

ISSN Impreso: 1810-634X
ISSN on line. : 2309-8740

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

Volumen 89 N° 1
ENERO - MARZO 2023



INSTITUCIÓN CIENTÍFICA FUNDADA EN 1933

LIMA, PERÚ

REVISTA
de la
SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ
(Rev Soc Quím Perú)
ISSN impreso: 1810-634X
ISSN on line: 2309-8740

Revista Trimestral

Comité Editor

Editor en Jefe : Ana Cecilia Valderrama Negrón
Miembros : Julio Santiago Contreras
Lisveth Flores Del Pino
Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

COMITÉ CONSULTIVO

Dr. Juan Dávalos Prado
Consejo Superior de Investigaciones
Científicas

Dr. Jimmy Rosales Huamaní
Universidad Nacional de Ingeniería

Dr. Julio Santiago Contreras
Universidad Nacional Mayor de San
Marcos

Dr. Olivio Castro Mandujano
Universidad Nacional Mayor de San
Marcos

Dr. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
Universidad Nacional Mayor de San
Marcos

M.Sc. Virginia Torpoco Carmen
Universidad Nacional de Ingeniería

Dra. Ana Valderrama Negrón
Universidad Nacional de Ingeniería

Dr. Hugo Alarcón Cavero
Universidad Nacional de Ingeniería

Dr. Gino Picasso Escobar
Universidad Nacional de Ingeniería

Revista indizada en el Chemical Abstracts, SciELO y Latindex

Sede: Av. Nicolás de Aranibar 696 Santa Beatriz – Lima 01

Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú

Teléfono (511) 960 189 928

e-mail: sqperu@gmail.com

Portal web: www.sqperu.org.pe

Ley 26905 – Hecho el depósito legal a la Biblioteca Nacional del Perú

Certificado N 95-1567

Vol 89

ENERO – MARZO 2023

N° 1

En el Perú: N° suelto S/ 15

Suscripción anual: S/ 60.00

En el extranjero suscripción anual: US \$ 50

SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ
CONSEJO DIRECTIVO
(marzo 2022 – marzo 2024)

Presidente	: Mg. Nora Gabriela Hernández
Vice-Presidente	: Dra. Santos Haydeé Chávez Orellana
Tesorera	: Dra. Ana Lucy Siccha Macassi
Secretario	: Mg. Mario Antonio Bolarte Arteaga
Director Administrativo	: Mg. Helmer Helí Lezama Vigo
Vocales	: Q.F. Gabriela Soriano Chávez Mg. Norma Amparo Cuizano Vargas Mg. Fernando Carlos Carrasco Solís Dra. Magali Camila Vivas Cuéllar Dra. Mercedes Puca Pacheco MSc. Christian Ronald Jacinto Hernández

Comisión de Economía y Finanzas

Presidenta: Dra. Ana María Osorio Anaya

Comisión de Publicaciones

Presidenta: Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón

Comisión de Actuaciones Científicas

Presidenta: Mg. Fernando Carrasco Solís

INSTITUCIONES Y EMPRESAS PROTECTORAS DE LA
SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

CONTENIDO
(Vol. 89 – N° 1 – 2023)

Trabajos Originales

- Caracterización del aceite esencial de *Clinopodium revolutum* y estudio computacional de sus compuestos bioactivos contra el cáncer, por Renéé Isabel Huamán Quispe, Jesús Alvarado-Huayhuaz, Karina dos Santos Machado, Ana Valderrama Negrón 1 – 13
- Estudio liquenoquímico del liquen *Hypotrachyna cirrhata*, por Derin Benites Samamé, Nino Castro Mandujano, Marco Guerrero Aquino 14 – 29
- Hydrogeochemical analysis of surface water quality in a minig area on the Andes Western range, por Christ Jesus Barriga Paria, Alexis junior Quispe Vargas, Jamil Jesus Quispe Vilca, John Steve Anthersson Quiroz Pacho, Dario Vrayan Quispe Gomez, Pablo Ramos Mamani 30 – 48
- Polifenoles y actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss y su aplicación en una crema dermatocósmética, por Jorge Rojas Valdivia, Américo Jorge Castro-Luna, Norma Julia Ramos-Cevallos, Donald Ramos-Perfecto, Mario Alcarraz-Curi, Jacqueline Segura-Vasquez, Danny Cáceres-Antaurco 49 – 67
- Reconocimiento molecular de complejos de desferrioxamina con aluminio, galio y hierro en el receptor Fhuc: un estudio *in Silico*, por Jesús Alvarado-Huayhuaz, Wilmar Puma Zamora, Atualpa C. Braga, Ana Cecilia Valderrama Negrón 68 – 88

Revista Arbitrada

Derechos reservados: Prohibido el uso total o parcial del material de esta revista sin indicar la fuente de origen.

Nota: Las referencias comerciales que aparecen en los trabajos no constituyen una recomendación de la Sociedad Química del Perú.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La Revista de la Sociedad Química del Perú publica trabajos originales e inéditos de carácter científico, tecnológico y técnico en el campo de las ciencias químicas. La Revista acepta preferentemente los trabajos que expresen resultados valiosos, producto de las investigaciones científicas básicas o aplicadas, así como, los de divulgación que, por su importancia y la claridad de su exposición, constituyan un material valioso para la comunidad científica y tecnológica.

La Revista, en formato impreso o electrónico, está dividida en las siguientes secciones: artículos de investigación, comunicaciones cortas, cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y divulgación.

Los trabajos son recibidos por el Comité Editorial, quien revisará cumplan con las “Instrucciones para los autores”, la ortografía y redacción (incluida la puntuación). A continuación, pasa a la Comisión de Publicaciones y Árbitros para que se pronuncien sobre el contenido científico. Si existen observaciones se comunicará al autor corresponsal para que se proceda a levantar dichas observaciones.

Los artículos de investigación son el resultado de un trabajo experimental o teórico, producto de una investigación científica o tecnológica, que aporta un nuevo conocimiento. Se recomienda una extensión entre 10 a 15 páginas a espacio y medio.

Las comunicaciones cortas son trabajos cuya extensión no debe ser mayor a 4 páginas a espacio simple, escritas bajo las mismas características que un artículo de investigación. Están referidos a trabajos cortos concluidos, pero en los que hay urgencia en su publicación.

Las cartas al editor son comunicaciones que brindan la oportunidad para discutir, criticar o ampliar algunos puntos sobre los trabajos publicados en la Revista. Su extensión no debe exceder una hoja a espacio simple.

Los trabajos de revisión se basan en recopilaciones bibliográficas de temas en los que el autor tiene amplia experiencia. La Comisión de Publicaciones encomendará estos trabajos a especialistas en la materia.

Los artículos de enseñanza de la química son aquellos que proporcionan, en especial a los profesores y alumnos, una nueva visión, interpretación o aclaran los conceptos, teorías o experimentos químicos. Los requisitos que deben tener son: originalidad, importancia pedagógica, relevancia y claridad.

Las notas informativas corresponden a temas que no están relacionados a una investigación, pero son artículos que merecen ser divulgados, por ser de gran interés para la comunidad química.

Los autores de los trabajos publicados son los únicos responsables de la autenticidad y opiniones expresadas en los mismos. Todos los autores de un artículo deberán firmar una carta de presentación del trabajo como garantía de haber participado activamente en la investigación y redacción del artículo. Todas las comunicaciones entre la Comisión de Publicaciones y el autor corresponsal se realizarán vía correo electrónico. El autor corresponsal deberá responder los correos electrónicos en el plazo que se señale.

Los autores enviarán sus artículos al correo electrónico revsqperu@gmail.com a la Comisión de Publicaciones, junto con una carta dirigida al editor y abonarán 30 soles (autores nacionales) ó 30 dólares (autores extranjeros) por concepto de gastos administrativos (por revisión del artículo), como adelanto del pago de la publicación, no reembolsables.

La publicación de cada trabajo está sujeta al pago de las siguientes sumas:

Cuando todos los autores son socios: S/ 120.00

Cuando todos los autores no son socios: S/ 200.00

Si entre los autores hay socios y no socios: S/ 150.00

Si los autores residen en el extranjero US \$ 110.00

Cuando el número de autores es superior a 3 se añadirá, además, S/ 30.00 por cada autor en exceso.

Si el trabajo es enviado del extranjero, será US \$ 15.00 más por cada autor en exceso.

Por exceso de correcciones de estilo se cobrará después de la segunda, un mínimo de S/ 30.00.

The publication of each work is subject to payment of the following ones:
When all the authors are partners of the Peruvian Chemical Society: S/ 120.00
When all the authors are not partners: S/ 200.00
If among the authors there are partners and non partners: S/ 150.00
If the authors reside abroad US \$ 110.00

When the number of authors is superior at 3 it will be paid, also, US \$ 15.00 for each author in excess.

Formato para los artículos

Baje la plantilla de artículo. Los autores pueden solicitar la plantilla de artículo al correo electrónico revsqp@gmail.com

1. El texto completo, debe ser escrito en formato Microsoft Word, tamaño de página A4. Márgenes; izquierdo 3 cm, derecho 3 cm, superior 3 cm, inferior 3 cm. Espacio 1 1/2, fuente Times New Roman, estilo de fuente regular (salvo indicación contraria), color de fuente negro (texto y gráficos) y tamaño de fuente 12. Se imprimirá de manera vertical. Todo el texto, excepto el título, debe estar alineado a la derecha y a la izquierda (usar la opción "justificar"). Los decimales deben llevar coma.
2. Los idiomas de publicación son español e inglés.
3. El título del trabajo, que debe ser **breve y claro**, en español y en inglés (este último antes del abstract) se escribe con tamaño de fuente 16, centrado y en negritas. Los nombres completos de los autores aparecerán a continuación con tamaño de fuente 12, el autor corresponsal se identificará con un asterisco. Las instituciones de la cual proceden los autores se escriben con tamaño de fuente 10 e irán a pie de página, donde también sólo el autor corresponsal colocará su correo electrónico después de la dirección postal completa de su institución.
4. Se presentarán dos resúmenes, uno en español y otro en inglés (Abstract), con una extensión aproximada entre 50 y 200 palabras. Las palabras Resumen y Abstract se escriben con tamaño de fuente 14, centrado y en negrita. Además, después del Resumen se deberá incluir entre 3 y 6 palabras clave, en español. Tanto Palabras clave como Key words se escriben a la izquierda del texto, con tamaño de fuente 12 y en negrita.).
5. Deberá respetarse las normas internacionales referentes a la nomenclatura, símbolos y sistemas de medida. Los nombres científicos de género y especie van en cursiva (itálica).
6. El caso de artículos originales y comunicaciones cortas, el texto debe contener las siguientes secciones: Introducción, Parte Experimental, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias. Éstas se escriben con tamaño de fuente 14, en negritas y centradas. Las cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y notas informativas, tendrán las secciones que el autor crea más conveniente.
7. Las tablas, figuras y esquemas, que no deben ser mayores que una página A4, tienen numeración arábica seguido de punto. A continuación, se coloca la leyenda que explique su significado. La numeración y leyenda en una tabla, cuyo formato debe ser básico 1, se colocan en la parte superior a diferencia de las figuras y los esquemas que se ubican en la parte inferior. Las figuras deben ser originales y de alta resolución.
8. Las tablas, fotos, figuras y esquemas deben estar incluidos en el documento de Microsoft Word.
9. Las referencias, se citan en el texto correlativamente como superíndice. El número de estas referencias no debe ser excesivo. Deberían fluctuar entre 7 y 15. La sección Referencias se escribe con tamaño de fuente 14, centrado y **en negrita**. Las abreviaturas de las revistas se escribirán según el Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) y List of Journals Indexed in Index Medicus, (<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html>) Las referencias citadas se escribirán con el tamaño de fuente 10 y se seguirá el estilo de Vancouver.

CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *CLINOPODIUM REVOLUTUM* Y ESTUDIO COMPUTACIONAL DE SUS COMPUESTOS BIOACTIVOS CONTRA EL CÁNCER

Reneé Isabel Huamán Quispe^a, Jesús Alvarado-Huayhuaz^a, Karina dos Santos Machado^b, Ana Valderrama Negrón^{*a}

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. La búsqueda de compuestos bioactivos contra el cáncer se potencia con el uso de herramientas computacionales y las bases de datos moleculares. *Clinopodium Revolutum* (CR) es una planta empleada con fines medicinales en diferentes males, sin embargo, hacen falta mayores estudios científicos que respalden su bioactividad. En este trabajo se analizan 55 componentes en el aceite esencial de CR, identificados por GC-MS, con potencial actividad anticancerígena mediante estudios *in silico*. Se seleccionaron los receptores de fármacos anticancerígenos, como la quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK-2), la quinasa dependiente de ciclina 6 (CDK-6), la topoisomerasa-I (Topo I), la topoisomerasa-II (Topo II), el linfoma B de células (Bcl-2) y el receptor 2 del factor crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2). Todas estas estructuras fueron obtenidas del banco de datos de proteína PDB RCSB. Según las simulaciones de docking molecular se encontró que los compuestos perilaldehído y calamenene del aceite esencial presentaron mayor afinidad de interacción con las dianas farmacológicas CDK-2, CDK-6, Topo I y VEGFR. Los complejos de perilaldehído-receptor se simularon mediante dinámica molecular por 50 nanosegundos, identificando predominantemente interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno mediados por agua del solvente. Nuestros hallazgos muestran que los compuestos en el aceite esencial de CR presentan potencial actividad anticancerígena.

Palabras clave: *Clinopodium revolutum*, cáncer, docking molecular, dinámica molecular.

CHARACTERIZATION OF THE ESSENTIAL OIL OF *CLINOPODIUM REVOLUTUM* AND COMPUTATIONAL STUDY OF ITS BIOACTIVE COMPOUNDS AGAINST CANCER

ABSTRACT

Cancer is one of the main causes of death worldwide. The search for bioactive compounds against cancer is enhanced by the use of computational tools and molecular databases. *Clinopodium Revolutum* (CR) is a plant used for medicinal purposes in various ailments; however, further scientific studies are needed to support its bioactivity. In this work, 55 components in the essential oil of CR are analyzed, identified by GC-MS, with potential

^a Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima, Perú, anitacvn29@yahoo.com.mx.

^b COMBI-Lab, Grupo de Biología Computacional, Centro de Ciências Computacionais, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil

anticancer activity through *in silico* studies. Anticancer drug receptors were selected, such as cyclin-dependent kinase 2 (CDK-2), cyclin-dependent kinase 6 (CDK-6), topoisomerase-I (Topo I), topoisomerase-II (Topo II), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2). All these structures were obtained from the Protein Data Bank RCSB. According to molecular docking simulations, it was found that perilaldehyde from the essential oil showed higher interaction affinity with the pharmacological targets CDK-2, CDK-6, Topo I, and VEGFR. Perilaldehyde-receptor complexes were simulated by molecular dynamics for 50 nanoseconds, identifying predominantly hydrophobic interactions and hydrogen bonds mediated by solvent water in their stabilization. Our findings demonstrate that the compounds in the essential oil of CR present potential anticancer activity.

Keywords: *Clinopodium revolutum*, cancer, molecular docking, molecular dynamics.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. De acuerdo con el instituto nacional de enfermedades neoplásicas INEN, en el Perú la incidencia de cáncer en hombres y mujeres se ha incrementado en un 40 % en el periodo del 2020 al 2021, siendo mayor el número de casos provenientes del interior del país. Las neoplásicas más frecuentes en la población son; el cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal y tiroides ¹.

Hoy en día, los productos naturales son una importante fuente rica en compuestos bioactivos con gran potencial terapéutico. Por ejemplo, la camptotecina y el taxol (paclitaxel) aislados de *Camptotheca acuminata* y *Taxus brevifolia* respectivamente., siguen siendo los muy importantes en la terapia contra el cáncer desde que sus mecanismos fueron descubiertos, por ejemplo, la camptotecina es capaz de intervenir en el proceso de replicación y transcripción del ADN a través de la formación del complejo topoisomerasa-ADN provocando la muerte celular. Por otro lado, el taxol se une a los microtúbulos causando una catástrofe mitótica en las células cancerosas ^{2,3}

Dada la gran variedad de plantas medicinales, la familia lamiaceae incluye una gran diversidad de especies con actividad farmacológica apreciable. Generalmente las especies de esta familia se caracterizan por ser arbustos de olor aromático ricos en compuestos de gran valor medicinal, esto debido a que cada especie perteneciente a esta familia posee una gran diversidad de metabolitos secundarios con buenas propiedades antibacteriales, antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales y anticancerígenas ⁴. Dentro de las lamiaceae algunos metabolitos secundarios que podemos encontrar son los polifenoles; como: los ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos, ligninas, cumarinas, antraquinonas y xantonas; que en el cuerpo exhiben importantes propiedades antioxidantes, antivirales, antifúngicas y anticancerígenas ⁵.

Los polifenoles son capaces de causar la muerte de células cancerosas a través de varios mecanismos apoptóticos ⁶. Los terpenoides son otro grupo de metabolitos secundarios que poseen importantes aplicaciones medicinales, los cuales se clasifican de acuerdo al número de unidades isopreno en; monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos y triterpenos, y además son el componente principal de los aceites esenciales ⁷. El papel

de los terpenos en la terapia contra el cáncer ha cobrado una gran importancia en los últimos años, debido a su poder antitumoral, antiproliferativo, apoptótico, antiangiogénico y antimetastático^{8,9}.

Por otro lado, los aceites esenciales son mezclas complejas compuestas por sustancias orgánicas volátiles, lipídicas y de olor fuerte. Generalmente los aceites esenciales presentan en su composición terpenoides (monoterpenos, monoterpénos oxigenados, sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados, diterpenos), fenilpropanoides y compuestos fenólicos¹⁰. Los aceites esenciales son ampliamente utilizados en la industria de alimentos¹¹, pesticidas¹² y farmacéutica¹³ y cosméticos, fragancias¹⁴. De esta amplia gama de aplicaciones, en los últimos años se han estudiado sus actividades anticancerígenas¹⁵. Compuestos como el mentol, mentona, carvona, piperitenona, pulegona, terpinel-4-ol, α -tujona, 1,8-cineol, β -citronelal, geraniol, linalol, alcanfor, borneol, α -pineno, β -pineno, E,E-farnesol, óxido de cariofileno, espatulanol, γ -eudesmol, germacreno D, humuleno, δ -cadineno, timol, carvacol, cinamato de metilo son algunos ejemplos de los compuestos anticancerígenos presentes en los aceites esenciales de las extraídos de diferentes especies de la familia *Lamiaceae*¹⁶.

Entre los receptores biológicos anticancerígenos mayormente estudiados se encuentran; los inhibidores de quinasa dependientes de ciclina CDK, que son una familia de serina/treonina quinasa que actúan como proteínas reguladoras de los puntos de control durante el ciclo celular, conformado por; el crecimiento celular (G1), la replicación del ADN (S), mayor crecimiento y preparación para la fase final (Gap 2) y segregación cromosómica y división celular o mitosis (M)¹⁷. En resumen, la proteína quinasa 2 CDK-2 controla la fase G1/S y CDK-6 controla la fase G1 y la transcripción de la proteína retinoblastoma (Rb), ambas son responsables de regular la proliferación celular¹⁸. Los receptores de topoisomerasa I (topo I) y topoisomerasa II (topo II), son enzimas nucleares que catalizan la introducción de cambios topológicos en el ADN, es decir que durante la replicación y transcripción del ADN, la topo I y Topo II actúan como liberadores de tensión mediante la formación de rupturas transitorias monocatenarias y bicatenarias en la doble hélice del ADN, por lo cual las topoisomerasas son esenciales en la proliferación celular^{19,20}. Por otro lado existen reguladores apoptóticos encargados de mantener la homeostasis de los tejidos del cuerpo a través de la muerte celular programada, el cual es un proceso fisiológico que permite el recambio celular²¹. Sin embargo los reguladores apoptóticos que se encuentran en la familia BCL-2, son las responsables de modular el umbral de respuesta a una amplia variedad de estímulos apoptóticos implicados en varios tipos de carcinomas humanos^{22,23}. En cambio el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF y sus receptores VEGFR son indispensables en el proceso de regulación de la vascularización y angiogénesis^{24,25}. La unión VEGF/VEGFR-2 activa las vías de señalización en la angiogénesis, siendo el VEGFR-2 el principal receptor de VEGF²⁶. VEGFR-2 es el receptor de tirosina quinasa transmembrana que se correlaciona con la proliferación, división, motilidad, adhesión y angiogénesis celular, cuyo bloqueo inhibe la proliferación de células cancerosas²⁷.

Hoy en día los estudios *in silico* son una poderosa herramienta en la búsqueda de nuevos fármacos y elucidación de mecanismos de unión ligando-proteína. Estudios de acoplamiento molecular de los compuestos identificados en aceites esenciales han mostrado importantes aportes en cuanto a su potencial anticancerígeno. Compuestos

como (*E*)-*Z*-Farnesylacetone identificado en el aceite de *I. viscosa* demostró potencial poder antiangiogénico con una buena afinidad en los receptores VEGFR^{28,29}

C. revolutum (Ruiz & Pav.) Govaerts es un especie de la familia lamiaceae comúnmente conocida como “flor de arena” encontrada en la sierra de Huánuco-Perú a 3770 m.s.n.m.³⁰. Generalmente la flor de arena es usada para tratar problemas gastrointestinales, hepáticos y cálculos biliares. Hasta la fecha, son pocos los estudios realizados en esta especie, por lo que en la presente investigación se ha realizado el estudio *in silico* de los componentes químicos identificados en el aceite esencial de CR como posibles agentes con potencial anticancerígeno frente a seis receptores biológicos (CDK-2, CDK-6, Topo I, Topo II, BCL-2 y VEGFR-2), los cuales cumplen funciones clave en el ciclo celular, crecimiento celular y replicación del ADN empleando cálculos de acoplamiento y dinámica molecular.

PARTE EXPERIMENTAL

La Figura 1 resume la metodología desarrollada y en seguida se detalla en extenso cada uno de los puntos.

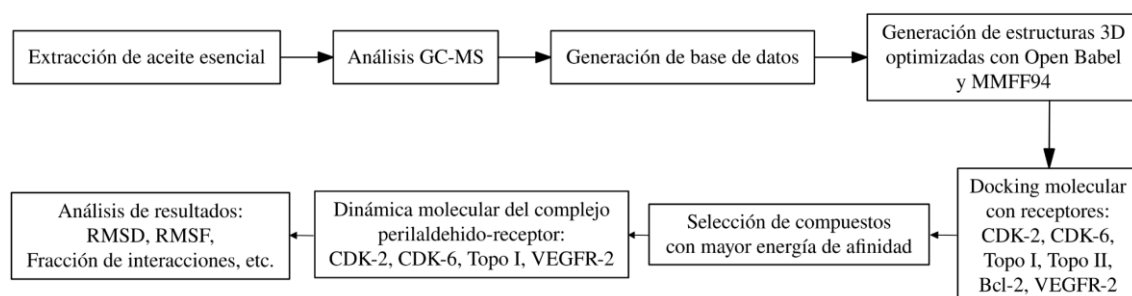


Figura 1. Resumen de la metodología.

Extracción del aceite esencial

Las hojas secas (13 Kg) de CR se sometieron a extracción por arrastre de vapor de agua. La mezcla de aceite-agua fue separada por diferencia de densidades, se adicionó sulfato de sodio para remover la humedad, seguidamente fue almacenado en un frasco ámbar a 4°C hasta su uso.

Análisis GC-MS

El análisis de los compuestos químicos del aceite esencial de CR fue realizado en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent 5975B) del laboratorio de cromatografía de la universidad San Antonio Abad del Cusco. Se inyectó 0.1 uL del aceite esencial de CR en modo Split (100:1), a una columna capilar de fenil metil silioxano (25 m x 0.25 mm i.d., 0.5 um film thickness). La temperatura del horno inicialmente fue programada a 60°C con incrementos de 5°C/ min hasta llegar a 230 °C. Se empleó helio (1ml/min) como gas de arrastre. La energía de ionización por impacto de electrones fue de 70 eV, con 38 min como tiempo de ejecución. Los componentes de CR fueron identificados a través de la comparación de los espectros de masa de cada pico con los de la biblioteca de espectros de masa proporcionados por el

NIST 11 (The National Institute of Standards) a través del software MSD Chemstation B.030 (Agilnet).

Generación de base de datos

Los compuestos identificados fueron documentados en su representación SMILES empleando el repositorio PubChem. Se generaron las estructuras 3D de los compuestos empleando Open Babel 2.4.1 y luego se optimizaron las estructuras con mecánica molecular empleando el campo de fuerza MMFF94 para ser utilizadas en la siguiente etapa.

Docking molecular

En las simulaciones de docking molecular fueron considerados como ligandos los 55 compuestos de la base de datos, que se encuentra disponible en <https://bit.ly/3YRLqyv>. Como dianas farmacológicas en este estudio se consideraron los receptores CDK-2, CDK-6, Topo I, Topo II, Bcl-2 y VEGFR-2, con código identificador: 1DI8, 1XO2, 1T8I, 1ZXM, 2O2F y 2OH4, respectivamente, obtenidos de la base de datos de proteínas (<https://www.rcsb.org/>).

Los receptores fueron pretratados con Wizard de la suite Schrödinger, donde se eliminaron aguas de cristalización y otras moléculas co-cristalizadas. Para aproximar la simulación *in silico* a un sistema real, se editó el estado de protonación en los seis sistemas según el pH 7.4 con PropKa y se empleó el campo de fuerza OPLS para minimizar la energía del sistema. Se generó el grid box empleando cada ligando co-cristalizado como centro de una caja cúbica con 20 Å de arista. El acoplamiento molecular fue realizado con Glide de la suite Schrödinger en modo extra precisión.

Simulaciones de dinámica molecular

Se realizaron simulaciones de dinámica molecular para evaluar la estabilidad de los mejores acoplamientos encontrados en la etapa anterior. Cuatro receptores fueron seleccionados: CDK-2, CDK-6, Topo I y VEGFR-2. La dinámica molecular fue realizada con el programa Desmond. La caja de simulación consistió en una caja ortorrómbica con aristas que distan 10 Å de la parte más externa del receptor, se adicionaron moléculas de agua usando TIP3P como modelo de solvente, iones de sodio y cloro para neutralizar el sistema y se estableció una concentración salina de 0.150 M. Con el campo de fuerza OPLS3 se equilibró el sistema con los ensambles isotérmico-isocórico e isobárico-isotérmico, a temperatura 310K con el termostato de Nosé-Hoover y una presión de 1.01325 bar con el baróstato de Martyna-Tobias-Klein, por 10 y 20 ps, respectivamente. Con este sistema equilibrado se realizó la etapa de producción de 50 ns, manteniendo constante el número de partículas, la temperatura (310K) y la presión (1.0 bar) (NPT), con la configuración predeterminada de relajación antes de la simulación. La animación de la trayectoria fue generada con 1000 frames por sistema. Se usó el módulo SID (Simulation interactions diagram) para la generación de la desviación cuadrática media (RMSD), fluctuación cuadrática media de la proteína (RMSF), diagrama de barras de la fracción de interacciones, diagrama de contactos ligando-proteína y propiedades del ligando (Ligand-RMSD, radio de giro, interacciones intramoleculares, área de superficie molecular, área de la superficie accesible al solvente y área de la superficie polar). Los cálculos con la suite Schrodinger fueron realizados en LIBIPMET de la Universidad

Nacional de Ingeniería y en el Centro de Ciencias Computacionales de la Universidade Federal do Rio Grande (FURG) en Brasil.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción del aceite esencial

De la extracción del aceite esencial de CR, se obtuvo un líquido amarillo pálido translucido (d: 0.912 g/ml), (I.R: 1.4864), cuya composición química se detalla en la tabla N°1.

Tabla 1. Composición química del aceite esencial encontrado en CR

N°	Tiempo de retención	Compuesto	Contenido relativo (%)
1	4.97	β -Tujeno	0.89
2	5.15	α -Pino	9.80
3	5.45	Canfeno	0.24
4	6.02	Sabineno	10.53
5	6.14	β -Pino	18.64
6	6.35	β -Mirceno	0.50
7	7.01	(+)-4-Carene	0.36
8	7.20	p-Cimeno	0.50
9	7.33	D-Limoneno	3.77
10	7.40	Eucaliptol	0.14
11	7.51	(E)- β - ocimeno	1.14
12	7.78	(Z)- β - ocimeno	0.69
13	8.09	γ -Terpineno	1.15
14	8.33	Cis- β - Terpeneol	0.16
15	8.88	α - Terpinoleno	0.25
16	9.17	Linalol	0.19
17	9.28	1-nonanal	0.11
18	9.48	1-octen-3-il-acetato	0.38
19	9.83	Ácido octanóico, éster metílico	0.26
20	10.65	6-octenal, 3,7-dimetil-, (R)-	0.37
21	10.71	(-)- Mentona	0.12
22	10.99	Pinocarvona	0.06
23	11.38	4- Terpeneol	0.33
24	11.75	α - Terpeneol	0.09
25	12.11	Decanal	0.07
26	12.62	Ácido nonanoico, éster metílico	0.09

27	12.76	(R)- Citronelol	0.06
28	13.13	(+)-Pulegona	0.08
29	13.66	(R)-(+)-citronelato de metilo	0.41
30	14.11	(-)- Perilaldehído	0.05
31	16.19	α -Cubebene	4.17
32	16.92	Copaeno	2.93
33	17.17	(-)- β - Borboneno	0.50
34	17.31	β - cubebene	6.37
35	17.72	Calamenene	0.10
36	17.84	α -Gurjunene	0.45
37	18.16	Cariofileno	10.78
38	18.35	β -coapeno	0.23
39	18.74	α -Selineno	0.05
40	18.99	Humuleno	0.44
41	19.18	Aloaromadendreno	0.25
42	19.51	(+)- Calarena	0.15
43	19.76	(E)-Germacreno	10.36
44	19.86	β - Selineno	0.63
45	20.00	Biciclo[4.4.0]dec-1-eno, 2- isopropil-5-metil-9-metileno-	0.25
46	20.12	1,5,5-trimetil-6-metileno- ciclohexeno	2.96
47	20.28	α -Farneseno	0.36
48	20.36	8-Isopropenil-1,5-dimetil- ciclodeca-1,5-dieno	2.57
49	20.58	4-epi-cubedol	0.8
50	20.75	(+)-delta-Cadineno	1.52
51	21.67	(E)-Nerolidol	0.07
52	21.91	Palustrol	0.06
53	22.14	(-)-espatulenol	0.27
54	22.29	Óxido de cariofileno	0.43
55	23.97	γ -pachulene	0.13

Docking molecular

Las energías de afinidad obtenidas son mostradas en gráficos de barras en la Figura 2, para los 10 compuestos principales. Se encontró a los compuestos (-)-perilaldehído y calamenene como los más frecuentes y con mayor afinidad en su respectivo receptor, siendo (-)-perilaldehído el mejor posicionado en cuatro receptores: CDK-2, CDK-6, Topo I VEGFR-2.

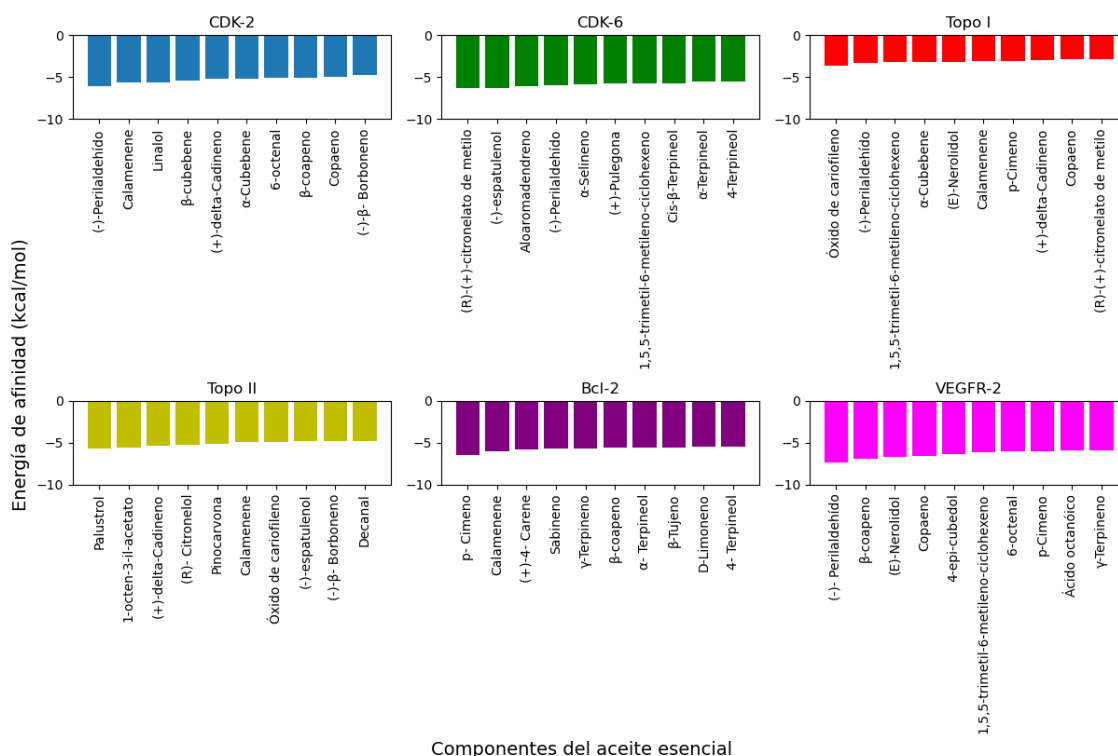


Figura 2. 10 principales complejos ligando-receptor en cada sistema (CDK-2, CDK-6, Topo I, Topo II, Bcl-2 y VEGFR-2) con respecto a su energía de afinidad.

