

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

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL CONTINUA

Volumen 90 N° 3
JULIO - SEPTIEMBRE 2024



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

Presidenta : Ana Cecilia Valderrama Negrón
Editor en Jefe : Hugo Alarcón Cavero
Miembros : Julio Santiago Contreras
Julio Ruiz Quiróz

COMITÉ CONSULTIVO

Dr. Hugo Arturo Alarcón Cavero
Universidad Nacional de Ingeniería

Dr. Jacinto Hernández, Christian Ronald
Universidad Nacional de Ingeniería

Dr. Olivio Nino Castro Mandujano
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Dr. Juan Montes de Oca Ávalos
Universidad Nacional de Ingeniería

Dr. Mario Ceroni Galloso
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Dr. Julio Santiago Contreras
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Dr. Juan Dávalos Prado
Instituto de Química-Física "Rocasolano"
España

Dra. Ana Valderrama Negrón
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 90

JULIO - SETIEMBRE 2024

N° 3

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 2024 – Marzo 2026)

Presidente	: Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón
Vicepresidente	: Dr. Mario Ceroni Galloso
Secretario	: Mg. Mario Antonio Bolarte Arteaga
Director Administrativo	: Mg. Helmer Helí Lezama Vigo
Tesorero	: Dr. Christian Ronald Jacinto Hernández
Vocales	: Mg. Elizabeth Deza Marti Dra. Santos Haydeé Chávez Orellana Mg. José Gonzalo Beretta Enciso Dr. Juan José León Cam Dra. Mercedes Puca Pacheco Mg. Norma Amparo Cuizano Vargas

Comisión de Economía y Finanzas

Presidente: Dr. Juan José León Cam

Comisión de Publicaciones

Presidente: Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón

Comisión de Actuaciones Científicas

Presidente: Dr. Juan Manuel Parreño Tipián

**INSTITUCIONES Y EMPRESAS PROTECTORAS DE LA
SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**

CONTENIDO

(Vol. 90 – N° 3 – 2024)

- Actividad fotoprotectora in vitro de una crema obtenida a partir del extracto etanólico de *Euphorbia Candelabrum* welw. ex hiern “candelabro”, por Iris G. Castilla Villagaray, Rocío Bendezú Acevedo, Felipe Surco Laos. Pags. 118 - 130
- Estudio fitoquímico, cuantificación de polifenoles totales y evaluación de la capacidad antioxidante de las bayas de la planta *Jaltomata Andagarae*, por Santos Ascate Salinas, Helmer Lezama Vigo, Nino Castro Mandujano, Nora Herrera Hernández. Pags. 131 - 141
- Estudio teórico DFT de las propiedades de la taspina y su interacción con la acetilcolinesterasa mediante acoplamiento molecular y dinámica molecular, por Joel C. Rengifo-Maravi, Pedro F. Ruiz-Campos, Fernando Grandez-Arias, Elvis M. Jimenez-Peña. Pags. 142 - 157
- Metabolomics of *polylepis racemosa* and use of the aqueous extract of its stem in the synthesis of silver nanoparticles, por José Francisco Román Ferreyra, José Monteza, Julio César Santiago contreras. Pags. 158 - 172
- Estudio del benzoato de metilo: caracterización y aplicación insecticida en *aedes spp*, por Américo Castro Luna, Norma Ramos Cevallos, Felix Castillo Morales, Adil Barrientos Amau, Maricielo Puma Puma, Ronaldo Villagra Ccasa, Nacarid Caso Francia, Sofía Otori Querevalu, Christian Trujillo Ramos, Rocio Reynoso Landacay. Pags. 173 - 186
- Informaciones

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

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.

Los idiomas de publicación son español e inglés.

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.

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.).

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).

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.

Las tablas, figuras y esquemas, que no deben ser mayores que una página A4, tienen numeración arábiga 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.

Las tablas, fotos, figuras y esquemas deben estar incluidos en el documento de Microsoft Word.

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

ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA IN VITRO DE UNA CREMA OBTENIDA A PARTIR DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *EUPHORBIA CANDELABRUM* WELW. EX HIERN “CANDELABRO”

Iris G. Castilla Villagaray^{*a}, Rocío Bendeزú Acevedo^b, Felipe Surco Laos^b.

