005). Membrane Permeable Arginine-Rich Peptides and the Translocation Mechanisms. *Advanced Drug Deliveries Reviews.* 57: 547-58.
- Green, M. y Loewenstein, P. (1988). Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human Immunodeficiency Virus TAT Trans-Activator Protein. *Cell.* 55: 1179-1188.
- Gugger, M., y Reubi J. (1999). Gastrin-Releasing Peptide Receptors in Non-Neoplastic and Neoplastic Human Breast. *Am J. Pathol.* 155: 2067-2076.
- Kowalsky, R. J. y Falen, S. W. (2004). *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine*. Estados Unidos: American Pharmacist Association, 20-50.

- Lin, K.S., Luu, A. y Baidoo, K. E., Hashemzadeh-Gargan H. (2005). A New High Affinity Technetium-99m-Bombesin Analogue with Low Abdominal Accumulation. *Bioconjugate Chem.* 16: 43-50.
- Nock, B., Nikolopoulou A., Chiotellis, E., Loudos, G., Maintas, D., Reubi, J.C. y Maina T. (2003). [99mTc] Demobesin 1, Anovel Potent Bombesin Analogue for GRP Receptor-Targeted Tumor Imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 30: 247-250.
- Nock, B., Nikolopoulou, A., Galanis, A., Cordopatic, P., Waser, B., Reubi, J.C. y Maina, T. (2005). Potent Bombesin-Like Peptides for GRP-Receptor Targeting of the Tumor with 99mTc A Preclinical Study. *J. Med. Chem.*, 48: 100-104.
- Pedraza, M., Ferro, G., Mendiola, M.T. y Morales, P. (2000). Assessment of Radiation-Induced ADN Damage Caused by the Incorporation of 99mTc-Radiopharmaceuticals in Murine Lymphocytes Using Single Cell Gel Electrophoresis. *Mut. Res.*, 465: 139-44.
- Reubi, J. C. (2003). Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy. *Endocrine Rev.* 24: 389-427.
- Santos, C., Ferro, G., Arteaga, C., Ramirez, F., Luna, M. A. y Pedraza, M. (2009). Desing, Preparation, in vitro and in vivo Evaluation of 99mTc-N2S2-TAT(49-57)-Lys3-BN. A Target-Specific Hybrid Radiopharmaceutical. *Inter. J. Pharma.* 375: 75-83.
- Scopinaro, F., De Vincentis, G., Varvarigou, A. D., Laurenti, C., Iori, F., Remediani, S., Chiarini, S. y Stella, S. (2003). 99mTc-Bombesin Detects Prostate Cancer and Invasion of Pelvic Lymph Nodes. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 30: 1378-82
- Singh, N., McCoy, M. y Tice, E. (1988). Simple Technique for Quantitation of Low Levels of ADN Damage in Individual. *Exp Cell Res.*, 175: 184-191.
- Singh, N.P., Stephens, R.E. y Schneider, E.L. (1994). Modifications of Alkaline Microgel Electrophoresis for Sensitive Detection of ADN Damage. *Inter. J. Rad. Biol.* 66: 23-28.
- Speit, G. y Hartmann, A. (1999). The Comet Assay (Single-Cell Gel Test): A 220 SCG/Comet Assay Genetic Toxicology Guidelines Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of ADN Damage and Repair. *ADN Repair Protocols.* 113: 203-212.

- Varvarigou, A., Bouziotis, P., Zikos, C., Scorpinaro, F. y De Vicencetis, G. (2004). Gastrin-Releasing Peptide (GRP) Analogues for Cancer Imaging. *Cancer Biother. Radiopha.* 19: 2019-2029.
- Varvarigou A., Scorpinaro, F., Leondiadis, L., Corleto, V. Schilaci, O. y De Vicentis, G. (2002). Synthesis, Chemical, Radiochemical and Radiobiological Evaluation of a New ^{99m}Tc -Labelled Bombesin-Like Peptide. *Cancer Biother. Radiopha.* 29: 553-560.
- Vera, H. (1998). Radiofármacos como agentes terapéuticos en la atención y el tratamiento médico. *Boletín OIEA.* 1: 24-27.
- Verdera, S. 2007. *Radiofármacos Terapéuticos*. México: Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear, 1-25.
- Volkert, W. A., Goeckler, W. F., Ehrhardt, G. J. y Ketring, A. R. (1991). Therapeutic Radionuclides: Production and Decay Property Considerations. *J. Nucl. Med.* 32: 174-185.
- Welch, J. M. y Redvanly, S. C. (2003). *Handbook of Radiopharmaceuticals, Radiochemistry and Applications*. Estados Unidos: Wiley, 48-69.

Capítulo XIV

Polimorfismos de la glutatión S-transferasa GSTM1 y GSTT1 en leucemia aguda y la respuesta al tratamiento, utilidad del meta - análisis

Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez¹
Julieta Castillo Cadena² *

1. Introducción

1.1. Técnicas de PCR

Las técnicas de biología molecular son herramientas que se poseen actualmente para estudiar el ácido nucleico de cualquier ser vivo, se emplea desde la extracción de tal molécula hasta la identificación de bases nitrogenadas específicas, tales como Adenina, Guanina, Citosina, Timina, Uracilo –por la técnica de secuenciación–, pasando por la amplificación o reacción en cadena de la polimerasa (PRC).

La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR “polymerase chain reaction”, es una técnica desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés “primer”).

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta, pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y tiene una

relativamente alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Para solventar este último problema se ha de optimizar la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa, para que estos se unan al ADN en la localización correcta y realizar una adecuada manipulación de los reactivos. Para solucionar el problema de la cuantificación se han generado variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real.

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos, pero casi todos basados en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que queremos amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia "quencher", de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa, la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un rayo láser. La cuantificación de la fluorescencia, emitida durante cada ciclo de la PCR, será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general, para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones, para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

1.2. Leucemia Aguda

La leucemia aguda se ha clasificado en linfoblástica (LLA) y mielobástica (MLA), cada una con sus diferentes subtipos; afecta a niños y adultos. Se ha documentado la predisposición a leucemia aguda por exposición a sustancias químicas como el benceno y algunos agentes quimioterapéuticos.

La LLA es la consecuencia de la transformación maligna de una célula progenitora linfoide inmadura, que tiene la capacidad de expandirse y formar un clon de células progenitoras idénticas bloqueadas en un punto de su diferenciación.

La LLA comprende el 80% de todas las leucemias agudas en edad pediátrica y, aunque la etiología es todavía incierta, se han descrito algunos factores predisponentes tales como genéticos, virales y ambientales. Las manifestaciones clínicas suelen ser la consecuencia de la ocupación de la médula ósea por las células malignas ocasionando anemia, trom-

bocitopenia y leucopenia. El diagnóstico se realiza mediante el análisis morfológico, citogenético y molecular del aspirado de médula ósea. El tratamiento dura aproximadamente dos años. El pronóstico de los niños con LLA ha mejorado espectacularmente en las últimas décadas debido a los nuevos fármacos y en los últimos años a un tratamiento adaptado al riesgo de los pacientes. En la actualidad, la tasa de curación global de las LLA es de aproximadamente el 75% de los pacientes.

Sin embargo, existen efectos asociados con el tratamiento y con la enfermedad, ya que no siempre el paciente responde de igual manera (Seedhouse y Russell, 2007), lo que invita al estudio de genes de susceptibilidad, tales como los relacionados con el metabolismo de fármacos, entre ellos los genes GSTT1 y GSTM1, que se encuentran ubicados en las familias teta y mu respectivamente de la GST.

1.3. Genes de la Glutación S- transferasa

Las glutación S-transferasas GST, son una familia de multigenes que codifican enzimas citosólicas y membranales que participan en la biotransformación, haciendo que los compuestos tóxicos sean menos dañinos. Ésta desintoxicación celular está mediada por la catalización de la conjugación del glutatión, tiol tripeptídico (gamma-glutamyl-cisteinilglicina) con una amplia gama de compuestos endógenos y exógenos electrofílicos, incluyendo xenobióticos ambientales como los hidrocarburos policíclicos aromáticos y humo del tabaco; cancerígenos y fármacos como los agentes alquilantes y antraciclinas, indicados en la quimioterapia, produciendo una disminución de la inactivación de las especies reactivas de oxígeno, que generan estrés oxidativo con las macromoléculas celulares convirtiéndolos a ácidos mercaptúricos para su fácil excreción. Desde su descubrimiento, a principio de 1970, se ha descrito la estructura, función y significado toxicológico de las GST (Arruda *et al.*, 2001; Aydin-Sayitoglu *et al.*, 2006; Crump *et al.*, 2000; D' Alò *et al.*, 2004).

El primer polimorfismo que fue determinado es de la clase mu, constituido por al menos 5 genes: GSTM1, M2, M3, M4, M5, dos genes codifican para la isoforma GSTM1 y el polimorfismo presenta 4 variantes alelicas, GSTM1*A, GSTM1*B, GSTM1*C y GSTM1*0. El primer par no presenta diferencia aparente para la especificidad del sustrato. La variante alelica nula del homocigoto nulo GSTM1*0 determina la actividad enzimática.

Cerca del 50 % de la población caucásica presenta actividad de GSTM1. La ausencia de la forma M de la GST está asociada a una reducida eficiencia sobre la conjugación del xenobiótico. Los genes de esta enzima se encuentran ubicados en el cromosoma 1p13.3 (Laborde, 2010).

Recientemente, se han identificado los genes T1 de la GST, estos genes se encuentran ubicados en el cromosoma 22q11.2. La clase theta incluye GSTT1 y GSTT2, los cuales comparten 55% de la secuencia idéntica de bases nitrogenadas y ambos tienen un importante papel en la carcinogénesis (Sasai *et al.* 1999; Alves *et al.*, 2002; Barnette *et al.*, 2004).

Los primeros polimorfismos de GSTM1 y GSTT1, como factores de riesgo para leucemia aguda, fueron reportados en 1997 por Chen y colaboradores. Desde entonces un número creciente de estudios han confirmado o refutado una asociación entre los polimorfismos de GST y el riesgo de leucemia aguda (Basu *et al.*, 1997; Krajinovic *et al.*, 1999; Lemos *et al.*, 1999; Saadat *et al.*, 1999; Sasai *et al.*, 1999; Crump *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2000; Naoe *et al.*, 2000; Rollinson *et al.*, 2000; Woo *et al.*, 2000; Allan *et al.*, 2001; Arruda *et al.*, 2001; Alves *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2002; Haase *et al.*, 2002; Balta *et al.*, 2003; Barnette *et al.*, 2004; Canalle *et al.*, 2004; D'Alò *et al.*, 2004; Seedhouse *et al.* 2004; Joseph *et al.*, 2004; Pakakasama *et al.*, 2005; Aydin-Sayitoglu *et al.*, 2006; Haranatha *et al.*, 2006; Eyada *et al.*, 2007; Pigullo *et al.*, 2007; Gra *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2008; Majumdar *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2008). Existe controversia en los resultados, la cual puede deberse a la fuerza insuficiente de algunos estudios: diferencias entre los tipos de cáncer, el tipo de poblaciones y diseño del estudio. El objetivo de esta investigación fue conocer la frecuencia de los polimorfismos de GSTT1 y GSTM1 en pacientes leucémicos mexicanos y su respuesta al tratamiento.

2. Metodología

Se obtuvo muestra de sangre periférica de 18 pacientes con leucemia aguda y se realizó la genotipificación de GSTM1 y GSTT1. Se hizo extracción de ADN con el Kit para extracción y purificación de DNA genómico ZR GENOMIC DNA II, se realizó la amplificación de las regiones flanqueadas por los iniciadores de los 3 genes cuya secuencia se muestra abajo (Abdel-Rahman *et al.*, 1996), mediante PCR múltiple.

Gen	Secuencia (5'-3')	Amplicón
GSTT1 (f) GSTT1 (r)	5'TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3 5'TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA'-3	480 pb
GSTM1 (f) GSTM1 (r)	5'GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C'-3 5'GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G'-3	215 pb
CYP1A (f) CYP1A (r)	5'GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT'-3 5'CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC'-3	312 pb

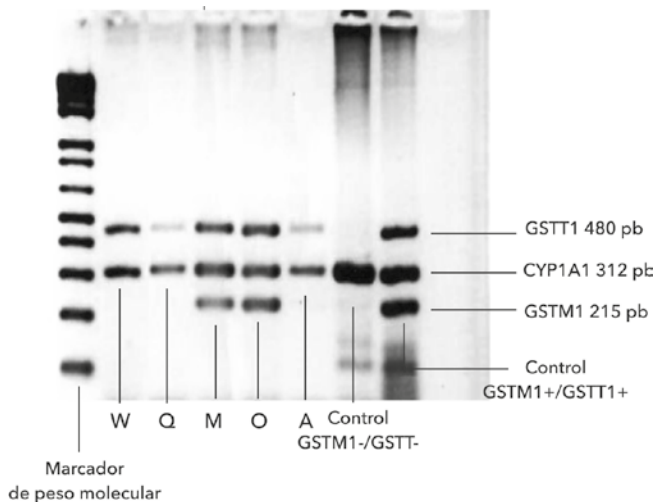
Se realizó la identificación de los polimorfismos con una electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio y por comparación con un marcador de peso molecular de 100pb.

3. Resultados

3.1. Genotipificación en niños con leucemia aguda en el Estado de México

Se realizó la genotipificación en 18 muestras de las cuales 6 fueron niños y 12 adultos, 96% tuvieron LLA y el 4% LMA. Una vez obtenidos los productos de amplificación, se realizó la electroforesis para identificar los genes en estudio. La presencia de la banda de 312 pb corresponde a CYP1A1 y muestra que la amplificación se llevó a cabo de manera regular. La banda de 480 pb indica la presencia del gen GSTT1 y en su ausencia nos dice que la muestra de ese paciente tiene deletada la región que se amplifica por PCR. De forma análoga la presencia de GSTM1 fue determinada por una banda de 215 pb y la ausencia indicó el polimorfismo nulo para este gen. Se obtuvieron los siguientes resultados: GSTM1 nulo 50%, GSTT1 nulo 27.77%. Por genotipos de ambos genes se tiene: GSTM1 - /GSTT1 - en el 11.11%; GSTM1 +/GSTT1 + en el 33.33%; GSTM1 -/GSTT1 + en el 38.88% y GSTM1 + /GSTT1 - en el 16.67%. Se muestra un gel que ejemplifica los resultados (figura 1).

Figura 1. Resultados de un gel en el que se identifican los genes GSTT1, GSTM1 y CYP1A1. W, Q, M, O, A fueron muestras de pacientes en el estudio



3.2 Respuesta al tratamiento y su asociación con los polimorfismos GTS

En la tabla 1, se puede observar la distribución del tipo de leucemia y genotipo encontrado, no hubo una asociación significativa entre ambos. El 41% de los adultos presentaron un genotipo GSTM+/GSTT+, el genotipo GSTM1-/GSTT1+ predominó en el 50% de los niños, el tipo de leucemia fue de células B, y la morfología tipo L1 o L2, la asociación que se encontró fue que un genotipo GSTM1-, podría conferir susceptibilidad de desarrollo a la enfermedad y al tipo de leucemia.

Tabla 1. Respuesta al tratamiento de pacientes según tratamiento y genotipo

Clave	Tipo de leucemia	Tratamiento (semanas)	Genotipo		Factor de riesgo	Evolución
			M1	T1		
NIÑOS						
A	LLA - pre B, L1	18	-	+	Infiltración a SNC	Desfavorable
E	LLA - L2	28	-	+	Edad y Ph +	Desfavorable
F	LLA - pre B, L2	20	-	+	Edad	Favorable

Continúa...

Clave	Tipo de leucemia	Tratamiento (semanas)	Genotipo		Factor de riesgo	Evolución
			M1	T1		
^a H	LLA	b	+	-	Edad	b
I	LLA - B, L2	35	-	-	Edad	Favorable
J	LLA - B, L1	40	+	+	7 ciclo de Qx, RC	Favorable
ADULTOS						
L	LLA - T	42	+	-	Tipo de leucemia, Infiltración a SNC, Leucocitosis	*Desfavorable
M	LLA - T	23	+	+	Evolucionando	Favorable
O	LLA - L2	3	+	+	Choque séptico, Ph +	*Desfavorable
P	LLA - B, L2	56	+	+	Recaída Candidato a trasplante, Ph+	Desfavorable
^a Q	LLA - B	25	-	+	RC	Favorable
R	LLA - L2	12	+	+	2° Ciclo de Qx, Ph +, RC	Favorable
S	LLA	75	-	-	Evolucionando, Micosis.	Favorable
^a T	LLA - L2	46	-	+	3 ciclo de quimioterapia, RC	Favorable
U	LLA - B	12	-	+	Probable toxicidad con tratamiento	*Desfavorable
^a V	LMA - M6	85	+	-	Tipo de leucemia	*Desfavorable
W	LMA - M4	39	-	+	inv(16), RC, Sepsis, Dosis más tóxica	*Favorable
Y	t - LMA	4	+	+	Edad, Tipo de leucemia	*Desfavorable

^a Sexo femenino, b=Tratamiento desconocido, *Falleció, M1 = GSTM1, T1 = GSTT1, Qx = Quimioterapia, RC = Remisión Completa, CHasta el momento que se elaboró este reporte Agosto 2009.

4. Discusión

Estudios epidemiológicos previos sugieren que la exposición ambiental influye de manera diferente en el riesgo para LMA y LLA, motivo por el cual podría ser esperado que la susceptibilidad genética también sea diferente. Tal es el caso de la asociación del genotipo nulo GSTM1- pero no del genotipo GSTT1 con LMA, que podría ser una indicación de la especificidad por el sustrato de GSTM1 en el metabolismo de agentes

involucrados en la etiología de M4, como nuestro estudio lo mostró en el caso W de LMA-M4, el cual tiene un genotipo GSTM1 nulo /GSTT1 presente (Woo *et al.*, 2000).

Al considerar la raza de los pacientes en este estudio, todos mestizos mexicanos, observamos que las dosis estandarizadas internacionalmente para el tratamiento de las leucemias tanto LLA como LMA pueden ser tóxicas incluso letales para algunos pacientes. En el caso de los adultos, cuando se utilizaron dosis menores a las recomendadas internacionalmente, la sobrevivencia aumentó; a diferencia de los niños en los que la dosis utilizada en los protocolos mundiales no parece afectar sustancialmente al paciente.

5. Meta análisis

El término meta análisis fue utilizado por primera vez por GV Glass en 1976 para referirse al “análisis estadístico de una serie de resultados obtenidos en ensayos clínicos individuales con la finalidad de integrarlos”. El meta análisis es la síntesis formal, cualitativa y cuantitativa, de diferentes investigaciones, que poseen en común una misma intervención, un mismo punto final de resultado y que se agrupan con la intención de sintetizar la evidencia científica, con respecto a la dirección del efecto producido por la intervención en análisis. Expresado de otra manera, el meta análisis es una estrategia de revisión sistemática que pretende responder a diversas cuestiones y que es especialmente útil cuando los resultados de varios estudios son discordantes con respecto a la magnitud de la dirección de un efecto, cuando los tamaños muestrales de los estudios individuales es demasiado pequeño para detectar dicho efecto como significativo o cuando una investigación de gran tamaño es demasiado costosa en términos económicos o de tiempo. El meta análisis es un procedimiento de investigación que mejora la calidad de las revisiones bibliográficas ya que provee los elementos para realizarlas metódicamente y arrojar resultados claramente interpretables.

El meta análisis es una aproximación más estructurada a la revisión de la literatura de lo que lo son las revisiones tradicionales y en esta medida pueden ser de más ayuda para establecer principios científicos. Los resultados del meta análisis permiten planificar futuras investigaciones sobre temas similares, ya que proporcionan la evidencia de los efectos que se pueden esperar de una intervención, permitiendo por ello mejores

cálculos del tamaño muestral; aportan también elementos de juicio para generar nuevas hipótesis o decidir si hacen falta nuevas investigaciones sobre el tema.

Los meta análisis pueden ser utilizados en la aprobación del uso de intervenciones por parte de organismos reguladores y en la docencia, ya que posee la capacidad de mostrar sintéticamente la evidencia científica disponible (Borenstein *et al.*, 2009).

5.1. Elaboración del Meta-análisis en leucemia aguda y los polimorfismos de GSTM1 y GSTT1, como factores de riesgo

Para ejemplificar los conceptos antes mencionados y su interrelación con el propósito de la evaluación de riesgo, realizamos un meta-análisis de estudios reportados de leucemia aguda y genes de susceptibilidad específicamente GSTM1 y GSTT1, con la información obtenida de las bases de datos, con los criterios que se comentan a continuación.

Buscamos y seleccionamos los artículos publicados desde enero de 1997 hasta diciembre 2008, identificando aquellos que contuvieran información de GSTM1 y/o GSTT1 y riesgo de leucemia aguda de las siguientes bases electrónicas: MEDLINE (Biblioteca Nacional de Medicina, Washington, DC, EE UU) y EMBASE (Elsevier Science, New York, EE UU), usando los términos de búsqueda "GSTM1" o "GSTT1" y "leucemia aguda".

Los criterios fueron:

1. Los artículos deberían ser estudios con diseño caso-control y proveer suficiente información para calcular un efecto de muestra.
2. Estudios con diferentes grupos de poblaciones se consideraron dentro del análisis (Rollinson *et al.*, 2000; Woo *et al.*, 2000; Balta *et al.*, 2003).
3. Investigaciones con diferentes tipos de leucemia (LLA y LMA) fueron tratados como estudios independientes.

Excluimos aquellos estudios que contuvieran información de leucemia crónica, dado que nos enfocamos a leucemia aguda.

La aplicación de estos criterios proporcionó 42 estudios caso-control. Para la realización del meta análisis se utilizó la razón de momios de leucemia aguda asociada con polimorfismos de GST, la cual fue re-calculada para cada estudio con su correspondiente intervalo de confianza del 95% (IC) estimado por el método de Mantel-Haenszel (Bewick *et al.*, 2004; Sterne *et al.*, 2001; Borenstein *et al.*, 2009). Es posible que nuestros resultados no sean exactamente los reportados en algunos estudios, por los diferentes criterios utilizados para el análisis estadístico, lo ideal es que se disponga de los datos crudos de cada uno de los autores y solicitar su aprobación para realizar el análisis. La estadística se realizó de los porcentajes de prevalencia de alelos nulos de *GTSM1* y *GSTT1* de cada estudio. El genotipo de bajo riesgo fue presencia de *GTSM1* o *GSTT1*, empleado como la línea de base para el cálculo de la RM. Para tomar en cuenta la posibilidad de heterogeneidad entre los estudios se empleó la prueba estadística de *Chi cuadrada*, un valor de $p \leq 0.05$ sugirió pérdida de heterogeneidad. La mayoría de los estudios contribuyeron a la heterogeneidad con valor de $p=0.000$.

Para el meta-análisis se usó el modelo de efectos fijos y efectos aleatorios. El modelo de efectos fijos asume que no hay heterogeneidad significativa cuando se suman los resultados de estudios individuales, mientras que el modelo de efectos aleatorios toma en cuenta tal heterogeneidad y adiciona un estimado empírico de variancia entre los estudios y de la variancia dentro del estudio. Reportamos resultados del modelo de efectos fijos, si la heterogeneidad entre los estudios era observada.

Para estratificar la población de niños y adultos, la leucemia aguda linfoblástica es más común en niños y la edad fue definida como individuos menores de 18 años y sobre el tiempo de diagnóstico. Se evaluó el potencial de publicación vía forest plot (gráfica en la que se muestra el número de veces que aumenta el riesgo de una variable en estudio). Los resultados de estudios con mayor número de casos fueron más ampliamente diseminados en el forest plot, respecto a los de menor número. La mayoría de los estudios fueron evaluados por el efecto conjunto de genotipos nulos para *GSTM1* y *GSTT1* en el riesgo de leucemia aguda. La presencia de ambos genotipos *GSTM1* y *GSTT1* fue usada como control de referencia para cada estudio. Todos los análisis fueron realizados usando STATA 10.1^{MR}, (Borenstein *et al.*, 2009).

De los 42 estudios caso-control seleccionados para el análisis, la mayoría tenía suficientes datos informativos para generar el estudio estadístico. Todos ellos utilizaron la PCR para amplificar las regiones de ADN correspondientes a los genes en estudio. La mayoría de los autores utilizó controles para la PCR. Se analizaron también los estudios que contenían en sus resultados reportes de genotipo GSTM1 nulo y GSTT1 nulo y fueron considerados como ambos genes nulos. El número de estudios que reportan esta última característica fueron 12 con un aproximado de casos-control de 4500; 7 estudios fueron de LLA; 4 de LMA y 1 de t-LMA. También se clasificaron de acuerdo al grupo de edad, en el que, 9 estudios fueron en niños y 3 en adultos (datos no mostrados).

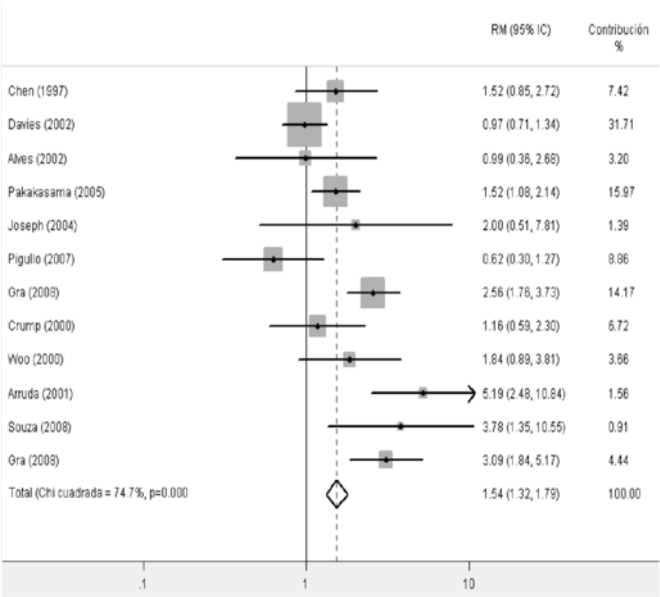
5.2. Lo que se obtuvo de este análisis

Los resultados del meta-análisis fueron los siguientes: Se identificaron 42 estudios, que dan aproximadamente 20,900 individuos en relación con los polimorfismos de GST. Veintiún estudios fueron realizados en ciudades europeas; 9 en americanas; 11 asiáticas y uno en África. En 8 se utilizaron como grupo control individuos del hospital, el detalle de los datos se resumen en las Tablas 2 a la 5. El número de individuos por estudio varió considerablemente, de un rango de 24 a 1436. Las frecuencias de los genotipos en los grupos control fluctuó de la siguiente manera, para GSTM1 nulo en leucemia aguda: fue de 24.8 a 59.7% en asiáticos, en europeos de 44.1 a 57.8% y de 37 a 54.5% en americanos. La frecuencia del genotipo GSTT1 nulo en leucemia aguda fue de 8.02 a 54.0% en asiáticos; de 8.0 a 25.5% en europeos y de 15 a 22% en americanos.

Se realizó el meta-análisis por cada gen nulo para riesgo de desarrollo de cada tipo de leucemia aguda, para GSTM1 en LLA fueron 20 y para LMA 22 estudios caso-control; mientras que para GSTT1 en LLA fueron 18 y para LMA 20. De los cuales se reportaron en niños 21 estudios caso-control para el gen GSTM1 y 18 para el GSTT1. En adultos, 21 fueron para el gen GSTM1 y 20 para GSTT1.

Para todos los grupos de estudio se obtuvo un forest plot en el que se muestra un efecto protector, cuando la razón de momios fue menor a 1, y un aumento de riesgo cuando este valor fue mayor a 1, utilizando un intervalo de confianza del 95%. También se muestra la contribución de cada uno de los estudios en el análisis representado por el tamaño de la caja, solo se muestra el gráfico de genotipos con ambos genes nulos (figura 2).

Figura 2. Forest plot de la razón de riesgos (RM) de GSTM1 nulo y GSTT1 nulo en el riesgo de desarrollo de LA. Estudios estratificados por tamaño de muestra y LLA fueron graficados de acuerdo a la variancia del log (RM), cada caja representa la RM estimada y su área es proporcional a la contribución para el estudio. El estudio más pequeño tenía un tamaño de muestra de 149, mientras que el más grande de 1384



Las distintas maneras en las que se pueden asociar las variables tales como sexo, edad, tamaño de muestra y grupo étnico, entre otras, de los estudios con los polimorfismos de GSTM1 y GSTT1, mostraron heterogeneidad significativa entre ellas.