Simulaciones de dinámica molecular

Se seleccionó al perilaldehído para las simulaciones de dinámica molecular por ser el componente con mayor potencial de efecto anticancerígeno multitarget en CR, según los resultados de docking molecular. Por lo tanto, los receptores seleccionados para esta etapa fueron CDK-2, CDK-6, Topo I y VEGFR, ya que en Topo II y Bcl-2, el ligando perilaldehído no aparece en el top 10 del docking molecular. Las trayectorias de las simulaciones de dinámica molecular pueden ser visualizadas en https://www.youtube.com/playlist?list=PLRMN3GUrx4qz4zm99sms4o5sY_2kWuB-G.

Los complejos ligando-receptor CDK-2, CDK-6 y VEGFR presentaron mayor estabilidad en comparación con Topo-I, de acuerdo con los resultados de la desviación cuadrática media (RMSD) mostrada en la Figura 3.

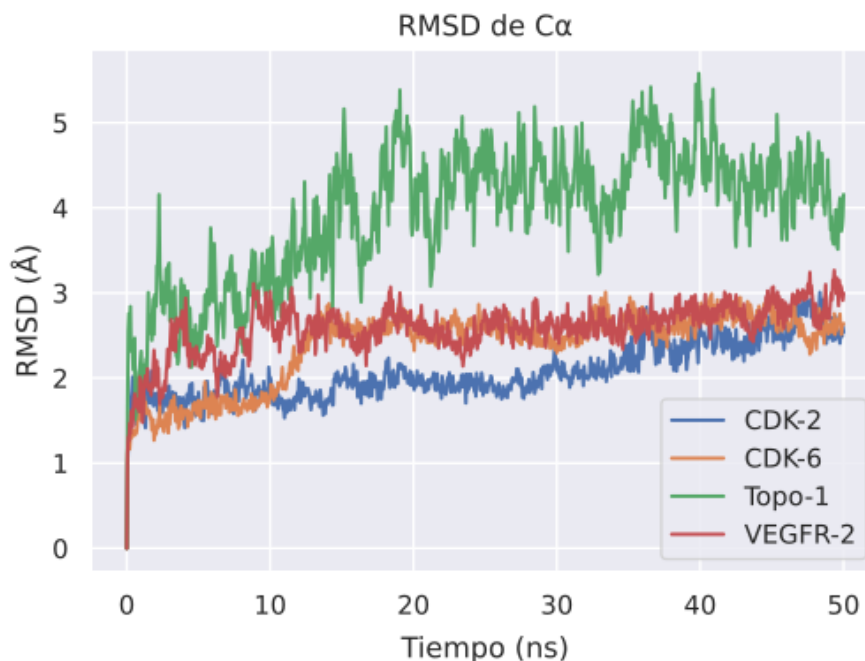


Figura 3. Desviación cuadrática media (RMSD) del C α de las simulaciones de dinámica molecular de perilaldehído con las proteínas CDK-2, CDK-6, Topo I VEGFR-2.

En general, los residuos presentan fluctuaciones relativamente bajas, de acuerdo con la desviación cuadrática media, en los puntos de contacto entre el ligando y el receptor, como se observa en la Figura 4 (líneas verdes verticales). Estudios relacionados con la búsqueda por cribado virtual y/o docking molecular de productos naturales con potencial actividad farmacológica muestran que valores promedio de estabilidad se encuentran por debajo de 2 y 6 Å, para RMSD y RMSF, respectivamente. Se observa en la Figura 5, que en CDK-2, CDK-6 y VEGFR-2 son predominantes las interacciones hidrofóbicas (barras moradas) y de acuerdo con el RMSD (Figura 3) y RMSF (Figura 4) podemos reconocer que estos complejos son más estables que el sistema perilaldehído-Topo I.

Este último complejo ya manifestaba una afinidad menor, como se observó en la Figura 2, sin embargo, esta energía de afinidad por encima de -5 kcal/mol, puede estar asociada con el relativo gran volumen en la cavidad del sistema proteína-doble hélice de ADN, cuando se elimina el ligando co-cristalizado en la etapa de pretratamiento.

El ligando (-)-perilaldehído por su gran afinidad con estas dianas farmacológicas en su sitio activo se perfila como el compuesto con mayor potencial anticancerígeno en el aceite esencial de CR.

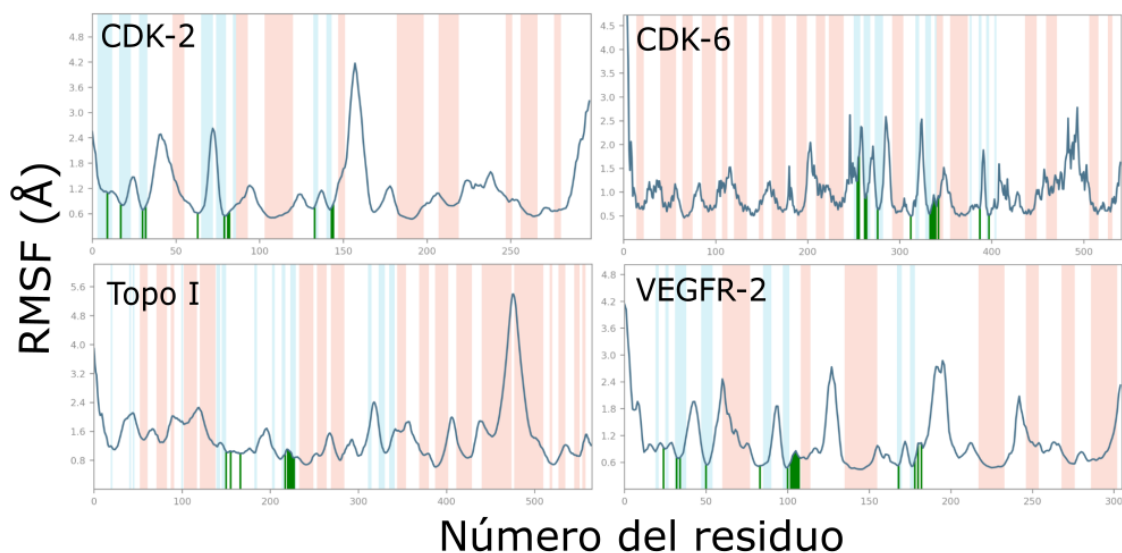


Figura 4. Fluctuación cuadrática media (RMSF) de los residuos en las simulaciones de dinámica molecular de perilaldehído con las proteínas CDK-2, CDK-6, Topo-I y VEGFR-2. Las líneas verdes indican los puntos de contacto entre el ligando y el receptor. Las regiones celestes y naranja indican estructuras beta y alfa, respectivamente.

Fracción de Interacciones

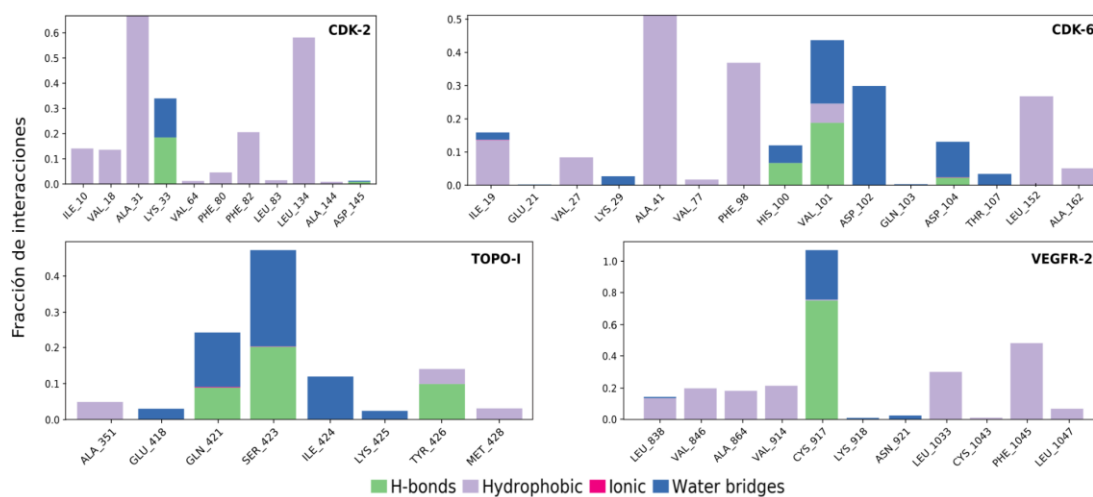


Figura 5. Fracción de interacciones intermoleculares de las simulaciones de dinámica molecular de perilaldehído con las proteínas CDK-2, CDK-6, Topo I VEGFR-2.

CONCLUSIONES

El aceite esencial de *Clinopodium Revolutum* posee propiedades medicinales promisorias contra el cáncer. En este trabajo se reportan 55 compuestos orgánicos en el aceite esencial de CR, obtenidos por GC-MS, de los cuales, (-)-perilaldehído muestra gran afinidad multitarget contra el cáncer, principalmente en las dianas farmacológicas CDK-2, CDK-6, Topo I VEGFR-2, donde mostró alta estabilidad de acuerdo a nuestros estudios computacionales. Estos hallazgos pueden dar continuidad al diseño y optimización de fármacos contra el cáncer mediante derivados de perilaldehído, calamenene, entre otros.

AGRADECIMIENTO

RIHQ y JAAH agradecen a FONDECYT (Convenio 237- 2015-FONDECYT) por el apoyo financiero otorgado a través de la beca de doctorado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vallejos-Sologuren CS. Situación del Cáncer en el Perú. Diagnóstico. 2020; 59 (2): 77–85.
2. Oberlies NH, Kroll DJ. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. *J Nat Prod.* 2004;67(2):129-35.
3. Huang M, Lu JJ, Ding J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Nat Prod Bioprospect.* 2021;11(1):5-13.
4. Nieto G. Biological Activities of Three Essential Oils of the Lamiaceae Family. *Medicines (Basel).* 2017;4(3):63. doi: 10.3390/medicines4030063.
5. Rasouli H, Farzaei MH, Khodarahmi R. Polyphenols and Their Benefits: A Review. *Int J Food Prop.* 2017; 20(S2): S1700-S1741.
6. Alam MN, Almoyad M, Huq F. Polyphenols in Colorectal Cancer: Current State of Knowledge including Clinical Trials and Molecular Mechanism of Action. *Biomed Res Int.* 2018;2018:4154185. doi: 10.1155/2018/4154185.
7. Joshee N, Dhekney SA, Parajuli P. *Medicinal Plants: From Farm to Pharmacy*; Springer International Publishing; 2019.
8. El-Baba C, Baassiri A, Kiriako G, Dia B, Fadlallah S, Moodad S, Darwiche N. Terpenoids' anti-cancer effects: focus on autophagy. *Apoptosis.* 2021; 26(9-10):491-511.
9. Kamran S, Sinniah A, Abdulghani MAM, Alshawsh MA. Therapeutic Potential of Certain Terpenoids as Anticancer Agents: A Scoping Review. *Cancers (Basel).* 2022;14(5):1100. doi: 10.3390/cancers14051100.
10. Jugreet BS, Suroowan S, Rengasamy RRR, Mahomoodally MF. Chemistry, bioactivities, mode of action and industrial applications of essential oils *Trends Food Sci Technol.* 2020; 101: 89–105.
11. Falleh H, Ben Jemaa M, Saada M, Ksouri R. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chem.* 2020; 330:127268. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127268.

12. Maes C, Bouquillon S, Fauconnier ML. Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. *Molecules*. 2019;24(14):2539. doi: 10.3390/molecules24142539.
13. Baptista-Silva S, Borges S, Ramos OL, Pintado M, Sarmento B. The progress of essential oils as potential therapeutic agents: a review. *J Essent Oil Res*. 2020; 32 (4): 279–295.
14. Sharmeen JB, Mahomoodally FM, Zengin G, Maggi F. Essential Oils as Natural Sources of Fragrance Compounds for Cosmetics and Cosmeceuticals. *Molecules*. 2021;26(3):666. doi: 10.3390/molecules26030666.
15. Abelan US, de Oliveira AC, Cacoci ÉSP, Martins TEA, Giacon VM, Velasco MVR, Lima CRRC. Potential use of essential oils in cosmetic and dermatological hair products: A review. *J Cosmet Dermatol*. 2022;21(4):1407-1418.
16. Adorjan B, Buchbauer G. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragr J*. 2010; 25 (6): 407–426.
17. Mesquita LSSD, Luz TRSA, Mesquita JWCD, Coutinho DF, Amaral FMMD, Ribeiro MNDS, et al. Exploring the anticancer properties of essential oils from family Lamiaceae. *Food Rev Int*. 2019; 35(2): 105–131.
18. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003;36(3):131-49.
19. Nurhayati APD, Lianingsih F, Indiani AM, Ghaissani SS. In Silico Study of Natural Pyridoacridine Against CDK- 2 and CDK-6 Cancer. *Eco Env Cons*. 2021; 27 (Special Issue): S25-S30.
20. Skok Ž, Zidar N, Kikelj D, Ilaš J. Dual Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II and Other Cancer-Related Targets. *J Med Chem*. 2020;63(3):884-904.
21. Şöhretoğlu D, Barut B, Sari S, Özel A, Arroo R. In vitro and in silico assessment of DNA interaction, topoisomerase I and II inhibition properties of chrysofenetin. *Int J Biol Macromol*. 2020;163:1053-1059.
22. Bai L, Wang S. Targeting apoptosis pathways for new cancer therapeutics. *Annu Rev Med*. 2014; 65:139-55.
23. Pena JC, Thompson CB, Recant W, Vokes EE, Rudin CM. Bcl-xL and Bcl-2 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 1999; 85(1):164-70.
24. Adefolaju-Gbenga A, Mwakikunga A. Lopinavir and Curcumin Directly Alters BAX/BCL2 and VEGF165b mRNA Levels to Suppress Human Squamous Cervical Carcinoma Cell Growth. *Int J Morphol*. 2019; 37(2): 584–591.
25. Wang X, Bove AM, Simone G, Ma B. Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8:599281. doi: 10.3389/fcell.2020.599281.
26. Liu G, Chen T, Ding Z, Wang Y, Wei Y, Wei X. Inhibition of FGF-FGFR and VEGF-VEGFR signalling in cancer treatment. *Cell Prolif*. 2021;54(4):e13009. doi: 10.1111/cpr.13009.
27. DaDakowicz D, Zajkowska M, Mroczko B. Relationship between VEGF Family Members, Their Receptors and Cell Death in the Neoplastic Transformation of Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(6):3375. doi: 10.3390/ijms23063375.
28. Modi SJ, Kulkarni VM. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR-2)/KDR Inhibitors: Medicinal Chemistry Perspective. *Med Drug Discov*. 2019; 2: 100009. doi: 10.1016/j.medidd.2019.100009.

29. Nadia B, Mesli F, Zahra BF, Merad-Boussalah N, Radja A, Muselli A, et al. Chemical composition variability and vascular endothelial growth factor receptors inhibitory activity of *Inulaviscosa* essential oils from Algeria. *J Biomol Struct Dyn*. 2022;40(8):3462-3480.
30. Serrano CA, Calsino B, Tupa AL, Huamán RI, Ludeña M, Rodríguez EF. Cuantificación de ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido rosmarínico en tres especies peruanas de *Clinopodium* (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae). *Arnaldoa*. 2016; 23 (1): 333 – 350.

ESTUDIO LIQUENOQUIMICO DEL LIQUEN HYPOTRACHYNA CIRRHATA

Derín Benites Samamé^a, Nino Castro Mandujano^{*a}, Marco Guerrero Aquino^a,

RESUMEN

El Perú es uno de los países más diversos del mundo, ya que contiene innumerables riquezas naturales esto es debido a una gran variedad de ecosistemas que lo hacen propicio para el desarrollo de ciertas especies entre ellas los líquenes; por ello es nuestro interés estudiar químicamente a los líquenes (liquenoquímica). En el presente trabajo se estudió el liquen *Hypotrachyna cirrhata*, recolectado en el distrito de Churín-Lima-Perú. Se realizaron las extracciones sucesivas fueron con metanol a partir de 150 g de muestra previamente acondicionada; los procesos de separación y purificación se realizaron mediante técnicas cromatográficas clásicas tales como Sephadex LH-20, cromatografía de columna, cromatografía en capa delgada con el fin de obtener los metabolitos secundarios puros, finalmente, elucidar sus estructuras químicas por RMN-1H. en esta investigación, a partir del extracto metanólico del liquen *Hypotrachyna cirrhata* fueron elucidados los compuestos: ácido protoliquesterínico, peróxido de ergosterol y 2,4-dihidroxi-3-hidroximetil-6metilbenzaldehido.

Palabras claves: *Hypotrachyna cirrhata*, ácido protoliquesterínico, peróxido de ergosterol.

LICHENOCHEMICAL STUDY OF THE LICHEN HYPOTRACHYNA CIRRHATA

Peru is one of the most diverse countries in the world, since it contains innumerable natural resources, this is due to a great variety of ecosystems that make it conducive to the development of certain species, including lichens; For this reason, it is our interest to study lichens chemically (lichenochemistry). In the present work, the lichen *Hypotrachyna cirrhata*, collected in the district of Churín-Lima-Peru, was studied. Successive extractions were made with methanol from 150 g of previously conditioned sample; the separation and purification processes were carried out using classical chromatographic techniques such as Sephadex LH-20, column chromatography, thin layer chromatography in order to obtain the pure secondary metabolites, and finally, to elucidate their chemical structures by 1H-NMR. In this investigation, from the methanolic extract of the lichen *Hypotrachyna cirrhata*, the following compounds were elucidated:

^a Facultad de Química e Ing. Química, UNMSM, Calle German Amezaga No. 375, Cercado de Lima, Lima, Perú. ocastron@unmsm.edu.pe

protoliquesterinic acid, ergosterol peroxide and 2,4-dihydroxy-3-hydroxymethyl-6-methylbenzaldehyde.

Keywords: *Hypotrachyna cirrhata*, protoliquesterinic acid, ergosterol peroxide.

INTRODUCCIÓN

El Perú ha sido reconocido como uno de los diecisiete países llamados megadiversos, por ser poseedores en conjunto de más del 70 % de la biodiversidad del planeta. La biodiversidad del Perú está representada por una gran variedad de ecosistemas, especies de flora y fauna, y diversidad genética, que han contribuido y contribuyen al desarrollo y la sostenibilidad mundial¹. Dentro de la gran variedad de flora peruana, tenemos a los líquenes. La liquenología (estudio químico de los líquenes) como campo de estudio en el Perú ha iniciado con el doctor en botánica Augusto Weberbauer², uno de los primeros investigadores de estas formas de vida, las cuales se pueden apreciar en su libro *el Mundo Vegetal de los Andes Peruanos* (1945). Sin embargo, a pesar de que varias especies de líquenes habían sido identificadas y otras utilizadas por la medicina tradicional, no fue hasta principios del siglo XX cuando la ciencia moderna se interesó por estos organismos, es por ello que estos organismos en el país aún no son tan conocidos. De acuerdo a Ramos³, solo se han reportado 924 especies de este organismo en todo el territorio, y que los estudios liquenoquímicos realizados sobre los líquenes peruanos en publicaciones científicas son muy escasos y gran parte de ellos no están identificados ni han sido estudiados.

Según su composición podemos decir que los líquenes son una asociación entre un hongo o micobionte y un simbiote fotosintético o fotobionte de cuya interacción origina un talo estable, con estructura y fisiología específicas⁴. Los líquenes tienen una amplia distribución geográfica, se encuentran desde los polos hasta el Ecuador; desde el nivel del mar hasta los picos más altos de las montañas y desde los sitios más húmedos como las selvas y los bosques hasta las zonas desérticas⁵, esto se puede deber a la gran adaptabilidad que poseen estos seres vivos, al modificar sus mecanismos fisiológicos dependiendo de las condiciones que haya en el entorno, permitiendo desarrollarse en lugares en que otros seres vivos no pueden.

A lo largo de los siglos, los líquenes se han utilizado para diversos fines, especialmente en la fabricación de colorantes, perfumes y remedios en medicinas populares⁶, en un principio sin conocimiento por parte de nuestros antepasados, pero debido al avance de la ciencia se descubrió que esto se debía a la presencia de los metabolitos existentes en estos organismos. Los líquenes son excepcionales en el reino vegetal, esto se debe a la alta concentración de metabolitos que pueden almacenar en su talo, se han descubierto

más de 800 metabolitos secundarios de líquenes, estos se han utilizado para muchas investigaciones referentes a aplicaciones fitoquímicas y farmacéuticas⁷, también son las únicas plantas conservadas en herbarios que resisten largos períodos de tiempo sin sufrir invasiones bacterianas o fúngicas, producto de la actividad antimicrobiana de muchas de las sustancias liquénicas⁸.

Entre los metabolitos liquénicos que también se presentan en otros organismos podemos citar aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, lactonas macrocíclicas, aromáticos monocíclicos, quinonas, cromonas, xantonas, terpenoides, esteroides y carotenoides. Entre los metabolitos hasta ahora aceptados como típicamente liquénicos se encuentran solamente dépsidos, depsidonas, depsonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos⁹.

Dentro de las investigaciones liquenoquímicas, tenemos la investigación del liquen *Psiloparmelia* distinta, realizado por Castro¹⁰, quien realizó el aislamiento, elucidación de las estructuras de los compuestos obtenidos, analizando sus espectros de IR, RMN-H, RMN-C, DEPT y EM; estos compuestos son: H (ácido 2-hidroxi-3-formil-4-etoxi-6-metil-benzoico), A (ácido fumarprotocetrárico). Por otro lado, Elix et al.¹¹ a partir de los extractos de diferentes líquenes caracterizaron con el uso de técnicas clásicas analíticas y espectroscópicas aislaron e identificaron estructuras de tres nuevas depsidonas: ácido decarboxi-alectorónico [3,8-di-hidroxy-1,6-di(2'-oxohepta1)-11 H-dibenzo[b,e] [1,4] dioxepen-1 lone] y ácido di- 0-metilfisódico [3,8-dimetoxy-11-0x0-1-(2'-oxoheptil)-6-pentil-11H-dibenzo[b,e][1,4]dioxepin-7-ácido carboxílico] y ácido subnorstictico (1,4,10- trihydroxy -8methyl- 3,7-dioxo-1,3 -dihydro-7H -isobenzofuro- [4,5-b][1,4]benzodioxepin-11-carbaldehido). En tal sentido, la presente investigación tuvo como objetivo, aislar y elucidar metabolitos secundarios del liquen *Hypotrachyna cirrhata* del distrito de Churín.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales. - Se utilizó los materiales básicos de laboratorio (vasos, bagueta, matraces, embudos, etc.), columnas cromatográficas (Sephadex, Sílica gel), cromatofolios de Sílica gel Merck 60 (70-230 mesh) y recipientes de vidrio varios volúmenes.

Reactivos. - Se utilizaron los siguientes reactivos: metanol (MeOH), acetato de etilo (AcOEt), hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetona (C₃H₆O) y etanol (EtOH), de grado analítico se adquirieron de Merck, para los espectros de RMN ¹H se utilizaron solventes deuterados acetona (C₃D₆O) y cloroformo (CDCl₃).

Equipos.- En los equipos se utilizó una balanza Analítica BOECO Germany BAS 31 de precisión 0,1 mg y capacidad 220 g, un molino Kinematica AG, maya 0.2 y fue conservado a -20 °C, el sonicador ELMA, Alemania con Frecuencia: 35 kHz; Potencia = 500 W, Tiempo = 30 min y modo = barrer, rotavapor Heidolph Hei-VAP value, la selladora al vacío Vacuubrand PC 3001 VARIOpro, una lámpara UV con Luz UV 254-

365 nm, el RMN ¹H Espectrómetro de Bruker Avance 400 MHz y el UHPLC-PDA-MS Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC sistema unido con un equipo Thermo Q exactive focus

Recolección del líquen. - Se realizó en dos oportunidades, primero para su identificación el 13 de enero del 2019, y luego para su análisis el 20 de abril del 2019, por el Dr. Olivio Nino Castro Mandujano. El lugar de colección de la especie fue en el margen izquierdo del río Huaura a 500 m de la plaza de la Comunidad Campesina de Picoy (2258 msnm), distrito de Churín, provincia de Oyón, del departamento de Lima.

Identificación taxonómica. - Una muestra representativa se envió a la ciudad de Arequipa, al herbario del Instituto Científico Michael Owen Dillon, Herbario Sur Peruano (HSP), para su identificación taxonómica.

Secado y Molienda. - El secado se realizó en una estufa a 40°C por 3 días, después de ello se procedió a moler con un molino de casa, para luego pasarlo por una malla N° 20, obteniendo finalmente, pequeñas partículas que pesaban en total 600 gramos aproximadamente¹².

Aislamiento de metabolitos

a) Extracción. -A partir de 150 g de líquen seco y molido, se sónico con aproximadamente 700 mL de MeOH grado analítico, a 25°C durante 30 minutos, se filtró y se reservó el filtrado, se adición 500 mL de MeOH sobre la muestra y se repitió el procedimiento unas 4 veces más. Los extractos combinados de MeOH se concentraron a sequedad con un rotavapor a 40°C (llamado Extracto EM)¹²

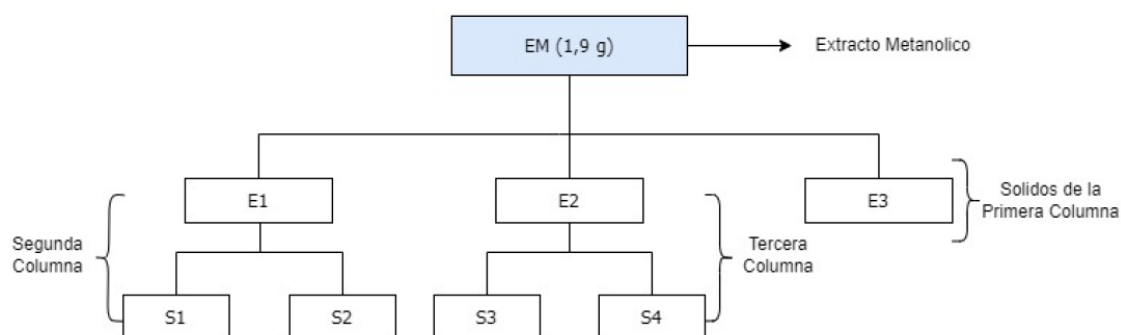


Figura 1. Separación del extracto metanólico.

Dónde: EM: Extracto Metanólico, E1: Sólido 1, E2: Sólido 2, E3: Sólido 3, S1: Subfracción 1, S2: Subfracción 2, S3: Subfracción 3, S4: Subfracción 4.

b) Separación y purificación. - La separación de los metabolitos secundarios, provenientes del extracto EM (1,9 g), se realizó usando las diferentes técnicas cromatográficas (CC y CCD), en varias etapas tal como lo podemos observar en la Figura 1, se empezó con la columna cromatográfica de exclusión molecular, Sephadex LH-20, con dimensiones acorde con la masa de la fracción y fase móvil de acuerdo a las necesidades, al final se obtuvo un sólido puro después de aplicar su análisis de CCD, este sólido se le llamó DB-HC-01. Luego, a partir de la subfracción S2, tal como se muestra en la Figura 2, se realizó otra CC, utilizando Sílica gel como fase estacionaria, a una proporción 1:40 (g extracto: g sílica) en medio de 400 mL de Hexano¹², después de varios análisis cromatográficos se encontró un sólido puro denominado DB-HC-02.

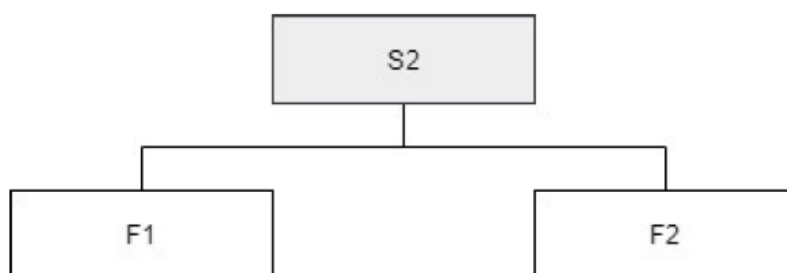


Figura 2. Separación de la fracción S2

Dónde: S2: Subfracción 2, F1: Subfracción 1 de la cuarta columna,
F2: Subfracción 2 de la cuarta columna.

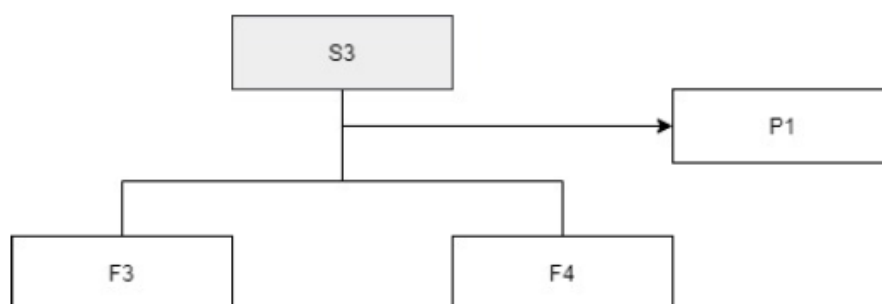


Figura 3. Separación de la fracción S3.

Dónde: S3: Subfracción 3, P1: Precipitado 1, F3: Subfracción 3 de la quinta columna,
F4: Subfracción 4 de la quinta columna

Por otro lado, se realizó una columna de sílica gel de la subfracción S3, utilizando sílica gel como fase estacionaria, a una proporción 1:40 (g extracto: g sílica) en medio de 400 mL de DCM. Luego, se procedió a realizar una placa en fase reversa MeOH-H₂O (1:1), se observó un compuesto puro, el sólido fue llamado DB-HC-03.

Los sólidos DB-HC-01, DB-HC-02 Y DB-HC-03 que se obtuvieron de las diferentes fases del proceso tuvieron que ser acondicionados previamente para ser enviados al

análisis espectroscópico, para ello en un vial se pesó una pequeña parte (<50 mg) del componente separado y purificado de la muestra líquénica, se añadió 5 mL de solvente en el cual será evaluado, luego se empleó el rotavapor para secarlo durante 4 o 6 horas. Una vez seco se diluye con 2 mL del solvente deuterado, con el cual será evaluado, se coloca 0,5 mL de la sustancia preparada con ayuda de una jeringa en un tubo de RMN para ser posteriormente evaluado en el equipo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Identificación taxonómica. - Este análisis botánico fue realizada por el Biólogo Daniel Ramos en las instalaciones del Herbario del Instituto Científico Michael Owen Dillon, “Herbario Sur Peruano” (HSP) y la clasificación taxonómica está en la tabla 1 y en la figura 4 tenemos imágenes del líquen.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del líquen

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Lecanoromycetes
Subclase	Lecanoromycetidae
Orden	Lecanorales
Familia	Parmeliaceae
Género	<i>Hypotrachyna</i>
Especie	<i>Hypotrachyna cirrhata</i>



Figura 4. Lique *Hypotrachyna cirrhata* (Fr.) Divakar, A. Crespo, Sipman, Elix & Lumbsch. (1) Lique en su ambiente natural, (2) Lique seco.