RESUMEN

Se ha comprobado que una de las principales causas del melanoma es la exposición a la Radiación Ultravioleta (RUV), por lo que el uso de fotoprotectores es muy importante. El objetivo fue demostrar la actividad fotoprotectora in vitro de una crema obtenida a partir del extracto etanólico de *Euphorbia candelabrum* Welw. ex Hiern “candelabro”, el extracto se obtuvo por el método de maceración, se le realizó un tamizaje fitoquímico para identificar los metabolitos secundarios, se comprobó la actividad antioxidante al extracto por los métodos de DPPH y FRAP, se elaboraron cremas a las concentraciones de 1%, 3% y 5% y se les realizó los controles de calidad pertinentes, la actividad fotoprotectora in vitro fue evaluada por el método descrito por *Mansur*. La actividad antioxidante por el método de DPPH mostró un IC₅₀ de 0,09836 mg/mL, y por el método FRAP se reportó que 1 mg/mL de extracto es equivalente a 1,04 mmol de TROLOX. El extracto mostró un FPS de 17,70, mientras que las cremas al 1%, 3% y 5% obtuvieron un FPS de 4,81, 11,34 y 25,97 respectivamente. Concluyendo que la crema al 5% obtuvo un FPS alto según la clasificación COLIPA, demostrando que posee actividad fotoprotectora UVB.

Palabras claves: *Euphorbia candelabrum*, factor de protección solar, crema fotoprotectora, radiación, UVB.

IN VITRO PHOTOPROTECTIVE ACTIVITY OF A CREAM OBTAINED FROM THE ETHANOL EXTRACT OF *EUPHORBIA CANDELABRUM* WELW. EX HIERN “CANDELABRO”

ABSTRACT

It has been proven that one of the main causes of melanoma is exposure to Ultraviolet Radiation (RUV), so the use of photoprotectors is very important. The objective was to demonstrate the in vitro photoprotective activity of a cream obtained from the ethanolic extract of *Euphorbia candelabrum* Welw. ex Hiern “chandelier”, the extract was obtained by the maceration method, a phytochemical screening was carried out to identify the

^{a,b} Facultad de Farmacia y bioquímica. Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Av de los Maestros, Ica, Perú

*geraldine1502_cv@hotmail.com

secondary metabolites, the antioxidant activity of the extract was verified by the DPPH and FRAP methods, creams were prepared at the concentrations of 1%, 3% and 5% and the relevant quality controls were carried out, the in vitro photoprotective activity was evaluated by the method described by Mansur. The antioxidant activity by the DPPH method showed an IC₅₀ of 0.09836 mg/mL, and by the FRAP method it was reported that 1 mg/mL of extract is equivalent to 1.04 mmol of TROLOX. The extract showed an SPF of 17.70, while the 1%, 3% and 5% creams obtained an SPF of 4.81, 11.34 and 25.97 respectively. Concluding that the 5% cream obtained a high SPF according to the COLIPA classification, demonstrating that it has UVB photoprotective activity.

Keywords: *Euphorbia candelabrum*, sun protection factor, photoprotective cream, radiation, UVB.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el melanoma es uno de los cánceres de piel más predominante a nivel mundial (75%), y una de sus causas principales es la radiación UV (ultravioleta)¹. El uso de fotoprotectores de predominio químico, es usado comúnmente por la población, sin embargo, existen estudios que demuestran que a largo plazo estos presentan efectos adversos, incluido a ello no solo se causa un daño al ser humano, si no también es pernicioso para el medio ambiente². El uso de productos naturales está siendo muy empleado en formulaciones cosméticas, debido a que tienen la capacidad de anular o reducir los procesos oxidativos que se desarrollan de manera incontrolada dentro del tejido cutáneo³. Es por ello que en la actualidad existe una mayor tendencia al consumo de estos a través de la fitocosmética. *Euphorbia candelabrum* es una especie perteneciente a la familia Euphorbiaceae, es conocida comúnmente como “candelabro”, es usado como planta ornamental, algunos pobladores utilizan su látex como abortivo, se aplica tópicamente para tratar heridas, llagas y verrugas, solo existe un estudio a nivel nacional sobre los frutos de esta especie, Vásquez et al.⁴ en su investigación determinaron la capacidad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos al 10% y 20% de los frutos de esta especie, mediante el método de DPPH y la cuantificación de polifenoles del extracto en estudio; obteniendo como resultado que el extracto hidroalcohólico al 20% de los frutos, es el que tuvo mayor actividad antioxidante in vitro, sin embargo, son más las investigaciones internacionales realizadas al género de esta especie, por ejemplo, Rodríguez V. et al.⁵ (2022), en su investigación, demostraron la actividad fotoprotectora y la composición fitoquímica de distintas plantas entre ellas *Euphorbia tirucalli*, la actividad fotoprotectora se realizó mediante el método de Mansur; obteniendo como resultados que el extracto de *E. tirucalli* presentó un FPS de 6,4, esto debido posiblemente a la presencia de los metabolitos secundarios encontrados tales como taninos, esteroides y flavonoides. En base a los estudios realizados y a la necesidad de elaborar formulaciones cosméticas con recursos naturales que eviten el uso de sustancias químicas que dañen la piel; se presenta la alternativa de elaborar una crema fotoprotectora a base del extracto etanólico de esta especie, la cual cumpla con los parámetros de calidad, aprovechando la biodiversidad de nuestro país y que se encuentre al alcance de la población, dejando una base para futuras investigaciones.