En todos los estudios fue calculada la razón de momios total por el método de Mantel-Haenszel y la heterogeneidad del estudio. Uno de los estudios (Eyada *et al.*, 2007) tuvo una RM extrema de 11.14 (IC 95% 0.70-178), pero no fue excluido del meta análisis ya que no afectó significativamente (tabla 2).

La RM total en leucemia aguda, asociado con genotipo GSTM1 nulo LLA y en LMA fue 1.11 (95% IC 1.06-1.16) (Tabla 2) y 1.14 (95% IC 1.09-1.19) (tabla 3) respectivamente. GSTT1 nulo en LLA y LMA fueron 1.07 (95% IC 0.98 - 1.17) (tabla 4) y 1.23 (95% IC 1.13-1.33) (tabla 5) respectivamente. Para ambos genes nulos en LLA y LMA fueron 1.38 (95% IC 1.16-1.64, p=0.002) y 2.30 (95% IC 1.67-3.12 p= 0.026) respectivamente.

Tabla 2. Razón de posibilidades recalculada de los artículos relacionados con GSTM1 nulo y riesgo de leucemia linfoblástica aguda

Autor (año)/País	Casos (n)	GSTM1 nulo n (%)	Controles (n)	GSTM1 nulo n (%)	Razón de momios (95% IC)	Contribución (%)
Chen (1997)/EE UU	197	104 (52.79)	416	170 (40.87)	1.29 (1.08 - 1.54)	6.47
Krajcinovic (1999)/Canadá	174	113 (64.94)	304	156 (51.3)	1.27 (1.08 - 1.48)	6.73
Lemos (1999)/Portugal	22	14 (63.64)	128	74 (57.8)	1.10 (0.78 - 1.56)	1.29
Saadat (1999)/Irán	38	21 (55.26)	75	24 (32.0)	1.73 (1.12 - 2.67)	0.96
Rollinson (2000)/RU	70	35 (50)	113	55 (48.7)	1.03 (0.76 - 1.39)	2.49
Woo (2000)/EE UU	53	24 (45.28)	242	124 (51.24)	0.88 (0.64 - 1.22)	2.64
Davies (2002)/EE UU	651	345 (53.0)	733	350 (47.75)	1.11 (1.00 - 1.23)	19.51
Alves(2002)/Portugal	47	32 (68.1)	102	50 (49.0)	1.39 (1.05 - 1.83)	1.87
Balta (2003)/Turquía	139	77 (55.4)	185	101 (54.6)	1.01 (0.83 - 1.24)	5.13
Barnette (2004)/EE UU	94	46 (48.94)	336	183 (54.5)	0.90 (0.71 - 1.13)	4.74
Canalle (2004)/Brasil	113	48 (42.48)	221	101 (45.7)	0.93 (0.72 - 1.20)	4.05
Joseph (2004)/India	118	48 (40.68)	118	29 (24.58)	1.66 (1.13 - 2.43)	1.72
Pakakasama (2005)/Tailandia	107	76 (71.0)	320	191 (59.7)	1.19 (1.02 - 1.38)	5.67
Haranatha (2006)/India	135	60 (44.44)	146	61 (41.75)	1.06 (0.81 - 1.39)	3.47
Aydin-Sayitoglu (2006)/Turquía	36	19 (52.8)	140	77 (55.0)	0.96 (0.68 - 1.35)	1.87
Aydin-Sayitoglu (2006)/Turquía	119	78 (65.5)	140	77 (55.0)	1.19 (0.98 - 1.45)	4.19
Eyada (2007)/Egipto	13	6 (46.2)	11	0 (0)	11.14 (0.70 - 178.03)	0.03
Pigullo (2007)/Italia	323	152 (47.06)	384	200 (52.08)	0.90 (0.78 - 1.05)	10.83
Han (2008)/China	120	72 (60.0)	204	113 (55.4)	1.08 (0.89 - 1.31)	4.96
Gra (2008)/Rusia	332	181 (54.5)	490	238 (48.6)	1.12 (0.98 - 1.28)	11.39
Total	2901	1551 (53.46)	4808	2374 (49.38)	1.11 (1.06 - 1.16)	100

a Grupos de edad mayor a 18 años. b Controles provenientes del hospital.

Tabla 3. Razón de posibilidades recalculada de los artículos relacionados con GSTM1 nulo y riesgo de LMA

Autor (año)/País	Casos (n)	GSTM1 nulo n (%)	Controles (n)	GSTM1 nulo n (%)	Razón de momios (95% IC)	Contribución (%)
Sasai (1999)/Japón	21	10 (47.62)	43	23 (53.5)	0.89 (0.52 - 1.51)	0.87
Sasai (1999) ^b /Japón	18	11 (61.11)	43	23 (53.5)	1.14 (0.72 - 1.81)	0.78
Lemos (1999)/Portugal	18	10 (55.56)	128	74 (57.8)	0.96 (0.62 - 1.49)	1.05
Crump (2000) ^b /EE.UU	297	159 (53.54)	152	75 (49.3)	1.08 (0.89 - 1.32)	5.70
Rollinson (2000)/RU	475	258 (54.32)	826	407 (49.3)	1.10 (0.99 - 1.23)	17.06
Naoe (2000)/Japón	411	227 (55.23)	150	77 (51.3)	1.08 (0.90 - 1.29)	6.48
Davies (2000) ^b /EE.UU	232	148 (63.79)	153	72 (47.1)	1.36 (1.12 - 1.65)	4.98
Arruda (2001) ^b /Brasil	38	28 (73.68)	276	102 (37)	1.99 (1.56 - 2.55)	1.42
Allan (2001)/RU	417	229 (54.92)	1019	496 (48.7)	1.13 (1.01 - 1.26)	16.54
Allan (2001) ^b /RU	89	49 (55.06)	1019	496 (48.7)	1.13 (0.93 - 1.38)	4.57
Haase (2002)/Alemania	213	107 (50.23)	239	122 (51)	0.98 (0.82 - 1.18)	6.60
Balta (2003) ^{b,c} /Turquía	31	19 (61.29)	185	101 (54.6)	1.12 (0.82 - 1.53)	1.66
Seedhouse (2004)/RU	200	101 (50.5)	177	78 (44.1)	1.15 (0.92 - 1.42)	4.75
Seedhouse (2004) ^b /RU	42	19 (45.24)	177	78 (44.1)	1.03 (0.71 - 1.49)	1.72
D'Alò (2004)/Italia	193	82 (42.49)	273	128 (46.9)	0.91 (0.74 - 1.11)	6.09
Aydin-Sayitoglu (2006)/Turquía	50	36 (72)	140	77 (55)	1.31 (1.04 - 1.65)	2.33
Aydin-Sayitoglu (2006) ^b /Turquía	44	28 (63.6)	140	77 (55)	1.16 (0.88 - 1.51)	2.11
Eyada (2007)/Egipto	19	13 (68.4)	11	0 (0)	16.2 (1.06 - 48.5)	0.04
Majumdar (2008)/India	110	57 (51.8)	137	34 (24.8)	2.09 (1.48 - 2.94)	1.74
Müller (2008)/Israel	136	70 (51.47)	217	119 (54.84)	0.94 (0.77 - 1.15)	5.26
Han (2008) ^b /China	120	82 (68.3)	204	113 (55.4)	1.23 (1.04 - 1.47)	4.81

Continúa...

Autor (año)/País	Casos (n)	GSTM1 nulo n (%)	Controles (n)	GSTM1 nulo n (%)	Razón de momios (95% IC)	Contribución (%)
Gra (2008) ^b /Rusia	71	38 (53.5)	490	238 (48.6)	1.10 (0.87 - 1.39)	3.46
Total	2789	1521 (54.54)	5140	3011 (58.58)	1.14 (1.09 - 1.19)	100

^a Leucemia mieloblástica aguda relacionada al tratamiento, ^b Grupos de edad menor a 18 años, ^c Controles provenientes del hospital, ^d Leucemia aguda no linfoblástica.

Tabla 4. Razón de posibilidades recalculada de los artículos relacionados con GSTT1 nulo y riesgo de LLA

Autor (año)/País	Casos (n)	GSTT1 nulo n (%)	Controles (n)	GSTT1 nulo n (%)	Razón de momios (95% IC)	Contribución (%)
Chen (1997)/EE UU	197	40 (20.3)	416	81 (19.47)	1.04 (0.74 - 1.46)	7.39
Krajinovic (1999)/Canadá	176	28 (15.91)	274	47 (17.2)	0.93 (0.60 - 1.42)	5.22
Rollinson (2000) ^b /RU	70	15 (21.43)	113	9 (8)	2.69 (1.24 - 5.82)	0.98
Woo (2000) ^b /EE UU	53	13 (24.53)	242	42 (17.36)	1.41 (0.82 - 2.44)	2.14
Davies (2002)/EE UU	651	102 (15.67)	733	143 (19.51)	0.80 (0.64 - 1.01)	19.09
Alves(2002)/Portugal	47	9 (19.15)	102	26 (25.5)	0.75 (0.38 - 1.47)	2.33
Balta (2003)/Turquía	139	29 (20.86)	185	42 (22.7)	0.92 (0.60 - 1.40)	5.11
Barnette (2004)/EE UU	79	9 (11.11)	300	66 (22)	0.52 (0.27 - 0.99)	3.90
Joseph (2004)/India	118	17 (14.41)	118	10 (8.47)	1.70 (0.81 - 3.56)	1.42
Canalle (2004)/Brasil	113	25 (22.12)	221	43 (19.5)	1.14 (0.73 - 1.76)	4.13
Pakakasama (2005)/Tailandia	107	50 (46.7)	320	122 (38.1)	1.23 (0.96 - 1.57)	8.68
Haranatha (2006) ^b /India	135	48 (35.55)	146	23 (15.75)	2.26 (1.46 - 3.50)	3.14
Aydin-Sayitoglu (2006) ^b /Turquía	36	2 (5.6)	140	29 (20.7)	0.27 (0.07 - 1.07)	1.68
Aydin-Sayitoglu (2006)/Turquía	119	29 (24.4)	140	29 (20.7)	1.18 (0.75 - 1.85)	3.78
Pigullo (2007) ^b /Italia	323	44 (13.62)	384	69 (17.97)	0.76 (0.54 - 1.07)	8.95

Continúa...

Autor (año)/País	Casos (n)	GSTT1 nulo n (%)	Controles (n)	GSTT1 nulo n (%)	Razón de momios (95% IC)	Contribución (%)
Eyada (2007)/Egipto	13	3 (23.1)	11	5 (45.5)	0.51 (0.16 - 1.66)	0.77
Han (2008)/China	120	61 (50.8)	204	100 (49)	1.04 (0.83 - 1.30)	10.51
Gra (2008)/Rusia	332	104 (31.3)	490	95 (19.2)	1.63 (1.28 - 2.08)	10.78
Total	2828	628 (22.19)	4539	980 (21.59)	1.07 (0.98 - 1.17)	100

^a Grupos de edad mayor a 18 años; ^b Controles provenientes del hospital.

Tabla 5. Razón de posibilidades recalculada de los artículos relacionados con GSTT1 nulo y riesgo de LMA

Autor (año)/País	Casos (n)	GSTT1 nulo n (%)	Controles (n)	GSTT1 nulo n (%)	Razón de momios (95% IC)	Contribución (%)
Basu (1997)/RU	200	43 (21.5)	100	23 (23)	0.93 (0.60 - 1.46)	4.37
Sasai (1999)/Japón	22	7 (31.82)	43	13 (30.2)	1.05 (0.49 - 2.25)	1.25
Sasai (1999)/Japón	18	12 (66.67)	43	13 (30.2)	2.21 (1.26 - 3.86)	1.09
Crump (2000)/EE UU	297	48 (16.16)	152	26 (17.1)	0.94 (0.61 - 1.46)	4.90
Rollinson (2000)/UK	482	89 (18.46)	826	125 (15.1)	1.22 (0.95 - 1.56)	13.11
Naoe (2000)/Japón	411	197 (47.98)	150	81 (54)	0.89 (0.74 - 1.06)	16.89
Davies (2000)/EE UU	232	77 (33.33)	153	23 (15)	2.21 (1.45 - 3.36)	3.95
Arruda (2001)/Brasil	38	13 (34.21)	276	44 (15.9)	2.15 (1.28 - 3.60)	1.52
Allan (2001)/UK	417	79 (18.94)	1019	140 (13.7)	1.38 (1.07 - 1.77)	11.57
Allan (2001)/UK	89	19 (21.35)	1019	140 (13.7)	1.55 (1.01 - 2.38)	3.20
Haase (2002)/Alemania	213	49 (23)	239	38 (15.9)	1.45 (0.99 - 2.12)	5.10
Balta (2003)/Turquía	31	2 (6.45)	185	42 (22.7)	0.28 (0.07 - 1.11)	1.72
D'Alb (2004)/Italia	193	56 (29.02)	273	52 (19)	1.52 (1.10 - 2.12)	6.13
Aydin-Sayitoglu (2006)/Turquía	50	15 (30)	140	29 (20.7)	1.45 (0.85 - 2.47)	2.17

Continúa...

Autor (año)/País	Casos (n)	GSTT1 nulo n (%)	Controles (n)	GSTT1 nulo n (%)	Razón de momios (95% IC)	Contribución (%)
Aydin-Sayitoglu (2006) ^b /Turquía	44	6 (13.6)	140	29 (20.7)	0.66 (0.29 - 1.48)	1.97
Eyada (2007)/Egipto	19	9 (47.4)	11	5 (45.5)	1.04 (0.47 - 2.32)	0.90
Majumdar (2008)/India	110	16 (14.54)	137	11 (8.02)	1.81 (0.88 - 3.74)	1.39
Müller (2008)/Israel	136	25 (18.38)	217	44 (20.28)	0.91 (0.58 - 1.41)	4.83
Han (2008)/China	120	66 (55)	204	100 (49)	1.12 (0.91 - 1.39)	10.54
Gra (2008) ^b /Rusia	71	21 (29.6)	490	94 (19.2)	1.54 (1.03 - 2.31)	3.39
Total	3193	849 (26.6)	5817	1071 (18.4)	1.23 (1.13 - 1.33)	100

^a LMA relacionada con el tratamiento, ^b Grupos de edad menor a 18 años, ^c Controles provenientes del hospital, ^d Leucemia aguda no linfoblástica.

En varios estudios se analizaron los genotipos de acuerdo a la región geográfica, etnicidad, tipos de cáncer, tamaño de muestra y procedencia de los controles (Chen *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 2002) y observaron diferencias entre los grupos étnicos. En este estudio no se consideraron aparte, ya que se analizó la asociación de polimorfismos de GST con la susceptibilidad a desarrollar leucemia aguda, considerando a todas las etnias en un mismo grupo.

En los análisis aquí realizados se observó heterogeneidad significativa (tablas 2 a 5), resultando para LLA y LMA una $p=0.000$.

Los polimorfismos de la GST (M1 y T1) han sido evaluados como factores de riesgo en varios tipos de cáncer. Estudios de epidemiología molecular indican que individuos con pérdida de los genes GSTM1 y GSTT1 son más susceptibles a desarrollar cáncer a diferencia de los que sí tienen estos genes.

Los resultados de este meta-análisis de 42 estudios caso-control, sobre GSTM1 y GSTT1, muestran un modesto incremento en el riesgo de leucemia linfoblástica y mieloblástica aguda sin embargo, al tener un genotipo nulo para ambos genes, el incremento de riesgo es más considerable para el caso de LMA en el adulto. Esto es compatible con la propuesta de que GSTM1 y GSTT1 podrían jugar un papel importante en la leucogénesis (Seedhouse y Russell, 2007). Hubo heterogeneidad entre los estudios, principalmente aquellos estudios cuya RM fue superior a 1 (Barnette *et al.*, 2004; Sasai *et al.*, 1999; Eyada *et al.*, 2007; Arruda *et al.*, 2001), esto podría ser por el tipo de población y por las características clínicas de los pacientes, ya que la gran mayoría de ellos estuvieron expuestos a agentes ambientales, sustancias químicas y forma de vida distinta (Piguillo *et al.*, 2007).

La heterogeneidad también se puede explicar por variables no controladas y que son inherentes al diseño de cada estudio ya que algunos tenían sesgos importantes por ejemplo, el tamaño de muestra, que en algunos fue pequeña (Sasai *et al.*, 1999; Eyada *et al.*, 2007) y dos estudios que utilizaron muestras altamente heterogéneas por el origen étnico (Arruda *et al.*, 2001; Eyada *et al.*, 2007). Generalmente, la heterogeneidad produce una sobre estimación de la verdadera asociación sin embargo, en este análisis, los estudios que contribuyeron a la heterogeneidad, no alteraron significativamente el valor estimado de la RM.

Para aclarar la asociación entre los genotipos y riesgo de leucemia, el tamaño de muestra es considerado un factor crucial en el diseño de estudios caso-control. Los estudios con tamaño de muestra menor de 100 casos-contróles parecen sobreestimar la verdadera asociación, debido a que la cantidad de individuos con genotipo nulo, no tienen la fuerza suficiente para detectarlo como una asociación, aunque es bien conocido que un estudio pequeño bien definido puede proveer una evaluación más precisa de riesgo, que un estudio con muchos casos pobremente diseñado. Sin embargo, muestras de gran tamaño con adecuada fuerza es uno de los factores importantes para el diseño de estudios caso-control y reflejaría mejor la asociación entre genotipos y riesgo de leucemia (Naoe *et al.*, 2002).

Algunos de los estudios analizados fueron basados en comparación con casos de otro tipo de cáncer y controles de población del hospital (Davies *et al.*, 2002; Balta *et al.*, 2003; Haranatha *et al.*, 2006; Pigullo *et al.*, 2007; Gra *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2000). Si bien es cierto que los genes GSTM1 y GSTT1 podrían conferir susceptibilidad a enfermos que no tienen cáncer, las frecuencias de sus genotipos podrían ser diferentes entre controles basados en la población y controles de población y pacientes del hospital no enfermos de cáncer, y esto puede introducir heterogeneidad entre los estudios. El uso de controles de población diferente a la de un hospital, es más apropiado en los estudios de asociación.

La asociación entre leucemia y un sitio polimórfico en particular, en una población podría ser de valor limitado como un biomarcador para cáncer en otra población.

5.3. Logros del Meta-análisis

Los resultados de este meta-análisis mostraron la asociación entre los polimorfismos de GST y el riesgo de leucemia aguda, particularmente para la LMA en adultos. Lo que significa que es conveniente seguir haciendo la genotipificación en población sana como grupo de comparación, y por otro lado, el consenso en el diseño de los estudios, para obtener resultados homogéneos y comparables.

6. Conclusiones

Además de todas las herramientas que se comentaron en este trabajo de investigación, para realizar el diagnóstico y elegir un tratamiento más

adecuado para cada paciente, es necesario implementar en las unidades hospitalarias en las que se da el servicio de hemato-oncología a la comunidad, el laboratorio de biología molecular, en el que se debe confirmar por técnicas de RT – PCR la cantidad de copias de ADN de la alteración cromosómica que se identificó.

Asimismo, identificar alteraciones cromosómicas por bandas GTG y FISH para la identificación más precisa de estas alteraciones. Queda como un importante reto para la farmacogenética el que se enfoquen los tratamientos personalizados en la terapéutica del cáncer, haciendo uso de los genes de susceptibilidad.

7. Referencias

- Abdel-Rahman, S.Z., El Zein, R.A., Anwar, W.A. y Au, W.W. (1996). A Multiplex PCR Procedure for Polymorphic Analysis of GSTM1 y GSTT1 Genes in Population Studies. *Cancer Letters*, 107: 229-233.
- Allan, J.M., Wild, C.P., Rollinson, S., Willett, E.V., Moorman, A.V., Dovey, G.J., Roddam, P.L., Roman, E., Cartwright, R.A. y Morgan, G. J. (2001). Polymorphism in Glutathione S-Transferase P1 Is Associated with Susceptibility to Chemotherapy-Induced Leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (20): 11592-11597.
- Alves, S., Amorim, A., Ferreira, F., Norton, L. y Prata, M.J. (2002). The GSTM1 and GSTT1 Genetic Polymorphisms and Susceptibility to Acute Lymphoblastic Leukemia in Children from North Portugal. *Leukemia*. 16 (8): 1565-1567.
- Arruda, V. R., Lima, C. S. P., Grignoli, C. R. E., De Melo, M. B., Lorand-Metze, I., Alberto, F. .L., Saad, S. T. O. y Costa, F. F. (2001). Increased Risk for Acute Myeloid Leukemia in Individuals with Glutathione S-Transferase Mu 1 (GSTM1) and Theta 1 (GSTT1) Gene Defects. *European Journal of Hematology*. 66 (6): 383-388.
- Aydin-Sayitoglu, M, Hatirnaz, O., Erensoy, N. y Ozbek, U. (2006). Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 Genes in the Susceptibility to Acute Leukemia. *American Journal of Hematology*. 81 (3): 162-170.

- Balta, G., Yuksek, N., Ozyurek, E., Ertem, U., Hicsonmez, G., Altay, C. y Gurqey, A. (2003). Characterization of MTHFR, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 Genotypes in Childhood Acute Leukemia. *American Journal of Hematology*. 73 (3): 154-160.
- Barnette, P., Scholl, R., Blandford, M., Ballard, L., Tsodikov, A., Magee, J., Williams, S., Robertson, M., Ali-Osman, F., Lemons, R. y Keller, C. (2004). High-Throughput Detection of Glutathione S-Transferase Polymorphic Alleles in A Pediatric Cancer Population. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 13 (2): 304-313.
- Basu, T., Gale, R.E., Langabeer, S. y Linch, D.C. (1997). Glutathione S-Transferase Theta 1 (GSTT1) Gene Defect in Myelodysplasia and Acute Myeloid Leukemia. *Lancet*. 349: 1450.
- Bewick, V., Cheek, L. y Ball, J. (2004). Statistics Review 8: Qualitative Data-Tests of Association. *Critical Care*. 8 (1): 46-53.
- Borenstein, M., Hedges, L.V., Higgins, J.P.T. y Rothstein, H.R. (2009). *Introduction to Meta Analysis*. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Ltd., 43-68.
- Canalle, R., Burim, R. V., Tone, L. G. y Takahashi, C. S. (2004). Genetic Polymorphisms and Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 43 (2):100-109.
- Chen, C., Liu, Q., Ching, P., Rivera, G. K., Sandlund, J. T., Ribeiro, R., Evans, W. E. y Relling, M. V. (1997). Higher Frequency of Glutathione S-Transferase Deletions in Black Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*. 89 (5): 1701-1707.
- Chen, H. C., Hu, W. X., Liu, Q. X., Li, W. K., Chen, F.Z., Rao, Z. Z, Liu, X. F., Luo, Y. P. y Cao, Y. F. (2008). Genetic Polymorphisms of Metabolic Enzymes CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 and Leukemia Susceptibility. *European Journal of Cancer Prevention*. 17: 251-258.
- Crump, C., Chen, C., Appelbaum, F. R., Kopecky, K. J., Schwartz, S. M., Willman, C. L., Slovak, M. L. y Weiss, N. S. (2000). Glutathione S-Transferase Theta 1 Gene Deletion and Risk of Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 9 (5): 457-460.

- D'Alò, F., Voso, M. T., Guidi, F., Massini, G., Scardocci, A., Sica, S., Pagano, L., Hohaus, S. y Leone, G. (2004). Polymorphisms of CYP1A1 and Glutathione S-Transferase and Susceptibility to Adult Acute Myeloid Leukemia. *Haematologica*, 89 (6): 664-670.
- Davies, S. M., Bhatia, S., Ross, J. A., Kiffmeyer, W. R., Gaynon, P. S., Radloff, G. A., Robinson, L. L. y Perentesis, J. P. (2002). Glutathione S-Transferase Genotypes, Genetic Susceptibility, and Outcome of Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood*, 100 (1): 67-71.
- Davies, S. M., Robison, L. L., Buckley, J.D., Radloff, G. A., Ross, J. A. y Perentesis, J. P. (2000). Glutathione S-Transferase Polymorphisms in Children with Myeloid Leukemia: A Children's Cancer Group Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 9 (6): 563-566.
- Eyada, T., Ghonemy, E., Ghoroury, E., El Bassyouni, S. y Masry, M. (2007). Study of Genetic Polymorphisms of Xenobiotic Enzymes in Acute Leukemia. *Journal Medical Science*. 7 (3): 354-360.
- Gra, O., Glotov, A., Kozhekbayeva, Z., Makarova, O. y Nasedkina, T. (2008). Genetic Polymorphism of GST, NAT and MTRR and Susceptibility to Childhood Acute Leukemia. *Molecular Biology*. 42 (2): 187-197.
- Haase, D., Binder, C., Bunger, J., Fonatsch, C., Streubel, B., Schnittger, S., Griesinger, F., Westphal, G., Schoch, C., Knopp, A., Berkovicz, D., Krieger, O., Wöramann, B., Hilgers, R., Hallier, E. y Schulz, T. (2002). Increased Risk for Therapy-Associated Hematologic Malignancies in Patients with Carcinoma of the Breast and Combined Homozygous Gene Deletions of Glutathione Transferase M1 and T1. *Leukemia Research*. 26 (3): 249-254.
- Haranatha, R. P. y Kaiser, J. (2006). Polymorphisms in the GST (M1 and T1) Gene and Their Possible Association with Susceptibility to Childhood Acute Lymphocytic Leukemia in Indian Population. *African Journal of Biotechnology*. 5 (16): 1454-1456.
- Joseph, T., Kusumakumary, P., Chacko, P., Abraham, A. y Pillai, M. R. (2004). Genetic Polymorphism of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTT1 and Susceptibility to Acute Lymphoblastic Leukemia in Indian Children. *Pediatric Blood and Cancer*. 43 (5): 560-567.

- Krajinovic, M., Labuda, D., Richer, C., Karimi, S. y Sinnett, D. (1999). Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 Genetic Polymorphisms. *Blood*, 93(5):1496-1501.
- Laborde E. (2010). Glutathione Transferase As Mediators of Signaling Pathways Involved in Cell proliferation and cell death. *Cell Death and Differentiation*. 17: 1373-1380.
- Majumdar, S., Charan, B., Ghosh, M., Dey, S., Mukhopadhyay y Chandra S. (2008). Association of Cytochrome P450, Glutathione S-Transferase and N-Acetyl Transferase 2 Gene Polymorphisms with Incidence of Acute Myeloid Leukemia. *European Journal of Cancer Prevention*. 17: 125-132.
- Müller, P., Asher, N., Heled, M., Bar, S., Risch, A. y Rund, D. (2008). Polymorphisms in Transporter and Phase II Metabolism Genes as Potential Modifiers of the Predisposition and Treatment Outcome of De Novo Acute Myeloid Leukemia in Israeli Ethnic Groups. *Leukemia Research*. 32: 919-929.
- Naoe, T., Takeyama, K., Yokozawa, T., Kiyoi, H., Seto, M. y Uike, N. (2000). Analysis of Genetic Polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1 and CYP3A4 in 469 Japanese Patients with Therapy-Related Leukemia/Myelodysplastic Syndrome and De Novo Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 6: 4091-4095.
- Pakakasama, S., Mukda, E., Sasanakul, W., Kadegasem, P., Udomsubpayakul, U., Thithapandha, A. y Honqenq, S. (2005). Polymorphisms of Drug-Metabolizing Enzymes and Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *American Journal of Hematology*. 79 (3): 202-205.
- Pigullo, S., Haupt, R., Dufour, C., Michele, P. D., Valsecchi, M. G., Basso, G., Rizzari, C., Biondi, A y Lanciotti, M. (2007). Are Genotypes of Glutathione S-Transferase Superfamily A Risk Factor for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia? Results of An Italian Case-Control Study. *Leukemia*. 21: 1122-1124.
- Rollinson, S., Roddam, P., Kane, E., Roman, E., Cartwright, R., Jack, A. y Morgan, G. J. (2000). Polymorphic Variation with the Glutathione S-Transferase Genes and Risk of Adult Acute Leukemia. *Carcinogenesis*. 21 (1): 43-47.