Elucidación estructural de metabolitos secundarios

a) Elucidación estructural del compuesto DB-HC-01.- El compuesto DB-HC-01, es un sólido de color marrón claro, que presentaba solubilidad en cloroformo, acetona. Para el análisis por RMN ^1H se disolvió en CDCl_3 , medido a una frecuencia de 400 MHz. en el Espectrómetro de Bruker Avance. En la Figura 5 se observa el espectro de RMN ^1H del compuesto DB-HC-01, que presenta los siguientes datos: A campo alto (desplazamiento menor) se pueden identificar los protones del grupo con menor desprotección, el cual es grupo metilo ($-\text{CH}_3$) como singulete a 0,865 ppm que se encuentra en el rango normal ya que está muy apantallado por la larga cadena de metilenos a la que se encuentra unido. La cadena de metilenos, muestra una señal de singulete a 1,231 ppm, esta señal muestra una gran intensidad debido a la cantidad de protones que representa [22H , $(\text{CH}_2)_{11}$]; el metileno unido a la cadena y al heterociclo (representado en la Figura 7 con el número 7) presenta una señal de 1,606 ppm, la cual se encuentra ligeramente desplazado de lo normal debido a que se encuentra unido a un heterociclo. De manera inversa el desplazamiento mayor se muestra a campos bajos y corresponde al que está unido heterociclo, el grupo metilideno ($=\text{CH}_2$), con su señal mostrado por dos dobletes a 6,403 y a 5,973 ppm, siguiendo en este orden decreciente se muestra la señal de un cuadruplete a 4,772 ppm, que representa al protón unido al carbono 4 que posee mayor desprotección debido a la cercanía del oxígeno del heterociclo.

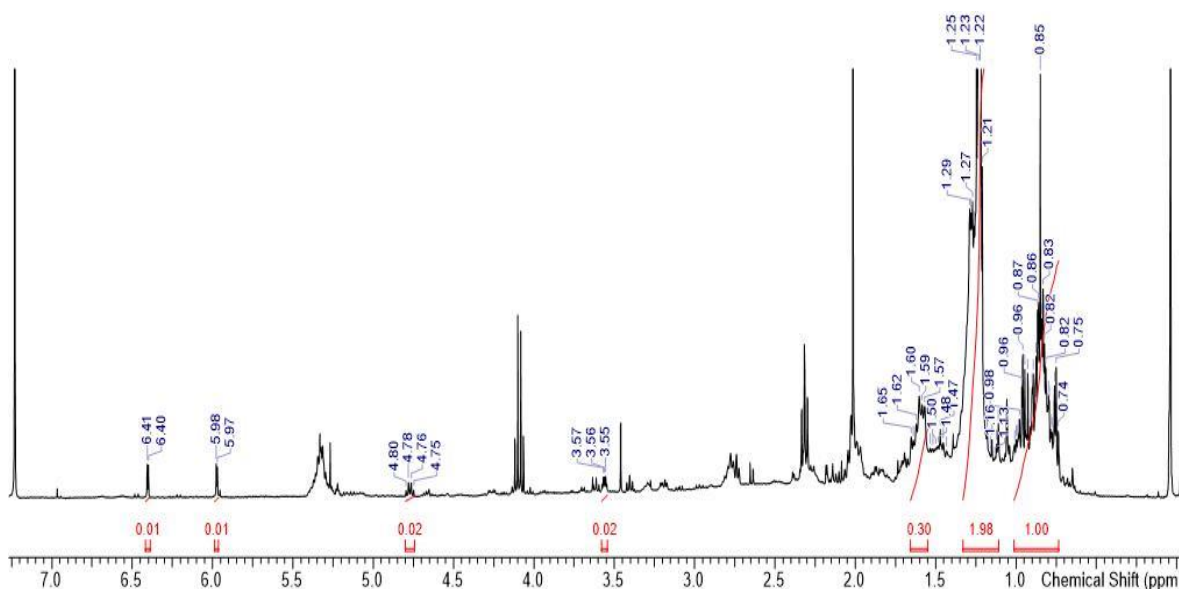


Figura 5. Espectro RMN ^1H del compuesto DB-HC-01 en CDCl_3 a 400 MHz.

Por último, la señal del protón del carbono 3 se muestra como un quintuplete a 3.561 ppm, este desplazamiento es debido a que el protón se encuentra en un entorno que presenta una alta densidad electrónica. En la Tabla 2, se toma en cuenta los datos experimentales del ^1H RMN y se comparan con los datos teóricos del Ácido Protoliquesterínico obtenidos por Huneck & Yoshimura¹³ y Kumar et al.¹⁴ de lo cual se observan valores muy cercanos a los obtenidos experimentalmente, con lo cual podemos afirmar que el compuesto DB-HC-01 se trataría del Ácido Protoliquesterínico, cuya estructura química lo observamos en la Figura 6.

Tabla 2. Comparación del espectro RMN ^1H (400 MHz) del compuesto DB-HC-01 en CDCl_3 y para el ácido protoliquesterínico.

Compuesto DB-HC-01	Desplazamiento δ (ppm)			Descripción
	Ácido protoliquesterínico			
	Huneck & Yoshimura, 1996 ¹³ 270 MHz, CDCl_3 : CD_3OD = 2: 1	Kumar et al. 2014 ¹⁴ 276 MHz, CDCl_3		
0,865	0,69	0.89	t, 3H, <i>Me-19</i>	
1,231	1,26	1.3-1.2	m, 22H, $-(\text{CH}_2)_{11}-$	
1,606	1,75	1.68	m, 2H, 1H, $-\text{CH}_2-7$	
3.561	3,60	-	ddd, 1H,s,6H,H-3	
4,772	4.84	4.81	q, 1H,H-4	
5,973	6.03	6.03	d, 1H,H-5	
6,403	6.39	6.43	d, 1H, <i>H-5</i>	
-	-	11.0	s, 1H,	

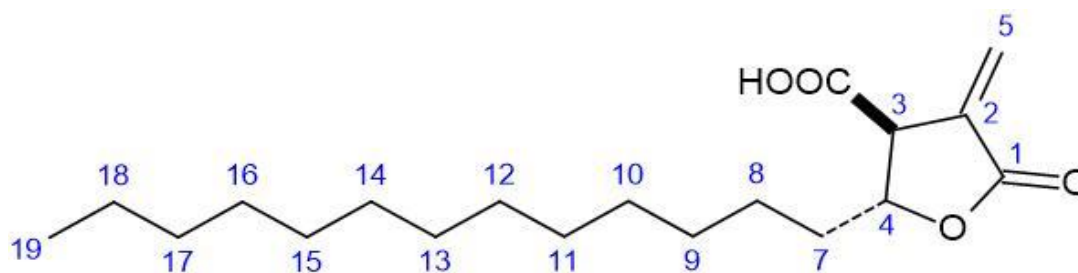


Figura 6. Estructura química propuesta para el compuesto DB-HC-01.

b) Elucidación estructural del compuesto DB-HC-02.- El compuesto DB-HC-02, es un sólido de color amarillo oscuro, que presenta solubilidad con el cloroformo. En la Figura 7 se muestra el espectro del compuesto del análisis por RMN ^1H que se disolvió en CDCl_3 , analizando el espectro observamos que el compuesto pertenece al grupo de los esteroides, ya que presenta los siguientes datos: A desplazamiento menor (campo alto) se pueden identificar seis señales de los protones del grupo metilo ($-\text{CH}_3$) con menor desprotección (cuatro del grupo metilo secundario y dos del grupo metilo terciario). Tal como se observa en la Figura 8, ampliación del espectro, para los grupos metilos secundarios las señales son dobletes, los cuales se muestran a 0,796; 0,836; 0,901 y 0,980 ppm, de manera similar los grupos metilo terciarios muestran señales de singletes a 0,822 y 0,883 ppm.

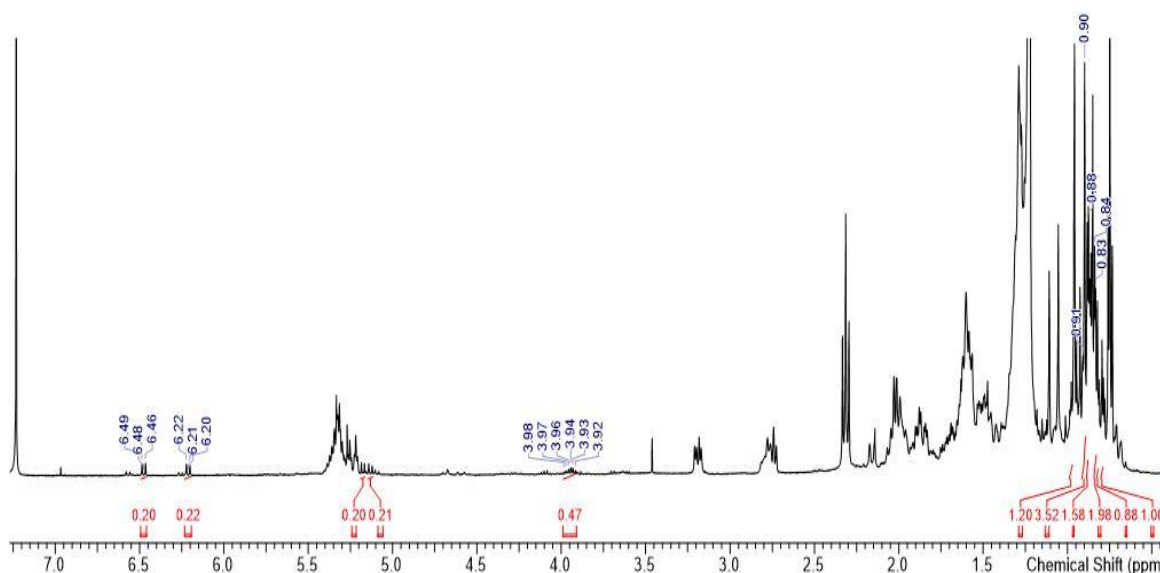


Figura 7. Espectro RMN ^1H del compuesto DB-HC-02 en CDCl_3 a 400 MHz.

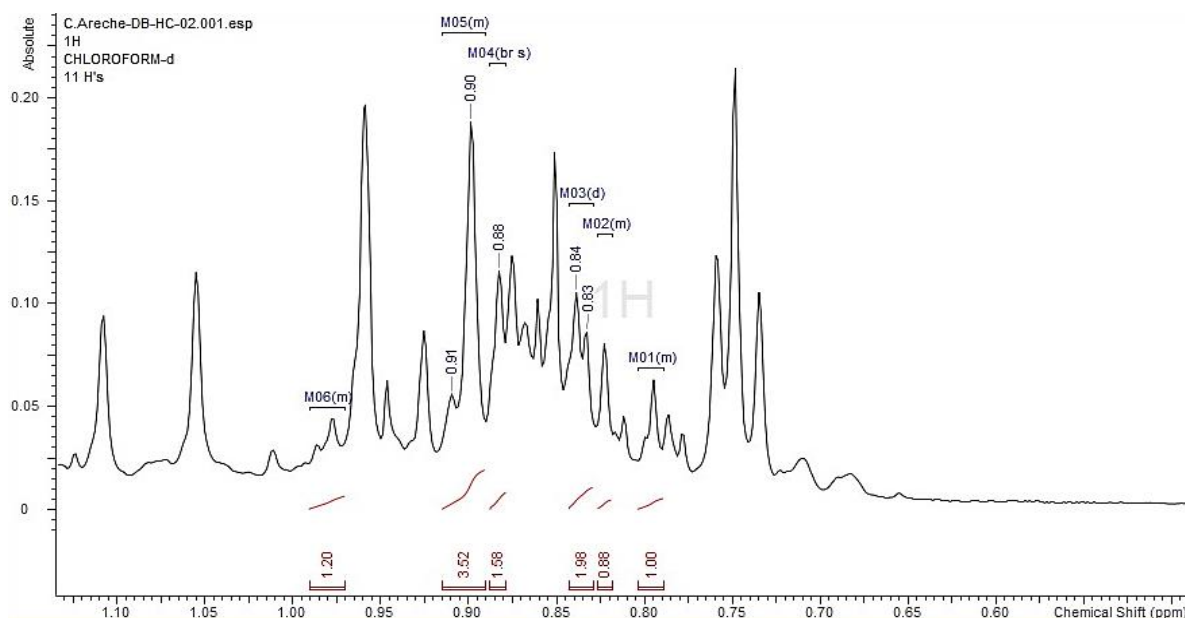


Figura 8. Ampliación 1 del espectro RMN ^1H del compuesto HC-DB-02.

Si continuamos escalando a mayores desplazamientos, llegamos a campo intermedio, en donde se apreció una señal multiplete, de seis picos, a 3.951 ppm del hidrogeno en C-3, los seis picos son debido a los cinco hidrógenos cercanos al protón, uno de estos hidrogeno unido a un oxigeno el cual genera una menor protección al protón (Ver Figura 9). A campos bajos, es decir a mayor desplazamiento, se observan dos dobletes a 5,131 y 5,176 ppm, estas se encuentran casi juntas, debido al acoplamiento de dos hidrógenos, adicionalmente estas señales nos comprobaron la presencia de hidrógenos vinílicos del compuesto en posición trans.

Por último, tal como se observa en la Figura 10 a campos muy bajos se muestran dos dobletes a 6,212 y 6,474 ppm, estas señales sugirieron ser de hidrógenos que forman un doble enlace, sin embargo, a diferencia de las señales precedentes estas están más desplazadas debido a que se encuentran en una posición muy cercana al radical superóxido lo cual genera un entorno que presenta una alta densidad electrónica, demostrando así la presencia de una estructura de peróxido.

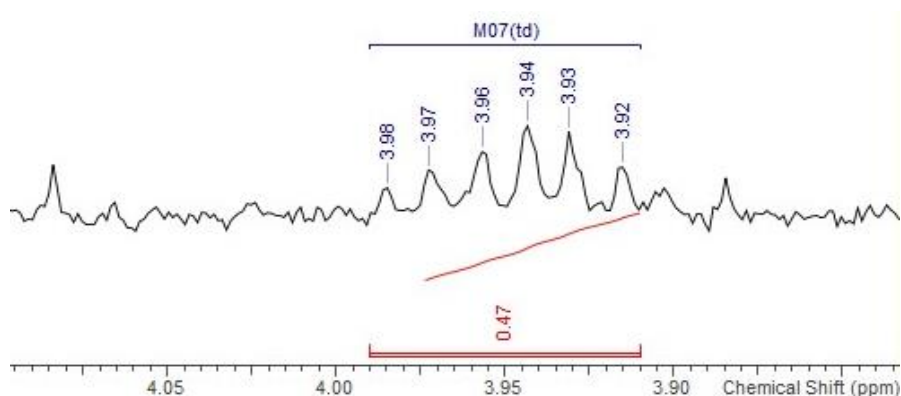


Figura 9. Ampliación 2 del espectro RMN ^1H del compuesto HC-DB-02.

En la Tabla 3, se toma en cuenta los datos experimentales del ^1H RMN y se comparan con los datos teóricos del Peróxido de Ergosterol obtenidos por Huneck & Yoshimura¹³, Krzyczkowski et al.¹⁵ y Yang et al.¹⁶, de lo cual a través del análisis espectrométrico se observan once valores muy cercanos a los correspondientes, con lo cual podemos afirmar que el compuesto HC-DB-02 se trataría del Peróxido de Ergosterol, cuya estructura química lo observamos en la Figura 11.

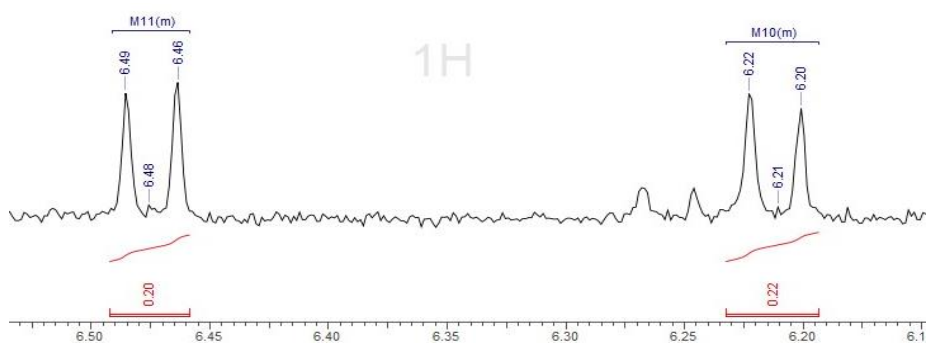


Figura 10. Ampliación 3 del espectro RMN ^1H del compuesto HC-DB-02.

Tabla 3. Comparación del espectro RMN ¹H (400 MHz) del compuesto DB-HC-02 en CDCl₃ y para el peróxido de ergosterol.

Compuesto DB-HC-02	Desplazamiento δ (ppm)		
	Peróxido de Ergosterol		
	Huneck & Yoshimura, 1996 ¹³ 60 MHz, CDCl ₃ :CD ₃ OD = 2:1	Krzychowski et al. 2009 ¹⁵ 500 MHz, CDCl ₃	Yang et al. 2019 ¹⁶ 400 MHz, CDCl ₃
0,796 (3H, d, H-27)		0.82 (3H, s, 18)	0.80 (3H, d, H-27)
0,822 (3H, s, H-18)		0.82 (3H, d, 26)	0.81 (3H, s, H-18)
0,836 (3H, d, H-26)		0.83 (3H, d, 27)	0.83 (3H, d, H-26)
	0.81-1.04 (6x-Me)		
0,883 (3H, s, H-19)		0.89 (3H, s, 19)	0.89 (3H, s, H-19)
0,901 (3H, d, H-28)		0.91 (3H, d, 28)	0.90 (3H, d, H-28)
0,980 (3H, d, H-21)		1.00 (3H, d, 21)	1.00 (3H, d, H-21)
3,951 (1H, m, H-3)	3.96 (1H,m,H-3)	3.97 (1H, m, 3)	3.94 (1H, m, H-3)
5,131 (1H, dd, H-22)	5.15-5.22	5.15 (1H, dd, 23)	5.14 (1H, dd, H-22)
5,176 (1H, dd, H-23)	(2H,m,H-22,H-23)	5.22 (1H, dd, 22)	5.22 (1H, dd, H-23)
6,212 (1H, d, H-7)		6.25 (1H, d, 6)	6.23 (1H, d, H-7)
	HO 6.35 (2H,q,H-6,H-7)		
6,474 (1H, d, H-6)		6.50 (1H, d, 7)	6.50 (1H, d, H-6)

c) Elucidación estructural del compuesto DB-HC-03.- El compuesto DB-HC-03, es un sólido de color marrón claro, soluble en acetona, medianamente soluble en metanol y cloroformo. Para el análisis por RMN ¹H se disolvió en CD₃COCD₃, medido a una frecuencia de 400 MHz. En el Espectrómetro de Bruker Avance. En la Figura 12 se observa el espectro de RMN ¹H del compuesto DB-HC-3, que presento los siguientes datos: A campo alto (desplazamiento menor) se pueden identificar los protones del grupo con menor desprotección, el cual es grupo metilo unido al anillo (-CH₃) como singulete a 2,680 ppm que se encuentra un poco desplazado hacia la izquierda de su rango normal, esto debido a su proximidad con el aldehído. El hidroximetil (-CH₂OH) muestra una señal a 4,757 ppm, esta señal muestra un ligero desplazamiento debido los grupos alcoholes

adyacentes; el protón unido al benceno presenta una señal de singulete a 6,688 ppm, la cual se encuentra dentro del rango normal. De manera inversa el desplazamiento mayor se muestra a campos bajos y corresponde al grupo aldehído, (-CHO), con su señal mostrado por un singulete a 10,420 ppm, que posee mayor desprotección debido al doble enlace con el oxígeno y debido a que el protón se encuentra en un entorno que presenta una alta densidad electrónica.

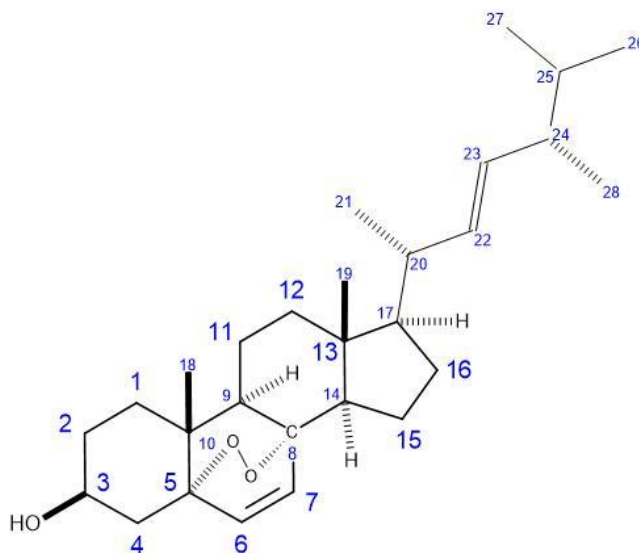


Figura 11. Estructura química propuesta para el compuesto DB-HC-02.

En la Tabla 4, se toma en cuenta los datos experimentales del ^1H RMN, los cuales se comparan con los datos teóricos del 2-Hidroxi-4-metoxi-6-metilbenzaldehído y del 2,4-Dihidroxi-6-metilbenzaldehído tomados del Huneck & Yoshimura¹³ y el 2,4-dihidroxi-3-(hidroximetil)-6-metilbenzaldehído tomado de Doyon et al.¹⁷, de lo cual se observan valores teóricos cercanos a los correspondientes experimentales, con lo cual podemos afirmar que el compuesto DB-HC-3 se trataría del 2,4-dihidroxi-3-(hidroximetil)-6-metilbenzaldehído, cuya estructura química lo observamos en la Figura 13.

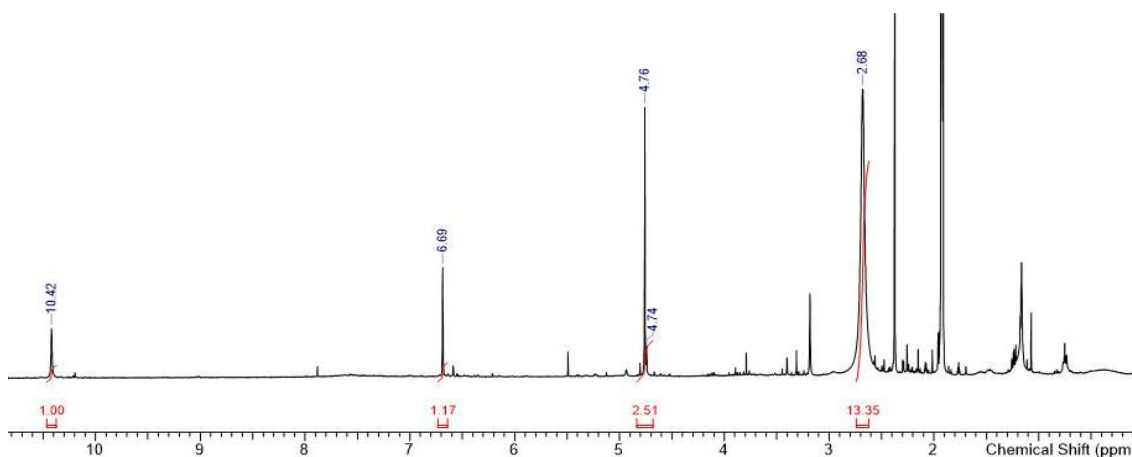


Figura 12. Espectro RMN ^1H del compuesto DB-HC-03 en CD_3COCD_3 a 400 MHz.

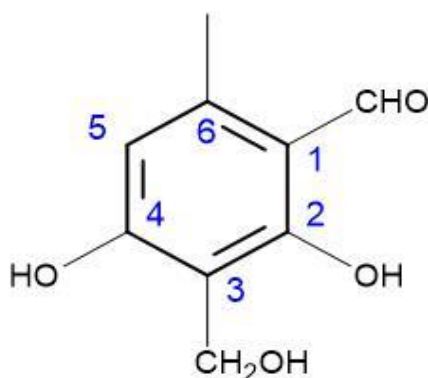


Figura 13. Estructura química propuesta para el compuesto DB-HC-03.

Tabla 4. Comparación del espectro RMN ^1H (400 MHz) del compuesto HC-DB-03 en CD_3COCD_3 y para compuestos similares.

Compuesto DB-HC-03	Desplazamiento δ (ppm)	
	2-Hidroxi-4-metoxi-6-metilbenzaldehido Huneck & Yoshimura, 1996 ¹³ (MHz, CDCl_3)	2,4-dihidroxi-3-(hidroximetil)-6-metilbenzaldehido Doyon et al. 2019 ¹⁷ 400 MHz, MeOD
-	12.60 (1H,s,-OH)	-
10.420 (s, 1H)	10.18 (1H,s,-CHO)	10.07 (s, 1H)
6.688 (s, 1H)	6.24 (2H,s,H-3,H-5)	6.26 (s, 1H)
4.757 (s, 2H)	3.79 (3H,s,OMe)	4.68 (s, 2H)
2.680 (s, 3H)	2.45 (3H,s,-Me)	2.50 (s, 3H)

CONCLUSIONES

Del líquen *Hypotrachyna cirrhata* (Fr.) Divakar, A. Crespo, Sipman, Elix & Lumbsch, través del método espectroscópicos RMN- ^1H se identificó la estructura química del compuesto HC-DB-01 como Ácido Protoliquesterínico, la estructura química del compuesto HC-DB-02 aislado, corresponde al peróxido de ergosterol y finalmente el compuesto HC-DB-3 se determinó la estructura del 2,4-dihidroxi-3-(hidroximetil)-6-metilbenzaldehido.

AGRADECIMIENTO

La presente investigación fue realizada bajo el proyecto PSINFINV, código C19070032-2019-UNMSM; en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química e Ing. Química-UNMSM, por ello mi reconocimiento y agradecimiento; también, se agradece al Dr. Carlos Areche responsable del Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Chile por el apoyo en la pasantía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministerio del Ambiente. Estrategia Nacional de Diversidad Biológica al 2021 y su Plan de Acción 2014 – 2018 – EPANDB. Lima, Perú: MINAM; 2014.
2. Weberbauer A. El mundo vegetal de los andes peruanos: estudio fitogeográfico. Lima: Estación Experimental Agrícola de La Molina. Dirección de Agricultura. Ministerio de Agricultura; 1945.
3. Ramos D. Lista de especies de líquenes y hongos liquenícolas del Perú. *Glalia*. 2014; 6(2).
4. Barreno E. Hongos Simbiontes: líquenes, micoficobiosis y micorrizas. En: Izco J, coordinador. *Botánica*. Madrid: McGraw Hill – interamericana; 1998. p.309 - 335.
5. Herrera T, Ulloa M. El Reino de los Hongos. México: UNAM-Fondo de Cultura Económica; 1990.
6. Shukla V, Joshi GP, Rawat MSM. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochem Rev*. 2010; 9: 303–314.
7. Rankovic´ B, Kosanic M. Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. En Rankovic´ B editor. *Lichen Secondary Metabolites Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*. Kragujevac, Serbia: Springer; 2015. p.1-26
8. Toledo F, García A, León F, Bermejo J. Ecología química en hongos y líquenes. *Rev Acad Colomb Cienc*. 2004; 28(109): 509-528.
9. González AG, Rodríguez EM, Hernández CE, Bermejo JB. Phytochemical investigation of Canary Island lichens. En *Virtual Activity, Real Pharmacology: Different Approaches to the Search for Bioactive Natural Compounds*. Research Signpost; 1997. p. 49-60.
10. Castro O. Contribución al estudio fitoquímico de la *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale. *Rev Soc Quim Perú*. 2011; 77(1): 56–65.
11. Elix JA, Adler MT, Wardlaw JH. A further three new Lichen depsidones. *Aust J Chem*. 1996; 49 (10): 1175–8.

12. Castro O. Investigación fitoquímica de los líquenes. Riga –Letonia, Unión Europea: editorial académica española; 2016.
13. Huneck S, Yoshimura I. Identification of Lichen Substances. Berlin: Springer; 1996.
14. Kumar N, Ravikumar S, Lakshmanan R, Jacob J, Kumar D, Nambisan B. Protolichesterinic Acid: A Prominent Broad Spectrum Antimicrobial Compound from the Lichen *Usnea albopunctata*. *Int J Antibiot.* 2014; 2014: 1–6.
15. Krzyczkowski W, Malinowska E, Suchocki P, Kleps J, Olejnik M, Herold F. Isolation and quantitative determination of ergosterol peroxide in various edible mushroom species. *Food Chem.* 2009;113(1):351–5.
16. Yang ZD, Li ZJ, Zhao JW, Sun JH, Yang LJ, Shu ZM. Secondary Metabolites and PI3K Inhibitory Activity of *Colletotrichum gloeosporioides*, a Fungal Endophyte of *Uncaria rhynchophylla*. *Curr Microbiol.* 2019; 76(7):904–8.
17. Doyon TJ, Perkins JC, Baker Dockrey SA, Romero EO, Skinner KC, Zimmerman PM, et al. Chemoenzymatic o-Quinone Methide Formation. *J Am Chem Soc.* 2019;141(51):20269-20277.

HYDROGEOCHEMICAL ANALYSIS OF SURFACE WATER QUALITY IN A MINING AREA ON THE WESTERN FLANK OF THE ANDES WESTERN RANGE

Christ Jesus Barriga Paria^{*aa}, Alexis Junior Quispe Vargas^a, Jamil Jesus Quispe Vilca^a,
John Steve Anthersson Quiroz Pacho^a, Dario Vrayan Quispe Gomez^a, Pablo Ramos
Mamani^a

ABSTRACT

This study used the hydrogeochemical properties of surface waters surrounding a mining project in Peru to compare them with the environmental quality standards established in Supreme Decree 004-2017-MINAM, focusing on category 3 for vegetable irrigation and animal drinking. Physical-chemical, inorganic, microbiological and parasitic parameters were evaluated in lagoons and springs. The results determined the presence of slightly alkaline deposits with a pH of 9.59 and slightly acidic deposits with a pH of 5.33, as well as deposits with high content of iron, manganese, and zinc. To ensure the reliability of the chemical analysis, an ionic balance of the main dissolved cations and anions was performed. The Piper diagram determined the predominant calcic sulfate waters, as well as the presence of a calcic bicarbonate water deposit. On the other hand, the Stiff diagram determined sulfate (SO_4^{2-}) as the predominant ion. This study concludes that the different stations comply with the environmental quality standards, although deposits with high levels of iron, manganese, and zinc were found in surface waters. Different treatments were determined to control pH levels and to decrease the amount of such ions present.

Keywords: Environmental quality standards · Water quality · Piper diagram · Stiff diagram · Surface waters

^a Escuela Profesional de Ingeniería de Minas, Universidad Nacional de Moquegua, Prolongación Calle Áncash s/n, Moquegua, Perú.
cbarrigap@unam.edu.pe

ANÁLISIS HIDROGEOQUÍMICO DE LA CALIDAD DE AGUAS SUPERFICIALES EN UNA ZONA MINERA EN EL FLANCO OESTE DE LA CORDILLERA OCCIDENTAL DE LOS ANDES

RESUMEN

Este estudio utilizó las propiedades hidrogeoquímicas de las aguas superficiales que rodean un proyecto minero en Perú, para compararlas con los estándares de calidad ambiental establecidos en el Decreto Supremo 004-2017-MINAM, centrándose en la categoría 3 para riego de vegetales y bebida para animales. Se evaluaron parámetros físico-químicos, inorgánicos, microbiológicos y parasitarios en lagunas y manantiales. Los resultados determinaron la presencia de depósitos ligeramente alcalinos con un pH de 9.59 y depósitos ligeramente ácidos con un pH de 5.33, así como depósitos con alto contenido de hierro, manganeso y zinc. Para garantizar la fiabilidad del análisis químico, se realizó un balance iónico de los principales cationes y aniones disueltos. El diagrama de Piper determinó la predominancia de aguas sulfatadas cálcicas, así como la presencia de un depósito de agua bicarbonatada cálcica. Por otro lado, el diagrama de Stiff determinó que el ion sulfato (SO_4^{2-}) era predominante. Este estudio concluye que las diferentes estaciones cumplen con los estándares de calidad ambiental, aunque se encontraron depósitos con altos niveles de hierro, manganeso y zinc en las aguas superficiales. Se determinaron diferentes tratamientos para controlar los niveles de pH y disminuir la cantidad de dichos iones presentes.

Palabras clave: Estándares de calidad ambiental · Calidad del agua · Diagrama de Piper Diagrama de Stiff · Aguas superficiales.

INTRODUCTION

The mining industry is the main economic activity in Peru, contributing to the country's industrial development and economic growth¹. However, mining can also have adverse environmental impacts that affect water quality². Inadequate management of mining wastewater and tailings can alter nearby rivers and streams, affecting the quality of surface water resources and the quality of life of nearby populations^{3,4}. Therefore, the development of water quality studies is important to verify compliance with mining water quality control regulations in accordance with each country's current legislation

Hydrogeochemistry is the study responsible for evaluating the quality of water based on its chemical composition and interaction with geology and mineralization of the area⁵. In

the mining context, hydrogeochemistry allows us to evaluate how mining processes affect the quality and quantity of water, as well as the development of measures to prevent detrimental effects on water resources⁶. Therefore, the development of such studies will be key to promoting responsible and sustainable mining in relation to water.