PARTE EXPERIMENTAL

Recolección y clasificación de la muestra.

Los frutos de la especie *Euphorbia candelabrum* Welw. ex Hiern fueron recolectados en la región de Ica, provincia de Ica, distrito de Ica, se realizó a las primeras horas de la mañana, haciendo uso de tijeras de podar (para evitar contaminación) y bolsas papel Kraft, luego se trasladó la muestra al laboratorio de Química General de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga". Una pequeña muestra se entregó al Museo de Historia Nacional de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para su respectiva clasificación botánica.

Obtención del extracto etanólico

Se seleccionaron aquellos frutos que estuvieran en buen estado, estos se secaron de manera artificial mediante una estufa a una temperatura de 38°C durante 5 días para luego proceder a cortar los frutos secos en 4 pedazos, después fueron envasados en frascos de vidrios de color ámbar para evitar la exposición de la luz, estos frascos contenían alcohol de 96°, se dejó macerando por 15 días, realizando una agitación diaria, para posibilitar la mayor extracción de los metabolitos secundarios. Una vez transcurrido estos días, se procedió a filtrar el macerado el cual fue colocado en una bandeja para su posterior secado.

Tamizaje fitoquímico

Se usaron 60g del extracto y con solventes de distinta polaridad se obtuvieron distintas fracciones, esto con el fin de llevar a cabo las reacciones de precipitación y/o coloración para la identificación de los metabolitos secundarios, según lo establecido por Lock⁶.

Caracterización fisicoquímica

Este ensayo se realizó con el fin de poder determinar las características propias del extracto, para ello se determinaron: sólidos totales (AOAC 925.03) por el método gravimétrico, sólidos solubles (AOAC 932.12) usando un método refractométrico, cenizas (AOAC 923.03) y pH por el método potenciométrico (AOAC 981.12)⁷.

Preformulación de la crema

Solubilidad.- Para esta prueba se usaron tubos de ensayos a los cuales se les agregó 5mL de los solventes a comprobar (Glicerina, aceite de oliva, agua destilada a temperatura ambiente, propilenglicol, agua a T° 70°C, vaselina, alcohol de 70°C y de 96°C) con una mínima cantidad de extracto, luego de ello se procedió a pesar la cantidad de extracto usado y anotar el peso, este ensayo se realizó por triplicado. Para clasificar la solubilidad se usó el cuadro establecido por la farmacopea.

Formulación de la crema

Para la formulación se usaron los excipientes que tuvieron una mayor compatibilidad en la Preformulación, los cuales otorgaron una buena estabilidad, cumpliendo con los parámetros de calidad, necesarios para su aplicación o administración, y que están estipulados según la normativa⁸. La fórmula seleccionada fue la crema O/W (Emulsión

Oleo-acuosa), a la cual se le incorporaron diferentes concentraciones del extracto etanólico de la especie *Euphorbia candelabrum*, tanto al 1%, 3% y 5%.

Control microbiológico.- Este control se basa en la capacidad de determinar la presencia o ausencia de algunos microorganismos mediante el uso de medios de cultivo, para ello se transfiere una pequeña cantidad de la crema a tratar en los medios de cultivos correspondientes, a una temperatura de incubación adecuada, para poder evidenciar si existe crecimiento microbiano, para comprobar que los resultados estén dentro de los parámetros adecuados se ha considerado las especificaciones descritas en la RESOLUCIÓN N° 2120 de la Comunidad Andina¹¹.