- Saadat, I. y Saadat, M. (1999). The Glutathione S-Transferase Mu Polymorphism and Susceptibility to Acute Lymphocytic Leukemia. *Cancer Letters*. 158: 43-45.
- Sasai, Y., Horiike, S., Misawa, S., Kaneko, H., Kobayashi, M., Fujii, H., Kashi-
ma, K. y Taniwaki, M. (1999). Genotype of Glutathione S-Transfe-
rase and Other Genetic Configurations in Myelodysplasia. *Leuke-
mia Research*. 23 (11): 975-981.
- Seedhouse, C., Faulkner, R., Ashraf, N., Das-Gupta, E. y Russell, N. (2004).
Polymorphisms in Genes Involved in Homologous Recombination
Repair Interact to Increase the Risk of Developing Acute Myeloid
Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 10: 2675-2680.
- Seedhouse, C. y Russell, N. (2007). Advances in the Understanding of Sus-
ceptibility to Treatment Related Acute Leukemia. *British Journal of
Hematology*. 137: 513-529.
- Woo, M. H., Shuster, J. J., Chen, C., Bash, R. O., Behm, F. G., Camitta, B.,
Felix, C. A., Kamen, B. A., Pui, C. H., Raimondi, S. C., Winick, N. J.,
Amylon, M. D. y Relling, M. V. (2000). Glutathione S-Transferase
Genotypes in Children Who Develop Treatment-Related Acute
Myeloid Malignancies. *Leukemia*. 14 (2): 232-237.

Capítulo XV

Estudio de la reactividad de hidruros de aluminio estéricamente protegidos con moléculas pequeñas insaturadas

Mónica Mercedes Moya Cabrera^{1 *}

Vojtěch Jančík¹

Rosa María Gómez Espinosa¹

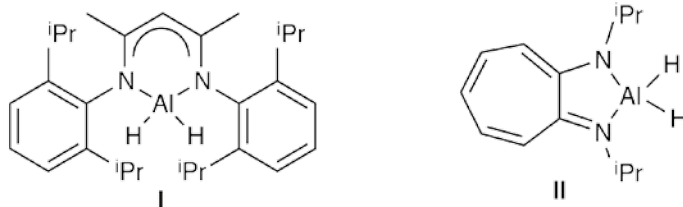
Telésforo Jesús Morales Juárez²

1. Antecedentes

1.1. Hidruros de aluminio

Los hidruros de aluminio han sido ampliamente estudiados debido a su importancia en una variedad de aplicaciones, incluyendo síntesis orgánica y procesos catalíticos industriales (Roesky, 2004). Los hidruros de aluminio normalmente presentan estructuras oligoméricas en fases condensadas. No obstante, se ha demostrado que utilizando ligandos voluminosos o multidentados, se pueden obtener pequeños agregados de hidruros de aluminio e incluso arreglos discretos, tales como los dihidruros monoméricos ${}^i\text{PrLAlH}_2$ (${}^i\text{PrL} = \text{HC}\{(\text{CMe})(\text{NAr})\}_2$; $\text{Ar} = 2,6\text{-}^i\text{Pr}_2\text{C}_6\text{H}_3$) (I) (Cui, *et al*, 2000) y $({}^i\text{Pr}_2\text{ATI})\text{AlH}_2$ (II) (Dias, *et al*, 1995) (Figura 1.1).

Figura 1.1



En este sentido, algunos tipos de hidruros de aluminio se han detectado en superficies durante el crecimiento de películas delgadas de compuestos de aluminio. En principio, los compuestos de aluminio conteniendo

grupos hidruro monoméricos podrían ser modelos útiles para entender con mayor profundidad las reacciones químicas que ocurren en la superficie de los grupos AlH_n .

1.2 Reducción de moléculas orgánicas

La hidroaluminación es una reacción importante tanto a nivel industrial como en el laboratorio y aunque ésta es ampliamente utilizada, solamente un número reducido de informes en la literatura tratan sobre los intermediarios en la reacción de hidroaluminación ya que en muchas reacciones los compuestos orgánicos son liberados por hidrólisis. Algunos ejemplos interesantes de la aplicación de hidruros de aluminio en síntesis orgánica incluye la reducción diastereoselectiva de hidrazonas derivadas de cetonas proquirales e hidrazinas quirales con LiAlH_4 (Bataille *et al.*, 2000).

Asimismo, el agente organometálico más poderoso para la reducción de las lactonas en lactoles es el hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H), el cual fue desarrollado durante la síntesis estereoespecífica de las prostaglandinas (Cook y Twine, 1968; Corey *et al.*, 1969).

Se han descrito otros métodos utilizando hidruros organometálicos, incluyendo la reducción de piranonas y cumarinas. Igualmente, las oximas pueden reducirse a aminas primarias utilizando LiAlH_4 aunque algunas del tipo $\text{ArCH}_2\text{CR}=\text{NOH}$ producen aziridinas. Sin embargo, cuando el agente reductor es DIBAL-H, el producto de reducción son aminas secundarias a partir de una transposición mientras que los isocianatos e isotiocianatos pueden ser reducidos a metilaminas con LiAlH_4 (Smith y March, 2001).

En este trabajo se informa sobre el estudio de hidroaluminación de isotiocianatos e isocianatos selectos con dos dihidruros de aluminio estéricamente impedidos en distintas relaciones molares.

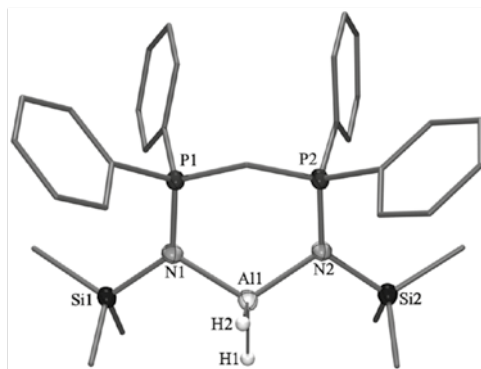
2. Resultados y discusión

2.1. Preparación de los hidruros $^{\text{TMS}}\text{LiAlH}_2$ (1) y $^{\text{Me}}\text{LiAlH}_2$ (2)

La reacción del bis(N-trimetilsililiminodifenilfosforanil) metano $^{\text{TMS}}\text{LH}$ ($^{\text{TMS}}\text{LH} = [\text{H}_2\text{C}\{\text{P}\Phi_2(\text{NSiMe}_3)\}_2]$) con el $\text{AlH}_3\cdot\text{NMe}_3$ en tolueno a temperatura ambiente produjo el dihidruro **1** con un rendimiento del 84 % (Esque-

ma 2.1). Por otra parte, la preparación de $^{\text{Me}}\text{LAlH}_2$ ($\text{L} = [\text{H}\{(\text{CMe})(\text{NAr})\}_2]^-$, $\text{Ar} = 2,4,6\text{-Me}_3\text{C}_6\text{H}_2$) (**2**) se hizo de acuerdo al método informado en la literatura (González-Gallardo *et al.*, 2007).

Esquema 2.1. Preparación del dihidruro de aluminio $^{\text{TMS}}\text{LAlH}_2$ (**1**)



La caracterización de **1** se realizó mediante técnicas espectroscópicas comunes (IR, RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, $^{27}\text{Al}\{^1\text{H}\}$), espectrometría de masas con ionización por impacto electrónico (IE) y por estudios de difracción de rayos X de monocristal. El espectro de IR exhibe bandas características del estiramiento asimétrico y simétrico correspondiente al grupo AlH_2 en 1827 y 1768 cm^{-1} , respectivamente. El espectro de RMN de ^1H presenta una señal ancha alrededor de δ 4.80 correspondiente a los dos protones del grupo AlH_2 y una señal triple en δ 1.79 ppm correspondiente al protón del metino, el cual presenta un acoplamiento a dos enlaces con los dos átomos de fósforo, $^2J_{\text{H-P}} = 3.86$ Hz. El espectro de RMN de $^{27}\text{Al}\{^1\text{H}\}$ presenta una señal en δ 129 ppm ($\omega_{1/2} = 3570$ Hz) correspondiente a un átomo de Al tetracoordinado mientras que en el espectro de RMN de $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ se observa una señal sencilla en 3.7 ppm. El espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ exhibe una señal sencilla en δ 29.1 ppm, la cual se encuentra desplazada sensiblemente a frecuencia más alta con respecto al ligante $^{\text{TMS}}\text{LH}$ (cf δ 6 ppm) (Appel y Ruppert, 1974). La evidencia espectroscópica anterior sugiere que el compuesto **1** se encuentra en forma de hidruro monomérico en disolución. Por otra parte, el espectro de masas (IE) exhibe un pico con m/z 585 correspondiente a $[\text{M}^+ - \text{H}]$, característica de los hidruros de aluminio.

Se obtuvieron cristales incoloros de calidad suficiente para realizar estudios de difracción de rayos X de monocristal, a partir de una solución saturada de **1** en pentano a $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$. El compuesto **1** cristalizó en un sistema monoclinico con un grupo espacial $P2_1$ con dos moléculas cristalográficamente independientes en la celda unitaria. La estructura cristalina de **1** muestra una molécula discreta con un átomo de aluminio tetracoordinado, semejante a lo observado en solución (figura 2.1). Los parámetros geométricos selectos y los datos cristalográficos más importantes sobre la solución y refinamiento de **1** se encuentran enlistados en las tablas 2.1 y 2.2, respectivamente.

Figura 2.1. Proyección ORTEP de la molécula A del compuesto **1** con elipsoides térmicos al 50 % de probabilidad en los heteroátomos

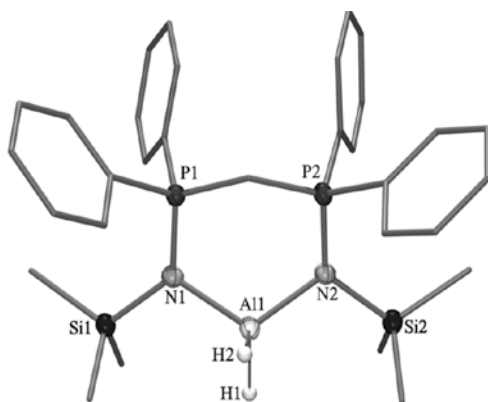


Tabla 2.1 Parámetros geométricos ($\text{\AA}$, $^{\circ}$) selectos para las moléculas A y B del compuesto **1**

Molécula A		Molécula B	
Al(1)–H(1)	1.56(1)	Al(2)–H(3)	1.58(1)
Al(1)–H(2)	1.58(1)	Al(2)–H(4)	1.56(1)
Al(1)–N(1)	1.912(2)	Al(2)–N(3)	1.930(2)
Al(1)–N(2)	1.918(2)	Al(2)–N(4)	1.920(2)
P(1)–N(1)	1.625(2)	P(3)–N(3)	1.628(2)
P(2)–N(2)	1.631(2)	P(4)–N(4)	1.623(2)
H(1)–Al(1)–H(2)	110(2)	H(3)–Al(2)–H(4)	112(2)

Continúa...

Molécula A		Molécula B	
N(1)-Al(1)-N(2)	110.4(1)	N(3)-Al(2)-N(4)	107.9(1)
N(1)-Al(1)-H(1)	106(1)	N(3)-Al(2)-H(3)	115(1)
N(1)-Al(1)-H(2)	108.0(1)	N(3)-Al(2)-H(4)	107(1)
N(2)-Al(1)-H(1)	107(1)	N(4)-Al(2)-H(3)	111(1)
N(2)-Al(1)-H(2)	116(1)	N(4)-Al(2)-H(4)	104(1)
P(1)-C(1)-P(2)	123.5(2)	P(3)-C(23)-P(4)	122.6(2)

Tabla 2.2 Datos cristalográficos y de refinamiento del compuesto 1

Fórmula	$C_{31}H_{41}AlN_2P_2Si_2$
Peso molecular	586.76
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo Espacial	$P2_1$
Temperatura, K	100(2)
λ , Å	1.54178
a , Å	11.813(1)
b , Å	20.347(1)
c , Å	14.760(1)
α , °	90
β , °	112.89
γ , °	90
Volumen, Å ³	3268(1)
Z	4
$\rho_{\text{calculada}}$, g·cm ⁻³	1.192
μ , mm ⁻¹	2.335
$F(000)$	1248
Intervalo θ , recolección datos	3.25 a 58.68°
Índice de intervalos	-12 $\leq h \leq$ 12 -21 $\leq k \leq$ 21 -16 $\leq l \leq$ 16
Reflexiones colectadas	13553

Continúa...

Reflexiones independientes (R_{int})	8393 (0.0261)
Datos/restricciones/parámetros	8393 / 11 / 710
GoF en F^2	1.038
$R1^a$, $wR2^b$ ($I > 2\sigma(I)$)	0.0294, 0.0741
$R1^a$, $wR2^b$ (datos totales)	0.0306, 0.0750
Parrámetro de estructura absoluta	0.48(1)
Pico/hueco restante más grande, $e\cdot\text{\AA}^{-3}$	0.492 / - 0.288

$$^a R1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|. \quad ^b wR2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$$

El átomo de aluminio presenta una geometría tetraédrica ligeramente distorsionada mientras que las distancias de enlace Al-H (1.56(2), 1.58(2), 1.56(1), 1.58(1) Å) son similares a las encontradas en otros compuestos semejantes L^*AlH_2 ($L^* = HC\{(CMe)(NMe)\}_2^-$ (1.53(4) Å) (Kuhn *et al.*, 2000) y $^{iPr}LAlH_2$ ($^{iPr}L = HC\{(CMe)(NAr)\}_2^-$; Ar = 2,6- $^{iPr}_2C_6H_3$) (1.51(2) Å) (Twamley *et al.*, 2001; Cui, *et al.* 2000). Los ángulos de enlace H-Al-H (110(2)° y 112(2)° son comparables con aquéllos de los compuestos antes mencionados (111.3(8) y 113.2(11)°), además el anillo CP_2N_2Al presenta una conformación en forma de bote.

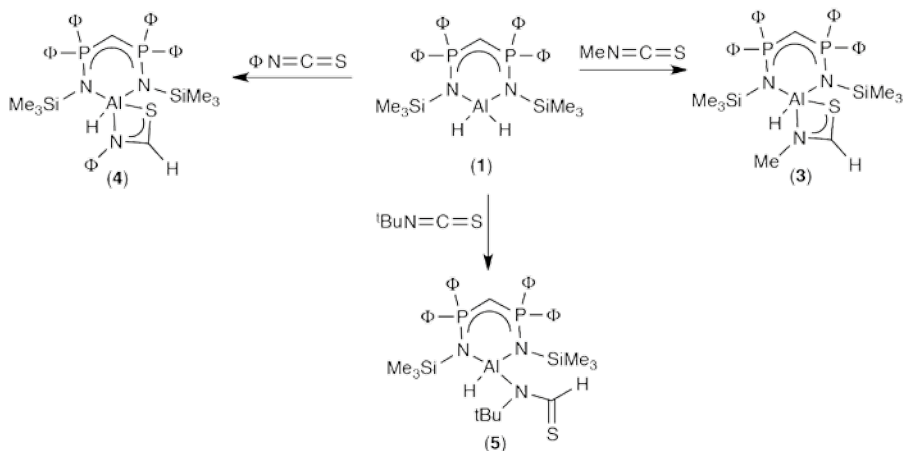
2.2. Reacciones de hidroaluminación

Se estudiaron las reacciones de hidroaluminación utilizando **1** con metil-, tertbutil- y fenilisotiocianato en relaciones molares 1:1 y 1:2. Con ambas relaciones estequiométricas se obtuvieron los mismos productos correspondientes a la hidroaluminación de una sola molécula del isotiocianato respectivo (Esquema 2.2.).

Las reacciones de **1** con el metil-, fenil y tertbutilisotiocianato en tolueno a temperatura ambiente, tanto con una relación molar 1:1 como 1:2 produjeron el mismo tipo de compuestos correspondientes a los compuestos **3**, **4** y **5**, respectivamente. De forma general, los tres compuestos anteriores presentan estructuras correspondientes a productos de una monohidroaluminación con la reducción selectiva de los grupos isotiocianato generando los grupos tioamido respectivo. El compuesto $^{TMS}LAlH\{\kappa^2-N,S-[CH(S)NMe]\}$ (**3**) se obtuvo con un rendimiento del 50 % mientras que $^{TMS}LAlH\{\kappa^2-N,S-[CH(S)N\Phi]\}$ (**4**) y $^{TMS}LAlH\{\kappa-N-[CH(S)N^tBu]\}$ (**5**) se obtuvieron con 69 % y 75 %, respectivamente. Todos los compuestos

fueron caracterizados por métodos espectroscópicos (IR y RMN de ^1H , $^{27}\text{Al}\{^1\text{H}\}$, $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$) y espectrometría de masas (IE).

Esquema 2.2. Reacciones de hidroaluminación de isotiociantos selectos con 1



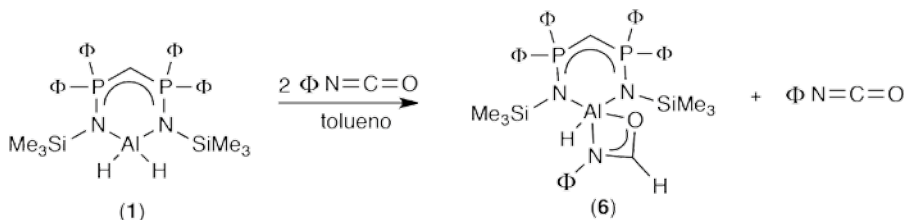
Los espectros de IR exhiben las bandas de estiramiento correspondiente a los grupos $\text{C}=\text{S}$ del tioamido ($\text{NC}(\text{S})\text{H}$) en la región de 1250 a 1260 cm^{-1} (Pertsch *et al.*, 2000). Además, los compuestos también exhiben la banda de vibración correspondiente a $\text{Al}-\text{H}$ alrededor de 1775 cm^{-1} . Los espectros de masas de los compuestos 3 - 5 no exhiben los iones moleculares. Sin embargo, se observan algunos fragmentos característicos, tales como m/z 494 y 416 correspondientes a los fragmentos $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{PSiAlS}$ y $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{P}_2\text{Si}_2\text{Al}$ en 5, respectivamente. Los compuestos 3 y 4 muestran un mismo fragmento en m/z 585 correspondiente a la pérdida del grupo tioamido [$M^+ - \text{RNC}(\text{S})\text{H}$]. Los espectros de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ y $^{29}\text{Si}\{^1\text{H}\}$ para 3, 4 y 5 exhiben las señales características del anillo inorgánico. Asimismo, los espectros de ^1H exhiben además señales sencillos en δ 8.85, 8.78 y 8.72 ppm, correspondientes al protón del grupo tioamido ($\text{NC}(\text{S})\text{H}$) de 3, 4, y 5, respectivamente.

La relación entre la integración de estos protones y los protones δ (CH) del anillo $\text{CHP}_2\text{N}_2\text{Al}$ sugiere la existencia de productos de monohidroaluminación. Esto también se confirma por la presencia de una señal ancha en δ 4.87 ppm correspondiente al protón de AlH . Los espectros de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de estos compuestos exhiben un señal aproximadamente en δ 160 ppm correspondiente al grupo tioamido.

Por otra parte, los espectros de RMN de $^{27}\text{Al}\{^1\text{H}\}$ exhiben diferente comportamiento en solución. En el caso del compuesto 3 se observa una señal sencilla en δ 56 ppm ($\omega_{1/2} = 153$ Hz) correspondiente a un átomo de aluminio pentacoordinado en disolución. Por otra parte, el compuesto 4 exhibe dos señales en δ 107 ppm ($\omega_{1/2} = 1350$ Hz) y en δ 62 ppm ($\omega_{1/2} = 125$ Hz) lo que sugiere la existencia de un equilibrio en disolución entre especies tetracoordinadas y pentacoordinadas. Este equilibrio no se observa en el espectro de ^1H . Finalmente, el compuesto 5 exhibe una señal sencilla en δ 119 ppm ($\omega_{1/2} = 1090$ Hz).

Adicionalmente se estudió la reactividad del compuesto 1 como agente reductor del fenilisocianato con relaciones molares 1:1 y 1:2 y en ambos casos se obtuvo el mismo compuesto, $^{\text{TMS}}\text{LAIH}\{\kappa^2\text{-}N,S\text{-}[\text{CH}(\text{S})\text{N}\Phi]\}$ (6) (Esquema 2.3).

Esquema 2.3. Reacción de hidroaluminación del fenilisocianato con 1

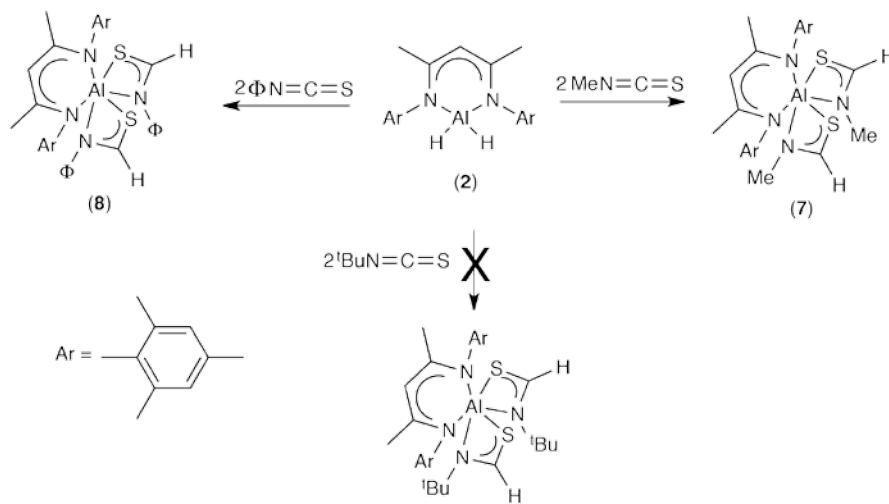


El compuesto 6 se obtuvo con 53% de rendimiento y fue caracterizado por los métodos espectroscópicos comunes. El espectro de IR muestra la señal de estiramiento correspondiente al carbonilo del grupo amido $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{H}$ en 1693 cm^{-1} . El espectro de ^1H muestra una señal sencilla en δ 9.29 ppm $\text{N}(\text{C}=\text{O})\text{H}$ con una relación similar a la de los grupos AlH (δ 4.78 ppm) y CH (δ 1.80 ppm). Esto sugiere la existencia de un producto de monohidroaluminación en disolución, similar a lo observado en ^{27}Al , donde se presenta una señal sencilla en δ 56 ppm correspondiente a un átomo de aluminio pentacoordinado. Además, el espectro de masas exhibe un pico con m/z 704, correspondiente a $[\text{M}^+ - \text{H}]$.

Por otra parte, se estudió también la reactividad del dihidruro de aluminio $^{\text{Me}}\text{LAIH}_2$ ($^{\text{Me}}\text{L} = [\text{H}\{(\text{CMe})(\text{NAr})\}_2]^-$; $\text{Ar} = 2,4,6\text{-Me}_3\text{C}_6\text{H}_2$) (2) con metil-, fenil- y terbutilisotiocianato en una relación 1:1 y 1:2. Independientemente de la relación molar utilizada se obtuvieron productos correspondientes a

una doble hidroaluminación para el metilisotiocianato y para el fenilisotiocianato. Sin embargo, en el caso del *ter*butilisotiocianato la reacción no procede, aislándose solamente las materias primas (Esquema 2.4).

Esquema 2.4. Reacciones de hidroaluminación de isotiocianatos selectos con 2



Los compuestos $\text{MeAl}[\kappa^2\text{-N,S-}[\text{CH(S)NMe}]]_2$ (7) y $\text{MeAl}[\kappa^2\text{-N,S-}[\text{CH(S)N}\Phi]]_2$ (8) se obtuvieron con 67% y 74% de rendimiento, respectivamente. Los espectros de IR en estado sólido de 7 y 8 exhiben la presencia de bandas de estiramiento para el grupo tioamido C=S en 1245 y 1260 cm^{-1} , respectivamente. Además, no se observa evidencia de la banda de vibración Al-H en la región de 1700 - 1800 cm^{-1} , lo que confirma la sustitución completa de los hidruros unidos al átomo de aluminio. Los espectros de masas muestran picos en m/z 434 y 496 correspondientes a los fragmentos $[M^+-R]$ ($R = \text{Me}$ (7), Φ (8)). La estructura de los compuestos 7 y 8 en disolución se elucidó mediante espectroscopía de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ y $^{27}\text{Al}\{^1\text{H}\}$. Los espectros de ^1H muestran las señales características del ligante además de una señal sencilla en δ 5.09 (7) y 5.23 ppm (8) correspondiente a los protones g con una relación semejante a las señales sencillas en δ 8.08 (7) y 8.56 ppm (8) correspondientes a los grupos tioamido (C(S)H). Los espectros de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de 7 y 8 muestran también la señal característica de los grupos tiocarbonilo en δ 183.7 y 186.1 ppm, respectivamente. Por otra parte, los espectros de RMN de $^{27}\text{Al}\{^1\text{H}\}$ mues-

tran señales sencillas en δ 15 (7) y 8 ppm (8), confirmando la existencia de compuestos de aluminio hexacoordinados en disolución.

Se obtuvieron cristales incoloros de calidad suficiente para realizar estudios de difracción de rayos X de monocristal, a partir de una solución saturada de 8 en una mezcla de CH_2Cl_2 /hexano a -5°C . El compuesto 2 cristalizó en un sistema monoclinico en el grupo espacial $P2_1/n$ con una molécula en la unidad asimétrica (Figura 2.2). Los parámetros geométricos selectos y los datos cristalográficos sobre la solución y refinamiento de 8 se encuentran enlistados en las tablas 2.3 y 2.4.

La estructura molecular de 8 exhibe un átomo de aluminio hexacoordinado con una geometría octaédrica distorsionada con los átomos de S coordinados de manera *anti*. Las distancias de enlace Al-S con 2.418(1) y 2.491(1) son mayores que aquéllas observadas en $^i\text{Pr}\text{Al}(\text{SH})_2$ (2.223(1), 2.217(1)) (Jancik *et al.*, 2003).

Figura 2.2. Proyección ORTEP del compuesto 8 con elipsoides térmicos al 50 % de probabilidad en los heteroátomos y los átomos de C24 y C31



Tabla 2.3. Parámetros geométricos selectos ($\text{\AA}$, $^\circ$) para el compuesto 8

Al(1)-N(1)	1.961(2)	N(1)-Al(1)-N(2)	92.6(1)
Al(1)-N(2)	1.960(2)	N(3)-Al(1)-N(4)	83.2(1)
Al(1)-N(3)	2.095(2)	N(1)-Al(1)-N(4)	162.6(1)
Al(1)-N(4)	2.052(2)	N(3)-Al(1)-N(1)	93.0(1)
Al(1)-S(1)	2.418(1)	N(3)-Al(1)-N(2)	168.0(1)

Continúa...

Al(1)-S(2)	2.491(1)	N(4)-Al(1)-N(2)	94.5(1)
C(24)-S(1)	1.694(2)	N(3)-C(24)-S(1)	117.5(2)
C(31)-S(2)	1.697(2)	N(4)-C(31)-S(2)	117.3(2)

Tabla 2.4. Datos cristalográficos y de refinamiento del compuesto 8

Fórmula	$C_{37}H_{41}AlN_4S_2$
Peso molecular	632.84
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo Espacial	$P2_1/n$
Temperatura, K	173(2)
Tamaño del cristal mm^3	0.44 x 0.44 x 0.29
λ , Å	0.71073
a , Å	10.996(2)
b , Å	15.678(3)
c , Å	19.928(3)
α , °	90
β , °	104.49
γ , °	90
Volumen, Å ³	3326(1)
Z	4
$\rho_{calculada}$, g·cm ⁻³	1.264
μ , mm ⁻¹	0.219
$F(000)$	1344
Intervalo θ , recolección datos	3.25 a 58.68°
Índice de intervalos	-13 $\leq h \leq$ 13 -18 $\leq k \leq$ 18 -23 $\leq l \leq$ 23
Reflexiones colectadas	27338
Reflexiones independientes (R_{int})	6069 (0.0414)
Datos/restricciones/parámetros	6069 / 0 / 408
GoF en F^2	1.031

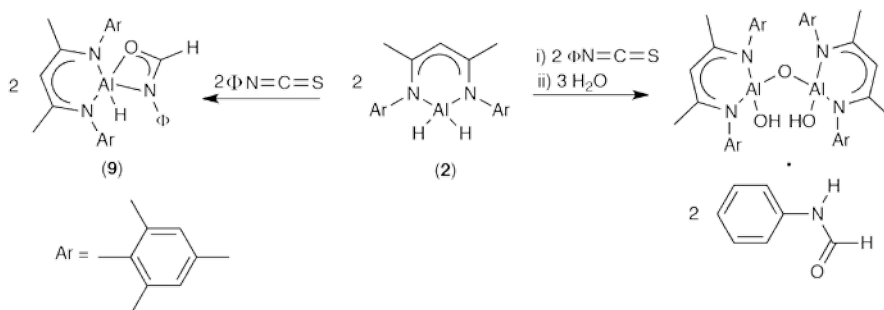
Continúa...