Water is a fundamental resource for the quality of life of both humans and other living beings. To guarantee its safety, it is essential to control various parameters that determine its quality and possible uses in society. In this context, hydrogeochemical studies fulfill an important role in determining the quality and identifying possible sources of contamination^{7, 8}. The pH level of water can have a significant impact on its use for agriculture and flood irrigation, as a pH that is too high or low can cause soil acidification or alkalization, which can make it infertile^{9, 10}. The dispersion of heavy metals in mining areas towards water resources can be a threat to water quality and human health since these metals can eventually be introduced into the human body through consumption when in suspension¹¹. In relation to these studies, this paper aims to carry out a hydrogeochemical analysis of surface waters in a polymetallic mining zone in central Peru, to identify and evaluate possible adverse effects on water quality generated by mining activity in the area. Additionally, the results obtained will be compared with the standards established by Peruvian Regulation Supreme Decree 004-2017-MINAM, which sets the parameters for water quality¹².

EXPERIMENTAL SECTION

The polymetallic mine area belongs stratigraphically to the Cretaceous sedimentary basin, where thick Cretaceous sediments are distributed throughout the area, forming three well-defined horizons. The lower part is composed of clastic rocks such as siliceous sandstones, limestones, and shales. The middle part is composed of calcareous rocks associated with dolomites and shales, and the upper part contains red layers. The mineralization of the deposit is a hydrothermal replacement, made up of zinc, lead, silver, and copper minerals. On the surface, mineralization appears in the form of iron and manganese oxides, resulting from the oxidation of primary sulfides, mainly composed of sphalerite, marmatite, and subordinately galena and chalcopyrite.

The operational area is located on the western flank of the Andean Western Cordillera, at an altitude ranging from 4500 to 5000 meters above sea level. The topography shows a glacial landscape, where remnants of ancient activity can be observed, such as moraine deposits on both sides of the natural channels or courses of the lagoons.

For the collection of surface water samples, parameters were measured in the field at 8 control points corresponding to stations (MS-01, MS-02, MS-03, MS-04, MS-05, MS-06, MS-07, and MS-08). The location of the sampling was recorded by a portable GPS from the brand GARMIN, see Figure 1. Field instruments were used to measure the pH (pH meter), electrical conductivity (conductivity meter), and temperature (thermometer) from

the brand EXTECH. To evaluate salinity, total dissolved solids, and other chemical elements, such samples were sent to an accredited quality laboratory in Perú.

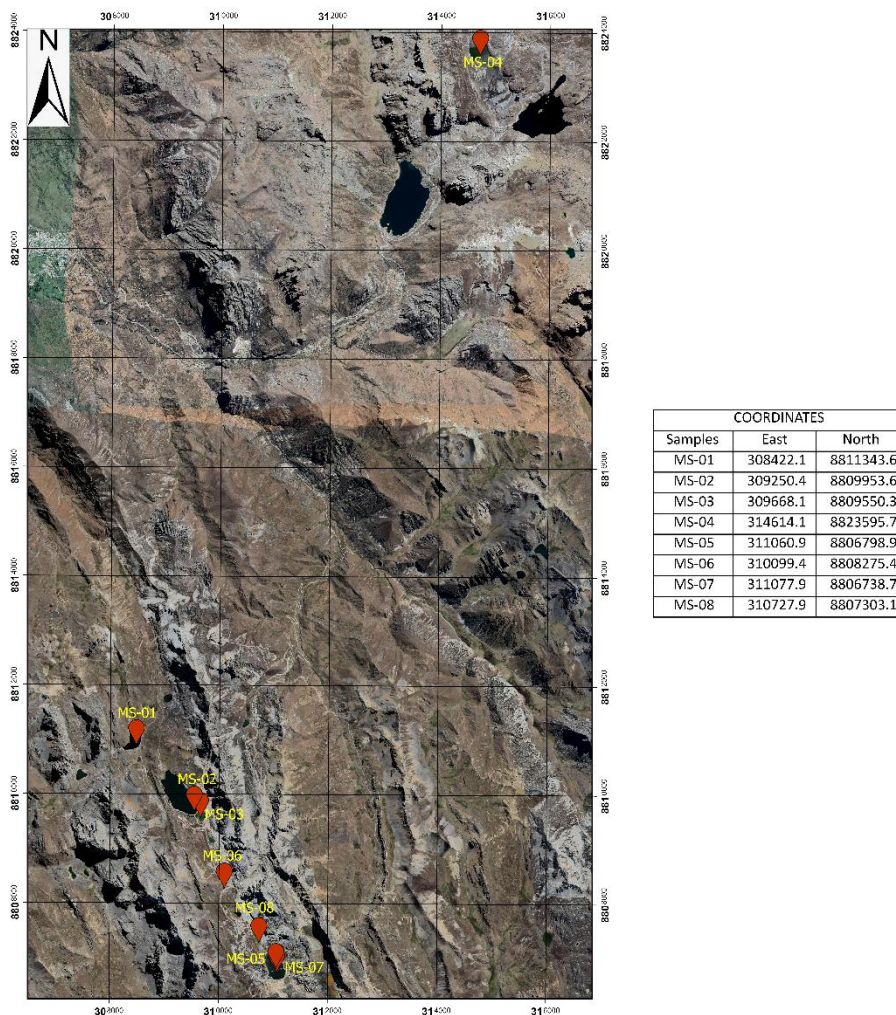


Figure 1. Location and Study Samples

For the development of the present hydrogeochemical study, the necessary graphs were prepared to understand the chemical composition present in surface waters and the influence of the terrain on their quality, for which the Piper and Stiff diagram methods were used. In this regard, the results obtained from the analysis of water samples were represented by the Piper and Stiff diagrams using RockWorks v2022 software. The Piper diagram is a graphical representation of the chemistry of water samples, where the present cations and anions are shown through separate ternary graphs, and both ternary graphs are projected onto a central diamond. This graphical representation allows for identifying hydrogeochemical groups and interpreting some chemical processes represented by the

data set being analyzed^{13, 14}. On the other hand, the Stiff diagram represents different types of water and their degrees of mineralization in the form of polygons through three horizontal axes, with the cations located to the left of the diagram and the anions to the right. This diagram allows appreciating the values of the ionic relationships with respect to unity and the variation of the relationships between cations and anions of a sample¹⁵.

RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Electrical Conductivity

The electrical conductivity of water occurs due to the presence of dissolved ions in its composition (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^{2-} , CO_3^{2-} , and PO_4^{3-}), which acts as conductive charges. The greater the presence of these ions, the greater the conductivity present. Additionally, the temperature of these ions will drastically affect the measurement of conductivity, since higher temperatures lead to greater resistivity, resulting in lower conductivity¹⁶. In relation to the above, the in-situ data obtained for electrical conductivity were taken at a temperature lower than 16.2°C , with a maximum value of $1105 \mu\text{S}/\text{cm}$ corresponding to the MS-06 station and a minimum value of $129 \mu\text{S}/\text{cm}$ corresponding to the MS-07 station, see Figure 2.

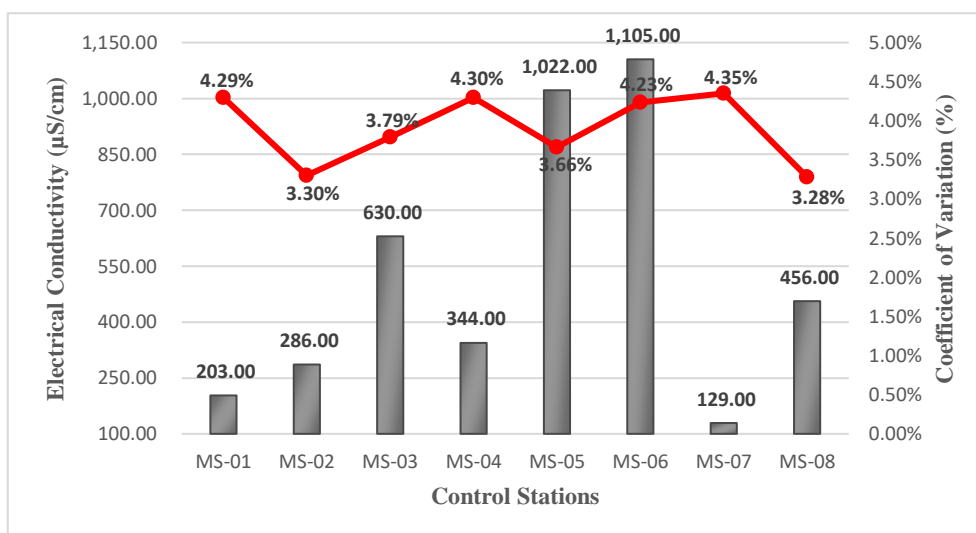


Figure 2. Electric Conductivity Results

The MS-03 and MS-04 stations show a different trend compared to the others due to the data collection at the MS-04 station was conducted at a point distant from the other stations, allowing for comparison with an environmentally balanced area. On the other hand, the MS-03 station is being taken as a reference point of the other stations near the mining zone. This comparison allows us to quantify and compare the details related to mining activity in relation to the surrounding water resources of the area.

3.2 pH

The results obtained from the field analysis indicate pH values that vary from slightly acidic to slightly alkaline, with a minimum pH value of 5.33 corresponding to station MS-05 and a maximum value of 9.59 corresponding to station MS-08, see Figure 3. According to the Supreme Decree 004-2017-MINAM corresponding to Category 3, for vegetable irrigation, the limits for pH are between 6.5 - 8.5. Comparing it based on the data obtained at the 8 stations, it can be observed that stations MS-05 and MS-08 are outside the permissible limits. Additionally, Category 3 for animal drinking water establishes a pH between 6.5 - 8.4, and based on the data obtained, stations MS-05 and MS-08 are also outside the established limits.

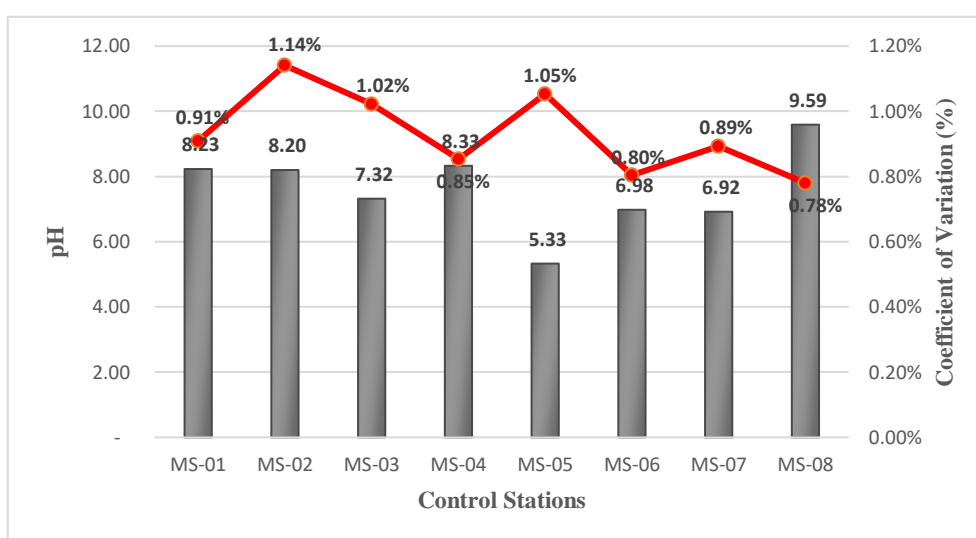


Figure 3. pH Results

3.3 Total Dissolved Solids (TDS)

The data obtained in the field for this parameter indicate a minimum value of 142 ppm, corresponding to station MS-01, and a maximum value of 905 ppm, corresponding to station MS-05, see Figure 4. Close monitoring of TDS is necessary because at high levels, they can cause scaling and corrosion when used^{17, 18}.

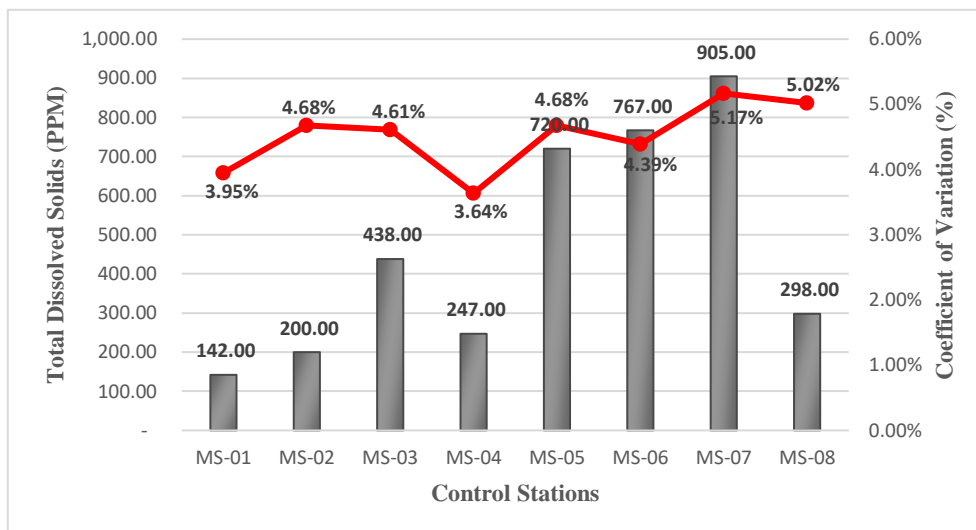


Figure 4. Results of Total Dissolved Solids (TDS)

3.4 Salinity

The salinity parameter in the field had a minimum value of 100 ppm, corresponding to station MS-01, and a maximum value of 647 ppm, corresponding to station MS-07, see Figure 5. The control of this parameter is of vital importance to avoid significant damage to the soil, since high concentration of salt affect the quality of vegetation and organic matter in the area¹⁹.

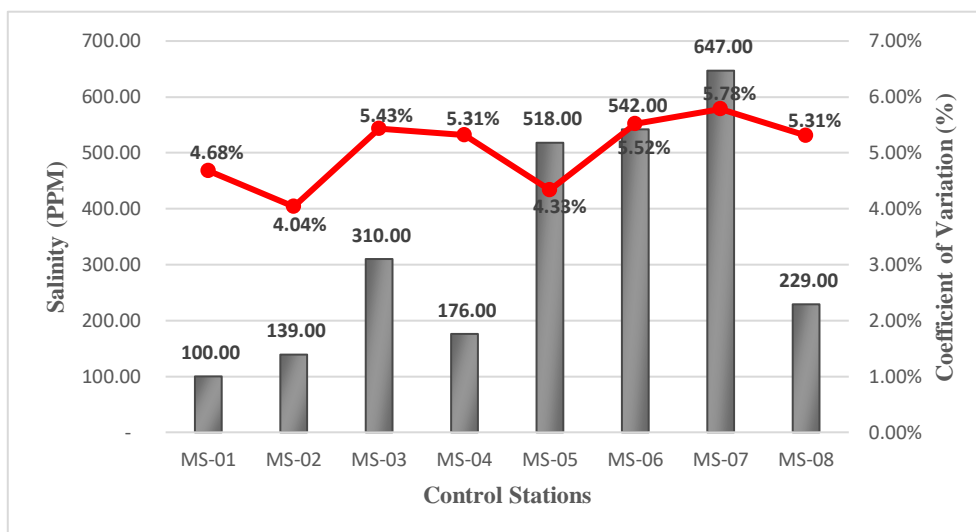


Figure 5. Results of Salinity

3.5 Temperature

The results obtained from the temperature field measurements vary from 8.1°C corresponding to station MS-05, to 16.2°C corresponding to station MS-07, see Figure 6.

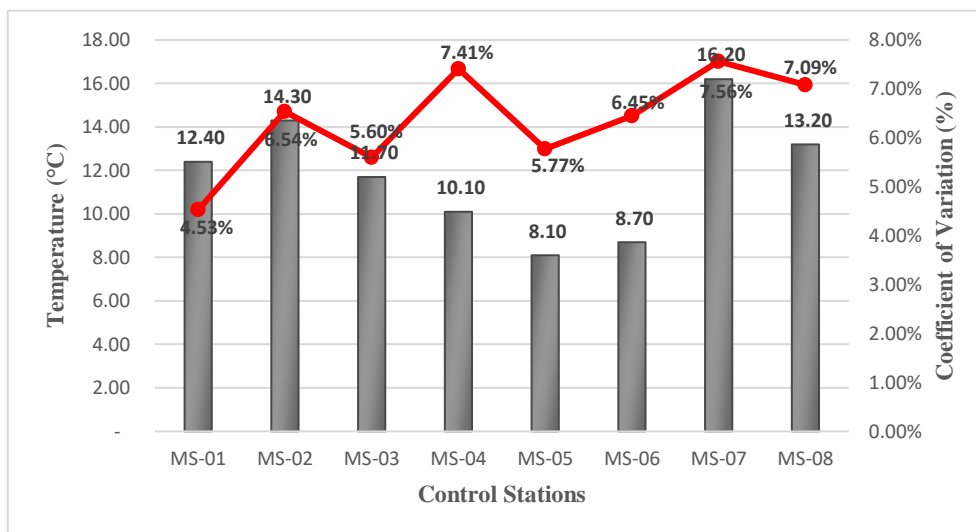


Figure 6. Temperature Results

3.6 Ionic Balance

Ionic balance is an indicative parameter that establishes that there must be a balance between the chemical components of water, where cations and anions must be in the same proportions. In addition, the result of the ionic balance will determine the quality of the chemical analysis^{20, 21}. For this purpose, a maximum allowable percentage of error is established, which is determined by the following formula.

$$Error (\%) = \frac{(\sum Cations - \sum Anions) * 100}{(\sum Cations + \sum Anions)}$$

The allowed error varies depending on each author, but generally ranges from $\pm 5\%$ to a maximum of $\pm 10\%$ ^{22, 23}. The variability in terms of the percentage of error is mainly caused by the presence of minor ions that are not evaluated in the chemical analysis. The results of the chemical analysis for the different stations indicate a maximum error percentage in station MS-07 with -53.30% and a minimum error percentage in station MS-08 with -2.63%. Thus, station MS-01 with a result of -8.73% is the only one that falls within the permissible limit, see Table 1. This does not mean that the other stations do not have reliable chemical analyses, but the presence of minor ions causes this variability when developing the corresponding chemical analyses.

Table 1. Results of Ionic Balance

	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻
M.W.	40.08	24.31	22.99	39.1	61.02	96.06	34.45
MS-01	26.80	4.66	2.00	0.40	79.00	31.00	8.00
mmole/l	0.67	0.19	0.09	0.01	1.29	0.32	0.23
meq/l	1.34	0.38	0.09	0.01	1.29	0.65	0.23
Σmeq/l		1.82				2.17	
Error (%)				-8.731			
MS-02	33.50	6.29	1.60	0.60	49.00	124.00	12.00
mmole/l	0.84	0.26	0.07	0.02	0.80	1.29	0.34
meq/l	1.67	0.52	0.07	0.02	0.80	2.58	0.34
Σmeq/l		2.27				3.72	
Error (%)				-24.163			
MS-03	50.00	12.64	0.90	1.50	14.00	297.00	18.00
mmole/l	1.25	0.52	0.04	0.04	0.23	3.09	0.51
meq/l	2.50	1.04	0.04	0.04	0.23	6.18	0.51
Σmeq/l		3.61				6.92	
Error (%)				-31.409			
MS-04	43.70	8.24	2.60	0.60	-	69.00	8.00
mmole/l	1.09	0.34	0.11	0.02	-	0.72	0.23
meq/l	2.18	0.68	0.11	0.02	-	1.44	0.23
Σmeq/l		2.99				1.66	
Error (%)				28.493			
MS-05	50.00	14.85	4.50	6.00	0.99	527.00	4.00
mmole/l	1.25	0.61	0.20	0.15	0.02	5.49	0.11
meq/l	2.50	1.22	0.20	0.15	0.02	10.97	0.11
Σmeq/l		4.07				11.10	
Error (%)				-46.386			
MS-06	50	12.99	25.30	5.80	-	571.00	8.00
mmole/l	1.25	0.53	1.10	0.15	-	5.94	0.23
meq/l	2.50	1.07	1.10	0.15	-	11.89	0.23
Σmeq/l		4.81				12.11	
Error (%)				-43.137			
MS-07	50.00	14.01	9.90	10.80	0.99	675.00	8.00
mmole/l	1.25	0.58	0.43	0.28	0.02	7.03	0.23
meq/l	2.50	1.15	0.43	0.28	0.02	14.05	0.23
Σmeq/l		4.35				14.30	
Error (%)				-53.304			
MS-08	50.00	6.26	4.00	5.30	-	164.00	3.00
mmole/l	1.25	0.26	0.17	0.14	-	1.71	0.08
meq/l	2.50	0.52	0.17	0.14	-	3.41	0.08
Σmeq/l		3.32				3.50	
Error (%)				-2.634			

3.7 Piper Diagram

The Piper diagram represents, through a graph, the chemical compounds of water samples, where cations and anions are shown in separate ternary graphics, which, through their projection, are graphed on a diamond in the center of the diagram²⁴. In each ternary graph, there is a representation of the main ions, in the case of cations (Na⁺, Ca²⁺, K⁺, and

Mg²⁺) and for anions (Cl⁻, SO₄²⁻, CO₃²⁻, and HCO₃⁻), where their intersection indicates the representation of the complete chemical composition of the water sample²⁵. Its function is to visualize the possible mixtures between different types of water, as well as to understand the present geochemical evolution of the site²⁶.

As shown in Figure 7, the predominant water type for stations MS-02 to MS-08 is calcic sulfate water, due to the high presence of sulfate ions in the different stations, while station MS-01 is classified as calcic bicarbonate water, due to the bicarbonate present in that station.

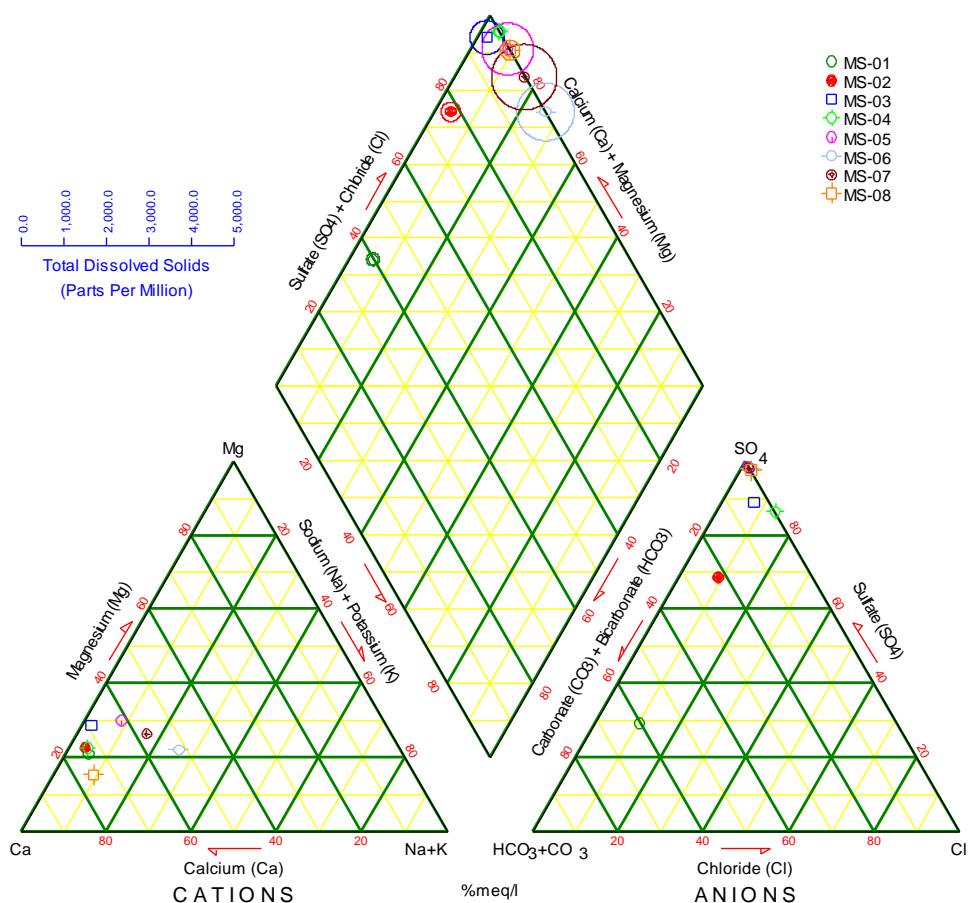


Figure 7. Location of Surface Waters on the Piper Diagram

3.8 Stiff Diagram

The Stiff diagram represents graphically the ionization present in the chemical composition of the water where the anions are located on the left side of the graph and the cations on the right²⁷. The graph allows us to identify the amount of ions and cations

present, by forming a polygon resulting from the union of the negative and positive ion ends²⁸. The Stiff diagram is useful for visualizing the ions and their distribution, making it a widely used tool for identifying possible sources of contamination or the geology of the site²⁹.

In Figures 8 and 9, we can see the anions and cations for each station, according to the provisions of Supreme Decree 004-2017-MINAM. All stations are below the Environmental Quality Standards established in Category 3, both for vegetable irrigation and animal drinking. The results of the Stiff diagram show that the predominant ions for station MS-01 are calcium and bicarbonate, while for the other stations, the predominant ions are calcium and sulfate.

The high presence of bicarbonates in the MS-01 stations may be a result of the weathering of carbonate rock minerals, as well as the weathering and dissolution of clastic and calcareous rocks that make up the lithology of the study area³⁰. On the other hand, for the other stations, the high presence of sulfate may be a result of the oxidation of minerals such as sphalerite, chalcopirite, and marmatite, which are present in the study area^{31,32}.

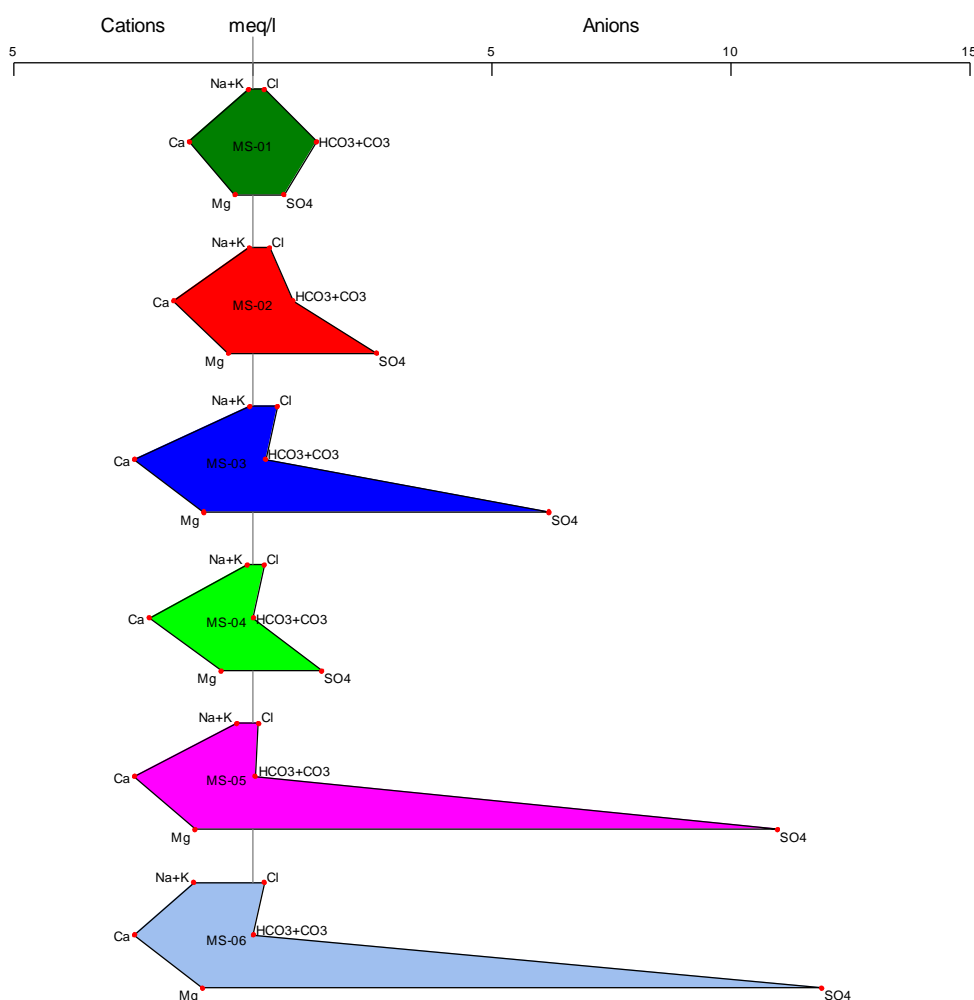


Figure 8. Stiff Diagram for stations MS-01 to MS-06

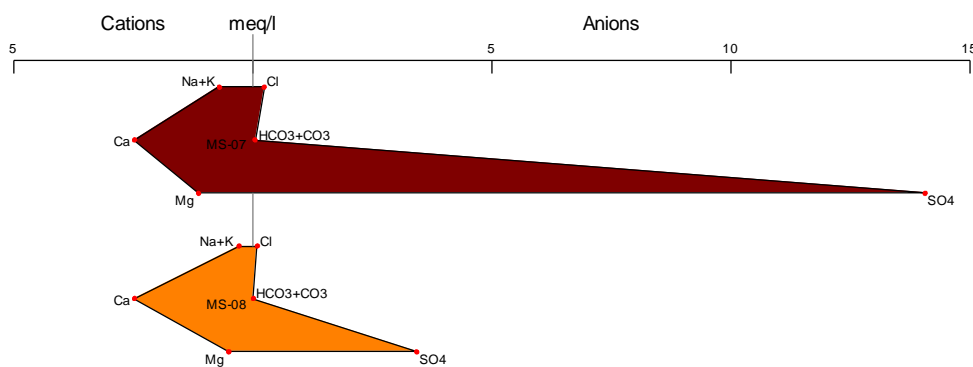


Figure 9. Stiff Diagram for stations MS-07 and MS-08

3.9 Results and Discussions of Chemical Analysis

In accordance with the provisions of Supreme Decree 004-2017-MINAM, a comparison was made between the data obtained at each station and the limits established in Category 3 of the aforementioned decree, for physical, chemical, and microbiological parameters as well as parasitic ones, see Tables 2 and 3.

Regarding pH, the decree establishes a limit between 6.5-8.4, and stations MS-05 and MS-08 exceed these permissible limits with a pH of 5.33 and 9.59, respectively. This indicates that the water at the first-mentioned station is slightly acidic, while the water at the second station is slightly alkaline.

In both cases, appropriate treatment is required to neutralize them. For station MS-05, which has slightly acidic water, treatment with calcium carbonate (CaCO_3) or slaked lime, or calcium hydroxide (Ca(OH)_2) can be performed, as both additives are effective in neutralizing acidic water. In the case of station MS-08, which has slightly alkaline water, acidification treatment can be carried out using sulfuric acid (H_2SO_4) or hydrochloric acid (HCl) to reduce pH and neutralize alkalinity³³.

Regarding the inorganic parameters evaluated, stations MS-05 and MS-06 exceed the permissible limit for iron, which is 5 mg/l, with values of 21.9 and 32.4 mg/l, respectively. Excess iron in water must be treated using methods that oxidize iron, such as treatment with potassium permanganate (KMnO_4), or with products like chlorine, which also oxidize iron, followed by removal through filtration or decantation.

In the case of manganese, stations MS-03, MS-05, MS-06, and MS-07 exceed the permissible limit of 0.2 mg/l, with values between 1.22 and 1.83 mg/l. Treatment for this chemical element is similar to that for iron, using potassium permanganate (KMnO_4) to oxidize the manganese and remove it through filtration.

Finally, we have zinc, which has a permissible limit of 2 mg/l for vegetable irrigation and 24 mg/l for animal drinking. All stations except MS-01, MS-04, and MS-08 exceed the

permissible limit, with values between 2.08 and 6.01 mg/l. Treatment for this element is generally carried out through chemical precipitation. The chemicals used for this process depend on the characteristics of the water, with the most common being calcium hydroxide (Ca(OH)₂), calcium sulfate (CaSO₄), sodium hydroxide (NaOH), and aluminum sulfate (Al₂(SO₄)₃), followed by filtering the zinc

For other physical, chemical, inorganic, microbiological, and parasitological parameters, the stations are below the permissible levels or those established in Supreme Decree 004-2017-MINAM for Category 3, both for vegetable irrigation and animal drinking.