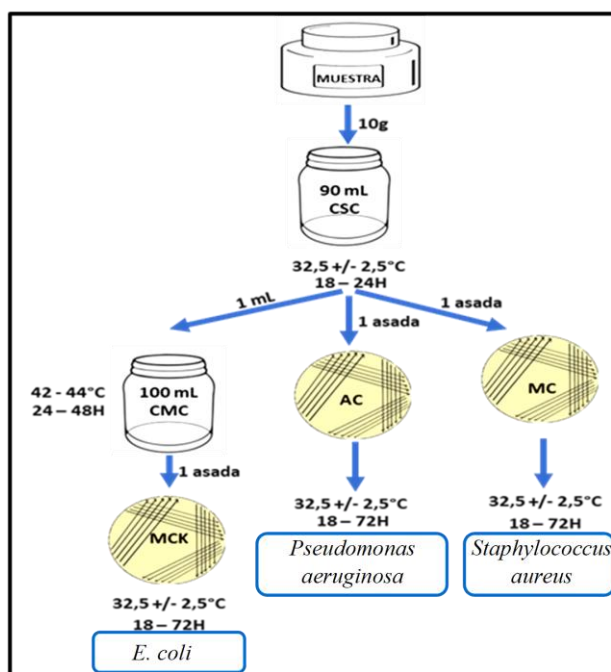


Figura 1. Esquema del método para el control microbiológico

Controles de calidad

a) **Ensayos organolépticos.-** Para la realización de los ensayos organolépticos (color, olor, aspecto), se utilizó la metodología descrita por Hernandez P. et al.⁹

b) Ensayos fisicoquímicos

- **Determinación de pH:** Para este método se usó un pH-metro digital, se pesó 1g de la crema para que sea homogenizada con 10mL de agua destilada en un vaso precipitado, luego se colocaron los electrodos correspondientes para poder medir el pH en las 3 cremas formuladas¹⁰.
- **Extensibilidad:** Para ello se usaron 3 pesas: 2 pesas de 2g y 1 pesa de 5g, y un papel milimetrado. Se colocó un portaobjeto previamente pesado encima del papel y 0,025g de la muestra, luego se colocó encima otro portaobjeto (también pesado) y se esperó por un tiempo de 1 minuto. Se midió la extensibilidad en 3 parámetros: sin peso, con las 2 pesas de 2g y 1 pesa de 5g y se midió el radio que se formaba, por último, se usó la siguiente fórmula para medir el área¹⁰.

$$\text{Área} = 3,1416 \times (r^2)$$

- **Viscosidad:** Se tomó una pequeña muestra representativa de la crema colocándola en un tubo de ensayo para luego ser medido en el viscosímetro rotatorio durante 120 segundos, se midió con un spin de 4 y en un RPM de 6. Finalmente, los resultados se registraron en Centipoises (cps)¹⁰.

Métodos para determinar la actividad antioxidante

a) Determinación de la actividad antioxidante mediante la decoloración del catión radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•)

Este método mide el grado de decoloración que provocan los componentes de los extractos a una solución etanólica de DPPH mediante el método de Brand Williams¹² con algunas modificaciones. Se preparó un volumen de 2,9 mL de solución DPPH y se le adicionó 0,1 mL de cada una de las diluciones preparadas, se agitó y luego se dejó reposar por un tiempo de 30 min., pasado ese tiempo se leyeron las absorbancias a una longitud de 517 nm, como blanco se utilizó el etanol, luego se empleó la fórmula de porcentaje de inhibición y esto nos permitió hallar el IC50 que es la concentración de la muestra problema necesaria para poder obtener una inhibición del 50% la absorbancia del radical libre DPPH.

b) Determinación de la Actividad antioxidante mediante el método FRAP (Reducción del hierro férrico a ferroso)

Este método se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Benzie y Strain¹³ con algunas modificaciones. Para este ensayo se usó un buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3,4), que contiene 2,4,6-tri (2- piridil) s-triazina (TPTZ) y Cloruro de hierro (III) (FeCl₃). Se usó 3 mL de esta solución y 100 µL de solución extracto, pasado 6 minutos de reacción se determina la absorbancia a una longitud de 593 nm. Se elaboró una curva patrón TROLOX® usando los resultados de la actividad, que se expresaron como valores TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity).

Método para evaluar la actividad fotoprotectora

Para este ensayo se tomó como referencia la técnica usada por Mansur, con algunas modificaciones, este método consiste en un análisis espectrofotométrico en el cual la formulación se diluye en etanol y se mide en el rango de la radiación UVB, para ello se realizaron diluciones sucesivas hasta llegar a una concentración mínima de 0,2 mg/mL. Con ese fin, se colocó 1 g de la muestra en una fiola de 100 mL, se procedió a filtrar descartando los primeros 10 ml, una vez obtenida esa dilución se tomó 5 mL de esa muestra, se colocó en una fiola 50 mL y se enrazó con etanol 96°. Por último, se tomaron 5mL de la muestra anterior y se enrazó en una fiola de 25 mL. Luego en el espectrofotómetro UV/VIS se procedió a leer las absorbancias dentro de 290 – 320 nm (UV-B) con un intervalo de 5 nm¹⁴. Una vez obtenida las absorbancias se realizó la fórmula para poder comprobar el FPS. Este ensayo se efectuó en el extracto y también por triplicado a las 3 cremas formuladas, así mismo se clasificó el FPS según COLIPA¹⁵.

$$\text{FPS espectrofotométrico} = \text{FC} \cdot \sum \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \cdot \text{Abs}(\lambda)$$

Donde:

FPS = Factor de Protección Solar

FC= Factor de corrección equivalente a 10

EE = Efecto eritematogénico de la radiación de longitud de onda

I = Intensidad solar de longitud de onda

Abs= absorbancia de la solución en la longitud de onda

Los valores para EE (λ) x I (λ) se muestran a continuación:

Tabla 1. Relación del efecto eritematogénico (EE) con la intensidad de la radiación (I) en cada longitud de onda (nm).