$R1^a$, $wR2^b$ ($I > 2\sigma(I)$)	0.0417, 0.0977
$R1^a$, $wR2^b$ (datos totales)	0.0417, 0.1020
Pico/hueco restante más grande, $e \cdot \text{\AA}^{-3}$	0.358 / - 0.203

$$^a R1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|, ^b wR2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)]^{1/2}$$

La reacción de 2 con el fenilisocianato tanto en una relación molar 1:1 como 1:2 en tolueno a temperatura ambiente dio el compuesto 9 con un rendimiento del 60% (Esquema 2.5).

Esquema 2.5. Reacciones de hidroaluminación del fenilisocianato con 2

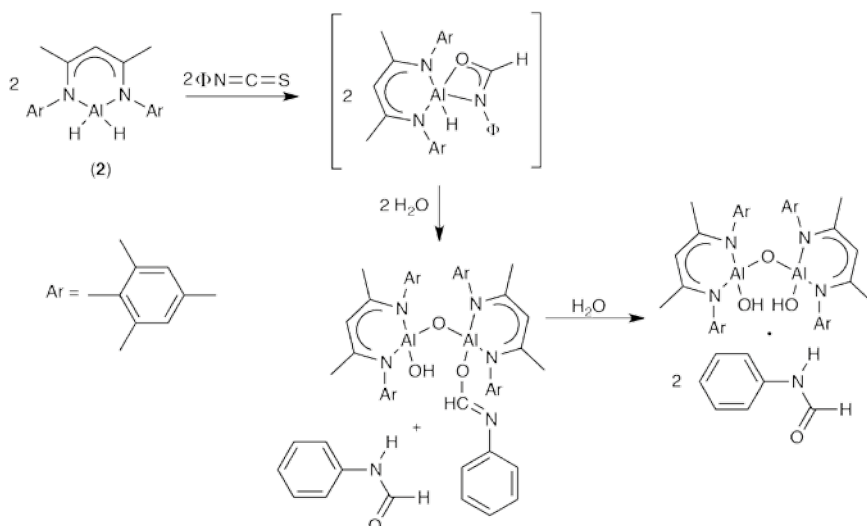


El espectro de IR muestra la señal característica del grupo C=O en 1693 cm^{-1} mientras que el espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ exhibe la señal correspondiente al grupo C=O en δ 178.0 ppm. El espectro de RMN de ^1H muestra una señal que corresponde al protón del grupo H(CO) en δ 9.49 ppm. Por otra parte, en el espectro de RMN de $^{27}\text{Al}\{^1\text{H}\}$ se observa una señal sencilla en δ 35 ppm correspondiente a un átomo de aluminio pentacoordinado. Las evidencias espectroscópicas anteriores sugieren entonces la existencia de un centro metálico de aluminio pentacoordinado con coordinación bidentada a un grupo amido producto de la reducción del isocianato.

Por otra parte, la reacción de 2 con dos equivalentes de fenilisocianato en presencia de 1.5 equivalentes de H_2O produjo el sistema cocrystalino $[\text{Me-LAl}(\text{OH})_2(\mu\text{-O}) \cdot 2[\Phi\text{NHC}(\text{O})\text{H}]]_2$, formado por una molécula de alumoxano con grupos terminales OH y dos moléculas de la N-fenilformamida $\Phi\text{NH}(\text{CO})\text{H}$. La ruta más probable de formación del sistema $[\text{Me-LAl}(\text{O-H})_2(\mu\text{-O}) \cdot 2[\Phi\text{NHC}(\text{O})\text{H}]]_2$ se propone en el esquema 2.6.

El sistema cocrystalino fue caracterizado por estudios espectroscópicos de RMN de ^1H , IR y espectrometría de masas, además de estudios de difracción de rayos X de monocristal. El espectro de RMN de ^1H del sistema presenta una señal sencilla que integra para dos átomos de hidrógeno en δ 4.82 ppm correspondiente a los protones del esqueleto del ligante β -dicetiminato. Además, se observa una señal sencilla en δ -0.64 ppm que corresponde a los dos protones del grupo OH.

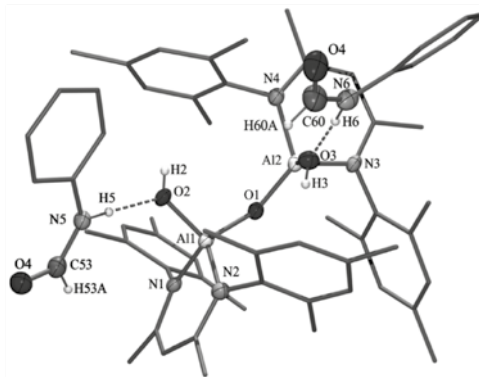
Esquema 2.6. Ruta propuesta para la formación del sistema $[\text{Me}^i\text{Al}(\text{OH})]_2(\mu\text{-O}) \cdot 2[\Phi\text{NHC}(\text{O})\text{H}]_2$



Por otra parte, en este espectro también se observan las señales correspondientes a las dos moléculas de N-fenilformamida en δ 8.01 y 8.35 ppm correspondientes a los protones de los grupos CHO y NH, respectivamente, integrando cada uno para dos protones. Además, el espectro de IR del sistema exhibe las bandas de estiramiento simétrico para el grupo carbonilo en 1696 cm^{-1} . El espectro de masas presenta un pico con m/z 121 correspondiente a la molécula de N-fenilformamida del cocrystal.

El sistema cocrystalino cristalizó a partir de una solución saturada de tolueno/hexano a -5°C , en un sistema triclinico con un grupo espacial $P-1$ (Figura 2.3). Los detalles cristalográficos más importantes sobre la solución y refinamiento del sistema cocrystalino $[\text{Me}^i\text{Al}(\text{OH})]_2(\mu\text{-O}) \cdot 2[\Phi\text{NHC}(\text{O})\text{H}]_2$ se encuentran enlistados en la tabla 2.5.

Figura 2.3. Proyección ORTEP del sistema cocrystalino $[\text{Me}]\text{Al}(\text{OH})_2(\mu\text{-O}) \cdot 2[\Phi\text{NHC}(\text{O})\text{H}]_2$ con elipsoides térmicos al 50% de probabilidad para los heteroátomos y C(53) y C(60)



La estructura cristalina de la molécula de $[\text{Me}]\text{Al}(\text{OH})_2(\mu\text{-O})$ contenida en el sistema cocrystalino exhibe un ángulo $\text{Al}(1)\text{-O}(1)\text{-Al}(2)$ correspondiente a $137.7(2)^\circ$ lo que representa valores ligeramente menores a aquéllos informados para los compuestos análogos $[\text{iPr}]\text{Al}(\text{OH})_2(\mu\text{-O})$ ($\text{iPrL} = [\text{HC}\{(\text{C-Me})(\text{NAr})\}_2]^-$; $\text{Ar} = 2,6\text{-iPr}_2\text{C}_6\text{H}_3$) ($143.8(2)^\circ$) (Bai *et al.*, 2003) y $[\text{iPr}]\text{Al}(\text{OH})(\mu\text{-O})\text{Al}^{\text{iPr}}\text{L}(\text{OCH}=\text{N}^t\text{Bu})$ ($147.8(1)^\circ$) (Peng, *et al.*, 2004). Los centros metálicos de aluminio están coordinados a un grupo OH con un átomo de oxígeno puente. Las distancias de enlace $\text{Al}(1)\text{-(}\mu\text{-O)}$ y $\text{Al}(2)\text{-(}\mu\text{-O)}$ con $1.692(3)$ y $1.701(3)$ Å, respectivamente, son similares a las informadas para compuestos análogos con la unidad Al-O-Al ($1.698(3)$, $1.694(3)$, $1.699(2)$ y $1.706(2)$ Å). Asimismo, las distancias de enlace Al-OH con $1.738(3)$ y $1.719(3)$ Å son comparables con aquéllas de los compuestos anteriores; $1.738(3)$, $1.741(3)$, $1.739(2)$ y $1.727(2)$ Å. Sin embargo son mayores que aquéllas existentes en el compuesto monometálico $[\text{iPr}]\text{Al}(\text{OH})_2$ ($1.710(2)$ y $1.695(2)$ Å) (Cui, *et al.*, 2000). Además, los ángulos de enlace $(\mu\text{-O})\text{-Al}(\text{OH})$ con $113.9(1)^\circ$ y $112.9(1)^\circ$, son semejantes a los informados para los compuestos antes mencionados.

Por otra parte, el sistema cocrystalino también contiene dos moléculas del N-fenilformamida $\Phi\text{NH}(\text{CO})\text{H}$. Estas moléculas se encuentran enlazadas a la molécula de alumoxano $[\text{Me}]\text{Al}(\text{OH})_2(\mu\text{-O})$ a través de puentes de hidrógeno entre el átomo de H del grupo NH de la N-fenilformamida y los átomos de O de los grupos OH del alumoxano.

Tabla 2.5 Datos cristalográficos y de refinamiento del compuesto 9

Fórmula	$C_{46}H_{60}Al_2N_4O_3 \cdot 2(C_7H_7NO)$
Peso molecular	1013.21
Sistema Cristalino	Triclínico
Grupo Espacial	$P-1$
Temperatura, K	173(2)
Tamaño del cristal mm^3	0.29 x 0.19 x 0.05
λ , Å	0.71073
a , Å	12.904(4)
b , Å	13.738(5)
c , Å	18.068(5)
α , °	90.21(4)
β , °	91.77(4)
γ , °	115.25(4)
Volumen, Å ³	2895(2)
Z	2
$\rho_{calculada}$, g·cm ⁻³	1.162
μ , mm ⁻¹	0.102
$F(000)$	1084
Intervalo θ , recolección datos	2.26 a 46.62°
Índice de intervalos	-14 $\leq h \leq$ 14 -15 $\leq k \leq$ 15 -20 $\leq l \leq$ 20
Reflexiones colectadas	26817
Reflexiones independientes (R_{int})	8332 (0.0806)
Datos/restricciones/parámetros	8332 / 370 / 782
GoF en F^2	1.000
$R1^a$, $wR2^b$ ($I > 2\sigma(I)$)	0.0658, 0.1423
$R1^a$, $wR2^b$ (datos totales)	0.1203, 0.1660
Pico/huevo restante más grande, e·Å ⁻³	0.309 / - 0.211

^a $R1 = \Sigma ||F_o| - |F_c|| / \Sigma |F_o|$, ^b $wR2 = [\Sigma w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \Sigma w(F_o^2)^2]^{1/2}$

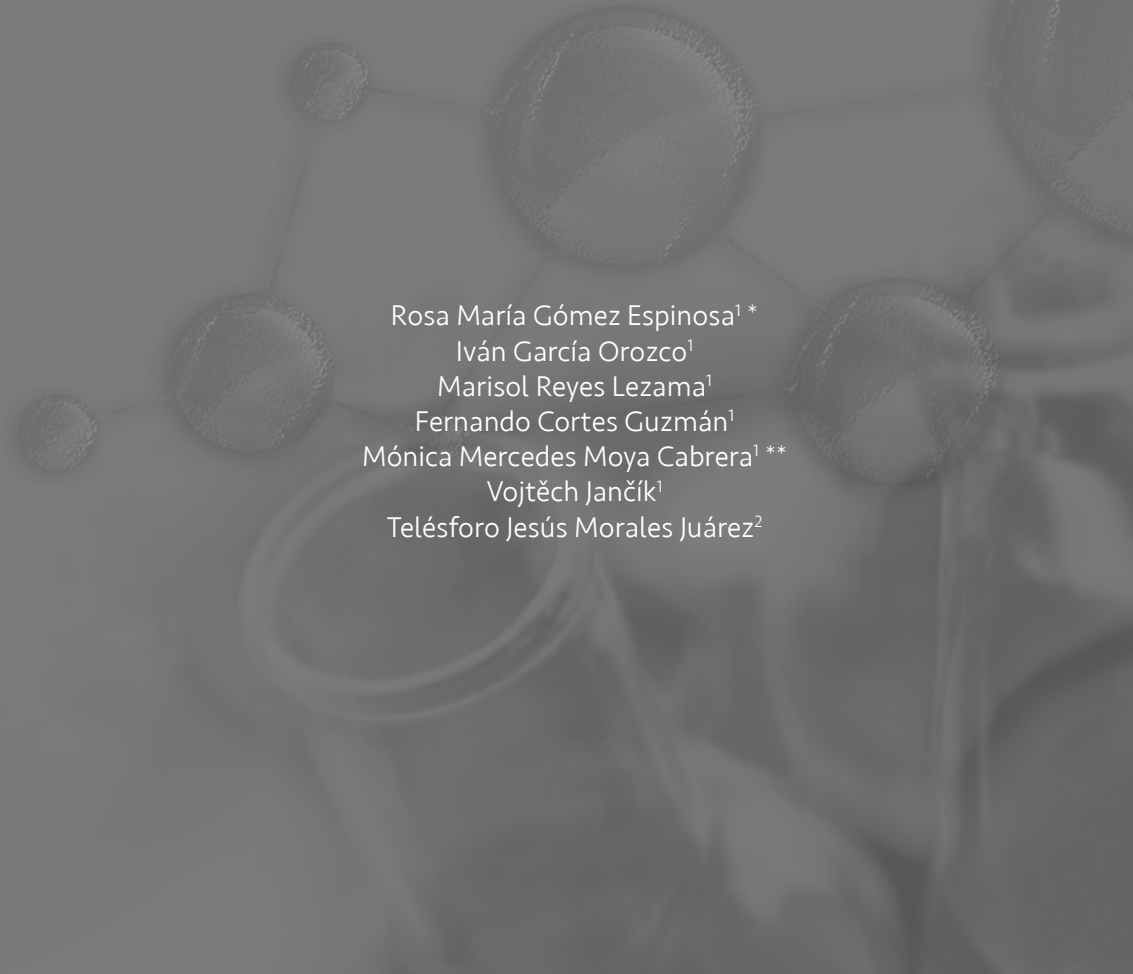
3. Referencias

- Appel, R. y Ruppert, I. (1974). Nonmetallic Imine Compounds. 53. Preparation of Silylated Alkylenebis (Iminophosphoranes) and Their Cyclization with Phosphorus (V) Fluorides. *Z. Anorg. Allg. Chem.* 406: 31-144.
- Bai, G., Roesky, H. W., Li, J., Noltemeyer, M. y Schmidt, H. (2003). Aluminum Dihydroxide with Terminal OH Groups: An Unprecedented Congener of Boronic Acid. *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.* 42: 1132 - 1135.
- Bataille, P., Paterne, M. y Brown, E. (2000). Diastereoselective LiAlH_4 Reduction of Chiral Ketone Hydrazones Derived from (R)-(-)-2-Aminobutan-1-ol. *Tetrahedron: Asymmetry*. 11: 1165 - 1181.
- Bent, B. E., Nuzzo, R. G. y DuBois, L. H. (1989). Surface Organometallic Chemistry in the Chemical Vapor Deposition of Aluminum Films Using Triisobutylaluminum: β -hydride and β -alkyl Elimination Reactions of Surface Alkyl Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 1634 - 1644.
- Cook, C. E. y Twine, C. E. (1968). A Ready Synthetical Route to the Estrogenic 2,4-Dialkylisoflav-3-enes. *Chem. Comm. Londres*: 791 - 792.
- Corey, E. J. Weinshenker, N. M., Schaaf, T. K. y Huber, W. (1969). Stereo-Controlled Synthesis of DL-Prostaglandins F2.alpha and E2. *J. Am. Chem. Soc.* 91: 5675 - 5679.
- Cui, C., Roesky, H. W., Hao, H., Schmidt, H.G. y Noltemeyer, M. (2000). The First Structurally Characterized Metal-SeH Compounds: $[\text{Al}(\text{SeH})_2]$ and $[\text{L}(\text{HSe})\text{AlSeAl}(\text{SeH})\text{L}]$. *Angew. Chem, Intern. Ed. Engl.* 39: 1815-1817.
- Dias, H. V. R., Jin, W. y Ratcliff, R. E. (1995). Aluminum Derivatives of N-Iso-propyl-2-(Isopropylamino) Troponimine. *Inorg. Chem.* 34: 6100-6106.
- Gonzalez-Gallardo, S., Jancik, V., Cea-Olivares, R., Toscano R. A. y Moya-Cabrera M. (2007). Preparation of Molecular Alumoxane Hydrides, Hydroxides, and Hydrogensulfides. *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.* 46: 2895-2898.

- Jancik, V., Peng, Y., Roesky, H. W., Li, J., Neculai, D., Neculai, A. M. y Herbst-Irmer, R. (2003). The First Structurally Characterized Aluminum Compound with Two SH Groups: $[LAl(SH)_2]$ ($L = N(Ar)C(Me)CHC(Me)N(Ar)$, $Ar = 2,6\text{-}i\text{-}Pr_2C_6H_3$) and the Catalytic Properties of the Sulfur $P(NMe_2)_3$ System. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 1452-1453.
- Kuhn, N., Fuchs, S. y Steimann, M. (2000). Vinamidin-Stabilisierte Alane. *Z. Anorg. Allg. Chem.* 626: 1387-1392.
- Peng, Y., Bai, G., Fan, H., Vidovic, D., Roesky, H. W. y Magull, J. (2004). Synthesis and Structural Characterization of A Terminal Hydroxide Containing Alumoxane via Hydrolysis of Aluminum Hydrides. *Inorg. Chem.* 43: 831-836.
- Pertsch, E., Bühlman, P. y Affolter, C. (2000). *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*. Alemania: Springer, 280-303.
- Roesky, H. W. (2004). Hydroalumination Reactions in Organic Chemistry. *Aldrichimica Acta*. 37: 103-108.
- Smith, M. B. y March, J. (2001). *March's Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms and Structure*. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.
- Twamley, B., Hardman, N. J. y Power, P. P. (2001). A Primary Monomeric Alane: $[N,N'\text{-bis}(2,6\text{-diisopropylphenyl})\text{pentane-}2,4\text{-diimino-}to\text{-}N,N']\text{dihidrdoaluminium}$. *Acta Crystallogr.* E57: m227-m228.

Capítulo XVI

Formación y estructura cristalina de dos diferentes compuestos a partir de la sulfonación de trifenilestibina



Rosa María Gómez Espinosa¹ *
Iván García Orozco¹
Marisol Reyes Lezama¹
Fernando Cortes Guzmán¹
Mónica Mercedes Moya Cabrera¹ **
Vojtěch Jančík¹
Telésforo Jesús Morales Juárez²

1. Introducción

Las transformaciones orgánicas catalizadas por metales de transición en medio acuoso han incrementado su importancia debido a la naturaleza y bajo costo que presenta el agua como disolvente, asimismo los complejos de metales de transición solubles en agua pueden ser utilizados como modelos para sistemas biológicos (Lippert, 1999). Se han realizado muchos trabajos relacionados con el desarrollo de ligantes hidrofílicos, los cuales pueden ser capaces de coordinarse con algunos metales de transición, estratégicos para ser utilizados como precursores catalíticos en solución, aplicados a reacciones donde un alqueno es el sustrato. Tal es el caso de las reacciones de hidroformilación (Deshpande *et al.*, 1996); hidrogenación (James, 1973); alquilación (Amatore *et al.*, 1995); sustitución alílica (dos Santos *et al.*, 1998); isomerización (Henry, 1973); y carbonilación (Kiji *et al.*, 1988), etc.

En los últimos años ha sido de considerable interés la catálisis homogénea en fase acuosa con metales de transición (Kuntz, 1987). Los ligantes frecuentemente utilizados para este tipo de reacciones son triarilfosfinas funcionalizadas con grupos hidrosolubles (Kuntz, 1987; Bonaplata *et al.*, 1995; Cornils *et al.*, 1995; XiaoZhong *et al.*, 2003; Kalck y Monteil, 1992). Las triarilfosfinas son buenos donadores σ que estabilizan al complejo metálico. Sin embargo, reportes recientes han mostrado que las estibinas, también funcionan como buenos ligantes en los procesos ya mencionados (Sharma *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 2001; Cabrera *et al.*, 2004). Las fosfinas sulfonadas son eficientes ligantes en la reacción de hidroformilación (Deshpande *et al.*, 1996), los grupos sulfónicos y sus sales proveen

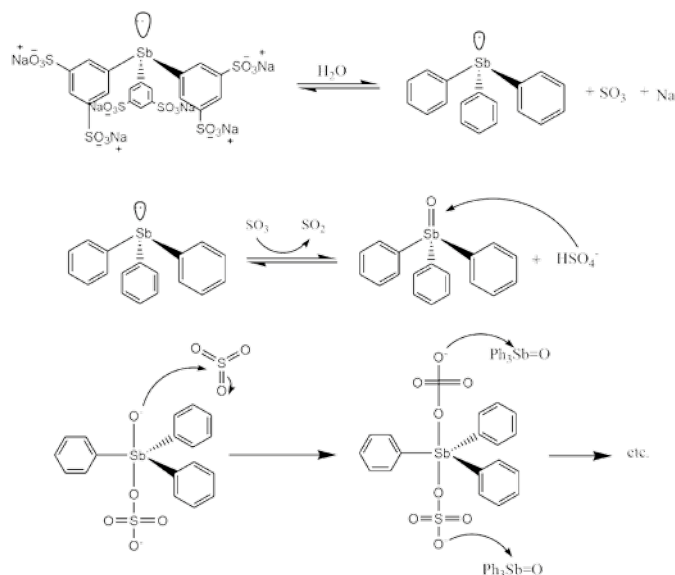
un alto grado de solubilidad en agua y ofrecen ventajas inherentes al proceso.

Dado lo anterior, resultó muy interesante el tratar de sintetizar ligantes sulfonados a base de antimonio, los cuales podrían ser utilizados como ligantes hidrosolubles; además de probar su reactividad en la reacción de amidocarbonilación. En dicha reacción se ha comprobado que los ligantes estibínicos son más selectivos y dan mejores resultados que las fosfinas correspondientes (Gómez *et al.*, 2001; Cabrera *et al.*, 2004).

2. Parte experimental

En un matraz Erlenmeyer de 50 mL se colocó trifenilestibina (1 g) en tetracloruro de carbono (0.5 mL). Se adicionó ácido sulfúrico fumante (33 % de SO_3 libre) (1 mL) controlando la temperatura (menor a 40°C) en agitación constantemente durante 45 minutos. Posteriormente se adicionó agua fría, formando un sólido blanco, que se filtró al vacío. El sólido formado se neutralizó con una solución de NaOH al 50%. Finalmente, se filtró, obteniéndose un sólido blanco, el cual se disolvió en metanol para su posterior recrystalización.

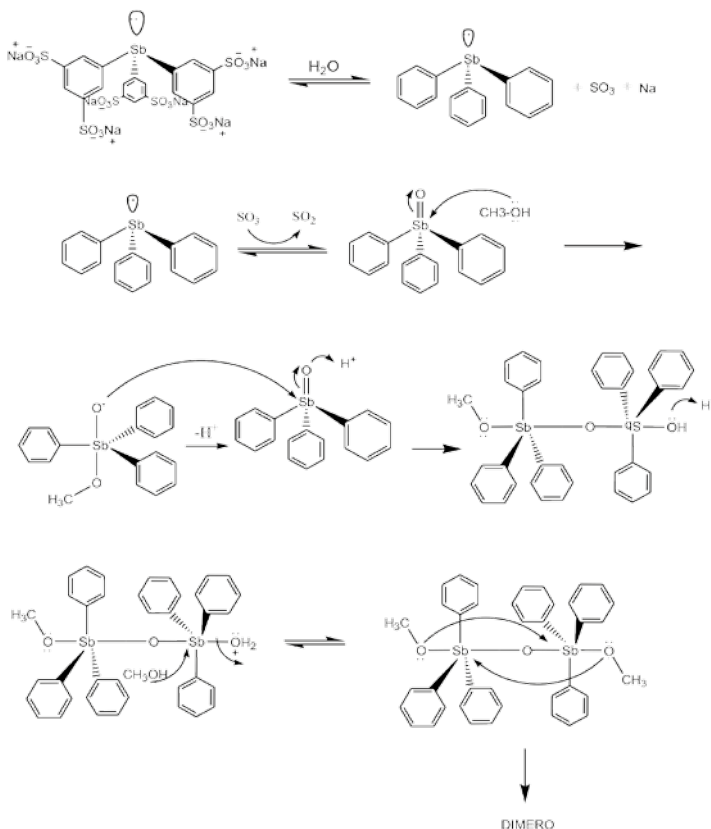
Esquema 1. Propuesta mecanística del polímero de poli[[μ -oxo-bis(trifenilstibina)]- μ -sulfato-O,O'] (1)



3. Resultados

La reacción de trifenilestibina, bajo condiciones de sulfonación (Kuntz, 1987), proporcionó un sólido blanco, el cual se cristalizó de metanol. Este proceso dio dos diferentes productos, los cuales fueron identificados por rayos X: el obtenido al cristalizar a temperatura ambiente presentó una estructura polimérica poli[[μ -oxo-bis-(trifenilstibina)]- μ -sulfato-O,O'] (1) y el otro compuesto, obtenido a baja temperatura fue el dímero bis-[(μ -metoxi)-(μ -oxo)-bis-(trifenilantimonio(V)) (2). Conociendo el carácter oxidante del trióxido de azufre, se propone los siguientes mecanismos de reacción para la formación de las estructuras 1 y 2 (esquemas 1 y 2).

Esquema 2. Propuesta mecanística del dímero de bis[(μ -metoxi)-(μ -oxo)-bis-(trifenilantimonio(V)) (2)



4. Estudios de difracción de rayos X

Los compuestos 1 y 2 se obtuvieron como cristales incoloros que se montaron en una fibra de vidrio y fueron analizados a temperatura ambiente en un Difractómetro Siemens P4/PC equipado con radiación de Mo ($K\alpha = 0.7107 \text{ \AA}$) o Cu ($K\alpha = 1.5418 \text{ \AA}$). El decaimiento se consideró insignificante en ambas muestras. Los datos más importantes de los análisis se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Datos cristalinos y detalles de refinación de los compuestos 1 y 2

	Compuesto 2	Compuesto 1
Formula	C41 H46 O5 Sb2	C36 H31 O5.5 S Sb2
FW	862.28	827.17
Sistema Cristalino	Ortorrómbico	Monoclínico
Grupo espacial	P n m a	P 21/c
Temp, K	293	298
λ , $\text{\AA}$	0.71073	1.54178
a , $\text{\AA}$	10.972(1)	12.251(2)
b , $\text{\AA}$	20.919(3)	14.849(1)
c , $\text{\AA}$	16.637(2)	18.140(1)
α , grados	90.0	90
β , grados	90.0	101.88
γ , grados	90.0	90
V , $\text{\AA}^3$	3818.58	3229.26
Z	4	4
$F(000)$	1698	1636
Tamaño del cristal, mm^3	0.006	0.008
Rango de índices	$-9 < h < 9$	$-8 < h < 8$
	$-9 < k < 9$	$-11 < k < 11$
	$-10 < l < 10$	$-15 < l < 15$
No. reflns colectadas	4506	4542
No. reflns independientes (R_{int})	4506	4306

Continúa...