Table 2. Chemical Analysis Results for Stations MS-01 to MS-04

Parameters	Unit of Measurement	D1: Vegetable Irrigation		D2: Animal Drinking Water	Surface Water Samples			
		Unrestricted Irrigation Water (c)	Restricted Irrigation Water	Animal Drinking Water	MS-01	MS-02	MS-03	MS-04
PHYSICAL - CHEMICAL PARAMETERS								
Bicarbonates	mg/l		518	**	79	49	14	-
Chlorides	mg/l		500	**	8	12	18	8
Conductivity	(µS/cm)		2500	5000	203	286	630	344
Nitrates (NO ₃ ⁻ - N)	mg/l		100	100	0.09	0.09	0.4	0.09
Nitrites (NO ₂ ⁻ - N)	mg/l							
Potential of Hydrogen (pH)	Unidad de pH		6.5 – 8.5	6.5 – 8.4	8.23	8.2	7.32	8.33
Sulfates	mg/l		1000	1000	31	124	297	69
Temperature	°C		Δ3	Δ3	12.4	14.3	11.7	10.1
INORGANIC PARAMETERS								
Barium	mg/l		0.7	**	0.025	0.028	0.025	0.033
Boron	mg/l		1	5	0.09	0.09	0.09	0.09
Copper	mg/l		0.2	0.5	0.002	0.006	0.025	0.002
Iron	mg/l		5	**	0.09	0.09	0.2	0.2
Lithium	mg/l		2.5	2.5	0.009	0.009	0.009	0.009
Magnesium	mg/l		**	250	4.66	6.29	12.64	8.24
Manganese	mg/l		0.2	0.2	0.019	0.215	1.22	0.001
Lead	mg/l		0.05	0.05	0.003	0.003	0.003	0.003
Zinc	mg/l		2	24	0.004	2.08	6.01	0.055
MICROBIOLOGICAL AND PARASITOLOGICAL PARAMETERS								
Thermotolerant Coliforms	MPN/100ml	1000	2000	1000	1.79	1.79	1.79	1.79

(a): For clear waters. No abnormal changes (for waters that present natural coloration).

(b): After simple filtration. (c): For the irrigation of public parks, sports fields, green areas, and ornamental plants, only the microbiological and parasitological parameters of the unrestricted irrigation type apply. Δ 3.00: means a variation of 3 degrees Celsius with

respect to the multi-year monthly average of the evaluated area. The symbol ** within the table means that the parameter does not apply to this Subcategory. Parameter values are reported in total concentrations unless otherwise indicated.

Source: Adapted from MINAM¹².

Parameters	Unit of Measurement	D1: Vegetable Irrigation		D2: Animal Drinking Water	Surface Water Samples			
		Unrestricted Irrigation Water (c)	Restricted Irrigation Water	Animal Drinking Water	MS-05	MS-06	MS-07	MS-08
PHYSICAL - CHEMICAL PARAMETERS								
Bicarbonates	mg/l	518		**	0.9	-	0.9	-
Chlorides	mg/l	500		**	4	8	8	3
Conductivity	(μ S/cm)	2500		5000	1022	1105	129	456
Nitrates (NO ₃ ⁻ - N)	mg/l	100		100	1.1	1.9	2.1	0.4
Nitrites (NO ₂ ⁻ - N)	mg/l							
Potential of Hydrogen (pH)	Unidad de pH	6.5 – 8.5		6.5 – 8.4	5.33	6.98	6.92	9.59
Sulfates	mg/l	1000		1000	527	571	675	164
Temperature	°C	Δ 3		Δ 3	8.1	8.7	16.2	13.2
INORGANIC PARAMETERS								
Barium	mg/l	0.7		**	0.018	0.016	0.032	0.05
Boron	mg/l	1		5	0.09	0.09	0.09	0.09
Copper	mg/l	0.2		0.5	0.132	0.033	0.024	0.002
Iron	mg/l	5		**	21.9	32.4	3.1	0.5
Lithium	mg/l	2.5		2.5	0.01	0.009	0.009	0.01
Magnesium	mg/l	**		250	14.85	12.99	14.01	6.26
Manganese	mg/l	0.2		0.2	1.764	1.56	1.83	0.077
Lead	mg/l	0.05		0.05	0.045	0.016	0.011	0.003
Zinc	mg/l	2		24	6.01	6.01	6.01	0.06
MICROBIOLOGICAL AND PARASITOLOGICAL PARAMETERS								
Thermotolerant Coliforms	MPN/100ml	1000	2000	1000	1.79	1.79	1.79	1.79

Table 3. Chemical Analysis Results for stations MS-05 to MS-08

(a): For clear waters. No abnormal changes (for waters that present natural coloration). (b): After simple filtration. (c): For the irrigation of public parks, sports fields, green areas, and ornamental plants, only the microbiological and parasitological parameters of the unrestricted irrigation type apply. Δ 3.00: means a variation of 3 degrees Celsius with respect to the multi-year monthly average of the evaluated area. The symbol ** within the table means that the parameter does not apply to this Subcategory. Parameter values are reported in total concentrations unless otherwise indicated.

Source: Adapted from MINAM¹².

CONCLUSIONS

The results of the comparison between the physico-chemical parameters and the permissible limits of Supreme Decree 004-2017-MINAM were positive, since the decree establishes a permissible limit for pH based on category 3, for vegetable irrigation of 6.5-8.4 and for animal drinking of 6.4-8.4. All stations comply with this established limit, except for stations MS-05 and MS-08, which have a pH of 5.33 and 9.59, respectively.

Station MS-05, with a pH of 5.33, would be classified as slightly acidic and requires treatment to neutralize it. For this, the use of calcium carbonate (CaCO_3) or lime slurry or calcium hydroxide (Ca(OH)_2) is recommended to neutralize the acidity of the water. On the other hand, station MS-08, with a pH of 9.59, would be classified as slightly alkaline, for which acidification treatment is recommended using sulfuric acid (H_2SO_4) or hydrochloric acid (HCl) to reduce the pH and neutralize the alkalinity. Regarding other evaluated physicochemical parameters such as electrical conductivity, salinity, temperature, and total dissolved solids, all evaluated stations comply with the permissible limits established in the Supreme Decree.

The elaboration of the Piper diagram allowed us to classify the types of water present in the different stations, resulting in the predominance of calcium sulfated water, and for station MS-01, calcium bicarbonate water. On the other hand, the Stiff diagram allowed us to observe the predominant ions in each station, resulting in sulfate (SO_4^{2-}) as the predominant ion and for station MS-01, the predominance of bicarbonate (HCO_3^-). Regarding the evaluation of inorganic parameters and what is established in the Supreme Decree, the most outstanding ions were evaluated, such as barium, boron, copper, iron, lithium, magnesium, manganese, lead, and zinc, for which high levels of iron, manganese, and zinc content were found.

For iron, stations MS-05 and MS-06 exceed the permissible limits of 5 mg/l, with values of 21.9 and 32.4 mg/l, respectively. It is recommended to treat the water with potassium permanganate (KMnO_4) or with products such as chlorine to oxidize the iron, and then remove it through filtration or decantation.

In the case of manganese, stations MS-03, MS-05, MS-06, and MS-07 are above the established limits of 0.2 mg/l, with values between 1.22 and 1.83 mg/l. For this, the use of potassium permanganate (KMnO_4) is recommended to oxidize the manganese and eliminate it through filtration.

Finally, zinc, which establishes permissible limits of 2 mg/l for vegetable irrigation and 24 mg/l for animal drinking, all stations except MS-01, MS-02 and MS-08, exceed the permissible limit, with values between 2.08 and 6.01 mg/l. It is recommended to carry out treatment through chemical precipitation, using chemical elements based on the water

characteristics, such as calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), calcium sulfate (CaSO_4), sodium hydroxide (NaOH), and aluminum sulfate ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), then proceed with zinc filtration.

For the case of other inorganic elements, as well as microbiological and parasitological parameters, the stations are within the established permissible limits.

In conclusion, the water resources in this study show acceptable values according to the environmental quality standards established in Supreme Decree 004-2017-MINAM. However, they can still be used for vegetable irrigation and animal drinking, with proper treatment to minimize or control the values of the exceeded parameters, such as pH and the concentration of iron, manganese, and zinc.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to express our gratitude to the mining concession holder for allowing us to utilize their facilities for the development of a new analysis of the quality of surface waters in the influence area of their mining site. We would also like to extend our appreciation to the Ministry of Energy and Mines of Perú for their support and collaboration in conducting this paper, as well as for providing relevant information that has been instrumental in its completion. Furthermore, we would like to express our gratitude to the National University of Moquegua for providing us with the opportunity to enhance the theoretical foundations necessary to support and substantiate the analysis of the results of this paper. We are thankful for the collaboration and dedication showed by the mining concession holder, the Ministry of Energy and Mines, and the National University of Moquegua in advancing science and knowledge in this research.

For other physical, chemical, inorganic, microbiological, and parasitological parameters, the stations are below the permissible levels or those established in Supreme Decree 004-2017-MINAM for Category 3, both for vegetable irrigation and animal drinking.

REFERENCES

1. Rondo KD, Alvarado WA, Inga JS, Moreno J, Cotrina-Teatino MA, Rodriguez JC, et al. Economic Analysis of Natural Resources in Peru. LACCEI. 2022; 2022 - December: 5 - 7. doi: 10.18687/LEIRD2022.1.1.46
2. Mardonova M, Han YS. Environmental, hydrological, and social impacts of coal and nonmetal minerals mining operations. *J Environ Manage.* 2023; 332: 117387. doi: 10.1016/j.jenvman.2023.117387

3. Faseyi CA, Miyittah MK, Sowunmi AA, Yafetto L. Water quality and health risk assessments of illegal gold mining-impacted estuaries in Ghana. *Mar Pollut Bull.* 2022; 182: 114277. doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.114277
4. Yoon H, Yoon J. The Impact Evaluation of Acid Mine Drainage on Zebrafish (*Danio rerio*) and Water Fleas (*Daphnia magna*) in the Vicinity of the Geum River Basin in Korea. *Int J Environ Res Public Health.* 2022; 19: 24. doi: 10.3390/ijerph192416470
5. Kabir M, Hossain N, Islam ARMT. Characterization of groundwater hydrogeochemistry, quality, and associated health hazards to the residents of southwestern Bangladesh. *Environ Sci Pollut Res.* 2021; 28: 68745-68761.
6. Onnis P, Byrne P, Hudson-Edwards KA, Frau L, Stott T, Williams T, et al. Source apportionment of mine contamination across streamflows. *Appl Geochem.* 2023; 151: 105623. doi: 10.1016/j.apgeochem.2023.105623
7. Zhang X, Zhao R, Wu X. Hydrogeochemistry, identification of hydrogeochemical evolution mechanisms, and assessment of groundwater quality in the southwestern Ordos Basin, China. *Environ Sci Pollut Res.* 2022; 29: 901-921.
8. Amiri V, Kamrani S, Ahmad A. Groundwater quality evaluation using Shannon information theory and human health risk assessment in Yazd province, central plateau of Iran. *Environ Sci Pollut Res.* 2021; 28: 1108-1130.
9. Tiwari AK, Singh AK, Singh AK. Hydrogeochemical analysis and evaluation of surface water quality of Pratapgarh district, Uttar Pradesh, India. *Appl Water Sci.* 2017; 7: 1609-1623.
10. Sahoo BP, Sahu HB, Pradhan DS. Hydrogeochemistry and surface water quality assessment of IB valley coalfield area, India. *Appl Water Sci.* 2021; 11: 153. doi: 10.1007/s13201-021-01433-1
11. Ewusi A, Daanoba E, Seidu J, Coffie-Anum E. Hydrogeochemical characteristics, sources and human health risk assessment of heavy metal dispersion in the mine pit water-surface water-groundwater system in the largest manganese mine in Ghana. *Environ. Technol. Innov.* 2022; 26: 102312. doi: 10.1016/j.eti.2022.102312
12. MINAM. Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM.[Internet]. Lima; MINAM; 2017. [Consultado 12 jul 2023]. Disponible en: <https://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/06/DS-004-2017-MINAM.pdf>.
13. Obasi PN, Eyankware MO, Akudinobi BE. Characterization and evaluation of the effects of mine discharges on surface water resources for irrigation: a case study of

- the Enyigba Mining District, Southeast Nigeria. *Appl Water Sci.* 2021; 11: 112. doi: 10.1007/s13201-021-01400-w
14. Yu H, Gui H, Zhao H. Hydrochemical characteristics and water quality evaluation of shallow groundwater in Suxian mining area, Huaibei coalfield, China. *Int J Coal Sci Technol.* 2020; 7: 825-835.
 15. Ifediegwu IS, Onyeabor CF, Nnamani CM. Geochemical evaluation of carbonate aquifers in Ngbo and environs, Ebonyi State, southeastern, Nigeria. *Model Earth Syst Environ.* 2019; 5: 1893-1909.
 16. Dimech A, Cheng L, Chouteau M. A Review on Applications of Time-Lapse Electrical Resistivity Tomography Over the Last 30 Years : Perspectives for Mining Waste Monitoring. *Surv Geophys.* 2022; 43: 1699-1759.
 17. Isah ME, Abdumumin NA. Effects of columbite/tantalite (COLTAN) mining activities on water quality in Edege-Mbeki mining district of Nasarawa state, North Central Nigeria. *Bull Natl Res Cent.* 2019; 43: 179. doi: 10.1186/s42269-019-0237-0
 18. Okolo CC, Oyedotun TD, Akamigbo FO. Open cast mining: threat to water quality in rural community of Enyigba in south-eastern Nigeria. *Appl Water Sci.* 2018; 8: 204. doi: 10.1007/s13201-018-0849-9
 19. Jakeman A, Barreteau O, Hunt R, Rinaudo JD, Ross A, editors. *Integrated Groundwater Management.* Springer; 2016. doi: 10.1007/978-3-319-23576-9
 20. Jabłońska-Czapla M, Nocoń K, Szopa S. Impact of the Pb and Zn ore mining industry on the pollution of the Biała Przemsza River, Poland. *Environ Monit Assess.* 2016; 188: 262. doi: 10.1007/s10661-016-5233-3
 21. Dutta M, Khare P, Chakravarty S. Physico-chemical and elemental investigation of aqueous leaching of high sulfur coal and mine overburden from Ledo coalfield of Northeast. *Int J Coal Sci Technol.* 2018; 5: 265-281.
 22. Al-Barakah FN, Al-jassas AM, Aly AA. Water quality assessment and hydrochemical characterization of Zamzam groundwater, Saudi Arabia. *Appl Water Sci.* 2017; 7: 3985-3996.
 23. Thakur N, Rishi M, Sharma DA. Quality of water resources in Kullu Valley in Himachal Himalayas, India: perspective and prognosis. *Appl Water Sci.* 2018; 8: 20. doi: 10.1007/s13201-018-0668-z

24. Sreedhar Y, Nagaraju A. Groundwater quality around Tummalapalle area, Cuddapah District, Andhra Pradesh, India. *Appl Water Sci.* 2017; 7: 4077-4089.
25. Xu Z, Sun Y, Gao S. Groundwater Source Discrimination and Proportion Determination of Mine Inflow Using Ion Analyses: A Case Study from the Longmen Coal Mine, Henan Province, China. *Mine Water Environ.* 2018; 37: 385-392.
26. Utom AU, Odoh BI, Egboka BC. Assessment of hydrogeochemical characteristics of groundwater quality in the vicinity of Okpara coal and Obwetti fireclay mines, near Enugu town, Nigeria. *Appl Water Sci.* 2013; 3: 271-283.
27. Tiri A, Lahbari N, Boudoukha A. Assessment of the quality of water by hierarchical cluster and variance analyses of the Koudiat Medouar Watershed, East Algeria. *Appl Water Sci.* 2017; 7: 4197-4206.
28. Ali SA, Ali U. Hydrochemical characteristics and spatial analysis of groundwater quality in parts of Bundelkhand Massif, India. *Appl Water Sci.* 2018; 8: 39. doi: 10.1007/s13201-018-0678-x
29. Shalaby T, Eissa M, El Kady M. Geochemistry of El-Salam Canal and the adjacent groundwater in north Sinai, Egypt: an application to a water treatment process using magnetic zeolite nanoparticles. *Appl Water Sci.* 2018; 8: 105. doi: 10.1007/s13201-018-0741-7
30. Igwe O, Omeka ME. Hydrogeochemical and pollution assessment of water resources within a mining area, SE Nigeria, using an integrated approach. *Int J Energ Water Res.* 2022; 6: 161-182.
31. Zhao F, Gu S, Hao L. Secondary Sulfate Minerals from Pyrite Oxidation in Lanmuchang Hg-Tl Deposit, Southwest Guizhou Province, China: Geochemistry and Environmental Significance. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2021; 107: 1004-1011.
32. Albiero G, Santucci L, Carol E. Assessment of Acid Sulfate Drainage in an Environmental Liability Associated with an Ancient Sulfuric Acid Industry in a Sector of the Río de la Plata Coastal Plain: Impacts On Soil And Water Quality. *Water Air Soil Pollut.* 2021; 232: 150. doi: 10.1007/s11270-021-05107-1
33. Ngounouno MA, Nguéyep LL, Kingni ST. Evaluation of the impact of gold mining activities on the waters and sediments of Lom River, Wakaso, Cameroon and the restorative effect of *Moringa Oleifera* seeds. *Appl Water Sci.* 2021; 11: 113. doi: 10.1007/s13201-021-01445-x

POLIFENOLES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *PETROSELINUM CRISPUM* (MILL) FUSS Y SU APLICACIÓN EN UNA CREMA DERMOCOSMÉTICA

Jorge Rojas Valdivia^{*a}, Américo Jorge Castro-Luna^b, Norma Julia Ramos-Cevallos^b,
Donald Ramos-Perfecto^c, Mario Alcarraz-Curi^d, Jacqueline Segura-Vasquez^b, Danny
Cáceres-Antaurco^b

RESUMEN

El *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss es una hierba aromática que contiene diversos compuestos fitoquímicos, entre los que se destaca los polifenoles; asimismo, se le atribuye propiedad antioxidante. El objetivo fue evaluar el contenido de compuestos fenólicos, la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico del *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss y la elaboración de una crema dermocosmética. La determinación de polifenoles se realizó aplicando el método *in vitro* de Folin Ciocalteu y; la captación de radicales libres, por los métodos DPPH^{*} y ABTS^{*+}. El extracto hidroalcohólico obtuvo un rendimiento de 3,94 % y mediante un screening fitoquímico se confirmó la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, terpenos, lactonas y antraquinonas. Se obtuvieron como resultados: $4,33 \pm 0,0162$ mg EAG/g de compuestos fenólicos y valores TEAC-DPPH^{*} y ABTS^{*+} de 6,4322 mg Trolox[®]/g y 40,8511 mg Trolox[®]/g de extracto, respectivamente. Los valores de IC50 fueron 396,27 y 111,53 $\mu\text{g/ml}$, ($p < 0,05$). El extracto presentó actividad antioxidante baja en comparación con el estándar Trolox[®]. Se elaboraron cremas dermocosméticas con el extracto hidroalcohólico del *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss a concentraciones del 1%, 2% y 4%. Se confirmó que la actividad antioxidante se mantuvo para la crema de concentración intermedia (2%), con un TEAC = 1,05 mg Trolox[®]/g crema 2%. Presentando diferencias significativas entre las cremas de concentraciones 1%, 2% y 4%., aplicando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

Palabras clave: *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss, actividad antioxidante, extracto hidroalcohólico, crema dermocosmética..

^a Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Jirón Huanta 1182, Lima 15001, Perú, jorgegerman.rojas@unmsm.edu.pe

^b Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

^c Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

^d Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

POLYPHENOLS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF *PETROSELINUM CRISPUM* (MILL) FUSS LEAVES AND ITS APPLICATION IN A DERMOCOSMETIC CREAM

ABSTRACT

Petroselinum crispum (Mill) Fuss is an aromatic herb that contains various phytochemical compounds in its aerial parts, among which polyphenols stand out; likewise, it is attributed antioxidant property. The objective was to evaluate the content of phenolic compounds, the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract of *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss and the preparation of a dermocosmetic cream. The determination of polyphenols was carried out applying the in vitro method of Folin Ciocalteu and; the uptake of free radicals, by the DPPH• and ABTS•+ methods. The hydroalcoholic extract obtained a yield of 3.94 % and through a phytochemical screening the presence of phenolic compounds, flavonoids, terpenes, lactones and anthraquinones was confirmed. The following results were obtained: 4.33 ± 0.0162 mg EAG/g of phenolic compounds and TEAC-DPPH• and ABTS•+ values of 6.4322 mg Trolox®/g and 40.8511 mg Trolox®/g of extract, respectively. The IC50 values were 396.27 and 111.53 µg/ml, ($p < 0.05$). The extract presented low antioxidant activity compared to the Trolox® standard. Dermocosmetic creams were made with the hydroalcoholic extract of *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss at concentrations of 1%, 2% and 4%. It was confirmed that the antioxidant activity was maintained for the intermediate concentration cream (2%), with a TEAC = 1.05 mg Trolox®/g 2% cream. Presenting significant differences between the 1%, 2% and 4% concentration creams, applying the Tukey method with a confidence level of 95% ($p \leq 0.05$).

Key words: *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss, antioxidant activity, hydroalcoholic extract, dermocosmetic cream.

INTRODUCCIÓN

Los recursos naturales del Perú y su biodiversidad permiten encontrar y estudiar plantas con propiedades medicinales, entre las cuales tenemos a las hierbas aromáticas como el *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss “perejil” que contienen diversos compuestos fitoquímicos entre los que destacan los flavonoides (apíina, luteolina, apigenina y algunos glucósidos), aceites esenciales (apiol y miristicina)¹, terpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos, a los que se les atribuyen propiedades antibacterianas, antivirales, antitumorales, antiinflamatorias y antioxidantes^{2,3}, cumarinas (bergapteno, imperatorina, xantotoxina, trioxaleno y angelicina)¹, también contiene apreciables cantidades de vitaminas C y E, minerales como fósforo, hierro, calcio y azufre⁴.

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos. Estos compuestos podemos denominarlos polifenoles. Se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. Algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales, otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.). Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides⁵. La biosíntesis de los polifenoles como producto del metabolismo secundario de las plantas tiene lugar a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos⁶. Los antioxidantes son componentes necesarios para proteger a las células del envejecimiento causado por moléculas inestables conocidas como radicales libres⁷. Los antioxidantes, de acuerdo con su función, se pueden dividir en primarios y secundarios o naturales y sintéticos. Los primarios comprenden minerales tales como: selenio, cobre, hierro, zinc, manganeso, vitaminas C, E y fitoantioxidantes. Las funciones de los antioxidantes secundarios son la captura de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la terminación de la reacción en cadena⁸. Las plantas también tienen que protegerse del sol; por lo cual tienen un mejor mecanismo de defensa para evitar oxidarse y morir, debido a que son incapaces de moverse para evitar la luz solar. Así tenemos que, la mayoría de las plantas sintetizan vitaminas C y E, además de compuestos fenólicos como flavonoides, los cuales son poderosos antioxidantes⁹.

El perejil, perteneciente a la familia Apiaceae, ha sido objeto de diversos estudios que resaltan su importancia debido a los avances en la investigación del análisis químico. Diversos estudios han demostrado que las plantas de la familia Apiaceae son prometedoras fuentes de compuestos bioactivos naturales, los cuales podrían resultar útiles en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética. Esto se debe a la presencia de aceites esenciales y componentes bioactivos en los extractos crudos de estas plantas, los cuales poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Estas propiedades respaldan su uso tradicional como remedios caseros y justifican la necesidad de llevar a cabo investigaciones adicionales para desarrollar métodos industriales eficaces y ecológicos¹⁰.

El *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss “perejil” es una planta herbácea de olor penetrante. Es nativa de la región mediterránea. Ha sido introducida y cultivada en muchas partes del mundo debido a los efectos medicinales que se le atribuyen, tales como: antiséptico, estimulante, emenagogo, antiespasmódico, carminativo, estomáquico y su acción sobre la fibra uterina. La hierba fresca es ampliamente utilizada en el arte culinario. Gran parte de su uso se debe a su contenido de aceite esencial, que le brinda un aroma característico¹¹. Se han identificado varios compuestos activos en el perejil que le confieren una amplia gama de actividad farmacológica, que incluye propiedades antioxidantes, hepatoprotectoras, protectoras del cerebro, antidiabéticas, analgésicas, espasmolíticas,

inmunosupresoras y antiplaquetarias¹². Sin embargo, en nuestro medio, no se tienen muchos estudios sobre la cuantificación de compuestos polifenólicos y evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss. Sobre esta base se decidió investigar para obtener y brindar mayor información para estudios posteriores y aplicaciones que puedan considerarlo como un recurso natural frente a productos que requieran una capacidad antioxidante para algún tratamiento dermatocósmico.

Se ha trazado como objetivos evaluar la cuantificación de los compuestos polifenólicos, la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico del *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss y de su crema dermatocósmica. La cuantificación de los compuestos polifenólicos se evaluó según el método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu utilizando el ácido gálico como estándar, la actividad antioxidante del extracto y de su crema dermatocósmica se determinó por los métodos de DPPH• y ABTS•+.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales, equipos y reactivos

1. Materiales

Baguetas, beakers de 5 ml, 10 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, probetas de 10 ml y 50 ml, cubetas de cuarzo para espectrofotómetro, embudo simple, frascos ámbar de 1 L, fioles de 25 ml, 100 ml, matraz Erlenmeyer 250 mL, micropipetas, papel filtro Whatman N° 42, soporte universal, gradillas, algodón, mortero y pilón, pipetas de 1 ml, 5 ml y 10 ml, puntas sueltas de (20 – 200 µl) y (100-1000 µl), tubos de ensayos, guantes de látex y papel aluminio.

2. Equipos

Balanza analítica electrónica modelo Ohaus® Pioneer Chaus Corporation USA, estufa modelo Barnstead Lab-Line, espectrofotómetro Thermo Scientific TM GENESYS 10S UV-Vis, refrigeradora Samsung Modelo ES21HKLMR, molino de discos, cronómetro, cocinilla eléctrica, evaporador rotatorio de marca DLAB RE100-Pro, centrífuga SMART R17, micropipetas marca ISOLAB y BOECO.

3. Reactivos y materias primas

Alcohol etílico 96%, agua bidestilada, agua destilada, carbonato de sodio anhydro (Na₂CO₃), metanol absoluto (Sigma), metanol al 70%, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico Trolox® (Aldrich), β, β'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) (Sigma), persulfato potásico (Sigma-Aldrich), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) (Aldrich), reactivo Shinoda, tricloruro férrico (FeCl₃), gelatina, reactivo de Bertrand, reactivo de Mayer, reactivo de Dragendorff, reactivo de Wagner, reactivo de Liebermann/Burchard, reactivo de Bornträger (Krauss), reactivo Baljet,

reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma- Aldrich) 0,2 N, carbonato de sodio 7,5%, ácido gálico (Sigma-Aldrich), N-Butanol, éter etílico, 1,2-diclorometano.

Metodología

1. Colecta y preparación de la muestra

La muestra de estudio, *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss “perejil” fue colectada en diciembre del 2019 en la provincia de Huaral del departamento de Lima cuya superficie es de 64 500 km², la altitud es de 186 msnm y las coordenadas geográficas son: UTM WG S 84 E:258717.9464 N: 872854.1858¹³. Se utilizó solo partes aéreas, se separaron las hojas del tallo y se pesaron para ser sometidas a la maceración durante 7 días en etanol 96°/agua (7:3).

2. Clasificación taxonómica

La clasificación del material biológico se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos a cargo de la Dra. Joaquina Alban Castillo, siendo la especie identificada *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss.

3. Obtención del extracto hidroalcohólico

Se pesó 1 Kg de hojas y tallos de *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss “perejil” y se puso a secar en una estufa a temperatura de 42 °C, obteniéndose un peso de 280 g de hojas secas que fueron tratadas con 1,5 L de una mezcla hidroalcohólica (7:3) realizando un proceso de maceración en un frasco de color ámbar durante siete días con agitación diaria. Posteriormente se realizó una filtración con papel Whatman N° 42 empleando un equipo de destilación al vacío, obteniéndose un peso de 18,79 g de extracto hidroalcohólico.

4. Marcha fitoquímica

El análisis fitoquímico consistió en realizar un análisis cualitativo de los metabolitos secundarios presentes en el extracto, utilizando reactivos de coloración y precipitación¹⁴.

5. Prueba de Solubilidad

El extracto se sometió a ensayos de solubilidad con solventes de polaridad creciente, empleando éter etílico, 1,2-diclorometano, n-butanol, alcohol etílico absoluto y agua destilada.

6. Determinación del contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Fundamento: Es un método espectrofotométrico que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual contiene molibdato y tungstato sódico que al reaccionar con los fenoles forma el complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, visualizándose una

coloración azul intensa de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}) que tiene un máximo de absorción a 765 nm¹⁵.

Preparación de la muestra: Se trató 0,2 g del extracto en 5 ml de metanol 70% a 70 °C. Se agitó por 10 minutos, se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 350 rpm por 10 minutos. Luego, se separó el sobrenadante en un tubo graduado. Se ajustó el volumen a 10 ml con metanol 70% frío, y se diluyó con agua hasta 100 ml¹⁵.

Procedimiento: Para la reacción de cuantificación, en un tubo de ensayo se colocó 100 µl de la dilución, 500 µl del reactivo Folin-Ciocalteu 0,2 N, se agitó y se dejó en reposo por 3 minutos, posteriormente, se agregó 400 µl de carbonato de sodio 7,5% w/v, se agitó y dejó en reposo durante una hora en oscuridad. Se realizó el mismo procedimiento para las concentraciones del estándar de ácido gálico (5-50 µg/ml). Se leyeron las absorbancias a 765 nm y el valor de polifenoles totales se expresó como equivalentes de ácido gálico/g de muestra¹⁵.

7. Determinación de la actividad antioxidante por el método de 2,2- difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•)

Fundamento: El radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) es de coloración violeta y en presencia de sustancias captadoras de radicales libres el compuesto reacciona y se decolora a amarillo pálido. La reducción del reactivo es seguida midiendo la disminución de la absorbancia espectrofotométricamente a 517 nm. El IC50 define la concentración mínima necesaria para inhibir en un 50% al DPPH• y la actividad antioxidante se expresa en TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox®)¹⁶.

Preparación de la muestra: A partir de una concentración de 12 mg/ml se realizaron diluciones de la muestra a 100, 200, 300 y 400 µg/ml, haciendo uso del solvente hidroalcohólico en proporción 7:3¹⁶.

Preparación de la solución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH): Se pesó 20 mg de DPPH y se disolvió en 50 ml de metanol para obtener una solución stock, posteriormente, se preparó la solución de trabajo de DPPH, midiéndose 1,7 ml de la solución stock de DPPH para llevarlo a un volumen final de 20 ml con metanol con una absorbancia final entre 0,600 – 0,700 ± 0,02 a una longitud de 517 nm¹⁶.

Procedimiento: Luego de la obtención de la solución de trabajo DPPH, se calibró el espectrofotómetro con un blanco que contiene 400 µl del solvente de la muestra problema y 800 µl de metanol. En un tubo de ensayo se colocó 400 µl de cada dilución y 800 µL de la solución de trabajo de DPPH, luego se agitó y dejó en reposo durante 30 minutos alejado de la luz. Se leyó las absorbancias a 517 nm y se realizó el mismo procedimiento para el control de DPPH en donde se reemplaza la muestra problema por su solvente y para la sustancia patrón Trolox®¹⁶.

Se calculó el porcentaje de inhibición de acuerdo a la siguiente fórmula¹⁶:

$$\% \text{Inhibición} = (\text{Abs. DPPH} - \text{Abs. muestra}) / (\text{Abs. DPPH}) \times 100$$

Se determinó el valor TEAC según la siguiente fórmula:

$$\text{TEAC} = \text{IC } 50 \text{ Trolox® } \mu\text{g/ml} / \text{IC } 50 \text{ DPPH muestra mg/ml}$$

8. Determinación de la actividad antioxidante por el método de β , β' -azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS●+)

Fundamento: El radical catiónico ABTS●+ es un cromóforo verde azulado que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del β , β' -azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) con persulfato de potasio. En presencia de una sustancia captadora de radicales libres el compuesto reacciona y se decolora. La reducción del reactivo es seguida midiendo la disminución de la absorbancia espectrofotométricamente a 734 nm. La actividad antioxidante de la muestra se expresa en IC50 (concentración mínima necesaria para inhibir en un 50% el ABTS●+)¹⁷.

Preparación de la solución stock de β , β' -azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS●+): Se preparó una solución stock de ABTS●+ 7 mM, y para su activación se añadió persulfato de potasio para una concentración final de 2,45 mM y se dejó reaccionar por 16 horas a temperatura ambiente y alejado de la luz. La solución stock de ABTS●+ se diluyó en agua bidestilada hasta obtener una absorbancia de $0,7 \pm 0,02$ a 734 nm¹⁷.

Preparación de la muestra: A partir de una concentración de 10 mg/ml se realizaron diluciones de la muestra a 25, 100 y 150 μ g/ml, haciendo uso del solvente hidroalcohólico¹⁷.