Longitud de onda (nm)	290	295	300	305	310	315	320
EE (λ) x I (λ)	0,0150	0,0817	0,2874	0,3278	0,1864	0,0839	0,0180

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos de caracterización del extracto etanólico de *Euphorbia candelabrum* Welw. ex Hiern “candelabro”.

Parámetros	Olor	Color	Aspecto	pH	Sólidos	Sólidos	Cenizas
					Totales	Solubles	
Resultados	Suigénieris	Verde oscuro	Viscoso	4,20	89,03516	42%	3,3985%
Unidades	---	---	---	---	g/100g	°Bx (Brix)	g/100g

Se efectuaron los controles fisicoquímicos como se puede observar en la tabla N°2, a los cuales aún no se les puede contrastar debido a que no se han encontrado investigaciones al respecto, por lo que se puede describir que es propio de esta especie.

En el tamizaje fitoquímico (tabla N°3) se obtuvo como metabolitos secundarios a los flavonoides, triterpenoides, esteroides, alcaloides, leucoantocianidinas y catequinas, a diferencia de la investigación realizada por Gonzales García K¹⁶ que si bien realizó un estudio al género más no a la especie, se obtuvo la presencia de taninos, lo que se mostró ausente en nuestra investigación, sin embargo concuerda con la presencia de flavonoides al igual que la investigación realizada por Azaat¹⁷, donde también se encontró alcaloides tal como se obtuvo en el tamizaje fitoquímico de la especie en estudio, además se ha visto una relación de la actividad antioxidante con el efecto fotoprotector². Con respecto a la

solubilidad, el extracto de la especie fue soluble en agua T° 70°C, en alcohol de 70° y 96°, en propilenglicol, en glicerina y parcialmente soluble en agua a T° ambiente.

Tabla 3. Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de *Euphorbia candelabrum* Welw. ex Hiern “candelabro”.

Metabolitos	Reacción	Resultado
Taninos	De gelatina-sal	-
Grupos aminos libres	De ninhidrina	+
Antraquinonas	De Bornträger	-
Flavonoides	De shinoda	+
Esteroides y/o triterpenoides	De Lieberman Burchard	+
Alcaloides	De Dragendorff	+
	De Mayer	
	De Wagner	
Leucoantocianidinas y catequinas	De Rosenheim	+

Nota: + positivo, - negativo

Con respecto a los resultados de los ensayos organolépticos en la crema, presentaron coloraciones propias, los cuales fueron comparados con la escala PANTONE¹⁸ una referencia de colores identificados por códigos para otorgarle una tonalidad y denominación exacta, se observó que el que tenía mayor concentración es el que presentó un color más intenso. El aspecto en todas las cremas formuladas fue uniforme y el olor característico para cada una de ellas. Por lo tanto, se obtuvieron buenos parámetros organolépticos. En cuanto a los controles fisicoquímicos en la crema, en los resultados del ensayo de extensibilidad, se obtuvo que la crema formulada al 5% es la que alcanzó una mayor extensibilidad, lo cual es favorable porque permite una mejor distribución de la crema en la zona de aplicación, asimismo con los resultados de viscosidad en todas las cremas formuladas, según la USP 39 - NF 34, se encuentran dentro del rango aceptable. Con respecto al pH los resultados muestran que las cremas son ligeramente ácidas, que están dentro del rango de pH de nuestra piel (4.7 – 5.9), lo que brinda una barrera protectora, inhibiendo el crecimiento de bacterias que puedan afectar a la piel.

Tabla 4. Resultado del control microbiológico de la crema al 5%

Microorganismos patógenos	Limitaciones	Resultados
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia (1g ó 1ml)	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia (1g ó 1ml)	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia (1g ó 1ml)	Ausente

Finalmente habiendo culminado con los ensayos organolépticos y fisicoquímicos de las crema elaboradas a las concentraciones respectivas, y siendo la crema al 5% la que presentar un valor alto de FPS, según la clasificación COLIPA y demostrando buenos parámetros fisicoquímicos y organolépticos, se le efectuó el control microbiológico, tal

como se puede apreciar en la tabla N° 4, la cual, demostró la ausencia de microorganismos específicos (patógenos), cumpliendo de esta manera con las normas estipuladas por la UPS 37 y por lo establecido en la Resolución N°2120 de la Comunidad Andina¹¹.