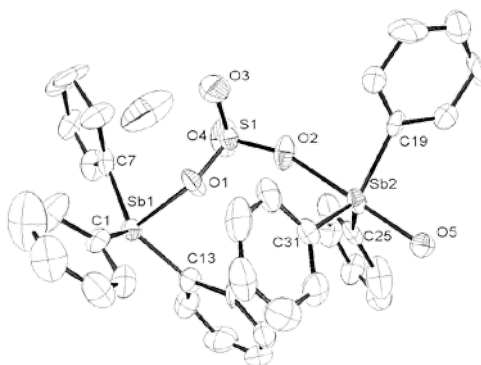
	Compuesto 2	Compuesto 1
No. datos / restricciones / parámetros	4506 / 0 / 225	4306 / 0 / 407
GoF on F^2	1.012	1.202

Las estructuras fueron resueltas por métodos directos. La refinación de la estructura anisotrópica fue llevada a cabo por técnicas matriciales de mínimos cuadrados para todos los átomos diferentes a hidrógeno. La solución de las estructuras y la refinación de las mismas se realizaron con el programa SHELXTL versión 6.10. La descripción de cada una de las estructuras se desarrollara a continuación de forma independiente.

4.1. Estructura cristalina del compuesto poli[[μ -oxo-bis(trifenilestibina)]- μ -sulfato-O,O'] (1)

La estructura del compuesto 1 se estableció completamente por los análisis de Difracción de rayos-X de monocristales obtenidos de la evaporación lenta de una solución metanólica del compuesto a temperatura baja (-20°C). La vista ORTEP del compuesto 1 se representa en la figura 1. Distancias y ángulos de enlace seleccionados se resumen en las tablas 2, 3 y 4.

Figura 1. Vista ORTEP de la estructura monomérica del polímero lineal 1. Los átomos de hidrógeno fueron omitidos para mayor claridad



La unidad básica del polímero es la estructura representada en la figura 1. En dicha estructura dos átomos pentacoordinados de antimonio están puenteados por una unidad sulfato y se enlazan a otra unidad monomérica a través de un puente oxo. El átomo de antimonio con un core SbC_3O_2 está ligeramente distorsionado de una geometría bipirámide trigonal. Los átomos de carbono aromáticos están localizados en las posiciones ecuatoriales de dicha geometría, mientras que los átomos de oxígeno están en las posiciones apicales. Las distancias de enlace Sb-C están en el rango de 2.08 a 2.14 Å. Los enlaces Sb-O son diferentes entre ellos. El valor del enlace Sb-O-Sb se encuentra alrededor de 1.95 a 1.99 Å, similar al enlace Sb-O de una estructura Sb_2O_3 (1.977 Å) reportada (Svensson, 1975). El enlace Sb-O-S es aproximadamente de 2.20 Å y es ligeramente más largo que el enlace Sb-O-Sb. Los ángulos de enlace C-Sb-C tienen valores de 131.1, 115.5 y 112.5° alrededor del átomo Sb1, mientras que para el átomo Sb2, dichos ángulos son de 123.3, 117.5 y 117.7°. Es importante resaltar que el ángulo C-Sb-C de mayor valor es aquel localizado del mismo lado del fragmento SO_4 . Los ángulos de enlace (Sb)O-Sb-O(S) tienen valores de 176.3 y 178.1° correspondientes a los centros Sb1 y Sb2, respectivamente. El ángulo de enlace O-Sb-O presenta una ligera distorsión de la geometría ideal de bipirámide trigonal, pero puede considerarse muy cercano a la linealidad. La geometría del fragmento SO_4 es muy cercana a la tetraédrica, por el valor de los ángulos alrededor del átomo de azufre. Las longitudes de enlace S-O tienen valores que están entre 1.44 - 1.51 Å, los cuales son más largos que los que presenta el antimonio (Sb1-O1 y Sb2-O2).

Tabla 2. Distancias (Å) y ángulos (°) de enlaces seleccionados de la estructura cristalina del compuesto 1

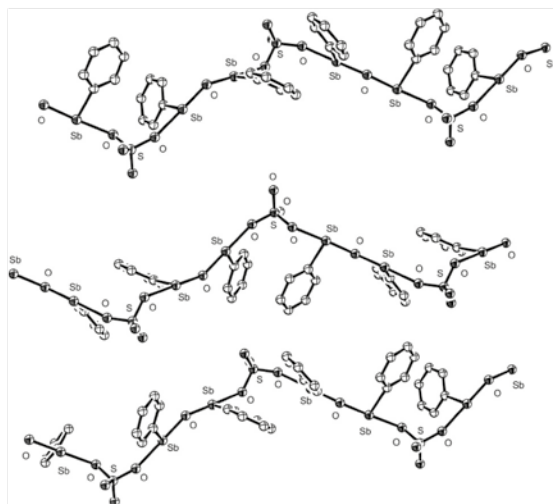
Enlace	Å	Ángulo	°	Ángulo	°
Sb1 O5	1.995(19)	O5 Sb1 C13	90.4(11)	C19 Sb2 C31	117.7(13)
Sb1 C13	2.08(3)	O5 Sb1 C7	90.9(10)	O5 Sb2 O2	178.1(9)
Sb1 C7	2.09(4)	C13 Sb1 C7	131.1(12)	C25 Sb2 O2	87.0(10)
Sb1 C1	2.14(3)	O5 Sb1 C1	99.4(10)	C19 Sb2 O2	84.9(10)
Sb1 O1	2.20(2)	C13 Sb1 C1	115.5(12)	C31 Sb2 O2	85.9(10)
Sb2 O5	1.95(2)	C7 Sb1 C1	112.5(12)	O4 S1 O3	115.2(17)

Continúa...

Enlace	Å	Ángulo	°	Ángulo	°
Sb2 C25	2.10(3)	O5 Sb1 O1	176.3(9)	O4 S1 O2	109.5(14)
Sb2 C19	2.11(3)	C13 Sb1 O1	86.6(11)	O3 S1 O2	108.7(14)
Sb2 C31	2.12(3)	C7 Sb1 O1	89.5(10)	O4 S1 O1	109.3(14)
Sb2 O2	2.22(2)	C1 Sb1 O1	83.8(10)	O3 S1 O1	106.9(16)
S1 O4	1.44(2)	O5 Sb2 C25	91.1(11)	O2 S1 O1	107.0(14)
S1 O3	1.45(3)	O5 Sb2 C19	95.6(10)	S1 O1 Sb1	133.2(13)
S1 O2	1.48(2)	C25 Sb2 C19	117.5(13)	S1 O2 Sb2	160.7(16)
S1 O1	1.51(2)	O5 Sb2 C31	95.5(11)	Sb2 O5 Sb1	144.3(12)
O5 Sb1	1.995(19)	C25 Sb2 C31	123.3(11)		

La estructura polimérica tiene una conformación zigzag que se evidencia por el análisis de los ángulos de enlaces S-O-Sb, los cuales tienen diferentes valores. El ángulo de enlace S1-O2-Sb2 presenta un carácter muy cercano a la geometría lineal (160.7°) mientras que el ángulo S1-O1-Sb1 tiene un valor más cercano a una geometría tetraédrica (133.2°), además de ser similar al valor del ángulo Sb2-O5-Sb1 (144.3°). Los átomos O1, Sb1, O5, Sb2 y O2 se encuentran entre planos que se intersectan en el centro O5. Los planos de este fragmento tienen un ángulo de torsión de 85.5° a lo largo de la cadena polimérica. Los grupos fenilos que contienen los átomos de carbono C13 y C25 presentan un empaquetamiento π entre ellos, propuesto a partir de las distancias presentadas entre los centroides de cada grupo fenilo (3.92 Å). El arreglo angular del plano que incluye los átomos O1-Sb1-O5-Sb2-O2 puede deberse a la simetría tetraédrica del fragmento SO₄ y al empaquetamiento π de los anillos aromáticos (figura 2). La estructura de la cadena polimérica tiene un arreglo periódico a través de toda la celda cristalina.

Figura 2. Vista de la cadena principal del polímero. Para mayor claridad, solo se muestran los grupos fenilos que presentan empaquetamiento- π

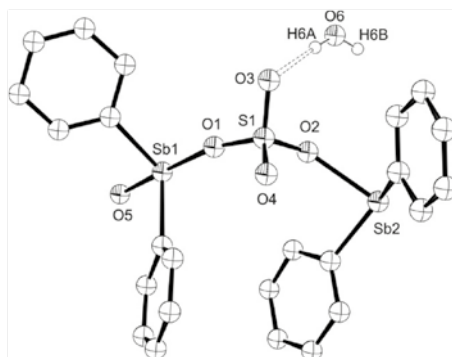


En la estructura cristalina se observa una molécula de agua de cristalización por cada unidad monomérica. Dicha molécula de agua presenta puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno O3 (tabla 4 y figura 3).

Tabla 3. Distancias (Å) y ángulos (°) de enlace del puente de H con moléculas de agua, en la estructura cristalina del compuesto 1

	O...H	H-O	O...O	OHO ángulo
O6 H6A O3	0.86	2.00	2.85(9)	177.1

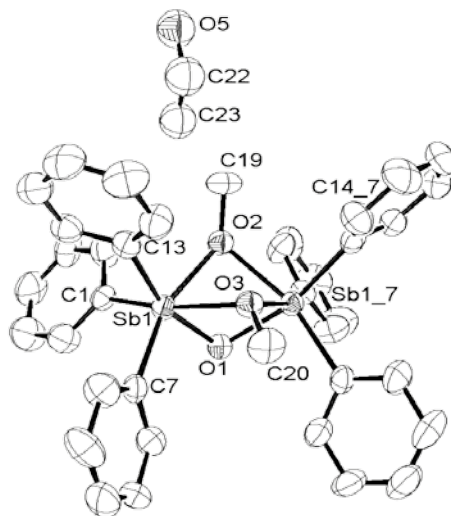
Figura 3. Puente de hidrógeno presente en el compuesto 1



4.2. Estructura cristalina del compuesto bis[(μ -metoxi)-(μ -oxo)-bis-(trifenilantimonio(V))] (2)

De manera similar al compuesto 1, la estructura del compuesto 2 fue establecida completamente por análisis de difracción de rayos-X de monocristal. Monocristales adecuados para difracción se obtuvieron a partir de la evaporación lenta de una solución etanólica de dicho compuesto a baja temperatura. La estructura del complejo, representada en su vista ORTEP, se muestra en la figura 4. Distancias y ángulos de enlace representativos se resumen en la tabla 4.

Figura 4. Representación ORTEP del compuesto 2. Los átomos de hidrógeno no están representados, para mayor claridad



Los análisis de Difracción de rayos-X del compuesto 2 muestran una estructura molecular con dos átomos de antimonio, cada uno de ellos hexacoordinado a tres átomos de carbono de anillos aromáticos que ocupan posiciones terminales y a tres átomos de oxígeno conformados por un puente oxo y dos puentes metoxilo entre ambos núcleos de antimonio. La distancia de enlace Sb-C tienen valores alrededor de 2.14 Å. Las distancias de enlace O-Sb son diferentes: aquellas que tienen al puente metoxilo tienen valores de 2.20 Å aproximadamente, mientras que la distancia O-Sb del puente oxo es ligeramente más corta que la primera (1.98 Å) y su valor es similar a la observada en la estructuras del tipo Sb_2O_3 (1.977

Å) (Svensson, 1974). El átomo de antimonio muestra una geometría octaédrica distorsionada principalmente por los ángulos de enlace O-Sb-O que contienen los puentes oxo y metoxi. De forma similar a lo descrito, los ángulos de enlace C-Sb-C presentan diferencias, dependiendo de su conformación: aquellos que están del mismo lado de los puentes metoxilo (99.20 y 99.08°) son ligeramente más cortos que el que se encuentra del mismo lado que el puente oxo (102.46°). El valores de los ángulos de enlace Sb-O-Sb que incluye a los puentes metoxilo son menores (88.9 y 89.9°) en comparación al que contiene el puente oxo (102.4°).

Tabla 4. Distancias (Å) y ángulos de enlace (°) representativos del compuesto 2

Enlace	Å	Ángulo	°	Ángulo	°
Sb1 O1	1.988(4)	O1 Sb1 C1	93.2(3)	C1 Sb1 C7	102.1(3)
Sb1 C1	2.137(8)	O1 Sb1 C7	93.2(3)	C1 Sb1 C13	99.2(3)
Sb1 C7	2.149(7)	O1 Sb1 C13	160.3(3)	C7 Sb1 C13	99.1(3)
Sb1 C13	2.155(9)	C1 Sb1 O2	92.4(3)	O1 Sb1 O2	72.2(3)
Sb1 O2	2.192(5)	C13 Sb1 O2	92.0(3)	O1 Sb1 O3	75.0(2)
Sb1 O3	2.213(6)	C7 Sb1 O2	160.1(2)	O2 Sb1 O3	69.6(2)
Sb1 Sb1'	3.0978(10)	C1 Sb1 O3	160.6(3)	Sb1 O1 Sb1	102.4(3)
		C7 Sb1 O3	93.9(3)	Sb1 O2 Sb1	89.9(3)
		C13 Sb1 O3	88.8(3)	Sb1 O3 Sb1	88.9(3)

Por otro lado, es importante resaltar que el ángulo de enlace O-Sb-O que incluyen el puentes metoxilo (69.60°) es más corto que aquellos que incluyen al puente oxo (72.17 y 74.98°). La alta densidad electrónica que presenta el puente oxo puede ser la causa de la apertura del ángulo de enlace C1-Sb1-C7 y el cierre del ángulo O2-Sb1-O3. Este hecho puede confirmarse por la presencia de un puente de hidrógeno con una molécula de etanol presente en la celda cristalina (tabla 5).

Tabla 5. Distancias (Å) y ángulos de enlace (°) de los puentes de hidrógeno del compuesto 2

	O...H	H-O	O...O	Angulo OHO
O4 H4A O5	0.85	1.88	2.73(3)	175.4
O5 H5A O1	0.85	1.88	2.734(15)	179.4

El puente de hidrógeno que forma el puente oxo hace que dicho átomo de oxígeno presente ángulos de enlace H-O-Sb (125.5°) y O-Sb-O (102.4°) más cercanos a una geometría trigonal que a una tetraédrica, lo que hace suponer una hibridación sp^2 para dicho átomo de oxígeno y con ello un orbital p puro que forma una interacción $p_\pi-d_\pi$ en ambos enlaces O-Sb. Por otro lado, los puentes metoxilo presentan ángulos de enlace alrededor del átomo de oxígeno de 123.1° , para los ángulos Sb-O-C y para el ángulo Sb-O-Sb un valor cercano a 90° . Esto nos lleva a proponer un carácter más tetraédrico y con ello una hibridación sp^3 para el átomo de oxígeno puente, que presenta un par de electrones de no-enlace.

El arreglo cristalino del compuesto 2 presenta moléculas de agua de cristalización. Se pueden distinguir dos tipos diferentes de moléculas de agua, en relación al grado de distorsión que muestran. En la molécula de agua mas distorsionada no se observó interacción alguna con la molécula del compuesto 2, mientras que para la otra molécula de agua pueden identificarse tres interacciones: un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del puente oxo y al mismo tiempo dos interacciones de tipo CH- π entre el grupo CH_2 del etanol con la nube π del grupo fenilo unido a un átomo de antimonio. La distancia entre el centroide del anillo fenilo y el átomo de H es de $2.857 \text{ \AA}$, que se encuentra dentro de las distancias observadas para este tipo de interacciones (Desiraju, 2002). Así también, las distancias entre los átomos de carbono del fenilo con el átomo de hidrógeno del CH_2 presentan una distancia promedio de $3.17 \text{ \AA}$ con una desviación estándar de $0.08 \text{ \AA}$, lo que indica que el átomo de hidrógeno se encuentra aproximadamente al centro del anillo aromático. Este mismo comportamiento se observa entre el otro átomo de hidrógeno del mismo grupo CH_2 con el otro anillo aromático. Con ello puede llegar a suponerse cierto grado de reconocimiento de la molécula de etanol (por el fragmento $-CH_2OH$) en el fragmento $PhSbOSbPh$.

5. Conclusiones

Se obtienen dos estructuras cristalinas diferentes al tratar de cristalizar el compuesto sulfonado de la trifenilestibina por dos diferentes métodos, uno a temperatura ambiente (compuesto 1), siendo este un polímero con estructura en zigzag, donde este tipo de enlace O-Sb-O no es muy poco común, lo cual hace relevante la obtención de este polímero de antimonio. La otra estructura cristalina obtenida a baja temperatura

fue un dímero de la trifenilestibina, donde se observa en la estructura cristalina disolvente de cristalización (metanol) con puentes entre las dos moléculas de trifenilestibina.

6. Referencias

- Amatore, C., Blart, E., Genet, J.P., Jutand, A., Lemaire-Audoire, S. y Savignac, M. (1995). New Synthetic Applications of Water-Soluble Acetate Pd/TPPTS Catalyst Generated in situ. Evidence for A True Pd (O) Species Intermediate. *J. Org. Chem.* 60 (21): 6829-6839.
- Bonaplata, E., Dinq, H., Hanson, B. E. y McGrath, J. E. (1995). Hydroformylation of Octene-1 with A Poly (Arylene Ether Triarylphosphine) Rhodium Complex. *Polymer.* 36 (15): 3035-3039.
- Cabrera, A., Sharma, P., Arias, J. L., Pérez-Flores, J., Velasco, L. y Gómez, R. M. (2004). Amidocarbonylation of Alkenes at Very Low Pressures with a Co₂(CO)₈/SbR₃ System: Two Easy Routes to Reach N-acetyl-a. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 212 (1): 19-23.
- Cornils, B. y Kuntz, E. G. (1995). Introducing TPPTS and Related Ligands for Industrial Biphasic Process. *J. Organomet. Chem.* 502 (1): 177-186.
- Deshpande, R. M., Purwanto, Delma, H. y Chaudhari, F. V. (1996). Kinetics of Hydroformylation of 1-Octene Using [Rh (COD)Cl]₂-TPPTS Complex Catalyst in A Two-Phase System in the Presence of a Co-solvent. *Ind. Eng. Chem. Res.* 35 (11): 3927-3938.
- Desiraju, G. R. (2002). Hydrogen Bridges in Crystal Engineering: Interactions without Borders. *Acc. Chem. Res.* 35: 565-573.
- Dos Santos, S., Tong, Y., Quignard, F., Choplin, A., Sinou, D. y Dutasta, J. P. (1998). Supported Aqueous-Phase Palladium Catalysts for the Reaction of Allylic Substitution: Toward on Understanding of the Catalytic System. *Organometallics.* 17 (1): 78-89.
- Gómez, R. M., Sharma, P., Arias, J. L., Pérez-Flores, J., Velasco, L. y Cabrera, A. (2001). Amidocarbonylation of Cyclohexene and 1-Pentene with Co₂ (CO) Modified with Triarylstibines in Very Mild Conditions. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 170 (1): 271-274.
- Henry, P. M. (1973). Palladium (II)-Catalyzed Exchange and Isomerization Reactions. *Acc. Chem. Res.* 6 (1): 16-24.

- James, B., (1973). *Homogeneous hydrogenation*. Estados Unidos: J. Wiley & Son.
- Kalck, P., and Monteil, F. (1992). Use of Water-Soluble Ligands in Homogeneous Catalysis. *Adv. Organomet. Chem.* 34: 219-278.
- Kiji, J., Okano, T., Nishiumi, W. y Konoshi, H. (1988). Palladium-Catalyzed, Atmospheric Pressure Carbonylation of Allylic Chlorides in Two-Phase Aqueous Sodium Hydroxide-Organic Solvent Media. *Chem. Lett.* 63 (6): 957-960.
- Kuntz, E. G. (1987). Homogeneous catalysis in water. *Chemtech.* 17: 570-575.
- Lippert, B. (1999). Impact of Cisplatin on the Recent Development of Pt Coordination Chemistry: A Case Study. *Coord. Chem. Rev.* 182 (1): 263-265.
- Sharma, P., Cabrera, A., Arias, J.L., Le Lagadec, R., Manzo, R.L. y Sharma, M. (1998). Crystal Structures of Trio(o-tolyl)stibine in Two Crystal Forms. *Main Group Metal Chem.* 21 (6): 303-308.
- Svensson, C. (1974). The Crystal Structure of Orthorhombic Antimony Trioxide, Sb₂O₃. *Acta Cryst.* B30: 458-461.
- Svensson, C. 1975. Refinement of the crystal structure of cubic antimony trioxide, Sb₂O₃. *Acta Cryst.* B31, 2016-2018.
- XiaoZhong, L., Fanzhi, K., Xiaolai, Z. y Zilin, J. (2003). Polyether Triarylphosphine Oxides for Hydroformylation of Oleyl Alcohol in Micellar Catalysis. *Catal Comm.* 4 (3): 129-133.

Capítulo XVII

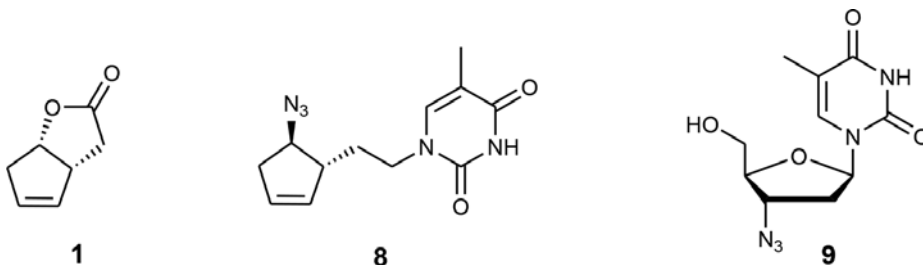
Síntesis de un análogo de AZT, un compuesto anti-HIV

Davir González Calderón¹
Carlos Augusto González González¹
Aydeé Fuentes Benítes¹
Erick Cuevas Yañez²
David Corona Becerril²
Carlos González Romero^{1 *}

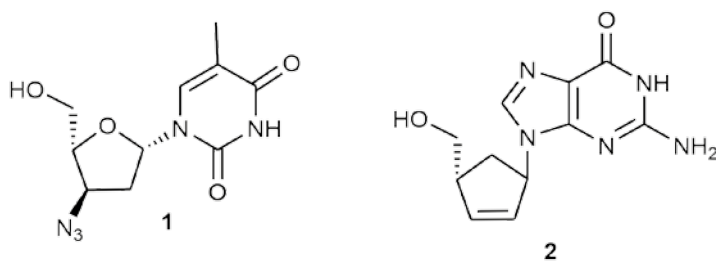
1. Introducción

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es un problema grave de salud pública que aqueja a más de 35 millones de personas en el mundo, y dadas las propiedades de los virus de poder mutar, hace que los fármacos usados para el combate contra el VIH pierdan su efectividad con el tiempo. Es el caso del fármaco, conocido como azidovudina o AZT (1) y el carbovir (2) cuyos efectos laterales empiezan a predominar sobre los beneficios (De Clercq, 2009). Ante esta situación se hace necesario contar con nuevos compuestos con actividad antiviral. Para eso se diseñó la síntesis de un compuesto análogo que cumpliera con los requisitos mínimos necesario que marca la relación estructura actividad, partiendo de la lactona 3 y a través de una síntesis de siete pasos se obtuvo el producto 9.

Figura 1. Fórmulas estructurales del derivado carbocíclico 8 de la azidovudina 9 sintetizado a partir de la lactona de Corey 1



Los análogos de nucleósidos del tipo carbocíclico, son conocidos como C-Nucleósidos, en este tipo de compuestos, se reemplaza el átomo de oxígeno en la molécula del tetrahidrofurano, por un grupo metileno (Bondeiteich, 1987). Esta modificación estructural ha mostrado un rango amplio de actividad biológica y ha atraído la atención como una alternativa para el diseño de agentes antitumorales y antivirales, debido a las ventajas potenciales en el uso terapéutico de este tipo de compuestos, ya que poseen una mayor estabilidad metabólica y en algunos casos se ha reportado un incremento en la actividad biológica en comparación con los nucleósidos normales (Ferrero y Gotor, 2000; Pathack, 2002).



2. Materiales y métodos

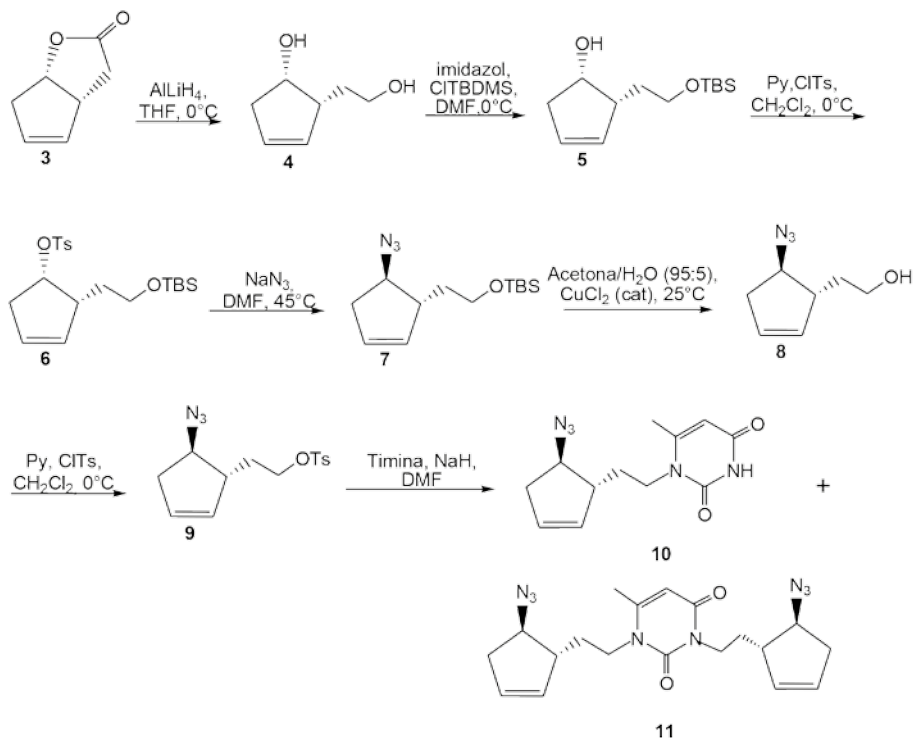
Para llevar a cabo exitosamente esta síntesis, se emplearon compuestos grado reactivo provenientes de la compañía Aldrich Co., los disolventes se secaron bajo técnicas convencionales (Chai, 2009). Se utilizó nitrógeno para crear atmósfera inerte en las reacciones que así lo requirieron. La identificación inequívoca de los compuestos se llevó a cabo por métodos espectroscópicos tales como infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de hidrógeno RMN ^1H a 300 MHz y 500 MHz) y de carbono (RMN ^{13}C a 75.4 MHz y 125 MHz), análisis bidimensional como COSY o Correlated Spectroscopy (Espectroscopía de correlación ^1H - ^1H) y HETCOR o Heteronuclear Correlation (Correlación Heteronuclear ^1H - ^{13}C), experimentos especiales de ^{13}C como APT o Attached Proton Test (Experimento de unión a hidrógeno), DEPT o Experimento de transferencia de polarización desacoplada, NOE o Efecto Nuclear de Overhauser, espectrometría de masas (EM) de baja y alta resolución. El material de vidrio se secó a 120°C por 2 h previo a su uso.

3. Resultados y discusión

El compuesto 10 análogo del nucleósido 9 fue sintetizado a partir de un derivado de la lactona de Corey 3 a través de una serie de pasos involucrando reacciones de reducción, protección de grupos funcionales, reacción de tosilación, y sustitución nucleofílica (esquema 1).

Dicha síntesis fue ideada y estructurada de acuerdo a la relación existente entre las estructuras químicas de otros antivirales con eficaz acción farmacológica. El trabajo se inició con la purificación de la materia prima 3, ya que el análisis de cromatografía en capa fina (ccf) mostró un producto mayoritario acompañado de tres impurezas. El método de purificación elegido fue el de cromatografía en columna, recobrándose 80% del material inicial. El espectro de radiación infrarrojo (IR), mostró la presencia del carbonilo de la lactona en 1765 cm^{-1} , confirmado por la vibración del enlace C–O en 1170 cm^{-1} , por otro lado la olefina se presenta como una banda de poca absorción en 1610 cm^{-1} .