Procedimiento: Luego de obtener la solución de trabajo ABTS●+, se calibró el espectrofotómetro con un blanco que contenía 20 μ l del solvente de la muestra problema y 980 μ l de agua bidestilada. En un tubo de ensayo se colocó 20 μ l de cada dilución y 980 μ l de la solución de trabajo de ABTS●+. Posteriormente se agitó y dejó en reposo durante 7 minutos alejado de la luz. Las absorbancias fueron medidas a 734 nm, realizando el mismo procedimiento para el control de ABTS●+ en donde se reemplaza la muestra problema por su solvente. Se realizó el mismo procedimiento para el estándar Trolox®. En ambos métodos, DPPH y ABTS●+, las soluciones de trabajo se prepararon y se cubrieron con papel aluminio para evitar su degradación¹⁷.

Se efectuó el cálculo del % de inhibición de acuerdo con la siguiente fórmula¹⁷:

$$\% \text{ Inhibición} = (\text{Abs. Radical libre} - \text{Abs. muestra}) / (\text{Abs. Radical libre}) \times 100$$

Se determinó el valor TEAC según la siguiente fórmula:

$$\text{TEAC} = \text{IC 50 Trolox® } \mu\text{g/ml} / \text{IC 50 muestra mg/ml}$$

9. Formulación de la crema dermocosmética

Tabla 1. Formulación de crema dermocosmética a base del extracto hidroalcohólico de *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss “perejil”.

Fase	Componente	Nombre/INCI	Crema	Crema	Crema
			al 1%	al 2%	al 4%
			%	%	%
A)	Agua desionizada	Water	71.11	70.11	68.11
	Carbopol® Ultrez 21 polymer	Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	0.14	0.14	0.14
	Edeta BD	Disodium EDTA	0.10	0.10	0.10
B)	Lanette O	Cetoestearyl alcohol	3.20	3.20	3.20
	MONTANOV™ 202	Arachidyl Alcohol (and) Behenyl Alcohol (and) Arachidyl Glucoside	3.00	3.00	3.00
C)	Emulgade® 1000 NI	Cetearyl Alcohol (and) Cetareth-20	3.10	3.10	3.10
	Aceite de palta	Persea gratissima oil	1.70	1.70	1.70
	Aceite de coco	Cocos nucifera (Coconut) Oil	1.70	1.70	1.70
D)	Oliest IPM-R	Isopropyl myristate	1.50	1.50	1.50
	Cetiol® Ultimate	Undecane (and) Tridecane	1.50	1.50	1.50
E)	Gransil PSQ	Polymethylsilsesquioxane	0.80	0.80	0.80
	XIAMETER™ PMX-1501 Fluid	Cyclopentasiloxane (and) Dimethiconol	1.00	1.00	1.00
F)	iMoist HU 50	Hydroxyethyl Urea	4.50	4.50	4.50
	Glicerina 99.5%	Glycerin	3.00	3.00	3.00
G)	Vitamin E Acetate	Tocopheryl Acetate	0.50	0.50	0.50
H)	Extracto de Perejil hidroalcohólico 7:3	Petroselinum crispum leaf extract	1.00	2.00	4.00
I)	Saliguard® EHGP	Ethylhexylglycerin (and) Phenoxyethanol	1.00	1.00	1.00
J)	Trietanolamina 88%	Triethanolamine	0.15	0.15	0.15
K)	Rheosol AVC	Acrylamide/Sodium Acrylate Copolymer (and) Paraffinum Liquidum (and) Trideceth-6	1.00	1.00	1.00
			100.00	100.00	100.00

10. Caracterización de la crema dermocosmética

Una vez formulada y preparada la crema antiarrugas a base del extracto hidroalcohólico de perejil al 4%, se valoraron las siguientes propiedades organolépticas: aspecto, color, olor. En cuanto a las propiedades fisicoquímicas consideradas fueron: pH, gravedad específica y viscosidad¹⁸.

También se efectuaron las pruebas de estabilidad, que nos indican la preservación de sus propiedades físicas y químicas a través del tiempo. Para ello se realizaron dos pruebas: estrés térmico y centrifugación, las cuales también se efectúan en el laboratorio cosmético SKIN CLEAN S.R.L. Durante el estrés térmico, se tomaron tres muestras del producto y se sometieron a distintas temperaturas, una muestra se llevó a la estufa a 40 °C, la segunda muestra se refrigeró a -5 °C y la tercera muestra se dejó a temperatura ambiente 18 – 25 °C. Este ensayo se realizó por 30 días, verificando las muestras diariamente para observar si se produce separación de fases y/o algún cambio desfavorable en cuanto a; olor, color, pH y viscosidad¹⁹. Posteriormente, se colocaron dos muestras del producto en una centrífuga a una velocidad angular de 3000 rpm por un tiempo de 20 minutos y se observó si se llevaba a cabo la separación de fases²⁰.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por el método de maceración hidroalcohólica se obtuvo el extracto del *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss “perejil” con un rendimiento de 3,94%.

En la marcha fitoquímica se confirmó la presencia con mediana evidencia de flavonoides, compuestos fenólicos, triterpenoides, antraquinonas y lactonas. Con poca evidencia se confirmó la presencia de taninos y saponinas. Finalmente, sin ningún tipo de evidencia los alcaloides (Tabla 2.).

Tabla 2. Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico del *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss “perejil”.

<i>Metabolitos Secundarios</i>	<i>Reacción de identificación</i>	<i>Resultados en el extracto etanol/agua (7:3) de Petroselinum crispum (Mill) Fuss “perejil”</i>	<i>Calificación</i>
Flavonoides	Shinoda	Coloración rojo intenso	++
Compuestos Fenólicos	Tricloruro Férrico (FeCl ₃)	Coloración azul verdoso	++
Taninos	Gelatina	Coloración ligeramente blanca	+
	Dragendorff	-	-

	Bertrand	-	-
	Wagner	-	-
Alcaloides	Mayer	-	-
Saponinas	Prueba de Espuma	1 cm persistente	+
Triterpenoides	Liebermann	- Coloración pardo rojiza	++
	Burchard		
Antraquinonas	Borntrager (Krauss)	Coloración rojiza	++
Lactonas	Baljet	Coloración naranja rojiza	++

Leyenda: (+++) Alta evidencia, (++) Mediana evidencia, (+) Poca evidencia, (-) Negativo.

Con respecto a la prueba de solubilidad, el extracto hidroalcohólico del *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss “perejil” es altamente soluble en alcohol etílico absoluto. Es medianamente soluble en agua destilada y poco soluble en en n-butanol, 1,2-diclorometano y éter etílico (Tabla 3.).

Tabla 3. Prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico del *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss “perejil”.

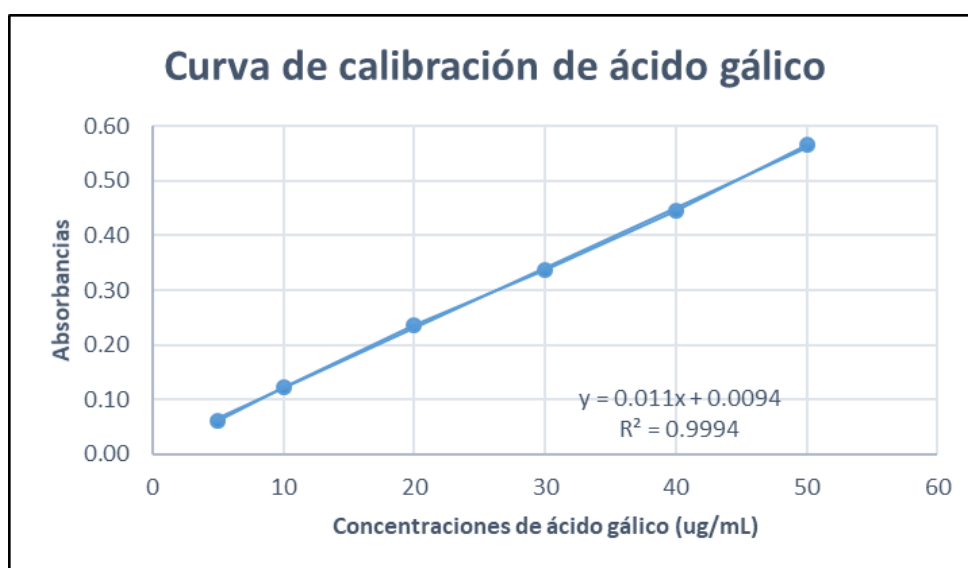
<i>Solvente</i>	<i>Solubilidad</i>
Alcohol etílico absoluto (C ₂ H ₆ O) (polar prótico)	+++
n-butanol (C ₄ H ₁₀ O) (polar prótico)	+
Éter etílico (C ₂ H ₅) ₂ O (no polar)	+
1,2-diclorometano (CH ₂ Cl ₂) (polar prótico)	+
Agua destilada (H ₂ O) (polar prótico)	++

Leyenda: (+++) Alta evidencia, (++) Mediana evidencia, (+) Poca evidencia, (-) Negativo.

La muestra obtuvo un promedio de absorbancia de: 0,2958 y un valor de $4,33 \pm 0,0162$ mg EAG/g de extracto hidroalcohólico de *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss. (Tabla 4, Figura 1.).

Tabla 4. Concentración de ácido gálico ($\mu\text{g/ml}$) vs. absorbancia.

<i>Concentración de ácido gálico ($\mu\text{g/ml}$)</i>	<i>Absorbancias</i>
5	0,0611
10	0,1223
20	0,2364
30	0,3371
40	0,4453
50	0,5655

**Figura 1.** Curva de calibración de ácido gálico

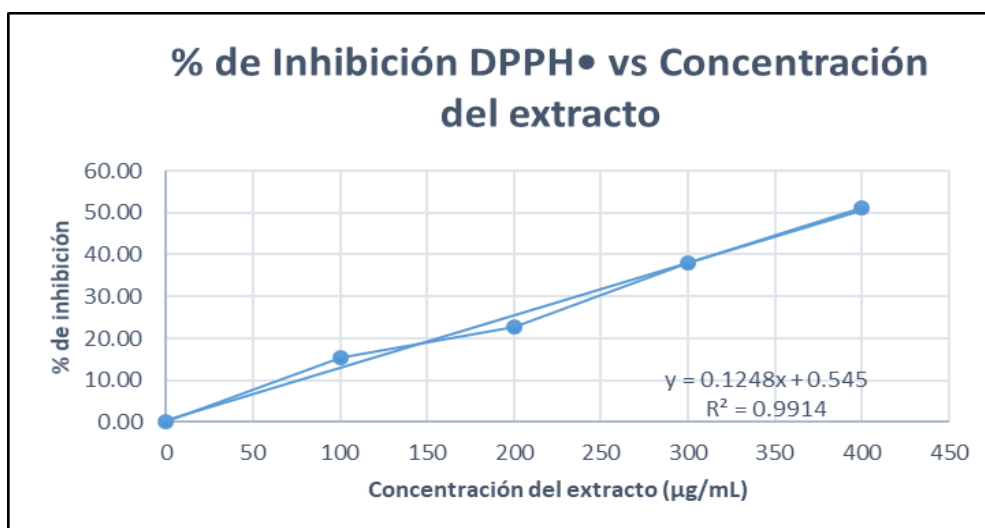
En la Tabla 5 y Figura 2 se observa una relación dependiente entre la concentración de extracto y porcentaje (%) de inhibición del radical DPPH•. A mayor aumento de concentración, la inhibición aumenta.

Las medias diferentes indican que existen diferencias significativas entre sí, usando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

La muestra obtuvo un $\text{IC}_{50} = 396,2740 \text{ ug/ml}$, que en comparación con el estándar de Trolox® ($\text{IC}_{50} = 2,5487 \text{ ug/ml}$) su actividad antioxidante es baja; el estándar con una concentración menor inhibe el 50 % del radical DPPH•.

Tabla 5. Concentración del extracto, absorbancia, desviación estándar y porcentaje (%) de inhibición del radical DPPH•

<i>Concentración del extracto (µg/ml)</i>	<i>Absorbancia ± DE</i>	<i>Inhibición (%) DPPH•</i>	<i>IC 50 (µg/ml)</i>
0	0,4306 ± 0,0041	0,0000	396,2740 µg/ml
100	0,3641 ± 0,0173	15,4486	
200	0,3321 ± 0,0025	22,8691	
300	0,2663 ± 0,0062	38,1513	
400	0,2108 ± 0,0002	51,0413	



TEAC = 6,4322 mg Trolox®/g muestra

Figura 2. Porcentaje de Inhibición DPPH• vs. Concentración del extracto.

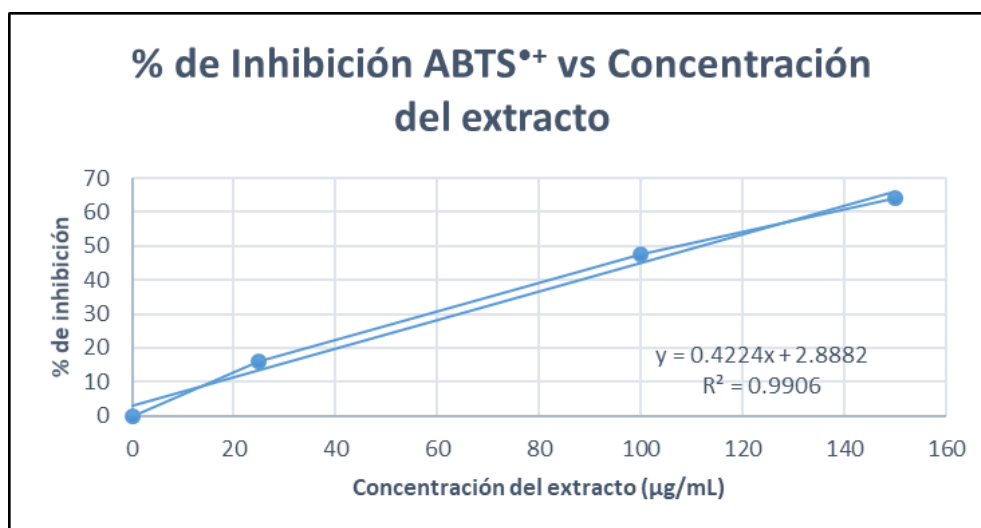
En la Tabla 6 y Figura 3 se observa una relación dependiente entre la concentración de extracto y el porcentaje (%) de inhibición del radical ABTS•+. A mayor aumento de concentración la inhibición aumenta.

Las medias diferentes indican que existen diferencias significativas entre sí, usando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

La muestra obtuvo un IC 50 = 111.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que en comparación con el estándar de Trolox® (IC50 = 4.5549 $\mu\text{g}/\text{mL}$) su actividad antioxidante es baja, el estándar con una concentración menor inhibe 50 % del radical ABTS•+.

Tabla 6. Concentración del extracto, absorbancia, desviación estándar y porcentaje (%) de inhibición del radical ABTS•+

Concentración del extracto ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Absorbancia \pm DE	(%) Inhibición ABTS•+	IC 50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
0	0,7844 \pm 0,0001	0	IC 50 = 111,53
25	0,6589 \pm 0,0172	15,9941	$\mu\text{g}/\text{ml}$
100	0,4123 \pm 0,0123	47,4342	



TEAC = 40,8511 mg Trolox®/g muestra

Figura 3. Porcentaje de Inhibición ABTS•+ vs. Concentración del extracto

Se realizó la preparación y caracterización de una crema dermocosmética a base de extracto hidroalcohólico de *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss en concentraciones de 1%, 2% y 4%, se observó que la formulación de mayor concentración de extracto presentaba aspecto de emulsión viscosa de color ligeramente marrón suave y de olor característico, con pH 5,8 - 6,5 y una viscosidad 35,000 - 150,000 cps.

Mientras que las pruebas de estabilidad evidenciaron que las propiedades físicas y químicas se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo y bajo las condiciones a las que se sometió. Estos resultados sugieren que la crema desarrollada tiene una buena

estabilidad, lo que la convierte en una opción prometedora para su aplicación dermocosmética.

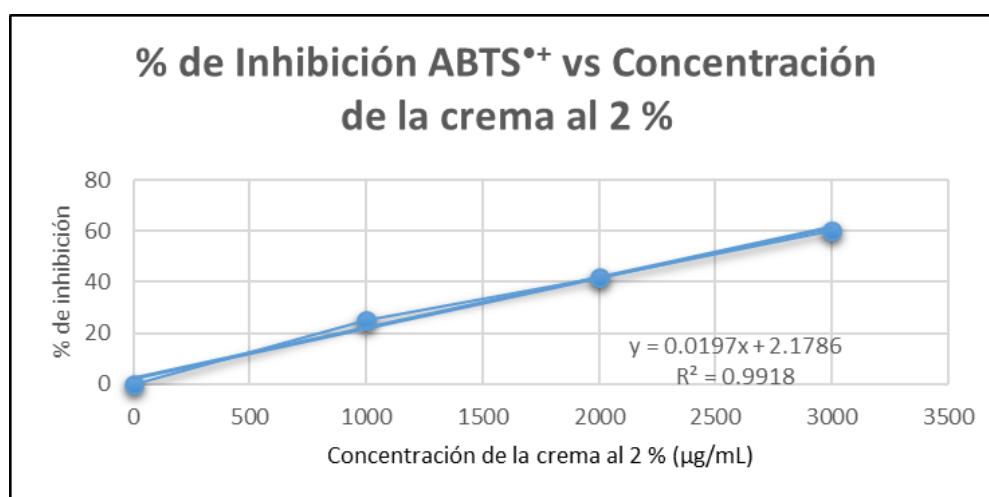
Para el método ABTS^{•+} se preparó una concentración de 10 mg/ml de crema y se hicieron diluciones equivalentes a las obtenidas en el extracto hidroalcohólico de *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss (Tabla 7.).

Tabla 7. Concentración de la crema, absorbancia, desviación estándar y porcentaje (%) de inhibición del radical ABTS^{•+}.

Concentración de la crema al 2% (μg/ml)	Absorbancia ± DE	(%) Inhibición ABTS ^{•+}	IC 50 (μg/ml)
0	0,7584 ± 0,0519	0,0000	IC 50 = 2427,4822 μg/ml
1000	0,5688 ± 0,0109	24,9923	
2000	0,4404 ± 0,0222	41,9344	
3000	0,3029 ± 0,0160	60,0589	

Las medias diferentes indican que existen diferencias significativas entre sí, usando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$) (Figura 4.).

Se confirmó la actividad antioxidante en la crema dermocosmética elaborada a base del extracto hidroalcohólico del *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss (perejil), la actividad se mantuvo en la crema.



TEAC = 1,0499 mg Trolox®/g crema 2%

Figura 4. Porcentaje de Inhibición ABTS^{•+} vs. Concentración de la crema al 2%

Se ha demostrado en diversos materiales bibliográficos que los radicales libres tienen una estrecha relación con diversas enfermedades en el ser humano, es por ello que se dispone de sistemas destinados a neutralizar el efecto nocivo que ejercen estos compuestos, aunque al parecer, no son lo suficientemente eficientes, por lo que se recomienda ingerir compuestos con propiedades antioxidantes como las vitaminas, betacaroteno y ascorbatos, muchos de los cuales se encuentran en los vegetales, describiendo el efecto beneficioso que podrían ejercer los flavonoides²¹.

En el presente trabajo se utilizó el método de maceración hidroalcohólica, obteniéndose el extracto del *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss “perejil” con un rendimiento de 3,94%. Asimismo, la marcha fitoquímica evidenció la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos, así como también lactonas y triterpenoides, indicando que hay evidencia de metabolitos secundarios con función antioxidante, mientras que la prueba de solubilidad evidenció su afinidad por los solventes polares próticos frente a los no polares.

Entre los metabolitos secundarios que presenta el extracto hidroalcohólico del perejil están los flavonoides y los compuestos fenólicos que le confieren una acción antioxidante. Además, el perejil tiene diversas propiedades entre las que se mencionan: antiulcerosa²², antihepatotóxica²³, hipoglucemiante²⁴, antioxidante²⁵ y actividad estrogénica²⁶.

Se ha descrito que ciertos flavonoles como la rutina o la miricetina, inhiben específicamente a la xantina oxidasa, enzima que presenta afinidad por producir especies reactivas de oxígeno, fenómeno implicado en varios estados patológicos²⁷. En la marcha fitoquímica, se evidencia la presencia de polifenoles, por lo cual, se realizó la prueba in vitro de Folin-Ciocalteu obteniéndose una absorbancia de 0,2958 y un valor de $4,33 \pm 0,0162$ mg EAG/g de extracto hidroalcohólico de *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss. En otro estudio, se identificaron veintinueve glucósidos flavonoides en el extracto acuoso (PC) de *Petroselinum crispum* var. *crispum* y apiina, el compuesto principal, se aisló de las mismas. Se obtuvo apigenina (90% de pureza) por hidrólisis de apiina²⁸.

Se cuantificó un alto contenido de fenoles ($12,49 \pm 1,70$ mg EAG por gramo del extracto acuoso de perejil) por el método de Folin-Ciocalteu y flavonoides totales ($15,05 \pm 2,20$ mg de equivalentes de quercetina por gramo de extracto acuoso de perejil) por el método de cloruro de aluminio en *P. crispum*. En comparación con nuestro resultado la cantidad de polifenoles totales presentes en el extracto hidroalcohólico del *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss es menor con respecto a la cuantificación del extracto acuoso del *Petroselinum crispum* var. *crispum* reportados por Neide Mara²⁹.

Con respecto a la capacidad antioxidante se midieron mediante dos métodos muy utilizados: DPPH• y ABTS•+, dando como valores TEAC-DPPH•, ABTS•+ de 6,4322 mg Trolox®/g y 40,8511 mg Trolox®/gde extracto, respectivamente. En los métodos DPPH• y ABTS•+ los valores de IC50 de 396,2740 µg/ml y 111,53 µg/ml presentaron diferencia significativa ($p \leq 0,05$). Se concluyó que el extracto hidroalcohólico posee actividad antioxidante baja en comparación con el estándar Trolox®.

Mortada et al.²⁴ evaluó la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss por el ensayo del radical 1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•) y 2,2'-

azino- bis (3-etilbenzotiazolina-6-ensayo de ácido sulfónico (ABTS•+). Los resultados obtenidos fueron que la fracción de acetato de etilo derivada del extracto metanólico demostró la actividad de DPPH• (Sc50= 44,51±2,06 µg/ml) y la actividad de ABTS•+ (69,82±3,07 mg Trolox® eq./10 g extracto). En comparación con nuestro resultado el extracto metanólico posee una mayor capacidad antioxidante.

Con respecto a la actividad antioxidante de la crema de perejil al 2%, se obtuvo un TEAC = 1,0499 mg Trolox®/g crema 2% el cual no supera al Trolox®, debido a los diferentes componentes, aditivos y excipientes presentes en su formulación; sin embargo, con los valores obtenidos se puede afirmar que la crema de perejil al 2% ejerce efecto antiarrugas. Por otro lado, se debe tomar en cuenta que el uso de distintos sustratos lipídicos tendría un impacto significativo en la actividad de diversos antioxidantes según su naturaleza hidrófila o lipófila, debido a que la distribución y las características de solubilidad afectan la actividad de los antioxidantes en un sistema heterogéneo donde se distribuyen de manera diferente entre las fases acuosa y lipídica³⁰. Asimismo, el mecanismo de oxidación y descomposición del hidróperóxido varía con la temperatura, por lo que se pueden obtener diferentes resultados a diferentes temperaturas; y los distintos métodos utilizados para seguir la oxidación pueden dar resultados variables según los diferentes efectos de los antioxidantes en la formación de hidróperóxidos y su descomposición. Las eficiencias de antioxidantes relativas cambian significativamente de un sustrato lipídico oxidante a otro. En el mismo sustrato lipídico, la actividad relativa de los antioxidantes generalmente depende de la concentración de los antioxidantes³¹.

Para concluir, dado que *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss “perejil” es una especie vegetal en investigación, no fue posible encontrar otros estudios sobre la actividad antioxidante de cremas a base de este vegetal, es por ello que con esta investigación se pretendió añadir la acción antioxidante del “perejil” a formas farmacéuticas tópicas, puesto que estos preparados son fácilmente utilizados por la población y al ser usados por vía tópica mejora sus beneficios para la piel, por lo cual, la concentración de antioxidantes y el vehículo son factores importantes en su efectividad³². Por otro lado, Castaño²⁷ afirma que, en la actualidad, las cremas tópicas son una estrategia clave para prevenir las manifestaciones cutáneas, por lo que es la vía responsable del envejecimiento celular; debido a esto se buscan activos cosméticos que sean capaces de neutralizar su efecto, siendo fundamental la aplicación de activos antioxidantes que pueden minimizar los efectos del estrés oxidativo y retrasar la muerte celular que se oculta tras el proceso de envejecimiento de la piel.

CONCLUSIONES

El contenido de polifenoles totales del extracto hidroalcohólico del *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss (perejil) fue de 4,33 ± 0,0162 mg EAG/g determinado por el método de Folin-Ciocalteu.

La actividad antioxidante in vitro del extracto hidroalcohólico del *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss (perejil) por el método DPPH• exhibió un IC50 de 396,27 µg/mL con un valor

TEAC de 6,4322 mg Trolox/g y para el ABTS•+ su IC50 fue 111,53 µg/ml con un valor TEAC de 40,8511 mg Trolox/g ($p < 0,05$).

Se elaboraron cremas dermocosméticas con el extracto hidroalcohólico *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss “perejil” en concentraciones de 1%, 2% y 4%, las cuales presentaron actividad antioxidante in vitro por el método ABTS•+ con un TEAC = 1,0499 mg Trolox®/g crema 2%. Hallándose diferencias significativas entre sí, mediante el método de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Delgado M. Caracterización y cuantificación de flavonoides en dos especies de *Petroselinum* con diferentes tratamientos térmicos. [Tesis de Postgrado]. Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2015.
2. Brack Egg A. Diccionario Enciclopédico de Plantas útiles en del Perú. Cuzco: Centro Bartolomé de las Casas; 1999. p 82.
3. Font Quer P. Plantas Medicinales: El Dioscórides renovado. Barcelona: Editorial Labor; 1981.
4. Troncoso L, Guija E. Efecto antioxidante y hepatoprotector del *Petroselinum savitum* (perejil) en rata, con intoxicación hepática inducida por paracetamol. Rev An Fac Med. 2007; 68(4): 333-343.
5. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. Nutr Hosp. Madrid. 2012; 27(1):76-89.
6. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr Rev. 1998; 56: 317-333.
7. Hosseinpour S, Adibah F, Majid A, Roji M. Antioxidant properties of cashew leaves extracts before and after treatment with activated carbon used in cosmetics. J Med Plant Res. 2011; 5(17): 4162-4170.
8. Junes R. Evaluación de la actividad antioxidante in vitro y efecto regenerador in vivo de una crema cosmética con extracto liofilizado de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). [Tesis de Postgrado]. Lima, Perú: Universidad Nacional de Mayor de San Marcos; 2017.
9. Pinell S. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. J Am Acad Dermatol. 2003; 48 (1): 1-22.
10. Sayed-Ahmad B, Talou T, Saad Z, Hijazi A, Merah O. The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. Ind Crops Prod. 2017; 109:661–71.

11. Vivanco R, León E, Castro A, Ramos N. Composición química del aceite esencial de *Petroselinum crispum* (Mill) Fuss “perejil” y determinación de su actividad antibacteriana. *Ciencia e Investigación*. 2012; 15(2): 78-83.
12. Farzaei MH, Abbasabadi Z, Ardekani MR, Rahimi R, Farzaei F. Parsley: A review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. *J Tradit Chin Med*. 2013;33(6):815–26.
13. Espinoza A. Infraestructura de Información Geoespacial Fundamental. [Internet]. [citado 18 ene 2023]. Disponible en: <https://www.idep.gob.pe/geovisor/VisorDeMapas/>
14. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Tercera edición. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 2013.
15. ISO 14502-1. Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent International Organization of Standardization. 2005;1-10.
16. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*. 1995;28(1):25-30
17. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 2007;26(9/10):1231-7.
18. Mehlenbacher VC. Analisis de grasas y aceites. In: Volume 6 of Enciclopedia de la química industrial. Bilbao: Urmo; 1979.
19. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria - ANVISA. Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos. 1ra ed. Brasilia: ANVISA; 2004.
20. Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Chile. Guía de Trabajos Prácticos. Santiago: Universidad de Chile; 2004.
21. Troncoso L, Guija E. Propiedades antioxidantes del perejil (*Petroselinum sativum*). *Rev. Soc. Quím. Perú*, 2005; 71 (2): 99-106.
22. Al-Howiriny T, Al-Sohaibani M, El-Tahir K, Rafatullah S. Prevention of experimentally-induced gastric ulcer in rats by an ethanolic extract of “parsley” *Petroselinum crispum*. *Am J Chin Med*; 2003; 31(5): 699-711.
23. Bolkem S, Yanardag R. Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) on the liver of diabetic rats: a morphological and biochemical study. *Phytother Res*. 2004; 18(12): 996-9.
24. Yanardağ R, Bolkent Ş, Tabakoğlu-Oğuz A, Ösoy-Saçan O. Effects of *Petroselinum crispum* extract on pancreatic B cells and blood glucose os streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26(8): 1206-1210.
25. Nielsen SE, Young JF, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Sandström B, Dragsted LO. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *Br J Nutr*. 1999;81(6):447-55.

26. Yoshikawa M, Uemura T, Shimoda H, Kishi A, Kawahara Y, Matsuda H. Medicinal Foodstuffs. XVIII. Phytoestrogens from the aerial part of *Petroselinum crispum* Mill. (Parsley) and structures of 6-acetylapiin and a new monoterpene glycoside, petroside. Chem Pharm Bull. 2000; 48(7): 1039-44.
27. Robak J, Gryglewski R. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. Biochem Pharmacol. 1988; 37: 837-841.
28. Mara de Menezes Epifanio N, Rykiel Iglesias Cavalcanti L, Falcão Dos Santos K, Soares Coutinho Duarte P, Kachlicki P, Ożarowski M, et al. Chemical characterization and in vivo antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) aqueous extract. Food Funct. 2020;11(6):5346-5356.
29. Mortada ES, Nadia M, Ibrahim I, Abdel-Hady H, Abdel-Wahab BSA. Antioxidant activity, total Phenolic and Flavonoid Contents of *Petroselinum crispum* Mill. JALSI, 2018 19(2): 1-7.
30. Frankel EN. Chapter 9 - Antioxidants. En: Frankel EN, editor. Lipid Oxidation (Second Edition) [Internet]. Woodhead Publishing; 2012 [citado 26 jun 2020]. p. 209-58. (Oily Press Lipid Library Series). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780953194988500102>
31. Universidad Privada Autónoma del Sur S.A.C. Código de ética para la investigación. [Internet]. 2016. [Citado 19 set 2019]. Disponible en: <http://www.upads.edu.pe/admin/files/transparencia/CIDIGO-DEETICA.pdf>.
32. Castaño C, Hernández P. Activos antioxidantes en la formulación de productos cosméticos antienvjecimiento. Ars Pharm. 2018; 59(2): 77-84.

RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE COMPLEJOS DE DESFERRIOXAMINA CON ALUMINIO, GALIO Y HIERRO EN EL RECEPTOR FHUE: UN ESTUDIO *IN SILICO*

Jesús Alvarado-Huayhuaz^a, Wilmar Puma Zamora^b, Atualpa C. Braga^c, Ana Cecilia Valderrama Negrón^{*a}

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud ha categorizado a *Acinetobacter baumannii* en la categoría de alta prioridad, debido a que urgen estrategias farmacológicas para combatir su resistencia a los antibióticos. La maquinaria bacteriana de adquisición de hierro ha sido empleada exitosamente en estudios previos con diferentes bacterias Gram-negativas, para internalizar metales abiogénicos coordinados a sideróforos mediante el efecto caballo de Troya, sin embargo, aún no hay reportes con *A. baumannii*. En este trabajo se realizó un estudio *in silico* para conocer las posibilidades de aplicación de este efecto en *A. baumannii*, específicamente analizando su receptor de hierro-sideróforo de tipo hidroxamato (FhuE), y el reconocimiento molecular de los complejos de aluminio-desferrioxamina (Al-DFO) y galio-desferrioxamina (Ga-DFO). Se realizó un análisis estructural y energético de los complejos, incluyendo al control hierro-desferrioxamina (Fe-DFO). Encontramos importantes diferencias en la reactividad química de Fe-DFO, que parecen no influir en el reconocimiento molecular en FhuE. La energía de afinidad y las interacciones intermoleculares fueron prácticamente replicadas al intercambiar el metal, según el análisis de acoplamiento. Sin embargo, según las simulaciones de dinámica molecular, Al-DFO se estabilizó principalmente mediante enlaces de hidrógeno, mientras que Ga-DFO lo hizo en menor medida, asemejándose más a Fe-DFO. Estos resultados nos permiten confirmar que FhuE presenta un reconocimiento molecular de Al-DFO y GaDFO análogo al Fe-DFO, por ello, el diseño de nuevos complejos metal-sideróforo podrían ser una vía exitosa para la aplicación del efecto caballo de Troya en *A. baumannii*.