Tabla 5. Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH realizada al extracto etanólico de *Euphorbia candelabrum* Welw. ex Hiern “candelabro”

Concentración mg/MI	Absorbancia Promedio	%Inhibición
0,0158	0,898	14%
0,0319	0,800	23%
0,0638	0,647	38%
0,1275	0,402	61%

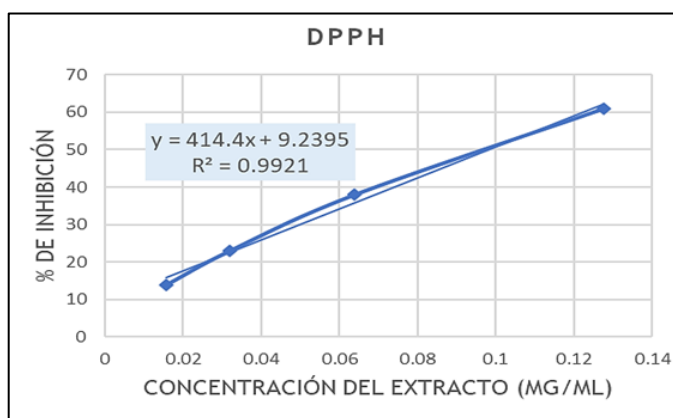


Figura 2. Correlación entre las concentraciones del extracto etanólico de de *Euphorbia candelabrum* Welw. ex Hiern “candelabro” y el % de inhibición del radical DPPH

IC₅₀ = 0.0983 mg/mL

Tabla 6. Valores de absorbancia de las diluciones patrones de trolox por el método FRAP

Concentración TROLOX (mM/mL)	Promedio Absorbancias
0,031	0,137
0,0625	0,189
0,125	0,306
0,25	0,48
0,5	0,828
1	1,51

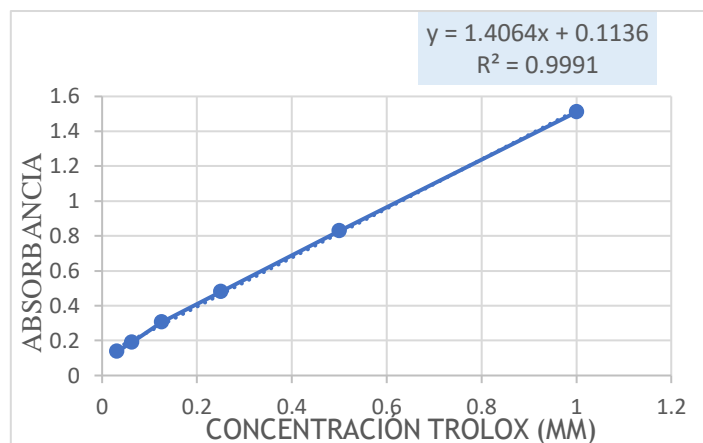


Figura 3. Curva de calibración de Trolox para la determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP

Tabla 7. Determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP realizada al extracto etanólico de *Euphorbia candelabrum* Welw. ex Hiern “candelabro”

Concentración mg/mL	Absorbancia Promedio	TEAC (mM de trolox)
0,157	0,45	0,239
0,314	0,713	0,426
0,628	1,210	0,780
1,25	1,863	1,244

Nota: TEAC (Capacidad antioxidante equivalente al trolox)

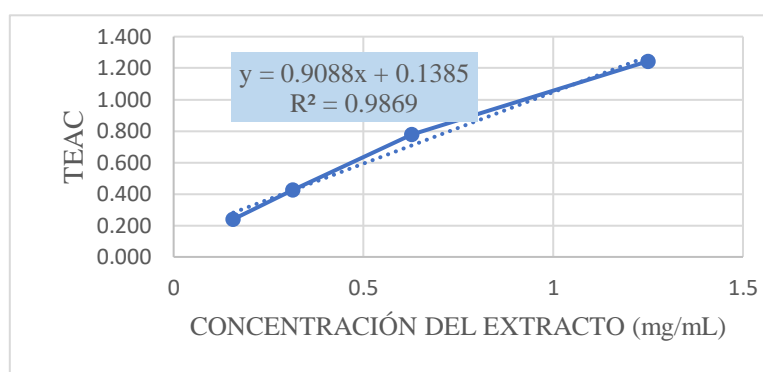


Figura 4. Correlación entre las concentraciones del extracto etanólico de *Euphorbia candelabrum* Welw. ex Hiern “candelabro” y TEAC.