Esquema 1: Síntesis del derivado del AZT 10



El análisis del espectro de RMN- ^1H mostró la presencia de dos señales múltiples en la zona de las olefinas (5.89-5.77 y 5.61-5.57 ppm) integrando cada una para un hidrógeno y que corresponde al doble enlace del ciclo, enseguida se aprecia en 5.13 ppm al hidrógeno del metino, base del oxígeno de la lactona como un doble de triple con constantes de acoplamiento (J) de 5.4 y 0.6 Hz, producto del acoplamiento con el metileno (H-5) y el hidrógeno del metino de H-2. A campo más alto se ve una señal múltiple (3.56-3.49 ppm) que corresponde al hidrógeno del metino 2^a; en tanto que el metileno alfa al carbonilo se observa como dos señales dobles centradas en 2.79 y 2.40 ppm integrando cada una para un hidrógeno y con una $J = 9.2$ Hz. Finalmente se aprecia una señal múltiple de 2.72 a 2.67 ppm que integra para dos hidrógenos y que se asignaron al metileno H-5.

Por otro lado, el análisis del espectro de RMN- ^{13}C , muestra siete señales que corresponden a otros tantos carbonos y que fueron asignados de la siguiente manera: en 176.7 ppm se aprecia el carbonilo de la lactona, 131.3 ppm, el carbono olefínico C-4, en tanto que C-3 se ve en 129.5 ppm. El carbono, base del oxígeno, se observa en 83.0 ppm además se puede inferir que el carbono 2a, al estar fuertemente impedido, se desplaza hasta 45.5 ppm. En tanto que el metileno de la posición dos se aprecia en la posición normal de 39.4 ppm. Finalmente el metileno C-5 se encuentra en 33.2 ppm.

Este análisis, demuestra con precisión la estructura del derivado de la Lactona de Corey, materia prima para esta síntesis.

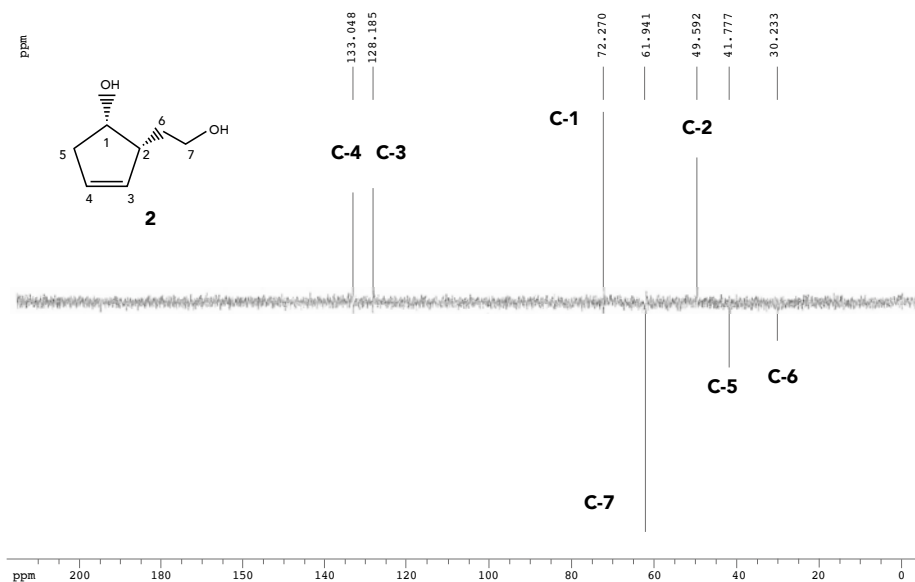
De acuerdo con la síntesis propuesta para la obtención del diol 4, es decir, la apertura de la lactona, se eligió la alternativa del uso de hidruro de litio y aluminio en solución de THF anhidro, bajo ambiente de nitrógeno a 0°C, ya que es conocido que estas condiciones no afectan al doble enlace presente (Carey y Sundberg, 2007). Esta metodología proporcionó un aceite amarillo transparente en 63% de rendimiento y, de acuerdo a los análisis efectuados, corresponde al diol deseado 4.

El espectro de infrarrojo muestra la desaparición de la banda del carbonilo en 1765 cm^{-1} y en cambio se observa una banda ancha correspondiente al grupo hidroxilo en 3440 cm^{-1} confirmándose con la aparición de dos bandas en 1255 y 1088 cm^{-1} .

En lo que respecta al análisis del espectro de RMN- ^1H se observa que los hidrógenos vinílicos permanecen sin cambio. Por otro lado, el hidrógeno del carbono, base del alcohol secundario (H-1), se ha desplazado a campo alto, apareciendo ahora en 4.48 ppm como un triple dobleteado por la interacción de los hidrógenos del metileno 5 y los del metino 1. Los hidrógenos del metileno 7 aparecen ahora como dos señales múltiples de 3.87 a 3.80 y en 3.71 a 3.66 ppm debido a su vecindad con el alcohol primario y dos centros quirales.

En el espectro de RMN- ^{13}C se aprecia la desaparición del carbono carbonílico C-1, desplazándose aproximadamente 10 ppm hacia campo alto (72.3 ppm); en tanto que los carbonos vinílicos se mantienen alrededor de la misma posición. Por otro lado el metileno C-7, al ser base de un alcohol primario se desplaza hasta 61.9 ppm. En lo que respecta a las tres señales restantes, se empleó una técnica de RMN- ^{13}C para poder diferenciar entre los carbonos secundarios (CH_2) y terciarios (CH) de la estructura conocida por las siglas APT (Attached Proton Test) (figura 2), en el que definitivamente se ve que C-2 se encuentra en 49.6 ppm, en tanto que en 41.8 se observa C-5 y finalmente C-6 está en 38.2 ppm.

Figura 2. Experimento APT del diol 2



Finalmente, el espectro de masas confirmó la estructura de la molécula en análisis ya que mostró el ion molecular en 128 u.m.a. el cual corresponde al peso molecular.

El producto presentó actividad óptica con una rotación relativa de -14.21° .

Una vez completamente identificado y caracterizado el diol 4, se procedió a la protección selectiva del alcohol primario.

En la literatura se describen infinidad de grupos protectores para alcoholes, entre los que destacan los sililos, el THP (tetrahidropirano), el MOM (metoximetilo), el MEM (2-metoxietoximetilo), bencilo, etc. eligiéndose como alternativa la protección del alcohol con un grupo sililo. Ahora bien, de este grupo aún hay más alternativas para proteger al grupo hidroxilo, entre las que destacan el *ter*-butildimetilsililo (TBDMS o TBS), el trimetilsililo (TMS), el tri-isopropilsililo (TIPS), entre otros más sofisticados. De los tres primeros, es conocido que el más versátil es el *ter*-butildimetilsililo, por lo que se optó por usar este reactivo, empleando las condiciones descritas por Corey (Corey y Venkateswarlu, 1972; Green y Wuts, 2006), es decir, 1.2 equivalentes de ClTBS, 2.5 equivalentes de imidazol por un equivalente del alcohol materia prima a 0°C en solución de dimetilformamida o DMF (2.0 mL/g del diol). Ahora bien, bajo estas condiciones, se esperaba que sólo se protegiera selectivamente el alcohol primario sobre el secundario, sin embargo se observó que pese a la baja temperatura, se iba formando el producto deseado más otro producto (Factor de retención o $R_F = 0.81$ Hexano-Acetato de Etilo 95:5) menos polar que, presumiblemente, es el compuesto doblemente protegido en el hidroxilo primario y secundario (según se mostró en el espectro de infrarrojo, desapareciendo la banda en 3440 cm^{-1}) quedando materia prima sin reaccionar. Ante este hecho, se optó por detener la reacción, obteniéndose 50% del diol monoprotegido 5 deseado y recuperando 32% de materia prima 4.

El análisis exhaustivo del espectro de IR, mostró una banda ancha (aunque no tanto como en el caso del diol) en 3440 cm^{-1} , atribuidas al grupo OH; además se ven las bandas fuertes de C–Si en 1255 y 1089 cm^{-1} .

Por otro lado, el espectro de masas mostró un fragmento en 243 ($M^+ + 1$) y el ion molecular en 242 M^+ , el cual corresponde al peso molecular del producto deseado.

El espectro de RMN- ^1H , mostró gran complejidad para la asignación de los hidrógenos, debido a la presencia de dos centros estereogénicos, por lo que se recurrió a los análisis bidimensionales de RMN-COSY y HETCOR.

El experimento de COSY (correlación espectroscópica ^1H - ^1H) fue de gran ayuda ya que permitió establecer la conectividad existente entre los átomos de hidrógeno presentes en esta molécula.

El análisis muestra, por ejemplo que partiendo de la señal múltiple que aparece de 4.47 a 4.42 que integra para un hidrógeno, atribuida a la base del alcohol debido a la influencia del grupo OH y que es conocido que se desplazan hasta esa región, tiene conectividad con el hidrógeno del grupo hidroxilo, con H-5a (véase que con H-5b no hay interacción porque ambos están *anti* y su ángulo diedro está a 90°) y con H-2.

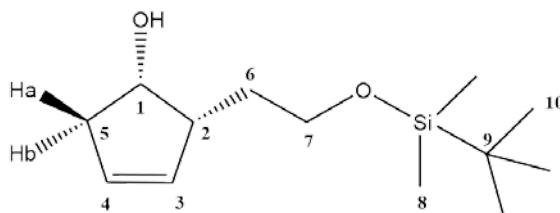
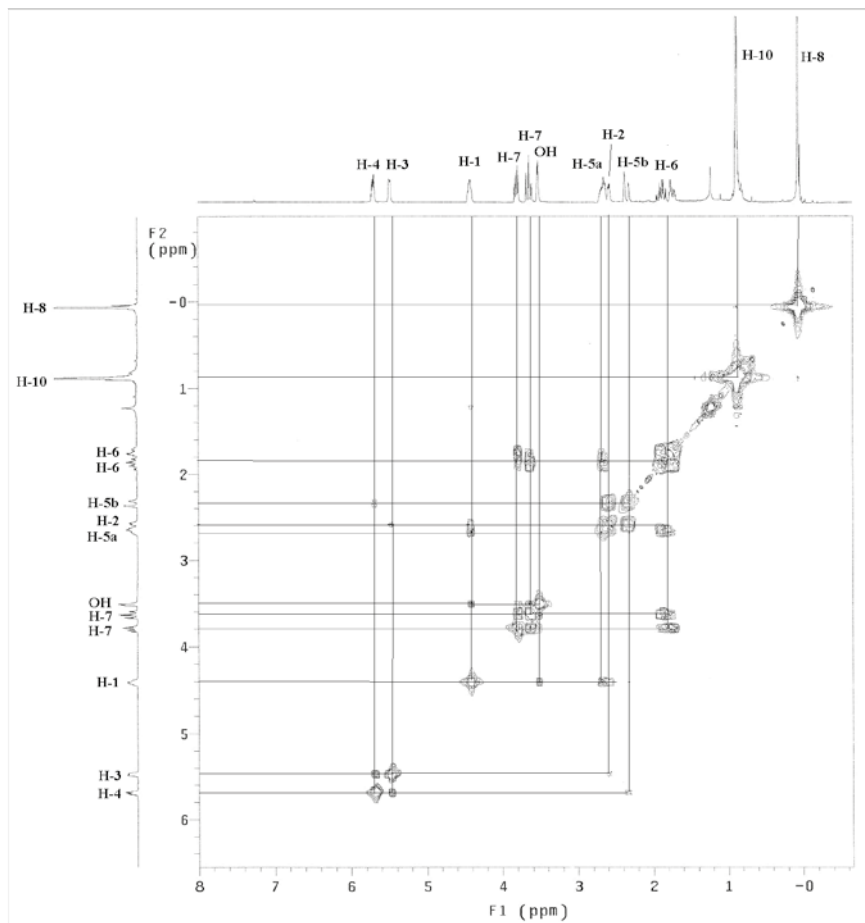
Por otro lado H-2 muestra también conectividad con H-3, H-1 y H-6.

Por otro lado H-3, está conectado con H-2 y H-4; enseguida se aprecia que H-4 tiene interacción con H-3 y H-5b, esto significa que no hay lugar a dudas sobre el desplazamiento de ambos hidrógenos.

Para H-6 se observa que tiene conexión con H-7 y H-2. Finalmente, H-7 se aprecia que tiene como vecino a H-6 (Figura 3).

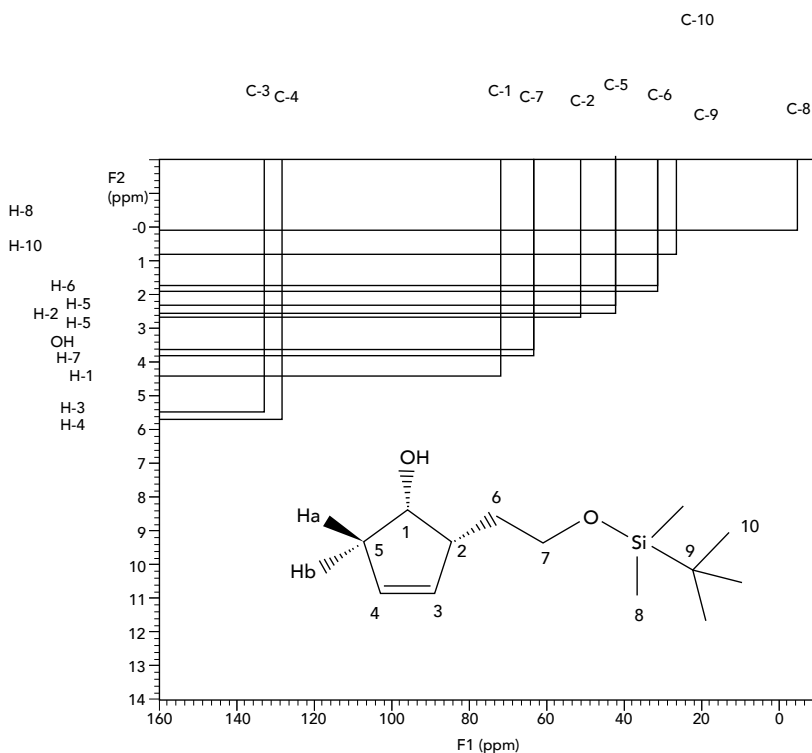
Para corroborar el análisis anterior, se recurrió a otro experimento bidimensional de RMN, conocido como HETCOR (Correlación heteronuclear), el cual permite establecer la asignación de los hidrógenos con su respectivo átomo de carbono dentro de la molécula.

Figura 3. Experimento bidimensional COSY del compuesto 5



De tal manera que en el espectro se aprecia con claridad que C-5, C-6 y C-7 son metilenos con hidrógenos químicamente iguales pero magnéticamente diferentes, lo que hace que los hidrógenos de cada uno de estos carbonos aparezca a desplazamientos químicos diferentes, por ejemplo, obsérvese que C-5 tiene correlación con H-5a, el cual aparece centrado en 2.68 ppm y con H-5b cuyo centro está en 2.38 ppm (figura 4).

Figura 4. Experimento bidimensional HETCOR del compuesto 5



Es interesante observar que tanto los carbonos vinílicos, como sus correspondientes hidrógenos, los cuales fueron correctamente asignados a través del experimento COSY H-H', mantienen una relación inversa entre sus desplazamientos, o sea que C-3 aparece a campo más bajo que C-4, en tanto que H-4 se encuentra a campo más bajo que H-3.

Finalmente, el producto presentó actividad óptica con una rotación relativa de -6.27° ($C=0.7$, CHCl_3).

El siguiente paso del esquema sintético propone que el grupo hidroxilo se transforme en un excelente grupo saliente sin perder la configuración relativa de C-1, por lo que se optó por la transformación al grupo *p*-toluénsulfonato (conocido comúnmente como tosilato). Esto se llevó a cabo bajo las condiciones clásicas de disolver el alcohol 5 en una mezcla de diclorometano-piridina anhidros, agitar por 30 min, enseguida adicionar el cloruro de *p*-toluénsulfonilo disuelto en diclorometano anhidro, se agitó hasta agotar la materia prima, entonces se vertió sobre una solución de sulfato de cobre acuoso para eliminar la piridina, evitando el uso de soluciones ácidas por el peligro de hacer reaccionar el doble enlace. Es bien conocido que por lo general, tanto los tosilatos como los mesilatos son inestables –situación que fue confirmada en este caso–, pues se obtuvo un aceite café que no soportó la temperatura ambiente (debe mantenerse a 0°C) y menos a las condiciones de purificación a través de cromatografía en columna de gel de sílice, alúmina o florisil, por lo que debe ser usado sin purificación y de ser posible de forma inmediata.

El análisis del espectro de IR del tosilato 6 mostró la desaparición de la banda ancha del OH en 3440 cm⁻¹, y apareciendo en cambio en 1464 cm⁻¹ y 1362 cm⁻¹, las bandas atribuidas al enlace C–S y S–O.

Una vez obtenido el tosilato 6, se procedió a someterlo a una reacción S_N2 utilizando un exceso de azida de sodio en solución de DMF (disolvente aprótico polar) por 12 h a 0°C y luego 48 h a 40°C hasta observar la desaparición de la materia prima y obtención de la azida 7. Después del trabajo normal de aislamiento y purificación por cromatografía en columna se obtuvo un aceite transparente, ligeramente amarillo en 63% de rendimiento en los dos pasos (Corey, E. J., 2000) y cuyos análisis espectroscópicos mostraron que es el producto azido 7 deseado.

El análisis del espectro de IR mostró la desaparición de las señales del tosilato (en 1464 cm⁻¹ y 1362 cm⁻¹), apareciendo en cambio una banda fuerte y fina en 2096 cm⁻¹, atribuida a la vibración del enlace de la azida.

El espectro de RMN-¹H, permite visualizar que los dos hidrógenos vinílicos están desplazados en una señal múltiple entre 5.75 y 5.66 ppm y que H-1 se ha desplazado aproximadamente 0.8 ppm a campo alto, apareciendo ahora en 3.69 ppm como un aparente triplete, pues está enmascarado con una señal múltiple correspondiente al metileno H-7, dichos desplazamientos pueden ser atribuidos a la influencia del sustituyente de

C-1, pues el grupo hidroxilo es más electronegativo que el grupo azida, en tanto que los demás hidrógenos se mantienen, aproximadamente en la misma zona.

En cuanto al espectro de RMN- ^{13}C se observa nuevamente el patrón mostrado en el correspondiente espectro de RMN- ^1H , es decir el desplazamiento de C-1 y C-7 a campo alto, apareciendo ahora 65.8 y 61.4 respectivamente, por la misma razón atribuida a los desplazamientos del espectro de RMN- ^1H . El producto presentó actividad óptica con una rotación relativa de -6.0° (C=1, CHCl_3). Finalmente, el espectro de masas mostró un fragmento en 238 ($\text{M}^+ - \text{N}_2 - 1$) y otro en 180 M^+ . En este espectro no se alcanza a ver el ion molecular, debido, probablemente a la inestabilidad de grupo azido a la temperatura, pues la técnica empleada es a través de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas.

En el esquema sintético se muestra que el siguiente paso es la desprotección del grupo sililo para la obtención del alcohol primario 8, para lo cual se tienen gran cantidad de métodos, entre los cuales se puede elegir el uso de HF acuoso/acetonitrilo, fluoruro de tetrabutylamonio, PPTS, y otros (Kuranaga, *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Yoshimura *et al.*, 2011) sin embargo, bajo cualquier condición de éstas, el doble enlace puede verse afectado, por lo que se decidió emplear la metodología descrita por (Tan *et al.*, 2000) el cual emplea catálisis de cloruro cúprico hidratado en acetona-agua a reflujo por 48 h. Después de purificación por cromatografía en columna, se obtuvo un aceite transparente café claro en 85% de rendimiento, el cual es estable a temperatura ambiente y del que se obtuvieron sus constantes espectroscópicas cuyo análisis determinó que corresponden al alcohol primario 8 deseado.

El espectro de IR mostró la presencia de una banda ancha en 3341 cm^{-1} , indicio claro de la eliminación del grupo sililo, y apareciendo por consecuencia el grupo hidroxilo, además continúa manteniéndose en 2095 cm^{-1} la banda fina y fuerte del grupo azido.

En el espectro de RMN- ^1H se aprecia la desaparición del grupo *ter*-butilo y metilo del TBDMS, pareciendo consecuentemente una señal ancha atribuible al grupo hidroxilo en 2.4 ppm, no mostrando otro cambio apreciable.

En cuanto al análisis del espectro de RMN- ^{13}C se ve la desaparición de tres señales a campo alto correspondiente a los tres tipo de carbono del

grupo sililoxi (metilo, *ter*-butilo y cuaternario) y comparando el desplazamiento con el diol 4, se visualiza que C-1 se desplazó 5.5 ppm a campo alto en el alcohol 8.

El producto presentó actividad óptica con una rotación relativa de -16.9° ($C=0.7$, CHCl_3).

Ya obtenido el alcohol-azida 6, se procedió a la conversión del alcohol primario a un grupo saliente muy efectivo, en forma análoga al tosilato 4, por lo que se empleó la misma metodología, obteniéndose un aceite café oscuro, inestable, por lo que se identificó únicamente por IR el cual mostró la desaparición de la banda del grupo alcohol, manteniéndose en 2097 cm^{-1} la banda fuerte y fina de la azida y apareciendo en 1448 cm^{-1} , 1362 cm^{-1} y 1177 cm^{-1} , las bandas del tosilato 9.

Finalmente, el tosilato 9 se hizo reaccionar con timina en medio básico en solución de DMF por 40 h a temperatura ambiente (no mayor a 30°C). Al agotarse la materia prima se observó por cromatografía en capa fina, la aparición de dos productos menos polares que la materia prima. De los dos productos obtenidos, el menos polar se obtuvo en 80% de rendimiento como un sólido blanco de p.f. = 185°C , cuyo análisis de la espectroscopía obtenido indicó que es el producto final deseado 10. Cabe destacar que la temperatura de reacción en el experimento es crucial; ya que a temperaturas mayores de los 30°C se obtiene como producto mayoritario el subproducto 11 de la reacción.

El espectro de IR del carbociclo 10, mostró una banda ancha y corta en 3479 cm^{-1} , debido a que existe tautomería entre la forma ceto y enólica del fragmento de la timidina, ocasionando este tipo de banda, también se aprecia la aparición de dos bandas en 1698 cm^{-1} y 1665 cm^{-1} , pertenecientes a los carbonilos, permaneciendo intacta la banda del grupo azida.

Estas observaciones fueron confirmadas por la espectroscopia de RMN- ^1H , en donde se aprecia la aparición de una señal ancha y corta en 8.72 ppm que integra para un hidrógeno y por el tipo de señal se asignó al grupo NH, otra señal múltiple que no se aprecia muy bien en 7.02 ppm perteneciente al hidrógeno del doble enlace de la timina y que integra para un hidrógeno. La multiplicidad de esta señal es debido al acoplamiento vinílico. Continuando con el análisis, se ve otra señal nueva en 1.93 ppm, en forma de doble con una $J = 1.2\text{ Hz}$ la cual integra para tres

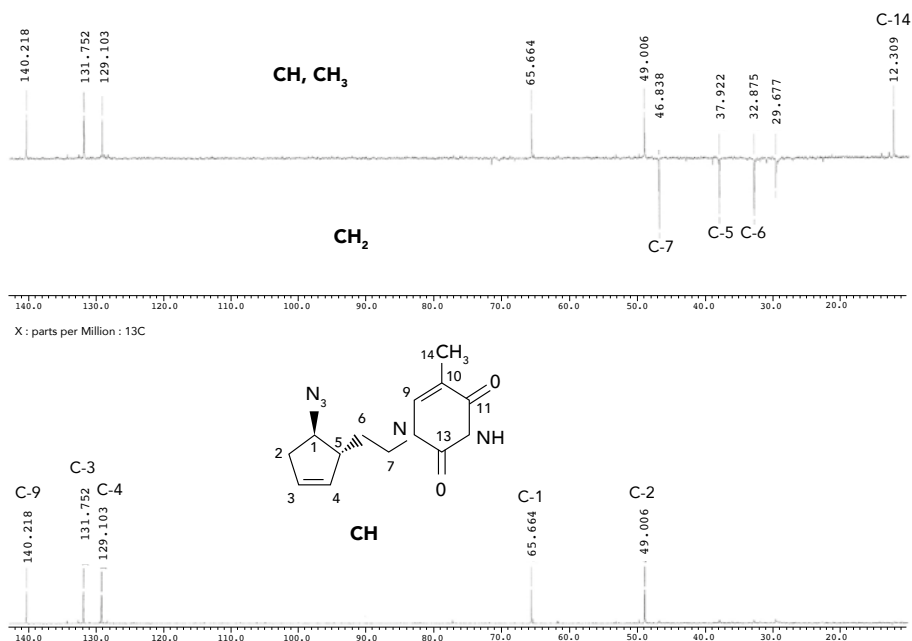
hidrógenos y que está acoplada con el hidrógeno vinílico de la timina y se asignó al metilo de la timina.

En cuanto al resto de las señales, corresponden en forma general a las ya descritas anteriormente.

Al analizar el espectro de RMN- ^{13}C , se observa la aparición de nuevas señales, tales como en 164.0 ppm y 150.6 ppm, las cuales fueron asignadas a los carbonos carbonílicos de la timina, en 110.9 ppm se aprecia la señal del carbono cuaternario, base del metilo, en cuanto al resto de los carbonos hidrogenados, se pudieron asignar gracias al experimento DEPT en donde se pueden diferenciar los metilos de los metileno y metinos (Figura 5); así se puede apreciar que el metilo (CH_3) aparece en 12.3 ppm (parte superior del espectro), los metilenos (CH_2) se aprecian en la parte inferior del espectro y los metinos (CH) en la parte media.

En cuanto al producto **11** menos polar, se determinó que es el compuesto doblemente sustituido en los dos nitrógenos de la timina. Este hecho pudo ser corroborado al analizar la espectroscopía de IR y RMN de hidrógeno y carbono, COSY-HETCOR y DEPT.

Figura 5. Experimento DEPT del producto final 10



De esta manera, se dio por concluido el trabajo experimental relativo a esta serie, obteniéndose un compuesto análogo de nucleósido que cumple con las características mínimas necesarias para ser un posible fármaco con propiedades antivirales.

4. Referencias

- Bondeiteich, M. y Griengl, H. (1987). Synthesis of Enantiomerically Pure Carbocyclic 3'-Azido-2', 3'-Dideoxy Thimidine, a Potential AntiAIDS Drug. *Tetrahedron Lett.* 28: 5311-5312.
- Carey, F. A. y Sundberg, R. J. (2007). *Advanced Organic Chemistry*. 5ta. Ed. Nueva York: Springer, 586-587.
- Chai, Ch. y Armarego, W. L. F. (2009). *Purification of Laboratory Chemicals*. 6ta. Ed. Nueva York: Pergamon Press, 445-447.
- Corey, E.J. y Venkateswarlu, A. (1972). Protection of Hydroxyl Groups as Tert-Butyldimethyl Silyl Derivatives. *J. Ame. Chem. Soc.* 94: 6190-6191.
- Corey, E.J. y Choi, S. (2000). Efficient Enantioselective Syntheses of Chloramphenicol and (D)-Threo- And (D)-Erythro-Sphingosine. *Tetrahedron Lett.* 41: 2765-2768.
- De Clercq, E. (2009). Another Ten Stories in Antiviral Drug Discovery (Part C): "Old" And "New" Antivirals, Strategies, and Perspectives. *Med. Res. Rev.* 29: 611-645.
- De Clercq, E., (2009). Antiviral Chemotherapy in 2009: Quo vadis? *Future Virol.* 4: 313-315.
- De Clercq, E. (2009). The History of Antiretrovirals: Key Discoveries over the Past 25 Years. *Rev. Med. Virol.* 19: 287-299.
- Ferrero, M. y Gotor, V. (2000). Biocatalytic Selective Modifications of Conventional Nucleosides, Carbocyclic Nucleosides and C-Nucleosides. *Chem Rev.* 100: 4319-4347.
- Green, W.T. y Wuts, P.G. (2006). *Protecting Groups in Organic Synthesis*. 4ta. Ed. Nueva York: Wiley Interscience, 237-240.
- Kuranaga, T., Ishihara, S., Ohtani, N., Satake, M. y Tachibana, K. (2010). Chemoselective Deprotection of Silyl Ethers by DIBALH. *Tetrahedron Lett.* 51: 6345-6348.