Palabras clave: Desferrioxamina, efecto caballo de Troya, aluminio, galio, *in silico*.

^a Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima, Perú, anitacvn29@yahoo.com.mx.

^b Centro de Estudios de Plantas Alimenticias y Medicinales (CEPLAM), Vicerrectorado de Investigación, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Av. de la Cultura 733, Perú.

^c Grupo de Química Computacional Aplicada, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, São Paulo, Brasil

MOLECULAR RECOGNITION OF DEFEROXAMINE COMPLEXES WITH ALUMINUM, GALLIUM, AND IRON IN THE FHUE RECEPTOR: AN IN SILICO STUDY

ABSTRACT

The World Health Organization has categorized *Acinetobacter baumannii* in the high-priority category, due to the urgent need for pharmacological strategies to combat its antibiotic resistance. The bacterial machinery for iron acquisition has been successfully employed in previous studies with different Gram-negative bacteria to internalize abiotic metals coordinated to siderophores through the Trojan horse effect. However, there are no reports yet with *A. baumannii*. In this work, an *in silico* study was conducted to explore the possibilities of applying this effect in *A. baumannii*, specifically by analyzing its hydroxamate-type iron-siderophore receptor (FhuE), and the molecular recognition of aluminum-desferrioxamine (Al-DFO) and gallium-desferrioxamine (Ga-DFO) complexes. A structural and energetic analysis of the complexes was carried out, including the control iron-desferrioxamine (Fe-DFO). We found significant differences in the chemical reactivity of Fe-DFO, which seemed not to influence the molecular recognition in FhuE. The affinity energy and intermolecular interactions were largely replicated when exchanging the metal, as per the docking analysis. However, molecular dynamics simulations showed that Al-DFO was primarily stabilized by hydrogen bonds, while Ga-DFO did so to a lesser extent, resembling Fe-DFO more closely. These results confirm that FhuE exhibits a molecular recognition of Al-DFO and Ga-DFO analogous to Fe-DFO. Therefore, the design of new metal-siderophore complexes could be a successful via for applying the Trojan horse effect in *A. baumannii*.

Keywords: Deferoxamine, trojan horse effect, aluminum, gallium, *in silico*.

INTRODUCCIÓN

La estrategia farmacológica llamada efecto caballo de Troya (THA, por sus siglas en inglés: *Trojan Horse Approach*) alude a la Guerra de Troya para explicar cómo se promueve la inserción de un agente tóxico (fármaco) en bacterias, empleando su propio mecanismo bioquímico de adquisición de hierro. En nuestra atmósfera oxidante predomina el Fe^{3+} , sin embargo, este presenta una extremadamente baja biodisponibilidad¹. Las bacterias y otros microorganismos desarrollaron estrategias de quelación para favorecer la formación de complejos de alta estabilidad con Fe^{3+} , para ello, sintetizan moléculas quelantes de bajo peso molecular llamadas sideróforos, como por ejemplo, enterobactina en *Escherichia coli* o preacinetobactina en *Acinetobacter*

*baumannii*². El complejo Fe³⁺-sideróforo se puede acoplar en una proteína receptora de sideróforos (endógenos y/o exógenos) localizada en la membrana externa del microorganismo, mediante un conjunto de interacciones intermoleculares con algunos residuos de aminoácidos específicos en la cavidad del receptor que inducen un ajuste dinámico entre el ligando y el receptor³. Esta configuración de interacciones, permite el reconocimiento molecular y promueve el proceso de internalización del hierro-sideróforo⁴.

A. baumannii es un cocobacilo Gram-negativo oportunista con alta supervivencia y resistencia a los antibióticos, en comparación a otras especies de *Acinetobacter* no *baumannii*. Se asocia principalmente con infecciones nosocomiales en pacientes de cuidados intensivos e inmunocomprometidos. Lamentablemente, la falta de tratamientos eficaces resulta en altas tasas de mortalidad, por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a *A. baumannii* resistente a carbapenémicos como una prioridad 1 o crítica, que requiere nuevos antibióticos con urgencia^{5,6}.

En nuestro organismo, el mecanismo de defensa promovido por citoquinas, hormonas y proteínas como las lipocalinas^{7,8} restringen la disponibilidad de hierro a concentraciones extremadamente bajas (hasta 10⁻²⁴ M), en consecuencia, *A. baumannii*, expresa receptores de xenosideróforos tales como desferricoprogen, ácido rodotorúlico y desferrioxamina para incrementar sus posibilidades de captación de hierro⁹. Los sideróforos endógenos identificados en *A. baumannii* son de tipo catecol y son la acinetobactina, la fimsbactina y la baumannoferrina, que son transportadas por diferentes tipos de proteínas receptoras, lo cual destaca su especificidad. En condiciones de alta demanda de hierro, participan proteínas receptoras de sideróforos de otros tipos, como reportaron Grinter y Lithgow en el año 2019¹⁰, al cristalizar por primera vez el hierro-sideróforo hidroxámico coprogeno (HWS) en la proteína FhuE (por sus siglas en inglés *ferric hydroxamate uptake E*), identificado con 6E4V en el repositorio de proteínas PDB RSCB.

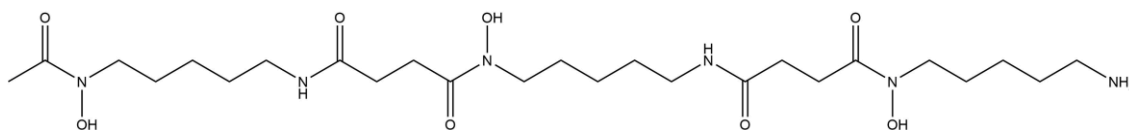


Figura 1. Representación molecular de la Desferrioxamina B.

La Desferrioxamina B (DFO, Figura 1) o N-(5-aminopentil)-N-hidroxi-N'-[5-(N-hidroxi-3-{[5-(N-hidroxiacetamido)pentil]carbamoilo}propanamido)pentil]butanodiamida (C₂₅H₄₈N₆O₈), es secretada por *Streptomyces pilosus*, y puede ser reconocida por otros microorganismos con receptores de sideróforos de tipo hidroxámico, como es el caso de la proteína FhuE. DFO presenta dos constantes de acidez, 7.92 en los grupos hidroxámicos y 10.23 en el grupo amina, que en medio neutro forma una especie catiónica. La carga total +1 se mantiene al coordinarse con hierro y formar el compuesto Ferrioxamina (Fe-DFO). Se han reportado casos de éxito de aplicación de THA en algunas bacterias Gram

negativas, empleando conjugados de DFO con fármacos o, por otro lado, complejos de DFO coordinando con metales abiogénicos, como Cd^{2+} , Al^{3+} (Al-DFO)¹¹ o Ga^{3+} (Ga-DFO)¹², sin embargo, todavía no se estudiaron contra *A. baumannii*.

Al^{3+} y Ga^{3+} , son parecidos con el ion férrico en el radio iónico (dependiendo de su spin), radio covalente, producto de solubilidad de $\text{Me}(\text{OH})_3$ (donde Me se refiere al metal) y constante de estabilidad al coordinarse con DFO para formar Me^{III} -DFO (Tabla 1), sin embargo, difieren en configuración electrónica, estructura magnética, temperatura de fusión, densidad y potencial de reducción. En consecuencia, el hierro presenta una marcada diferencia en su abundancia en el universo, en la corteza terrestre y a diferencia de Al y Ga, es esencial su participación en reacciones bioquímicas.

Tabla 1. Propiedades de los elementos aluminio, galio y hierro.

	Aluminio	Galio	Hierro
Número atómico	13	31	26
Abundancia (%)			
Universo	0,005	1×10^{-6}	0,11
Corteza terrestre	8,1	0,0019	6,3
Humanos	-	-	0,006
Configuración electrónica			
Neutro	$[\text{Ne}] 3s^2 3p^1$	$[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2 4p^1$	$[\text{Ar}] 3d^6 4s^2$
Estado de oxidación 3+	$[\text{Ne}]$	$[\text{Ar}] 3d^{10}$	$[\text{Ar}] 3d^5$
Electronegatividad de Pauling	1,61	1,81	1,83
$I_1 / I_2 / I_3$ (kJ mol ⁻¹)	577 / 1816 / 2744	579 / 1979 / 2963	762 / 1562 / 2957
Conductividad eléctrica (S/m)	$3,8 \times 10^7$ (conductor)	$7,1 \times 10^6$ (conductor)	$1,0 \times 10^7$ (conductor)
Tipo magnético	Paramagnético	Diamagnético	Ferromagnético
Temperatura de fusión (°C)	660,32	29,76	1538
Densidad (g/cm ³)	2,7	5,9	7,8
Potencial de electrodo (V) { E° , $\text{Me}^{3+} + 3e^- \rightarrow \text{Me}$ }	-1,66	-0,549	0,770 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$)
Radio iónico trivalente (Å), NC=6	0,54	0,62	0,65 d ⁵ spin alto 0,55 d ⁵ spin bajo
Radio covalente en Me^{3+} (Å)	1,18	1,26	1,25
pKa1 del $[\text{Me}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$	4,99	2,60	2,20
Log Kps $[\text{Me}(\text{OH})_3]$	-33,5	-37,0	-38,0
Log β $[\text{Me}^{\text{III}}\text{-DFO}]$	36,11	38,96	42,33

De los estudios *in vitro* realizados empleando Al, Ga y Fe con DFO (Me-DFO), principalmente se apoyaron de las concentraciones inhibitorias para validar la aplicación de THA, y no se realizó un análisis de las interacciones ligando-receptor. En este trabajo se estudiaron las similitudes y diferencias en reactividad química entre Al-DFO, Ga-DFO y Fe-DFO, y se analizaron sus interacciones intermoleculares con FhuE, empleando cálculo mecánico cuántico, docking molecular y dinámica molecular durante 50 ns, para mejorar la comprensión de los sistemas metal-DFO-FhuE.

PARTE COMPUTACIONAL

Optimización estructural y reactividad química

Las coordenadas cartesianas de los átomos de Fe-DFO se obtuvieron de la base de datos cristalográficos de Cambridge (CSD) con el identificador 155586. Se eliminaron las aguas de cristalización y los contraiones. Se usó Gaussian09¹³ para optimizar la estructura molecular de Fe-DFO, empleando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT en sus siglas en inglés) al nivel B3LYP^{14,15}/6-31G(d,p)^{16,17} para los átomos de C, H, O y N, la base SDD¹⁸ adaptada al respectivo pseudopotencial para el átomo metálico. Las correcciones del efecto del solvente han sido consideradas usando el modelo de solvatación implícita SMD¹⁹. Los estados estacionarios de mínimo no presentaron ninguna frecuencia imaginaria. Se usó el programa Schrödinger²⁰, para calcular la desviación cuadrática media de las estructuras superpuestas. Los cálculos con Gaussian09 fueron realizados en el clúster Heimdall del Grupo de Química Computacional Aplicada de la Universidade de São Paulo (Brasil).

Se empleó la estructura de Fe-DFO como plantilla para generar las estructuras de Al-DFO y Ga-DFO. Estas se optimizaron con el mismo nivel de cálculo mencionado y se verificó la ausencia de frecuencias imaginarias. Empleando el Teorema de Koopmans se calcularon los indicadores de reactividad global de Me-DFO (Me: Fe³⁺, Al³⁺ y Ga³⁺). Para el tratamiento de datos y la generación de gráficas usamos Jmol v14²¹, Matplotlib 3.2.2²², Maestro 2023²⁰ y Chemcraft v1.8²³.

Acoplamiento molecular de Me-DFO y FhuE

Empleamos las estructuras optimizadas de Me-DFO y la proteína FhuE, disponible en el banco de datos de proteínas (PDB RCSB) con identificador 6E4V. FhuE recibió un pretratamiento con Wizard de la suite Schrödinger, donde se eliminaron aguas de cristalización y el ligando co-cristalizado HWS (*Ferric coprogen*, C₃₅H₅₃FeN₆O₁₃). Se editó el estado de protonación del sistema según el pH 7.4 con PropKa y se minimizó la energía del sistema empleando mecánica molecular con el campo de fuerza OPLS. Para la configuración del acoplamiento molecular, se generó el *grid box* empleando HWS como centro de la caja cúbica con 20 Å de arista. El acoplamiento molecular fue realizado con Glide de la suite Schrödinger en modo extra precisión y el análisis de interacciones en dos dimensiones fue realizado con LigPlot+²⁴.

Simulaciones de dinámica molecular

Empleamos las estructuras acopladas en la etapa anterior para preparar los sistemas de dinámica molecular para cada metal-DFO-FhuE. La caja de simulación consistió en una caja ortorrómbica con aristas que distan 10 Å de la parte más externa de la proteína, se adicionaron moléculas de agua usando TIP3P como modelo de solvente, iones de sodio y cloro para neutralizar el sistema y se estableció una concentración salina de 150mM.

Con el campo de fuerza OPLS3, se equilibró el sistema usando Desmond²⁵ con los ensambles isotérmico-isocórico e isobárico-isotérmico, a temperatura 310K con el termostato de Nosé-Hoover y una presión de 1.01325 bar con el baróstato de Martyna-Tobias-Klein, por 10 y 20 ps, respectivamente. Con este sistema equilibrado se realizó la etapa de producción de 50 ns para cada metal-DFO-FhuE, manteniendo constante el número de partículas, la temperatura (310K) y la presión (1.0 bar) (NPT), con la configuración predeterminada de relajación antes de la simulación²⁶.

La animación de la trayectoria fue generada con 1000 frames por sistema y se disponibilizó en nuestro repositorio de Github. Se usó el módulo SID (Simulation interactions diagram) para la generación de la desviación cuadrática media (RMSD), fluctuación cuadrática media de la proteína (RMSF) y del ligando (L-RMSF), diagrama de interacciones intermoleculares y porcentajes, diagrama de barras de la fracción de interacciones, diagrama de contactos ligando-proteína y propiedades del ligando (Ligand-RMSD, radio de giro, interacciones intramoleculares, área de superficie molecular, área de la superficie accesible al solvente y área de la superficie polar). Los cálculos con el programa Schrödinger fueron realizados en LIBIPMET, de la Universidad Nacional de Ingeniería.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización estructural y reactividad química

Se obtuvo un RMSD de 0.8 Å entre la estructura cristalizada y la optimizada de Fe-DFO (Figura 2). Esto nos permitió validar el nivel cálculo para usarlo posteriormente en las moléculas de Al-DFO y Ga-DFO.

Las distancias promedio de Fe³⁺-O(C), Fe³⁺-O(N) y N-C(hidroxamato) fueron de 2.12, 2.00 y 1.33 Å respectivamente, con similitud a lo reportado en la literatura^{27,28}. Las frecuencias promedio de estiramiento de los grupos amida e hidroxamato fueron 1678 y 1505 cm⁻¹, respectivamente, que son valores aproximados a los reportados por Edwards y colaboradores²⁹. Se observan magnitudes análogas en las cargas de Mulliken de casi todos los átomos, siendo más marcada la diferencia en los átomos de N y O en el hidroxamato (átomos 1, 2, 5, 6, 9 y 10 de la Figura 3) y principalmente, en los átomos metálicos, donde observamos 1.6, 1.2 y 0.7 para Al, Ga y Fe, respectivamente. El vector momento dipolar de los complejos no es paralelo, sin embargo, presenta una

direccionalidad aproximada al grupo amina y un módulo mayor en Al-DFO, que en Ga-DFO y Fe-DFO, que son más cercanos en magnitud (Figura 4).

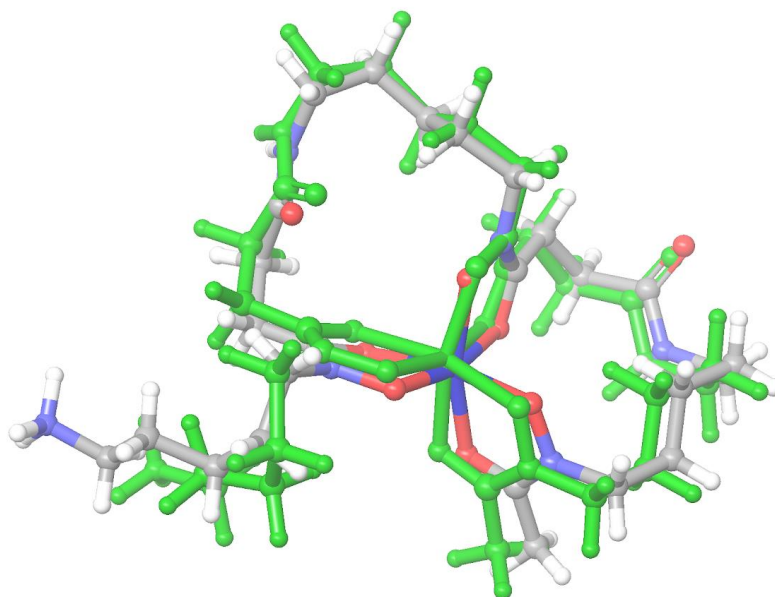


Figura 2. Superposición de la estructura optimizada y cristalizada (verde) de Fe-DFO.

Fe-DFO, presentó una menor barrera energética entre sus orbitales frontera HOMO y LUMO (E_{gap}) en comparación con los otros complejos (Tabla 2). Aunque los orbitales HOMO, son análogos en magnitud, LUMO es -2.47 eV para el Fe-DFO mientras que para Al-DFO y Ga-DFO es positivo, con 0.13 y 0.09 , respectivamente. De acuerdo con el Teorema de Koopmans, encontramos que la reactividad química de los complejos es muy distinta (Figura 5). En comparación con los complejos de aluminio y galio, encontramos que Fe-DFO presenta una menor energía de ionización, mayor potencial químico electrónico, mayor energía de afinidad, menor dureza, mayor blandura y mayor índice de electrofilicidad.

Este mayor grado de polarizabilidad y afinidad por regiones apolares, es favorable en el reconocimiento molecular de Fe-DFO, ya que las cavidades de interacción son predominantemente hidrofóbicas en las proteínas receptoras de membrana, como por ejemplo, en FoxA de *Pseudomonas aeruginosa*⁴ o en FhuA de *Escherichia coli*³⁰.

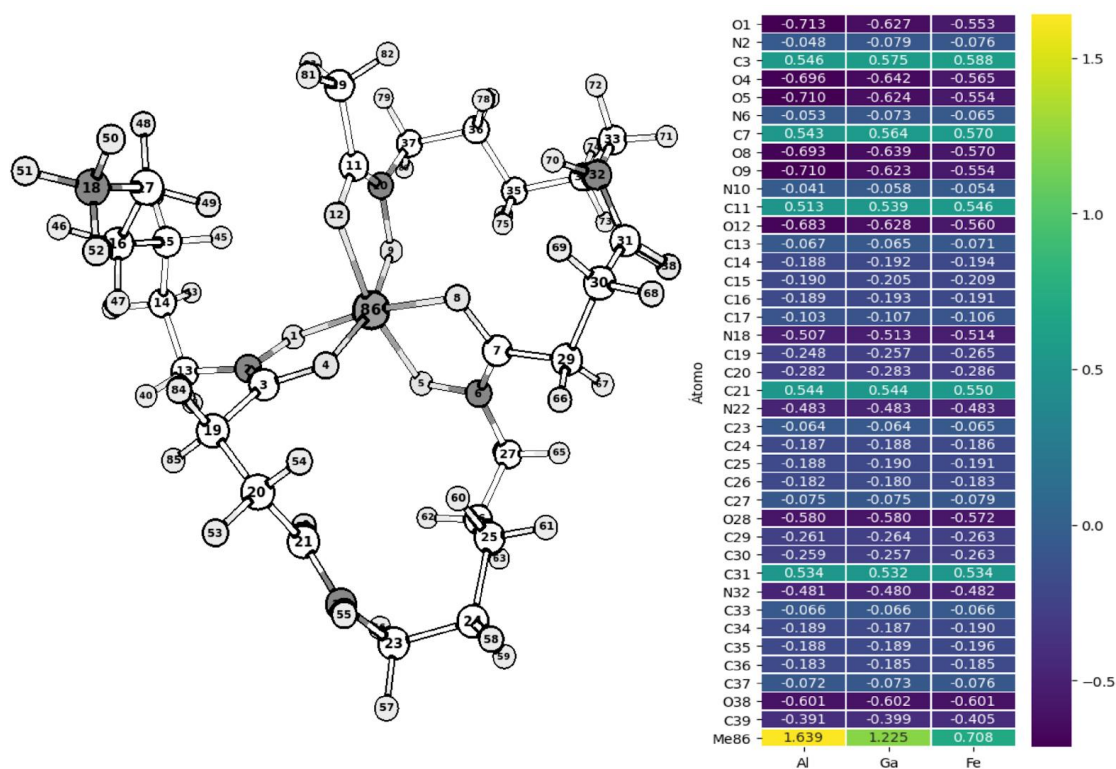


Figura 3. Cargas de Mulliken de los átomos en Me-DFO (Me=Al³⁺, Ga³⁺ o Fe³⁺). Se suprimieron los hidrógenos para mejorar la visualización.

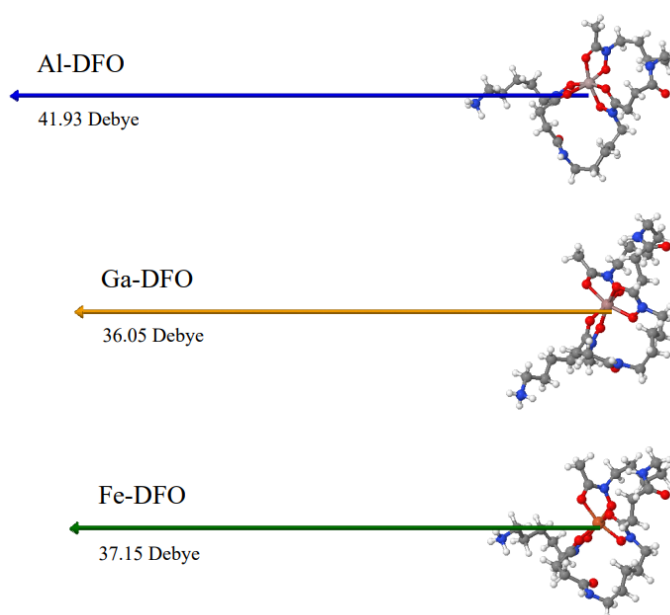


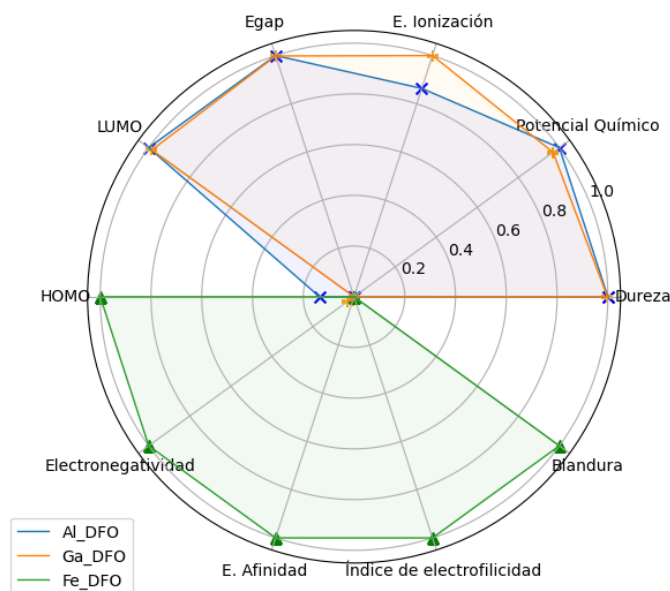
Figura 4. Módulo y dirección del momento dipolar en Me-DFO (Me=Al³⁺, Ga³⁺ o Fe³⁺)

Tabla 2. Reactividad global de los complejos Me-DFO.

Compuesto	HOMO / eV	LUMO / eV	Energía gap / eV	Energía de ionización	Afinidad Electrónica
Al-DFO	-5.83	0.13	5.96	5.83	-0.13
Ga-DFO	-5.87	0.09	5.96	5.87	-0.09
Fe-DFO	-5.62	-2.47	3.15	5.62	2.47

Continuación de la Tabla 2.

Compuesto	Potencial químico	Electronegatividad	Dureza	Blandura	Índice de electrofilicidad
Al-DFO	-2.85	2.85	2.98	0.17	1.37
Ga-DFO	-2.89	2.89	2.98	0.17	1.4
Fe-DFO	-4.04	4.04	1.57	0.32	5.19

**Figura 5.** Diagrama de radar de la reactividad global normalizada.

Acoplamiento molecular de Me-DFO y FhuE

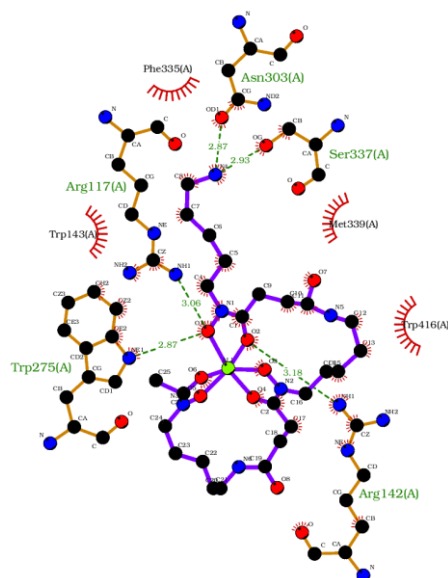
Aunque hay una marcada diferencia en la reactividad química de los iones metálicos en estudio y también de sus complejos con DFO, estas propiedades parecen no influir en el reconocimiento molecular en el receptor FhuE, ya que en las poses de acoplamiento con mayor afinidad entre Me-DFO y FhuE, encontramos ligeras diferencias energéticas y estructurales. Como, por ejemplo, 5.880 kcal/mol de Fe-DFO frente a -5.772 y -5.926 kcal/mol para Al-DFO y GaDFO, respectivamente (Tabla 3). Y en cuanto a la estructura ligando-receptor (Figura 6), se tienen prácticamente los mismos aminoácidos

interactuando, incluso considerando al coprogeno (HWS) cocrystalizado en FhuE: Arg117, Arg142, Trp275, Asn303, Ser337 y Met339 por enlaces de hidrógeno; y Trp143 y Trp416, por interacciones lipofílicas.

Tabla 3. Docking score e interacciones intermoleculares de Me-DFO con FhuE.

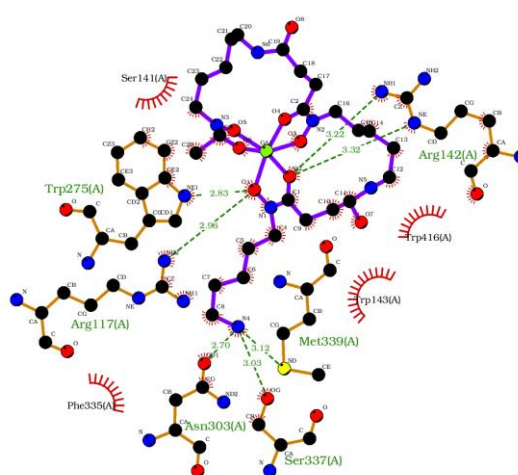
Compuesto	Docking score / kcal.mol ⁻¹	Enlace de hidrógeno	Lipofílico
HWS	-5.814	Arg117, Arg142, Trp275, Asn373	Ser141, Trp143, Ser337, Met339, Gly371, Trp416
Al-DFO	-5.772	Arg117, Arg142, Trp275, Asn303, Ser337	Trp143, Phe335, Met339, Trp416
Ga-DFO	-5.926	Arg117, Arg142, Trp275, Asn303, Ser337, Met339,	Ser141, Trp143, Phe335, Trp416
Fe-DFO	-5.880	Arg117, Arg142, Trp275, Asn303, Ser337, Met339	Ser141, Trp143, Phe335, Trp416

Al-DFO



HWS

Ga-DFO



Fe-DFO

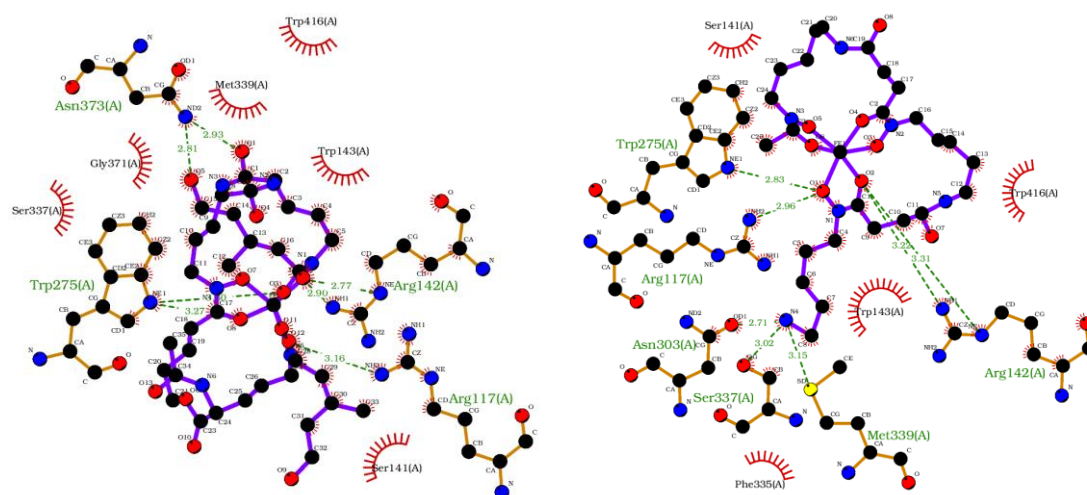


Figura 6. Diagrama de interacciones intermoleculares entre Me-DFO (Me= Al^{3+} , Ga^{3+} o Fe^{3+}) y FhuE.

Simulaciones de dinámica molecular

La Figura 7 muestra que los carbonos α en el receptor evolucionan hacia 2.0-2.5 Å de RMSD en los 3 casos. No se observan grandes diferencias entre los sistemas evaluados.

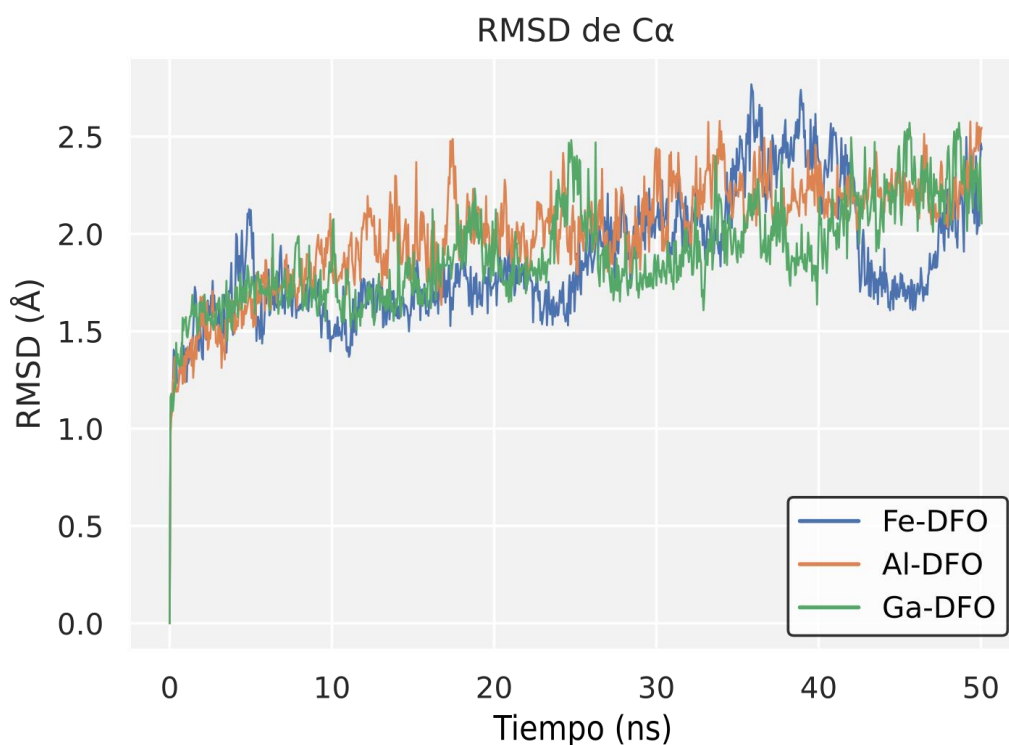


Figura 7. Desviación cuadrática media (RMSD) de los carbonos α para los complejos Me-DFO.

La desviación cuadrática media de las fluctuaciones de los residuos (RMSF) permitieron reconocer un perfil análogo entre Me-DFO (Figura 8), y coincidencias en los puntos de contacto (línea vertical de color verde). No se observaron cambios conformacionales (celeste: hoja beta y anaranjado: alfa) durante los 50 ns.