Empleando la ecuación de la recta $y=0,9088x + 0,1385$ se obtiene que:

1.04 mM de trolox equivale a 1,0 mg/mL de extracto

Para la determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico por el método de DPPH se obtuvo un IC 50 de 0.0983 mg/mL (tabla N° 5, figura N°2), mientras que la investigación realizada por Vásquez E.⁴ demostró que el extracto hidroalcohólico al 20% de la especie *Euphorbia candelabrum* presenta una mayor actividad antioxidante que el

mismo extracto al 10%, afirmando que la especie si presenta actividad antioxidante. Por otro lado, también se realizó la misma actividad por el método FRAP, afín de corroborar que, si presenta dicha actividad, lo cual reportó que 1 mg/mL de extracto es equivalente a 1.04 mmol del patrón TROLOX (tabla N° 7, figura N° 4). Así mismo podemos decir que la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Euphorbia candelabrum* puede deberse posiblemente a la presencia de flavonoides.

Tabla 8. Determinación de la actividad fotoprotectora del extracto etanólico de *Euphorbia candelabrum* Welw. ex Hiern “candelabro” por el método Mansur

Longitud de Onda	EE (λ) x I(λ)	Extracto		
		a	b	c
290	0,015	2,058	2,152	2,856
295	0,0817	2,009	2,07	2,321
300	0,2874	1,871	1,908	2,009
305	0,3278	1,684	1,707	1,871
310	0,1864	1,496	1,514	1,684
315	0,0839	1,332	1,35	1,506
320	0,018	1,197	1,214	1,332
SUMATORIA		1,6969011	1,7266394	1,8873931
FPS		16,969011	17,266394	18,873931
FPS PROMEDIO			17,703112	
Desviación estándar			1,024803401	
FPS FINAL			17,70 \pm 1,02	

Nota: Se usó la formula según Mansur (FC. \sum EE (λ) x I (λ). Abs (λ))

Donde:

EE (λ) x I(λ) = Relación del efecto eritematogénico (EE) con la intensidad de la radiación (I) en cada longitud de onda.

FPS= Factor de Protección Solar.

a, b, c = Repetición por cada análisis.

Se realizó la actividad fotoprotectora por el método de Mansur al extracto etanólico, obteniendo como resultado un FPS de 17,70 \pm 1,02, que según la clasificación europea (COLIPA)¹⁵ está dentro del rango de alto FPS.

Se determinó la actividad fotoprotectora in vitro a las cremas al 1%, 3% y 5%, obteniendo un FPS de 4,81 \pm 0,367, 11,34 \pm 0,76 y de 25,97 \pm 0,67 respectivamente, asimismo se halló la determinación del FPS de la base obteniendo un valor de 0,043 \pm 0,01, lo cual nos indica que es mínima la protección que ofrece la base sola, en comparación con las formulaciones que contienen el ingrediente activo (extracto etanólico); este ensayo nos permitió visualizar que la crema al 5% fue la que tuvo un mayor FPS.

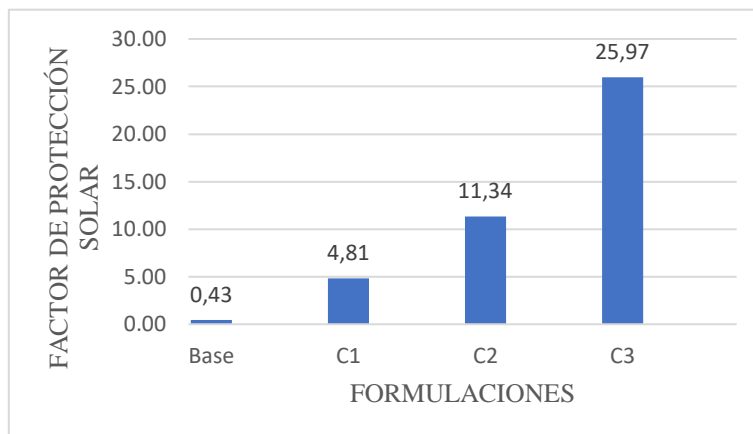


Figura 5. Gráfico del Factor de Protección Solar obtenido en las diferentes formulaciones