- Pathack, T. (2002). Azidonucleosides: Synthesis, Reactions, and Biological Properties. *Chem Rev.* 102: 1623-1667.
- Shah, S.T., Singh, S. y Guiry, P. J. (2009). A Novel, Chemoselective and Efficient Microwave-Assisted Deprotection of Silyl Ethers with Selectfluor. *J. Org Chem.* 74: 2179-2182.
- Tan, Z.P., Wang, L. y Wang, J.B. (2000). Deprotection of T-Butyldimethylsiloxy (TBDMS) Protecting Group with Catalytic Copper (II) Chloride Dihydrate. *Chin Chem.* 11: 753-756.
- Wang, J. T., Wu, W. T., Xu, Y. F. y Wu, L. M. (2010). Catalytic Removal of Tert-Butyldimethylsilyl (TBS) and Tetrahydropyranyl (THP) Groups from Protected Alcohols by NO+BF₄. *Methanol. Chinese Science Bulletin.* 55: 2803-2806.
- Yoshimura, Y., Yamazaki, Y., Saito, Y., Natori, Y., Imamichi, T. y Takahata, H. (2011). Synthesis of 5-Thiodidehydropyranylcytosine Derivatives as Potential Anti-HIV Agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 21: 3313-3316.

Capítulo XVIII

Uso de la reacción de Heck en la síntesis de compuestos orgánicos mediada por microondas*

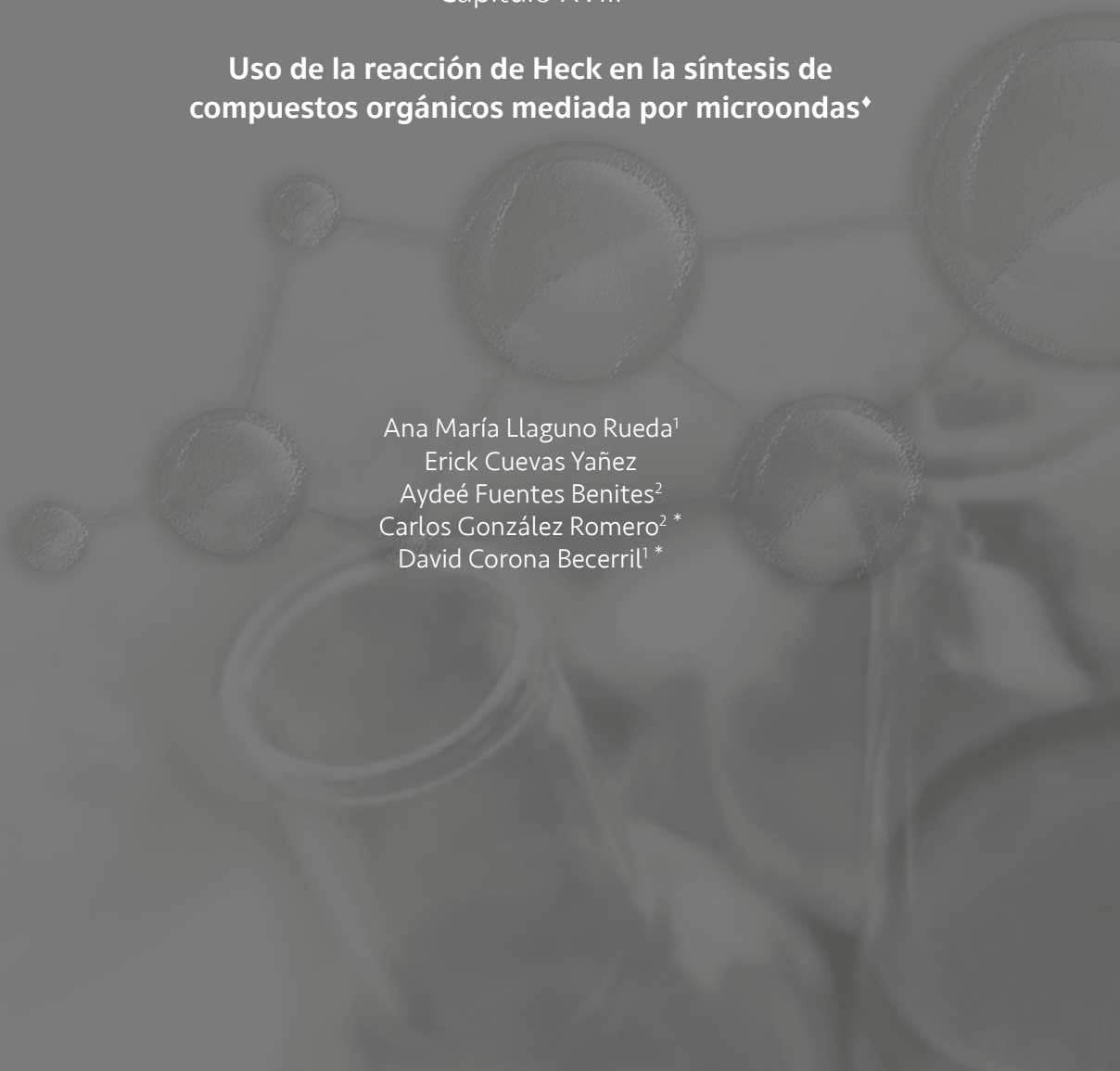
Ana María Llaguno Rueda¹

Erick Cuevas Yañez

Aydeé Fuentes Benites²

Carlos González Romero^{2 *}

David Corona Becerril^{1 *}



1. Introducción

La química verde consiste en el desarrollo de metodologías que modifiquen la naturaleza de los productos o procesos para reducir los riesgos que estos representan para la salud y el ambiente (Cornils, *et al.*, 1996). El diseño de productos y procesos ambientalmente amigables debe guiarse con los principios de la química verde (De Mejeire, *et al.*, 1994), que se basan en: 1) prevención de la creación de residuos; 2) maximización de la economía atómica; 3) uso de metodologías que generen productos con toxicidad reducida; 4) generar productos eficaces pero no tóxicos; 5) reducir el uso de sustancias auxiliares; 6) disminuir el costo energético; 7) utilización de materias primas renovables; 8) potenciación de la catálisis; 9) generar productos biodegradables; 10) desarrollar metodologías analíticas para la monitorización en tiempo real; y 11) minimizar el potencial de accidentes químicos.

Desde este punto de vista, el uso de la radiación de microondas (Miyaura y Suzuki, 1995) ha jugado un papel relevante en la síntesis de un amplio rango de moléculas orgánicas, cumpliendo con varias premisas de la química verde, ya que en principio disminuye el costo energético, emplea la utilización de catalizadores y minimiza los residuos; por lo cual la síntesis orgánica asistida con microondas se ha convertido en una disciplina reconocida en el ámbito del desarrollo de métodos de la química moderna.

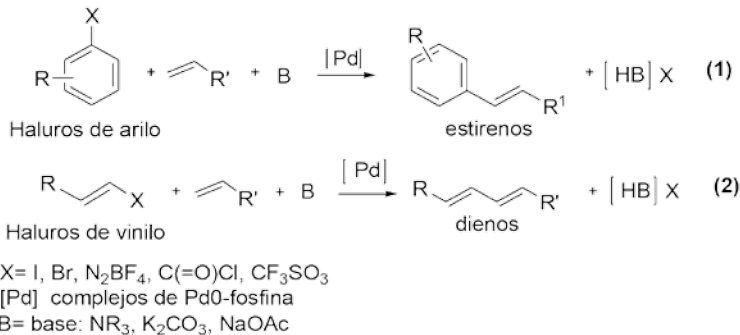
Adicionalmente, se pueden encontrar en la literatura gran número de ejemplos que implican el uso de la catálisis homogénea/heterogénea-ra-

diación microondas en la formación de enlaces carbono-carbono catalizadas por paladio, como son las reacciones tipo Heck (De Mejeire *et al.*, 1994), Suzuki (Miyaura y Suzuki, 1995) y Stille (1986), demostrando claramente que la transformación química puede disminuir los tiempos de reacción hasta en un orden de 10^3 veces en comparación con las reacciones catalizadas por metales de transición conducidas bajo condiciones típicas (calentamiento en un baño de aceite alrededor de 60-120 °C en un periodo de horas o días), lo cual disminuye de manera drástica el gasto energético.

1.1. La reacción de Heck: Acoplamiento carbono-carbono catalizado por complejos de Paladio

Mizoroki y Heck, descubrieron, independientemente, que las reacciones 1 y 2 (Esquema 1), llamadas actualmente "Olefinación de Heck" o "Reacción de Heck", se llevan a cabo con cantidades catalíticas de complejos de paladio (Cornils *et al.*, 1996).

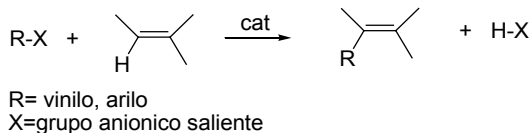
Esquema 1. Olefinación de Heck (Cornils, 1996)



El término "Reacción de Heck", resume los procesos catalíticos de acoplamiento C-C; que inicia con el reemplazo de un hidrógeno vinílico por un grupo vinilo, o arilo; este último grupo se introduce a partir de un halogenuro o un compuesto precursor relacionado (Esquema 2). El paso final que involucra la eliminación de un halogenuro de hidrógeno, requiere una base para atrapar el ácido. El paladio es prácticamente el único catalizador metálico utilizado como agente de la reacción de Heck, en forma de Pd^0 o sales de Pd^{II} o complejos de éstos, normalmente se utiliza de

1-5% en moles de catalizador (Cornils *et al.*, 1996). El alqueno también puede reaccionar con sales de diazonio, triflatos de arilo o compuestos de yodo hipervalentes. Los productos que se obtienen principalmente de estas reacciones son los 1,3-dienos y estírenos.

Esquema 2. Reacción de Heck (Cornils, 1996)



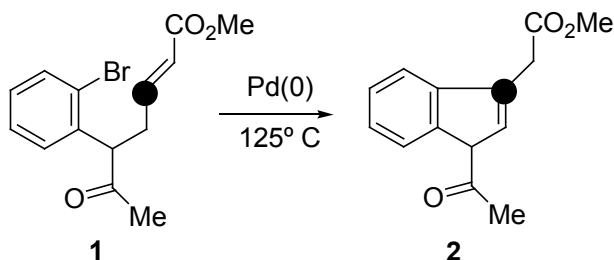
1.2. Condiciones de reacción

Los catalizadores típicos en la reacción de Heck son los complejos de Pd^0 -fosfina, por ejemplo: $\text{Pd}[\text{PPh}_3]_4$ o catalizadores generados *in-situ*, tales como: $\text{Pd}(\text{OAc})_2/\text{PPh}_3$. Heck y Spencer notaron que las fosfinas son necesarias para que de algún modo estabilice al catalizador (Cornils *et al.*, 1996); por otro lado, las aminas (como NEt_3) son las bases más comunes, pero también se usan K_2CO_3 , NaHCO_3 y NaOAc . En cuanto al catalizador que se usa con más frecuencia es, una combinación *in-situ* de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ y PPh_3 .

Las reacciones de Heck se llevan a cabo en disolventes polares apróticos o disolventes del tipo donador σ , tales como: acetonitrilo, sulfóxido de dimetilo (DMSO) o dimetil acetamida. La temperatura y tiempo de reacción, dependen de la naturaleza del haluro orgánico para ser activado y del límite de estabilidad del catalizador. Los disolventes polares como lo son la DMF, DMAc y NMP (*N*-metil pirrolidona) en combinación con NaOAc como base, son buenos en todos los casos, y aún en condiciones suaves de transferencia de fase en un sistema sólido/líquido empleando $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (sin ligantes de fosfinas) (Cornils *et al.*, 1996).

Se han informado reacciones de Heck tanto intra- como inter- moleculares. En cuanto a las olefinas monosustituídas pobres en electrones, son más reactivas que las olefinas ricas electrónicamente disustituídas o cíclicas. Varios grupos funcionales son compatibles con las condiciones de Heck, dando como resultados compuestos de carbono y heterocíclicos, incluyendo isomerizaciones de enlace (Esquema 3), precursores de productos naturales.

Esquema 3. Reacción de Heck para la ciclación intramolecular

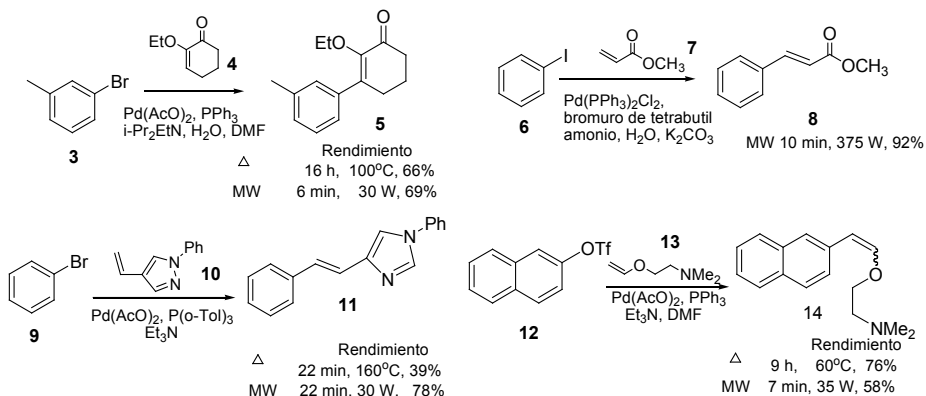


Debido al descubrimiento de la nueva generación de catalizadores, la reacción de Heck, ofrece una oportunidad excelente para su aplicación industrial, aún ante la baja reactividad de los cloruros de arilo. Otra gran demanda en esta área es el diseño de nuevos catalizadores quirales útiles para el acoplamiento de Heck estereoselectivo.

Adicionalmente, esta metodología puede llevarse a cabo en medio acuoso o incluso realizarse sin el uso de disolventes, lo cual hace que el proceso químico y residuos que se generan en la reacción sean más limpios; ofreciendo una nueva perspectiva en la disminución de disolventes de alto punto de ebullición que generalmente se requieren en éste tipo de reacciones por los métodos convencionales y que son difíciles de eliminar. Así, el acoplamiento de halogenuros de arilo con diferentes compuestos α , β -insaturados en medio acuoso han sido explorados bajo radiación microondas (MW) en un rendimiento que va de moderado a bueno y con una disminución de 16 horas a 6 minutos de reacción (ejemplos 2, 4 y 6, esquema 4) (Garg *et al.*, 1998, Villemin y Nechab, 2000; Díaz-Ortíz *et al.*, 1997).

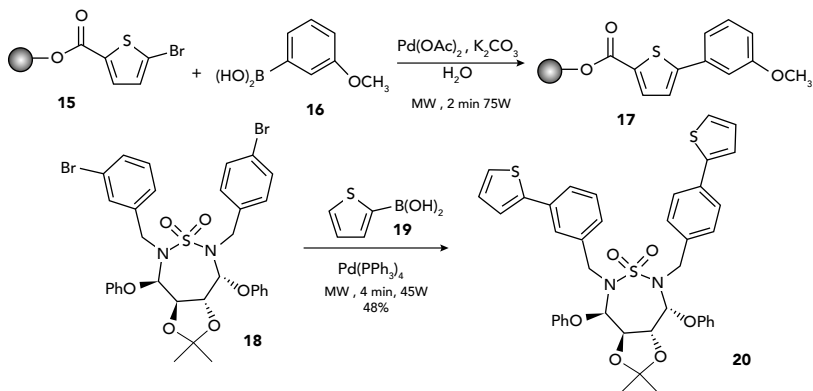
Otro aspecto importante es que la radiación por microondas mantiene la quelatación controlada y por tanto la regioselectividad que se observa en reacciones de Heck convencionales. Así la síntesis del éter vinílico **8** mostró la misma selectividad tanto por condiciones térmicas como por radiación microondas (Esquema 4), (Larhed y Hallberg, 1996).

Esquema 4. Aplicación de la radiación de microondas en la reacción de Heck



Existen nuevos materiales no tóxicos como son las resinas de polietilenglicol (PEG), los cuales se han utilizado en la síntesis de inhibidores de proteasas de HIV-1 (esquema 5) (Blettner *et al.*, 1999). Las resinas de PEG proceso, conocidas como síntesis en fase sólida, no solamente facilitan el proceso de purificación, sino que también ayudan en la solubilidad de los reactivos y estabilizan el catalizador de paladio en la ausencia de ligantes de fosfinas. Las reacciones concluyen en un tiempo de 2 minutos, mientras que las técnicas estándar requieren de 2 horas para finalizar la reacción. La estrategia de doble acoplamiento tipo Suzuki también fue utilizada para sintetizar un inhibidor C2-simétrico de proteasas HIV (esquema 5) (Schaal *et al.*, 2001).

Esquema 5. La reacción de Suzuki en la obtención de inhibidores de HIV-1



La gran versatilidad que presenta esta metodología se muestra en la fácil obtención de una variedad de sistemas heterocíclicos como son los índoles (Olofsson *et al.*, 1997, Namboodiri y Varma, 2001), pirimidinas (Villemin *et al.*, 2001), lactamas (Besson *et al.*, 2001), pirazoles (Kidwai *et al.*, 2000, Bentiss *et al.*, 2000), triazoles (Kidwai *et al.*, 2000, Bentiss, *et al.*, 2000), quinazolina (Besson *et al.*, 2000), benzodiazepina (Santagada *et al.*, 2001), piridinas (Alajarín *et al.*, 1992), cumarinas (Besson *et al.*, T. 2001) y quinolinas (Ranu *et al.*, 2000) a partir de materias comerciales disponibles.

1.3. Resultados

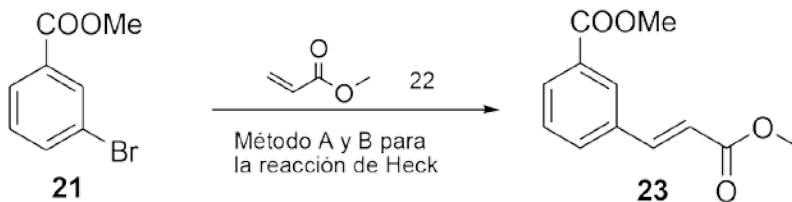
El presente trabajo de investigación partió del antecedente de la utilización de la reacción de Heck para la formación de enlaces carbono-carbono, tomando esta premisa el primer estudio trató sobre la formación de derivados comúnmente denominados chalconas, o sistemas α,β -insaturados a partir de la reacción de Heck entre un halogenuro aromático y un alqueno deficiente de electrones. El segundo estudio de este tipo de reacciones se centro en la formación de sistemas heterocíclicos a través de una reacción de Heck intermolecular. En los párrafos siguientes se describen estos procesos.

1.3.1. Generación del compuestos α,β -insaturados

1.3.1.1. Reacción de Heck del 3-bromobenzoato de metilo y acrilato de metilo

El primer estudio de la reacción de Heck que involucra la formación de los compuestos α,β -insaturados se realizó para la reacción del 3- bromobenzoato de metilo (21) con acrilato de metilo (22) (esquema 6), utilizando dos metodologías diferentes las cuales se resumen en la tabla 1.

Esquema 6. Reacción de Heck en tubo sellado a presión



La reacciones de Heck, en ambas metodologías, fueron purificadas por cromatografía en columna de Silica-Gel en un sistema de elución hexano-acetato de etilo (9:1), obteniéndose el 3-(3'-carbometoxi-1-fenil) acrilato de metilo (23) como un sólido de color blanco con un punto de fusión de 137-138 °C.

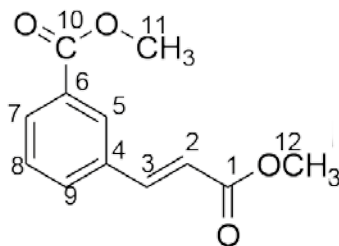
De los resultados observados en la tabla se puede concluir que la primera metodología es más eficiente en comparación con la segunda, ya que se obtiene mayor rendimiento en el mismo tiempo de reacción, quizás esto se deba a que en la primera metodología la ausencia de disolvente promueve que las moléculas se encuentran en mayor contacto y por lo tanto haya mayor interacción entre ellas, en comparación con la segunda metodología donde las moléculas se encuentran en solución y por lo tanto están más dispersas en el medio.

Tabla 1. Reacción de Heck por los métodos A y B

Método	Alqueno (equivalentes)	Condiciones de reacción	Rendimiento (%)
A	22 (1.25)	Pd(OAc) ₂ (0.01 equivalentes), tri-o-tolil-fosfina (0.02 equivalentes), Et ₃ N (1 equivalente), tubo sellado, sin disolvente, 3 días en calentamiento.	41
B	22 (1.1)	PdCl ₂ (0.05 equivalentes), PPh ₃ (0.01 equivalente), Et ₃ N (3 equivalentes), CuI (0.05 equivalentes, DMF (5 mL, disolvente), 3 días a reflujo.	10

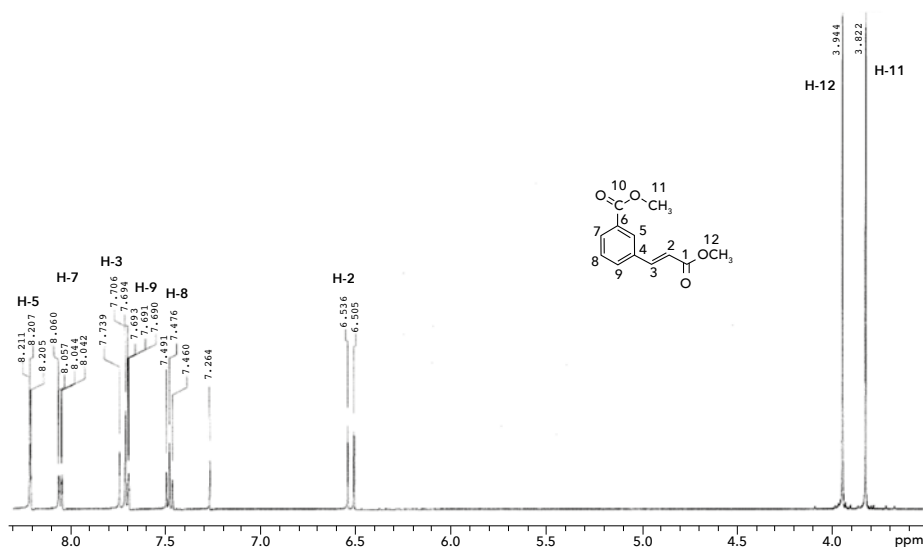
El compuesto 3-(3'-carbometoxi-1-fenil) acrilato de metilo (23) (figura 1), fue caracterizado por técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono-13 (RMN ¹H y RMN ¹³C) e infrarrojo (IR).

Figura 1. Benzoato 23



El espectro de infrarrojo muestra señales características de los grupos funcionales presentes en el compuesto 23, así en 2953 cm^{-1} se observan las bandas de los metilos, en 1729 cm^{-1} y 1749 cm^{-1} las bandas de los carbonilos de los éster de metilo y en 673 y 749 cm^{-1} las bandas correspondientes a un sistema aromático disustituido.

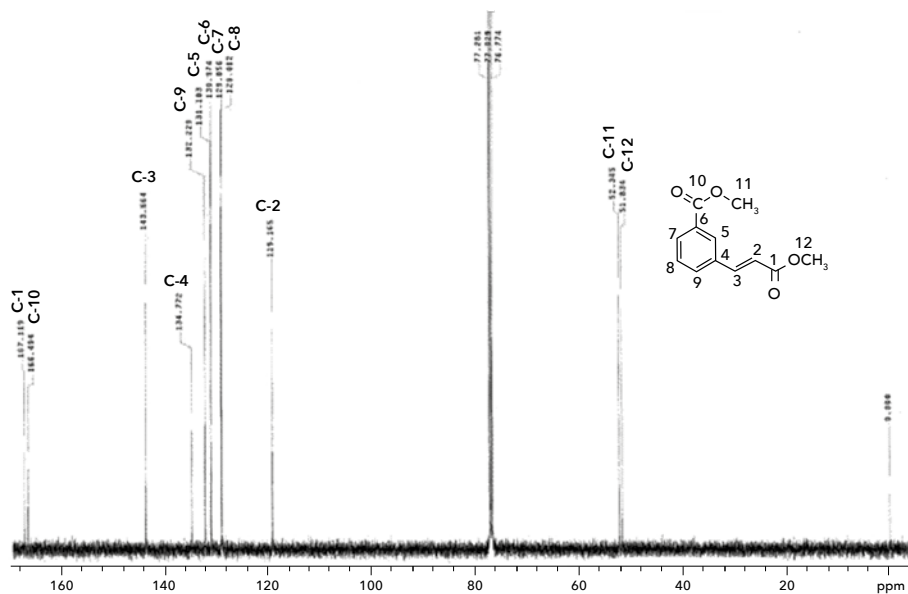
Figura 2. Espectro de RMN ^1H del benzoato 23



La estructura del producto α,β -insaturado 23 se corroboró a través del análisis de su espectro de RMN- ^1H (V. figura 2), el cual muestra la presencia de los metilos de ésteres, como una señal simple para tres hidrógenos en 3.94 ppm que corresponde a H-11, y la señal del metilo H-12 que se presenta como una señal simple que integra para tres hidrógenos en 3.82 ppm. Además, el alqueno se presentan como dos señales dobles en 6.5 ppm y 7.71 ppm que integran cada uno para un hidrógeno con una constante de acoplamiento de 16 Hz; esta constante de acoplamiento indica una geometría *trans* del alqueno. En la región de los hidrógenos aromáticos encontramos la señal del hidrógeno H-8 en 7.47 ppm como un doble de dobles con constantes de acoplamiento ambas de 8 Hz, en 7.69 ppm aparece la señal doble que integra para un hidrógeno con constante de acoplamiento de 8 Hz que fue asignada al hidrógeno H-9; el hidrógeno H-7 se presenta como una señal doble en 8.05 ppm con constante de acoplamiento de 8 Hz, finalmente a campos más bajos en 8.21 ppm se presenta el hidrógeno H-5 como una señal simple.

El experimento de RMN- ^{13}C (Figura 3) confirma la presencia del producto a partir de los desplazamientos químicos de sus carbonos, los cuales se resumen a continuación: 132 (C-1), 132.5 (C-2), 122.4 (C-3), 135.8 (C-4), 129.9 (C-5), 128.1 (C-6), 165.7 (C-7), 52.3 (C-8) ppm.

Figura 3. Espectro de RMN ^{13}C del benzoato 23

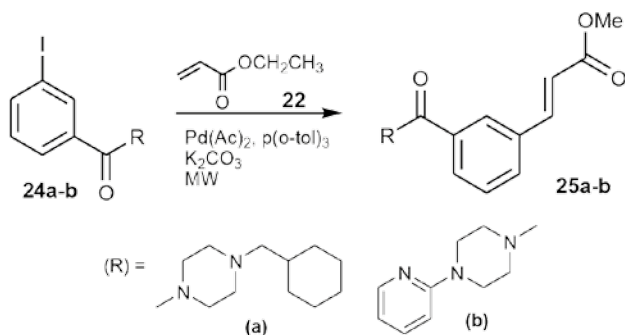


1.3.1.2 Reacción de arilamidas y acrilato de metilo

La generación del compuesto α,β -insaturado para la segunda serie de ejemplos, se realizó utilizando las arilamidas 24a-b y su reacción con acrilato de metilo (22) (esquema 7), a través de la reacción de Heck. La metodología empleada en esta parte utilizó a la radiación de MW como una fuente alternativa de energía; la cual tiene como finalidad disminuir los tiempos de reacción y aumentar los rendimientos de la reacción. El procedimiento para esta reacción se describe a continuación: en un vial; que contiene las especificaciones para someterlo a radiación de microondas, se disolvió la amida correspondiente (24a-b) en dimetilformamida (DMF), utilizando como catalizador $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.01equiv) y como ligante a la tri-*o*-tolilfosfina (0.02 equivalentes), como base K_2CO_3 (1 equivalente) y como grupo vinílico se utilizó al acrilato de metilo (1.25 equivalentes), el vial de reacción se sometió a radiación de microondas en un equipo

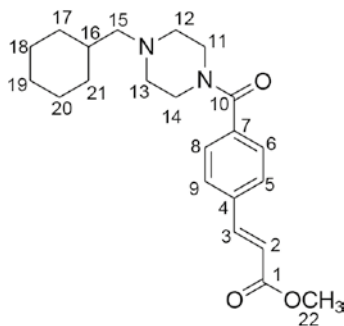
Anton-Paar Synthos 300, bajo las siguientes condiciones de reacción: un potencial de 600Watts, a 120°C y 20 minutos. Después de la purificación por cromatografía en columna, se obtuvieron sólidos de color blanco en ambas reacciones, en un rendimiento del 41% y 52% respectivamente para los compuestos 25a y 25b.