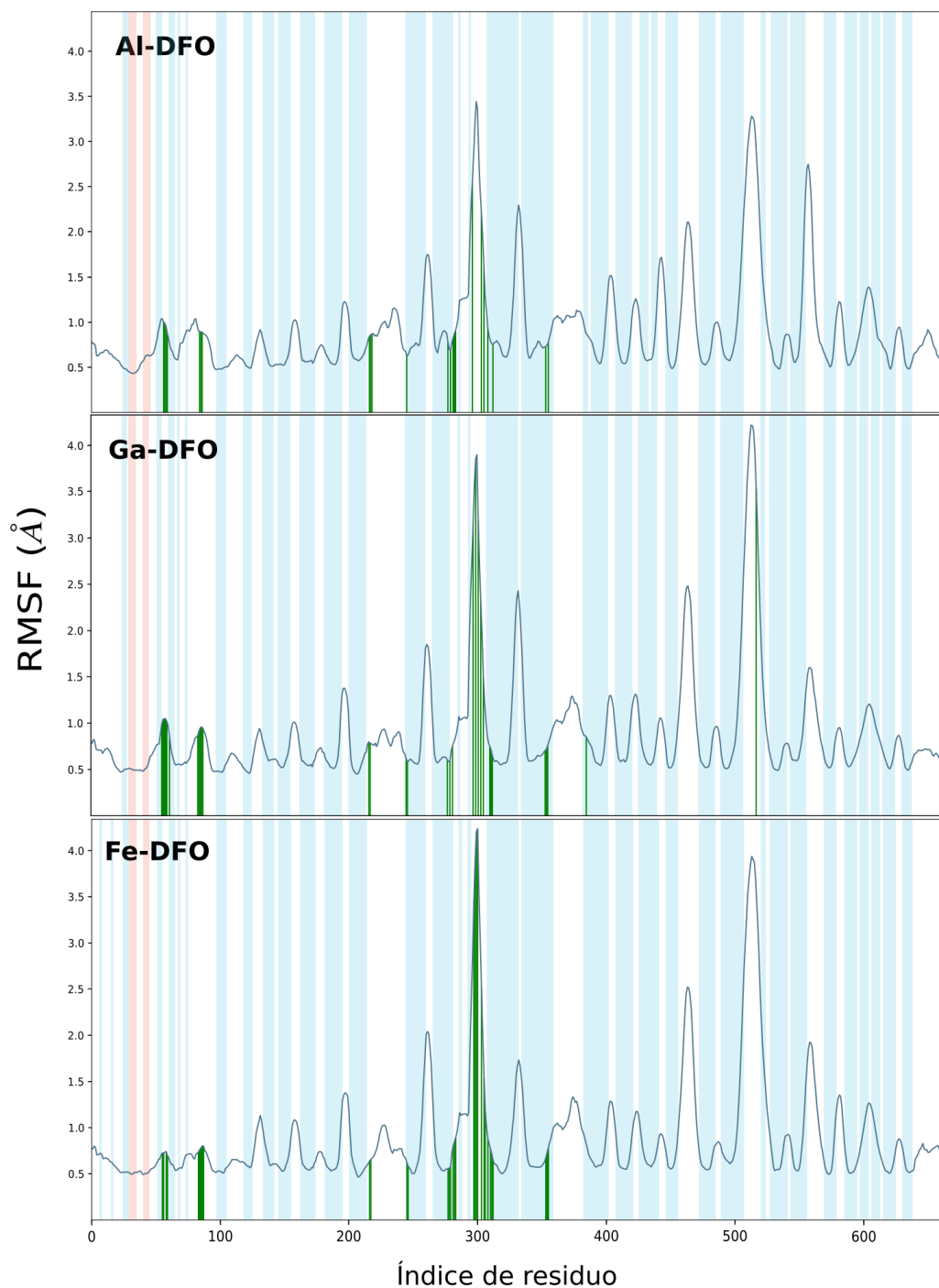


Figura 8. RMSF de los residuos de aminoácidos en FhuE.

Identificamos interacciones intermoleculares destacadas durante la simulación. La Figura 9, muestra únicamente las mayores al 30%. A continuación, se analizan las interacciones con aminoácidos que se han conservado o no de acuerdo con la información proveniente del docking molecular, empleando las Figuras 9 y 10.

Interacciones intermoleculares recurrentes conservadas:

Arg117: Se ha mantenido con interacción de tipo iónica, debido a su naturaleza catiónica, dirigida hacia los átomos negativos en los hidroxamatos y también mediante enlace de hidrógeno directamente a un oxígeno hidroxámico en Al-DFO, mientras que en Ga-DFO y Fe-DFO, a través de una molécula de agua como intermediaria (puente de agua).

Arg142: Altamente relevante en Al-DFO, mediante enlace de hidrógeno con el oxígeno neutro de dos hidroxamatos, en 44 y 99% (Figura 9). En Ga-DFO y Fe-DFO no hay enlace de hidrógeno, encontramos interacciones menores a 30% empleando aguas como intermediarios, como se observa en color azul en la Figura 10.

Trp143: Interacciones lipofílicas en los tres casos (Me-DFO), incluso también en HWS.

Trp275: En Al-DFO ocurre apilamiento π en un 73% y enlace de hidrógeno en 31%. Esto se intensifica en Ga-DFO: 87 y 89%; y Fe-DFO con 91 y 94%, respectivamente.

Trp416: No aparece en Al-DFO, pero sí en los complejos de Ga y Fe, mediante interacciones hidrofóbicas.

Interacciones intermoleculares recurrentes no conservadas:

Ser141, Asn303, Phe335, Ser337 y Met339 aparecen en el acoplamiento en la Tabla 3 de Me-DFO, sin embargo, no durante la dinámica molecular.

Otras Interacciones intermoleculares recurrentes:

Asn373: Mediante enlace de hidrógeno, con 99% en Al-DFO, 61% en Ga-DFO y 44% en Fe-DFO, dependiente de una molécula de agua en los complejos de Ga y Fe.

Asp114: Enlace de hidrógeno con la amina de Al-DFO (75%).

Asp116: Con Al-DFO (98%) y Ga-DFO (40%) mediante enlace de hidrógeno.

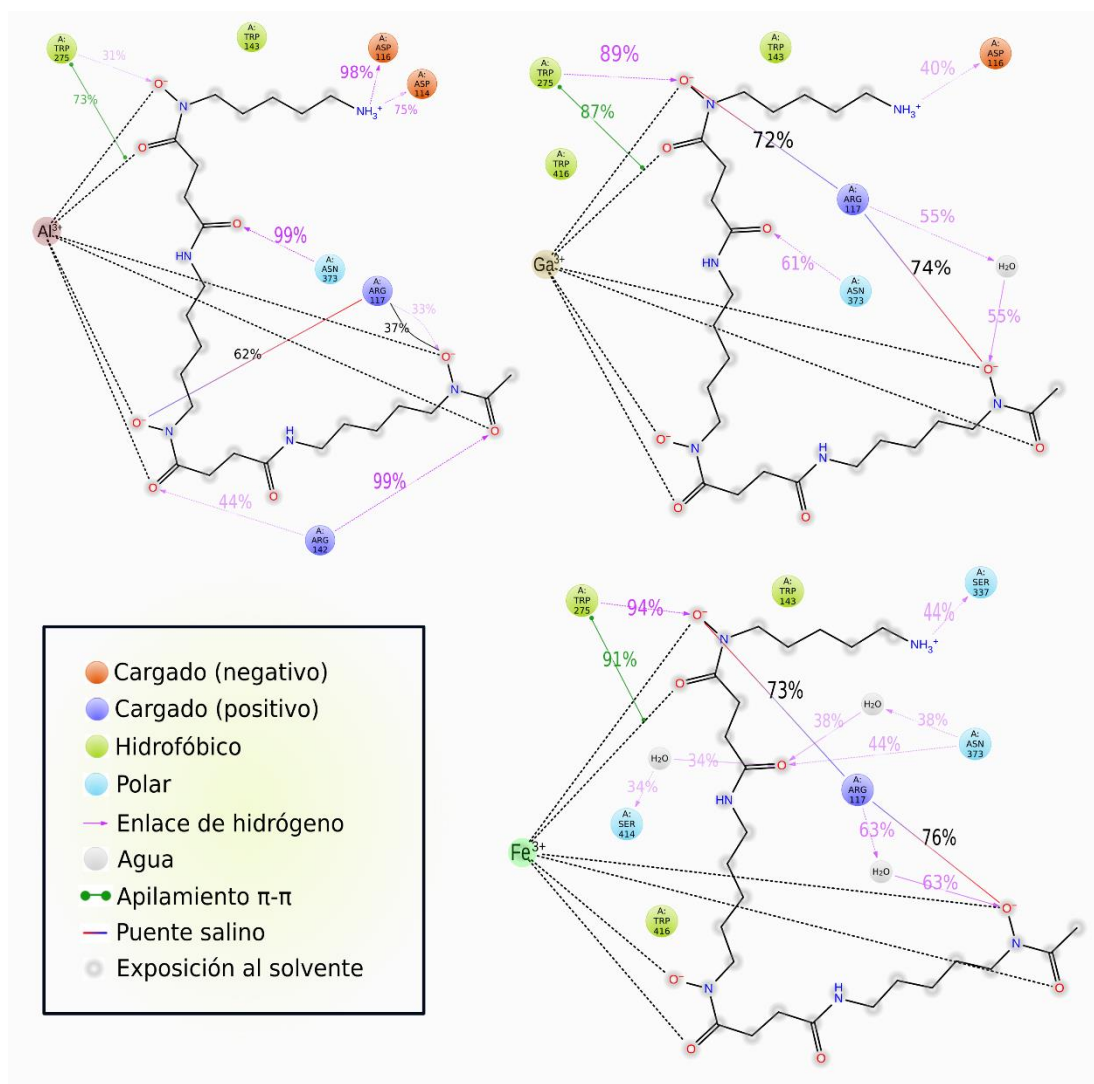


Figura 9. Diagrama de interacciones intermoleculares y porcentajes.

En la Figura 10, en general, observamos un perfil de la fracción de interacciones más parecido entre Ga-DFO y Fe-DFO. En Al-DFO se observa como principal aporte el enlace de hidrógeno (barras verdes).

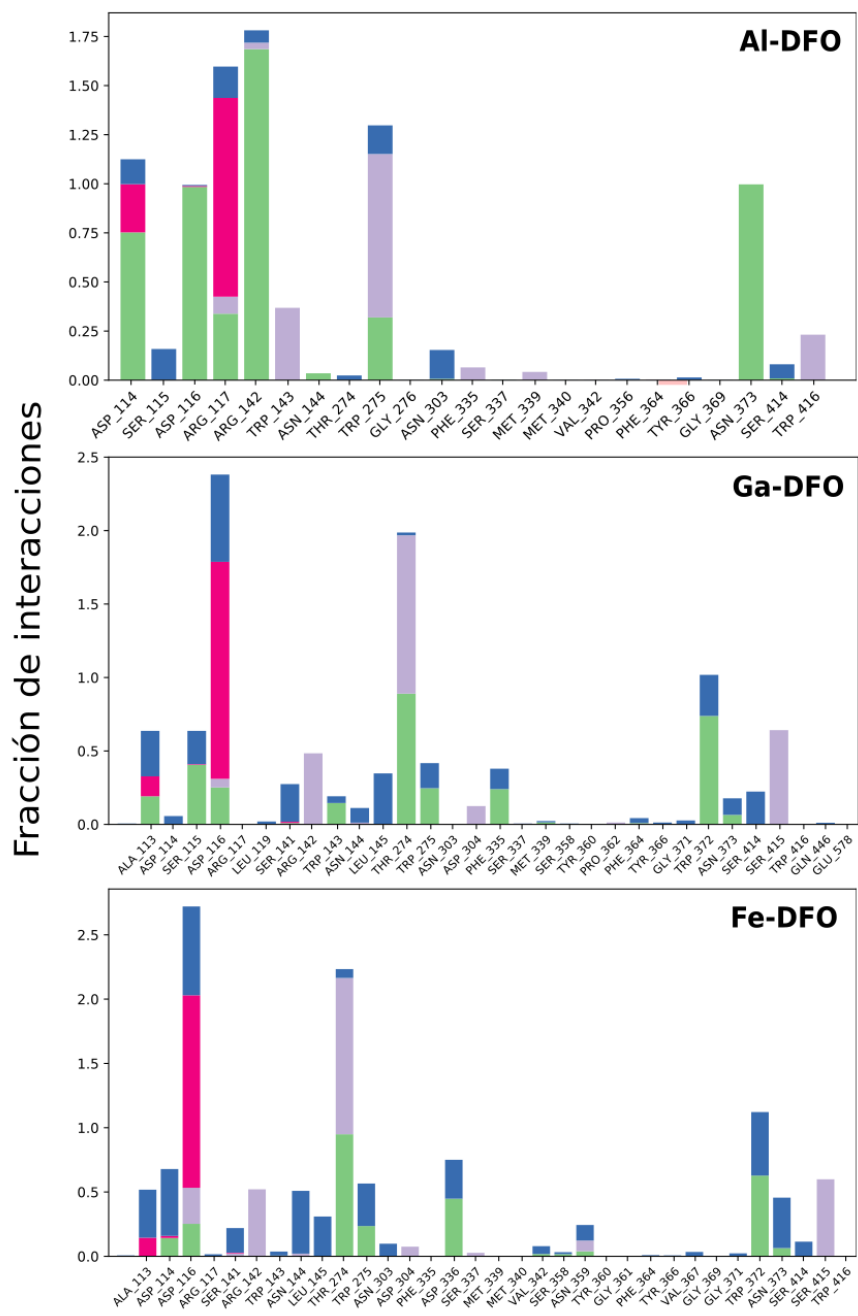


Figura 10. Diagrama de barras de la fracción de interacciones. Paleta de colores usadas en las interacciones: enlace de hidrógeno (verde), puente de agua (azul), iónicas (rojo) e hidrofóbicas (morado).

La Figura 11 muestra los momentos (o frames) en que ocurren las interacciones y en asociación con el número de contactos entre Me-DFO y la cavidad de FhuE, se observa como Al-DFO presenta un perfil más distante respecto de Ga-DFO y Fe-DFO.

La Figura 12 muestra que los átomos 19, 25, 26 y 39 en Me-DFO tienen mayor movilidad durante la dinámica molecular, mientras que el metal (átomo 1) y su esfera de coordinación (átomos 2, 5, 6, 9, 10 y 13) son los de menor fluctuación.

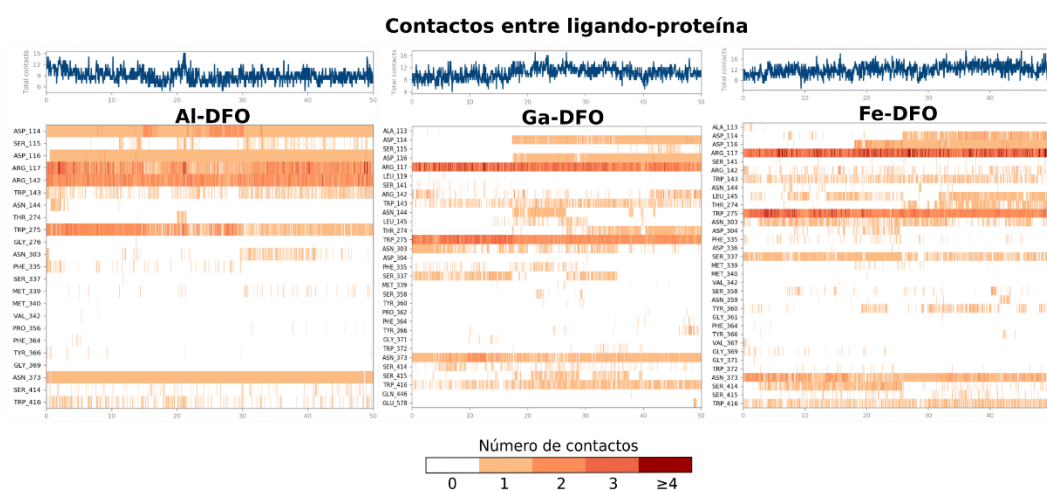


Figura 11. Diagrama de contactos ligando-proteína.

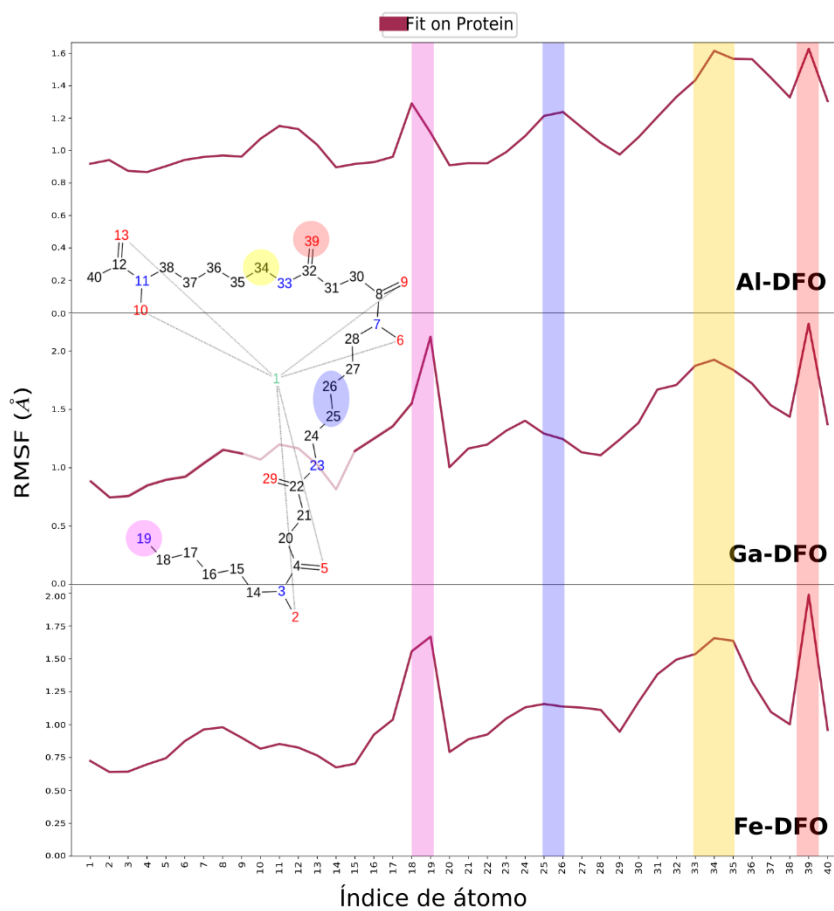
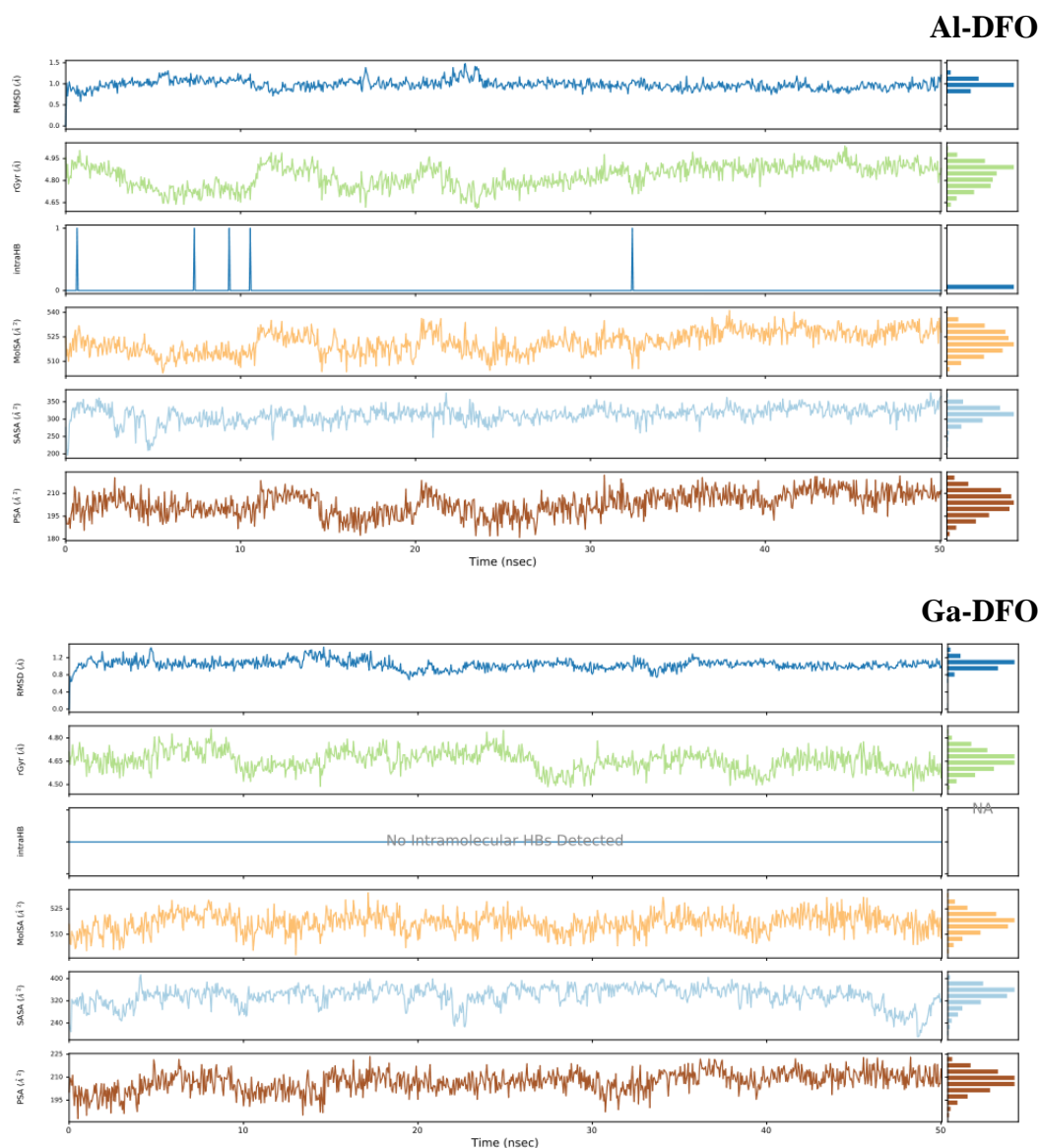


Figura 12. Fluctuación cuadrática media del ligando Me-DFO (L-RMSF).

El comportamiento de los ligandos a través de los frames nos permite evaluar qué tantas diferencias presentan entre ellos cuando se encuentran en el sistema de simulación. De esta manera, se observa en los boxplots mostrados en la Figura 13, que presentan ligeras diferencias. Prácticamente no hay interacciones intramoleculares (intraHB), el RMSD de Me-DFO se encuentra en torno de 1 Å, el radio de giro se encuentra alrededor de 4.65-4.85 Å, el área de la superficie molecular (MolSA) alrededor de 520 Å² considerando el radio de van der Waals, el área superficial de una molécula accesible por una molécula de agua (SASA) entre 300 a 320 Å² y finalmente, el área de la superficie accesible al solvente en una molécula aportada solo por átomos de oxígeno y nitrógeno (PSA), en torno de 200 Å².

En general, nuevamente encontramos que estos se comportan de manera análoga, a pesar de presentar interacciones intermoleculares diferentes como se observó en la Figura 10.



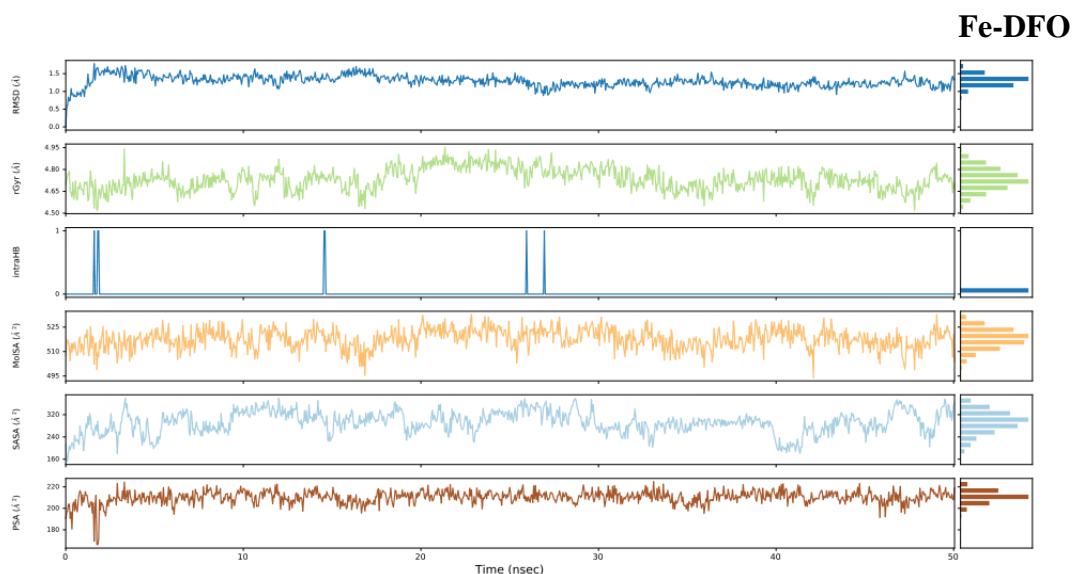


Figura 13. Propiedades de Me-DFO: Ligand-RMSD, radio de giro, interacciones intramoleculares, área de superficie molecular, área de la superficie accesible al solvente y área de la superficie polar.

CONCLUSIONES

Los cálculos realizados con DFT nos han permitido obtener una estructura con RMSD 0.8 Å con respecto del cristal de Fe-DFO, de esta manera, el nivel de cálculo adoptado ha sido suficiente y nos sirvieron en la optimización de las estructuras de Al-DFO y Ga-DFO. Encontramos que los complejos de aluminio y galio presentan diferencias en reactividad química con Fe-DFO, sin embargo, obtenemos energías de afinidad análogas con la proteína FhuE, esto parece indicar que el sideróforo DFO logra apantallar el intercambio de Fe^{3+} por Al^{3+} o Ga^{3+} . Descubrimos que durante la simulación de dinámica molecular los complejos Al-DFO y Ga-DFO se comportan de forma análoga con el Fe-DFO, como se puede observar en las fluctuaciones de los átomos del ligando (L-RMSF) o en las interacciones intermoleculares con los residuos de aminoácidos, sin embargo, el tiempo de interacción es diferente y en el caso de Al-DFO, se hace predominante el enlace de hidrógeno, mientras que en Ga-DFO ocurre en menor magnitud, asemejándose más al caso de Fe-DFO. En conclusión, estos resultados nos permiten confirmar que FhuE presenta un reconocimiento molecular de Al-DFO y GaDFO análogo al Fe-DFO, por ello, el diseño de nuevos complejos metal-sideróforo podrían ser una vía exitosa para la aplicación del efecto caballo de Troya en *A. baumannii*.

AGRADECIMIENTO

JAAH agradece a FONDECYT (Convenio 237- 2015-FONDECYT) por la concesión de la beca de doctorado. Agradecemos también a la profesora Dra. Karina Machado dos Santos (FURG, Brasil) por el apoyo con las simulaciones de dinámica molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Codd R. Siderophores and iron transport. In: Comprehensive Inorganic Chemistry III. Elsevier; 2023. p. 3–29.
2. Moynié L, Serra I, Scorciapino MA, Oueis E, Page MG, Ceccarelli M, et al. Preacinnetobactin not acinetobactin is essential for iron uptake by the BauA transporter of the pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Elife*. 2018; 7:e42270. doi: 10.7554/eLife.42270.
3. Barreiro EJ, Fraga CAM. Química Medicinal. As bases moleculares da ação dos fármacos. 3rd ed. São Paulo, Brazil: Artmed Editora; 2015. 608 p.
4. Josts I, Veith K, Tidow H. Ternary structure of the outer membrane transporter FoxA with resolved signalling domain provides insights into TonB-mediated siderophore uptake. *Elife*. 2019;8:e48528. doi: 10.7554/eLife.48528.
5. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018. 18(3):318–27.
6. OMS. Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS. [Internet]. 2021 [citado el 17 de julio del 2023]. Disponible en: bit.ly/43qCuzP
7. Nairz M, Haschka D, Demetz E, Weiss G. Iron at the interface of immunity and infection. *Front Pharmacol*. 2014;5:152. doi: 10.3389/fphar.2014.00152.
8. Khan A, Singh A, Singh P, Kumar R, Ojha KK, Singh VK, et al. LCN2-Fungal siderophore-iron binding and uptake leads to oxidative stress and cell death in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *J Biomol Struct Dyn*. 2023. 10;1–20.
9. Uppalapati SR, Sett A, Pathania R. The Outer Membrane Proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* Confer a Two-Pronged Defense in Facilitating Its Success as a Potent Human Pathogen. *Front Microbiol*. 2020;11:589234. doi: 10.3389/fmicb.2020.589234.
10. Grinter R, Lithgow T. Determination of the molecular basis for coprogen import by Gram-negative bacteria. *IUCrJ*. 2019. 1;6(3):401–11.
11. Huayhuaz JAA, Vitorino HA, Campos OS, Serrano SHP, Kaneko TM, Espósito BP. Desferrioxamine and desferrioxamine-caffeine as carriers of aluminum and gallium to microbes via the Trojan Horse Effect. *J Trace Elem Med Biol*. 2017;41:16–22.
12. Banin E, Lozinski A, Brady KM, Berenshtein E, Butterfield PW, Moshe M, et al. The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci*. 2008. 28;105(43):16761–6.

13. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. G. Gaussian 09. Vol. 121. Wallingford CT.: Gaussian Inc.; 2009. p. 150–66.
14. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys*. 1993. 98(7):5648–52.
15. Stephens PJ, Devlin FJ, Chabalowski CF, Frisch MJ. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. *J Phys Chem*. 1994 1;98(45):11623–7.
16. Hehre WJ, Ditchfield R, Pople JA. Self—Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian—Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *J Chem Phys*. 1972. 56(5):2257–61.
17. Hariharan PC, Pople JA. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theor Chim Acta*. 1973;28(3):213–22.
18. Bergner A, Dolg M, Küchle W, Stoll H, Preuß H. Ab initio energy-adjusted pseudopotentials for elements of groups 13–17. *Mol Phys*. 1993. 20;80(6):1431–41.
19. Marenich A V, Cramer CJ, Truhlar DG. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *J Phys Chem B*. 2009 7;113(18):6378–96.
20. Schrödinger Release 2023. New York, NY: LLC; 2023.
21. Hanson RM, Lu X-J. DSSR-enhanced visualization of nucleic acid structures in Jmol. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(W1):W528–33.
22. Hunter JD. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Comput Sci Eng*. 2007;9(3):90–5.
23. Chemcraft - Graphical program for visualization of quantum chemistry computations [Internet]. [citado 10 ene 2023]. Disponible en: <https://www.chemcraftprog.com/>
24. Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J Chem Inf Model*. 2011. 24;51(10):2778–86.
25. Bergdorf M, Kim ET, Rendleman CA, Shaw DE. Desmond/GPU Performance as of November 2014. *Shaw Res Tech Rep DESRES/TR-2014-01*. 2014.
26. Rosy J, Babkiewicz E, Maszczyk P, Mrówka P, Kumar B, Murugesan S, et al. l-Ornithine-N5-monooxygenase (PvdA) Substrate Analogue Inhibitors for *Pseudomonas aeruginosa* Infections Treatment: Drug Repurposing Computational Studies. *Biomolecules*. 2022. 25;12(7):887. doi: 10.3390/biom12070887.
27. Dhungana S, White PS, Crumbliss AL. Crystal structure of ferrioxamine B: a comparative analysis and implications for molecular recognition. *JBIC J Biol Inorg Chem*. 2001. 20;6(8):810–8.
28. Domagal-Goldman SD, Paul KW, Sparks DL, Kubicki JD. Quantum chemical study of the Fe(III)-desferrioxamine B siderophore complex—Electronic structure, vibrational frequencies, and equilibrium Fe-isotope fractionation. *Geochim Cosmochim Acta*. 2009.73(1):1–12.

29. Edwards DC, Nielsen SB, Jarzęcki AA, Spiro TG, Myneni SCB. Experimental and theoretical vibrational spectroscopy studies of acetohydroxamic acid and desferrioxamine B in aqueous solution: Effects of pH and iron complexation. *Geochim Cosmochim Acta*. 2005. 69(13):3237–48.
30. Alvarado-Huayhuaz JA, Quispe RIH, Miguel-Calderón KV, Carrascal-Márquez PN, Negrón ACV. Búsqueda de complejos de Fe con potencial actividad vía el Efecto caballo de Troya en *Escherichia coli*. *Rev ECIPerú*. 2021;18(2). doi: 10.33017/RevECIPeru2021.0013/