Esquema 7. Reacción de Heck llevada a cabo en Microondas



El compuesto 25a (figura 4) fue caracterizado por técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono-13 (RMN ^1H y RMN ^{13}C).

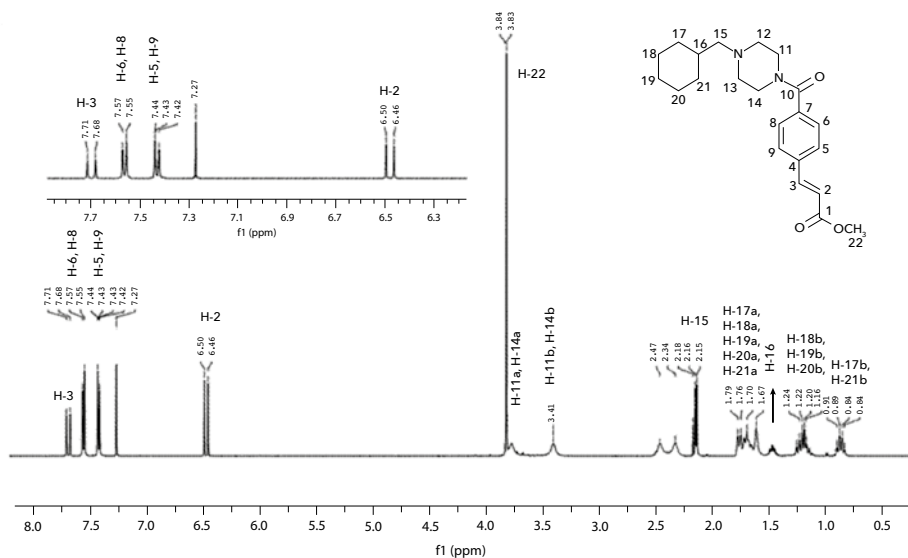
Figura 4. Ester-amida 25a



El espectro de RMN- ^1H del producto 25a (figura 5) fue fundamental para su caracterización; encontrando que los hidrógenos aromáticos se presentan como un sistema AB como dos señales dobles en 7.8 ppm (H-6; H8) y 7.4 ppm (H-5; H-9) con constantes de acoplamiento de 8 Hz; los hidrógenos vinílicos H-2 y H-3 se asignaron a las señales en 6.4 ppm y

7.6 ppm respectivamente, que forman otro sistema AB con constantes de acoplamiento de 15 Hz, lo cual indica una geometría de tipo *trans* sobre el doble enlace; en 3.8 ppm se observa una señal simple que integra para tres hidrógenos que corresponde al metilo del éster (H-22). Las señales de la piperazina se asignaron como a continuación se describe en 3,7 y 3.2 ppm dos señales amplias que integra para cuatro hidrógenos correspondientes a H-11, H-14, dos señales amplias que integra para cuatro hidrógenos en 2.46 y 2.33 ppm asignada a los hidrógenos H-13, H-12. Las señales para el anillo del ciclohexilo se asignaron de la siguiente manera; en 1.5 ppm una señal múltiple se asignó al hidrógeno H-16, las señales de los metilenos 17 al 21 se asignaron a las señales múltiples centradas en 0.78ppm que integra para dos hidrógenos (H-17a; H21-a), 1.2 ppm que integra para dos hidrógenos (H-18a; H-20a), 1.57 ppm que integra para seis hidrógenos (H-17b; H21-b; H-18b; H-20b, H-19), y en 2.15 ppm una señal doble que integra para dos hidrógenos correspondientes al metileno H-15.

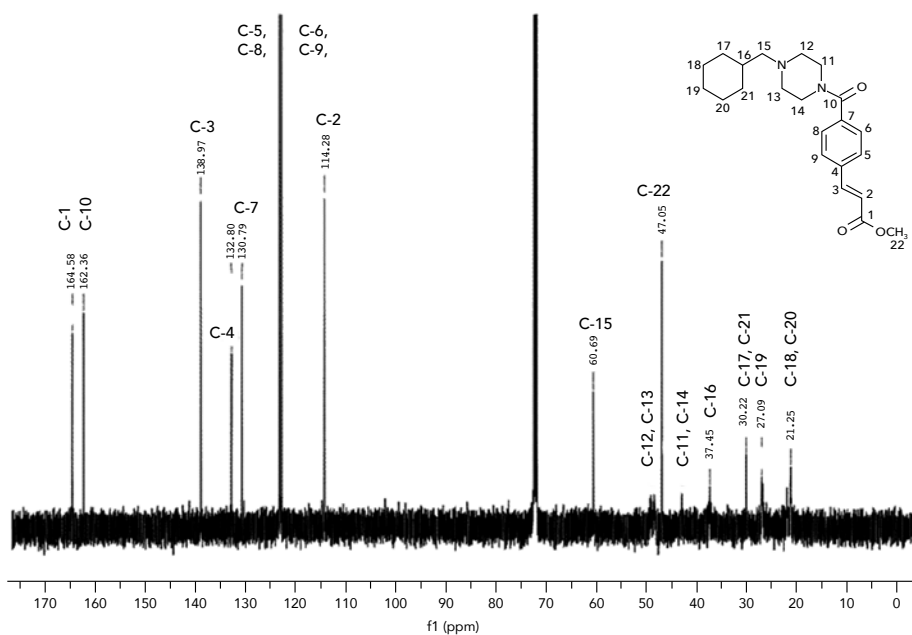
Figura 5. Espectro de RMN ^1H del éster-amida 25a



Por otro lado, el espectro de RMN de ^{13}C (V. figura 6), muestra dos señales en 169.6 ppm (C-10) y 167.3 ppm (C-1), que corresponden a los carbonos de los carbonilos de amida y éster respectivamente; en 143 ppm (C-3) y 119 ppm (C-2) se asignaron las señales para los carbonos del al-

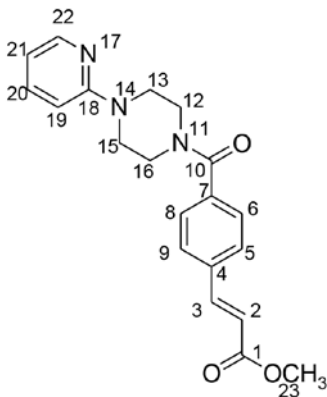
queno, las señales para el anillo de benceno se asignaron a las siguientes señales: 137.7 ppm (C-4), 135.4 ppm (C-7), 128.3 ppm (C-6), y 127.9 ppm (C-5), finalmente se puede apreciar el metoxilo del éster acrilato en 78 ppm (C-22) (figura 9). Las señales para los carbonos de la pirazina fueron asignados en los siguientes desplazamientos: 54.2 ppm (C-12; C-13) y 35.2 ppm (C-11; C-14). El carbono del metileno C-15 fue asignado a la señal de 65.6 ppm. Finalmente, los desplazamientos para los carbonos del ciclohexilo corresponden a las siguientes señales: 32 ppm (C-16), 31.1 ppm (C-17; C-21), 26.9 ppm (C-19) y 26.2 ppm (C-18; C-20).

Figura 6. Espectro de RMN ^{13}C del ester-amida 25a



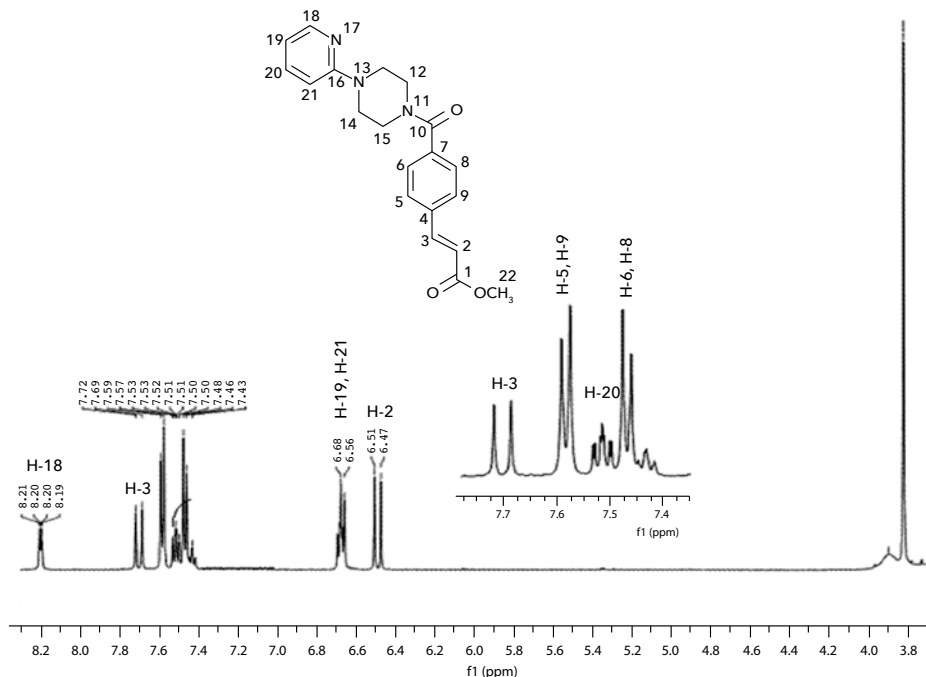
La caracterización del producto 25b (figura 7) se realizó por las técnicas espectroscópicas de RMN ^1H y ^{13}C .

Figura 7. Ester-amida 25b

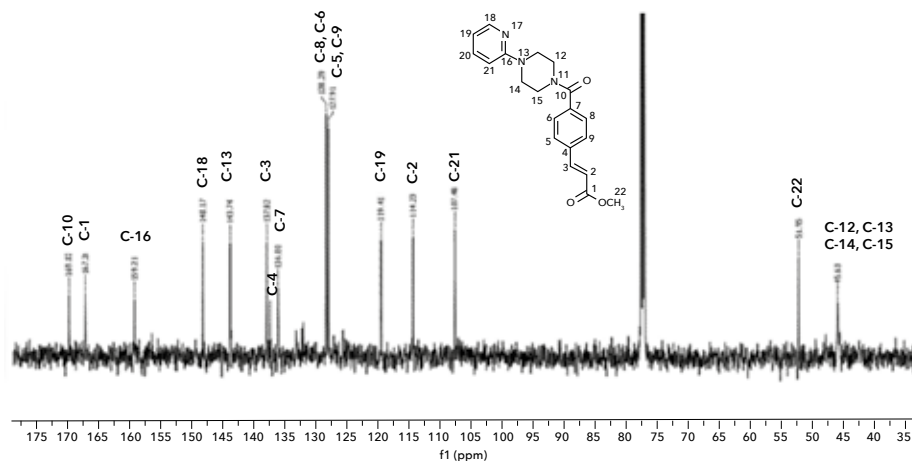


El análisis del espectro de RMN ^1H del producto **25b** (figura 8) fue fundamental para elucidar su estructura inequívocamente. El análisis, región por región, muestra a los hidrógenos aromáticos del fenilo como un sistema AB, como dos señales dobles en 7.7 ppm (H-6; H-8) y 7.6 ppm (H-5; H-9) ambos con constantes de acoplamiento de 8.1 Hz; en esa región aromática se presentan los hidrógenos del anillo de la piridina en 8.2 ppm (H-22), 7.4 ppm (H-20) y 6.6 ppm (H-19), los hidrógenos vinílicos H-2 y H-3 se asignaron a las señales en 6.45 ppm y 8.2 ppm respectivamente, que forman otro sistema AB con constantes de acoplamiento de 16 Hz, lo cual indica una geometría de tipo *trans* sobre el doble enlace. En 3.8 ppm se observa una señal simple que integra para tres hidrógenos que corresponde al metilo del éster (H-23), las señales de la piperazina se asignaron como a continuación se describe en 2.2 ppm una señal amplia que integra para cuatro hidrógenos correspondientes a H-13 y H-15, una señal amplia que integra para cuatro hidrógenos en 1.6 ppm asignada a los hidrógenos H-16, H-12.

Figura 8. RMN ^1H del ester-amida 25b



La revisión del espectro de RMN de ^{13}C del compuesto 25b (ver figura 9), muestra dos señales en 170 ppm (C-10) y 167 ppm (C-1), que corresponden a los carbonos de los carbonilos de amida y éster respectivamente; en 143 ppm (C-3) y 119 ppm (C-2) se asignaron las señales para los carbonos del alqueno, las señales para el anillo de fenilo se asignaron a las siguientes señales: 137.7 ppm (C-4), 135.4 ppm (C-7), 128.3 ppm (C-6), y 127.9 ppm (C-5), finalmente se puede apreciar el metoxilo del éster en 77.2 ppm (C-22) (figura 9). Las señales para los carbonos de la pirazina fueron asignados en los siguientes desplazamientos: 51.8 ppm (C-15; C-13) y 43.4 ppm (C-12; C-16). Los desplazamientos para los carbonos del anillo de piridina corresponden a las siguientes señales: 159 ppm (C-18, C-22), 114 ppm (C-21), 107.3 ppm (C-19) y 148 ppm (C-20).

Figura 9. RMN ^{13}C del ester-amida 25b

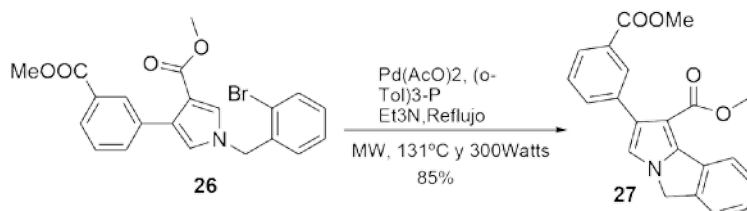
1.3.2. Reacción de ciclación intramolecular vía reacción de Heck

Una parte importante de esta investigación fue la de llevar a cabo la reacción de Heck intramolecular para la síntesis de compuestos heterociclos derivados de pirroloisindoles, con lo cual la metodología ya establecida serviría como una herramienta sintética importante hacia la formación de productos con posibles actividad biológica. La reacción final de esta investigación involucró la ciclación *vía* reacción de Heck del pirrol intermediario 26 adecuadamente funcionalizado, el cual fue preparado previamente en el laboratorio por nuestro grupo de investigación, y que se colocó en presencia de $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (0.01 equivalentes) como catalizador, tri-*o*-tolilfosfina (0.02 equivalentes) como ligante y se utilizó como base Et_3N (1 equivalente), todos los reactivos se disolvieron en DMF conforme las condiciones descritas para la reacción de acoplamiento en la formación de los derivados 25a-b.

Parte importante de este paso de reacción fue el uso de la radiación de microondas como fuente de energía con la finalidad de aumentar el rendimiento, y disminuir el tiempo de reacción haciendo más eficiente el gasto de energía. La mezcla de reacción se colocó bajo las siguientes condiciones: 131°C a 300 Watts durante 20 minutos. Después de la purificación por cromatografía en columna se obtuvo al derivado 1-carbo-

metoxi-2-(3-(metoxicarbonil)fenil)-5H-pirrolo[2,1-a]isoindol 27 como un sólido de color amarillo con un rendimiento de 85% (esquema 8).

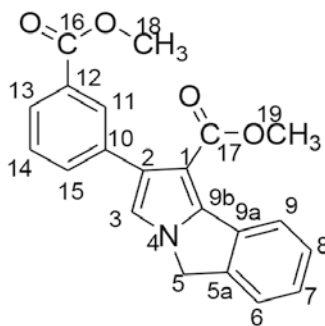
Esquema 8. Reacción de ciclación intramolecular a través de la reacción de Heck



La caracterización del producto 27 (figura 10) se realizó por las técnicas espectroscópicas de RMN ^1H y ^{13}C e infrarrojo (IR).

El espectro de infrarrojo del compuesto 27 presenta bandas en 1698 cm^{-1} y 1734 cm^{-1} características de los grupos funcionales de los carbonilos del éster y de la amida respectivamente como información principal.

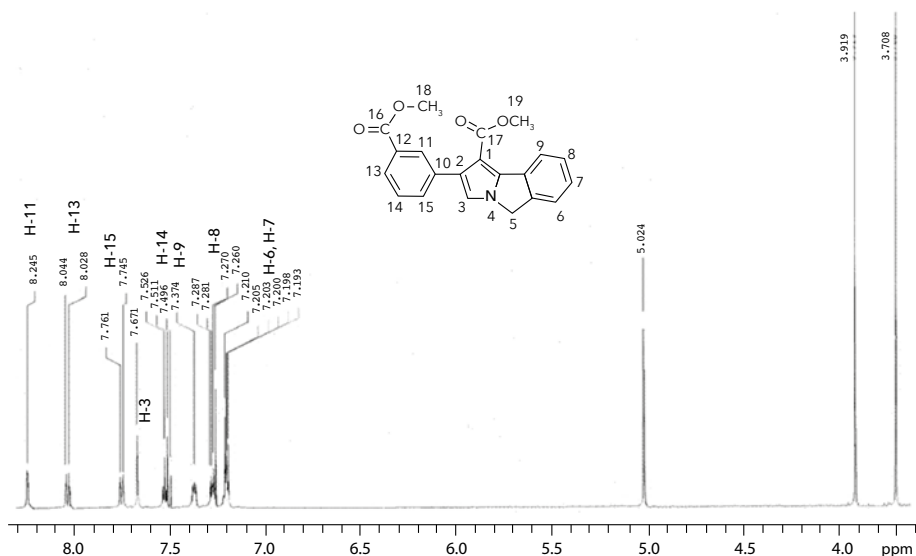
Figura 10. Indol 27



El análisis del espectro de RMN de ^1H del compuesto 27 (figura 11) confirma que se realizó el proceso de ciclación a través de la reacción de Heck, observando la presencia de los grupos metoxilo H-18 y H-19 como señales simples en de 3.91 y 3.7 ppm respectivamente. También se observa la presencia del metileno (H-5) en 5.02 ppm, otra de las señales importantes dentro del espectro, es la presencia del hidrógeno del anillo de pirrol H-3, en 7.67 ppm, como una señal simple. Para el caso del anillo aromático que contiene al grupo éster, se aprecian hidrógenos en la posición *orto* H-11 y H-15 con señales doble de dobles en 8.24 ppm y

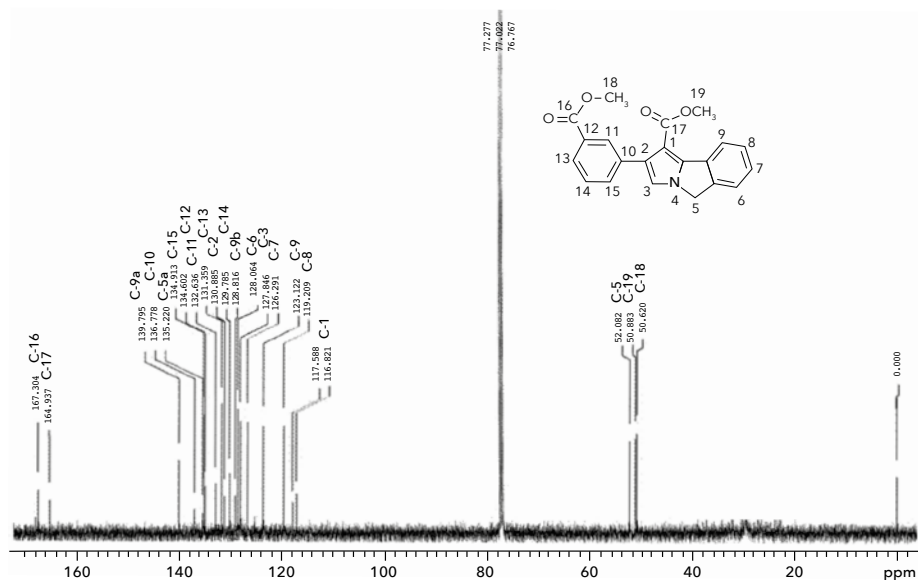
señales doble de dobles de dobles en 7.75 ppm en cada uno; con respecto al pirrol, también aparecen señales para los hidrógenos *meta* H-14 y *para* H-13 con señales doble de doble en 7.51 ppm y doble de dobles de dobles en 8.04 ppm. Finalmente, se encuentran los hidrógenos H-6, H-7, H-8 y H-9 para el anillo aromático que se encuentra unido al anillo de cinco miembros presentando señales múltiples en las regiones 7.28 ppm, 7.19 ppm, 7.21 ppm y 7.37 ppm respectivamente.

Figura 11. Espectro de RMN ^1H del indol 27



En cuanto al espectro de RMN de ^{13}C del derivado de pirrolo[2,1-a]isoin-
dol 27, se observan los carbonos de los grupo metoxilo C-18 y C-19 en
las regiones de 52.08 ppm y 50.8 ppm, al igual que continúan apare-
ciendo las señales de los grupos carbonilos C-16 y C-17 en las regiones
167.3 ppm y 164.9 ppm, uno de los carbono importantes que continúa
apareciendo es el carbono del metileno C-5 en 50.6 ppm. En tanto que,
los carbonos del anillo aromático C-11, C-13, C-14 y C-15 unido al grupo
éster se encuentran en las regiones 131.3 ppm, 128 ppm, 127.8 ppm y
134.9 ppm. Finalmente, el último anillo aromático unido al anillo de cinco
miembros presenta señales para los carbonos C-6, C-7, C-8 y C-9, en las
regiones de 119.2 ppm, 126.2 ppm, 128.2 ppm y 123.2 ppm (figura 12).

Figura 12. Espectro de RMN ^{13}C del Indol 27



2. Conclusiones

Se logró obtener una metodología para la formación de enlaces carbono-carbono a través de una ruta de síntesis que planteó el uso de la reacción de Heck en conjunción con las microondas como parte central del proceso central, dando como producto importante un derivado de pirrolo[2,1-a]isoindol (27).

Finalmente, hemos logrado encontrar condiciones ideales para la formación de derivados de derivados de pirrolo[2,1-a]isoindol (27), a través de metodologías ambientalmente amigables como la utilización de catalizadores y su combinación con radiación de microondas.

3. Referencias

Alajarín, R., Vaquero, J. J., García-Navío, J. L. y Alvarez-Builla, J. (1992). Synthesis of 1, 4-Dihydropyridines under Microwave Irradiation. *Synlett*. 4: 297-298.

- Bentiss, F., Lagrenée, M. y Barbry, D. (2000). Accelerated Synthesis of 3, 5-Disubstituted 4-Amino-1, 2, 4-Triazoles under Microwave Irradiation. *Tetrahedron Lett.* 41 (10): 1539.
- Besson, T., Guillard, J., Rees, C.W. (2000). Multistep Synthesis of Thiazoloquinazolines under Microwave Irradiation in Solution. *Tetrahedron Lett.* 41: 1027.
- Besson, T., Thiéry, V. y Frère, S. (2001). Microwave Acceleration of the Pechmann Reaction on Graphite/montmorillonite K10: application to the preparation of 4-substituted 7-aminocoumarins. *Tetrahedron Lett.* 42 (15): 2791.
- Blettner, C. G., König, W. A., Stenzel, W. y Schotten, T., (1999). Microwave-Assisted Aqueous Suzuki Cross-Coupling Reactions. *J. Org. Chem.* 64 (11): 3885-3890.
- Bose, A.K., Banik, B.K., Barakat, K.J. and Manhas, M. S. (1993). Simplified Rapid Hydrogenation Under Microwave Irradiation: Selective Transformations of β -Lactams. *Synlett.* 8:575.
- De Meijere A. y Meyer, F. E. (1995). Fine Feathers Make Fine Birds: The Heck Reaction in Modern Garb. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2379-2411.
- Díaz-Ortiz, A., Prieto, P. and Vázquez, E. (1997). Heck Reactions under Microwave Irradiation in Solvent-Free Conditions. *Synlett.* 3: 269.
- Garg, N., Larhed, M. y Hallberg, A. (1998). Heck Arylation of 1, 2-Cyclohexanedione and 2-Ethoxy-2-cyclohexenone. *J. Org. Chem.* 63: 4158.
- Herrmann, W. A. (1996). *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds*. Vol. 2. Alemania: Ed. VCH.
- Kidwai, M., Bhushan, K.R. y Misra, P. (2000). Microwave Assisted Synthesis of New Fungicidal Pyrazoles. *Indian. J. Chem.* 39B: 458-461.
- Larhed, M. y Hallberg, A. (1996). Microwave-Promoted Palladium-Catalyzed Coupling Reactions. *J. Org. Chem.* 61 (26): 9582.
- Miyaura, N. y Suzuki, A. (1995). Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron compounds. *Chem. Rev.* 95 (7): 2457-2486.

- Namboodiri, V. V. y Varma, R. S. (2001). Microwave-Accelerated Suzuki Cross-Coupling Reaction in Polyethylene Glycol (PEG). *Green Chem.* 3: 146-145.
- Olofsson, K., Kim, S. Y., Larhed, M., Curran, D.P. y Hallberg, A. (1999). High-Speed Highly Fluorous Organic Reaction. *J. Org. Chem.* 64: 4529-4541.
- Ranu, R.C., Hajra, A. y Jana, U. (2000). Microwave-Assisted Simple Synthesis of Quinolones from Anilines and Alkyl Vinyl Ketones on the Surface of Silica Gel in the Presence of Lindium. *Tetrahedron Lett.* 41(4): 531-533.
- Santagada, V., Persutti, E., Fiorino, F., Vivenzio, B. y Caliendo, G. (2001). Microwave Enhanced Solution Synthesis of 1, 4-benzodiazepin-5-ones. *Tetrahedron Lett.* 42: 2397.
- Schaal, W., Karlsson, A., Ahlsen, G., Lindberg, J., Andersson, H. O., Danielson, U. H., Classon, B., Unge, T., Samuelsson, B., Hultén, J., Hallberg, A. y Karlén, A. (2001). Synthesis and Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) of Symmetric and Nonsymmetric Cyclic Sulfamide HIV-1 Protease Inhibitors. *J. Med. Chem.* 44 (20):155-169.
- Stille, J. K. (1986). The Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organotin Reagents with Organic Electrophiles. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 25 (6): 508-524.
- Villemin, D., Gomez-Escolinilla, M.J. y Saint-Calir, J.F. (2001). Palladium-Catalysed Phenylation of Heteroaromatics in Water or Methylformamide under Microwave Irradiation. *Tetrahedron Lett.* 42 (4): 635.
- Villemin, D. y Nechab, B. (2000). Rapid and Efficient Palladium Catalysed Reduction of Aryl Halides by Triethylsilane under Microwave Irradiation. *J. Chem. Res.* 9 (1): 432-434.

TÓPICOS SELECTOS **de CIENCIAS** **QUÍMICAS**

coordinado por Leobardo Manuel Gómez Oliván, se terminó de imprimir el 20 de abril de 2018 en los talleres de Editorial CIGOME, S. A. de C. V., Vialidad Alfredo del Mazo núm. 1524, ex. Hacienda La Magdalena C. P. 50010, Toluca, México. Su edición consta de 300 ejemplares. La edición estuvo a cargo de la Dirección de Difusión y Promoción de la Investigación y los Estudios Avanzados.

Coordinación editorial: Patricia Vega Villavicencio

Diseño de forros: Hugo Iván González Ortega

Formación de interiores: Cristina Mireles Arriaga

Corrección: Adso Eduardo Gutiérrez Espinoza

Las Ciencias Químicas estudian tanto la composición, estructura y propiedades de la materia como sus reacciones y su relación con la energía. Conocer los compuestos químicos, el modo para obtenerlos o su relación con los procesos biológicos implican retos científicos, pues hay nuevas preguntas que necesitan ser resueltas mediante la investigación. Con el fin de reforzar la formación de los estudiantes y conscientes de estos retos, los Programas de Posgrado de la Facultad de Química de la UAEM editan esta obra. Los capítulos contenidos reflejan la actividad académica y los principales hallazgos encontrados en los proyectos de investigación, desarrollados por alumnos e investigadores del Posgrado, en las diferentes áreas del conocimiento: ingeniería química, química analítica, químico biológica, química inorgánica y química orgánica. El libro está dirigido a estudiantes, profesores, investigadores, a profesionales de la industria química y del sector salud.