CONCLUSIONES

Se demostró la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Euphorbia Candelabrum* Welw. ex Hiern “Candelabro”, el método de DPPH reportó un IC₅₀ de 0.0983 mg/mL, y por el método de FRAP, se encontró que 1 mg/mL de extracto es equivalente a 1.04 mmol del patrón TROLOX®. De igual manera la actividad fotoprotectora in vitro del extracto obtuvo un FPS de $17,70 \pm 1,02$, lo que indica que presenta un valor alto de FPS frente a la radiación UVB, con respecto a la actividad fotoprotectora in vitro de las cremas obtenidas a partir del extracto etanólico de la especie, a las concentraciones del 1%, 3% y 5%, siguiendo el método de Mansur, demostraron que la crema al 5% tiene un mayor FPS con $25,97 \pm 0,67$, considerándola como protección alta frente a la radiación ultravioleta B (UVB), además se puede asociar el efecto obtenido a los flavonoides encontrados en el extracto, asimismo todas las formulaciones realizadas se encontraron dentro de los parámetros establecidos por la normativa vigente. La evaluación del control microbiológico evidenció la ausencia de microorganismos específicos, en la crema al 5%, cumpliendo con las normas estipuladas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Jorge García Ceccarelli por su apoyo en el transcurso de esta investigación, asimismo a la Asociación Científica de Investigación Farmacéutica - Ica, por la motivación constante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alonso-Belmonte C, Montero-Vilchez T, Arias-Santiago S, Buendía-Eisman A. Situación actual de la prevención del cáncer de piel: una revisión sistemática. *Actas Dermosifiliogr.* 2022 Sep 1;113(8):781–91. doi: 10.1016/j.ad.2022.04.015.

2. Garnacho Saucedo GM, Salido Vallejo R, Moreno Giménez JC. Effects of solar radiation and an update on photoprotection. *An Pediatr.* 2020;92(6):377.e1-377.e9. doi: 10.1016/j.anpedi.2020.04.014.
3. Issn P. Determinación de la actividad antioxidante in vitro de los aceites volátiles de cuatro plantas de uso tradicional mediante la medición de la peroxidación lipídica de aceite. *Scientia.* 2006;1(30):365–70.
4. Vasquéz E, Vasquéz J, Bravo G. Actividad antioxidante in vitro de los extractos hidroalcohólicos de los frutos de *Euphorbia candelabrum* Trémaux. (cactus candelabro). [Tesis para optar por el Título Profesional de Químico Farmacéutico] Lima: Universidad María Auxiliadora; 2022.
5. Heya MS, Rodríguez RA, Guillén-Meléndez GA, González E, García-Hernández DA, Cordero A, et al. Actividade fotoprotetora in vitro de extratos vegetais / In vitro photoprotective activity of plant extracts. *Brazilian J Dev.* 2022;8(4):30472–83.
6. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos Naturales. Segunda ed. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
7. AOAC. Methods Official of Analysis. AOAC International- 16^a Edition. Rockville, Maryland: AOAC International; 2012.
8. Ministerio de Salud del Perú. Normas y Directrices para la Regulación de Productos Cosméticos y de Higiene Personal. Lima: MINSA; 2019
9. Hernández P, Huamaní L, Mirano M. Efecto fotoprotector y calidad del gel cosmético a base del extracto del alga marina “*Caulerpa filiformis* (Subr) Hering” recolectada en la provincia de Pisco – Ica. [Tesis para optar por el Título Profesional de Químico Farmacéutico] Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga; 2015.
10. Nuñez K, Romero T. Elaboración de una forma farmacéutica semisólida con actividad antiinflamatoria a partir del extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* Schulz Bipontinus “CHOCRA” [Tesis para optar por el título de Químico Farmacéutico]. Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga; 2015.
11. Reglamento Técnico Andino sobre Especificaciones Técnicas Microbiológicas de Productos Cosméticos [Internet]. 1.^a ed. Lima: Jorge Hernando Pedraza; 2019 [citado el 14 de mayo del 2024]. Disponible en: https://www.mincetur.gob.pe/reglamentostecnicos/inventario_reglamentos_tecnicos/pdf/Resolucion_2120_RTA_EETT_Microbiologicas.pdf
12. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* 1999; 22:25-30.
13. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239: 70 – 76.
14. Nuñez Arango L. Antioxidantes y/o fotoprotectores de los líquenes del páramo de *Sumapaz Thamnolia vermicularis* y *Cladonia* cf. *didyma* y estudio de su posible producción biotecnológica [Tesis para optar por el grado de Doctora en Ciencias Farmacéuticas]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2022.
15. COLIPA /JCIA/CTFA-SA. International Sun Protection Factor Test Method. Brussels: COLIPA; 2006.
16. Gonzales Garcias K. Compuestos antioxidantes en brácteas de *Euphorbia pulcherrima* Y actividad antiinflamatoria de la variedad “Amanecer Navideño”. [Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias en horticultura]. México: Universidad Autónoma Chapingo; 2021.

17. Azaat A, Babojian G, Issa N. Phytochemical Screening, Antioxidant and Anticancer Activities of *Euphorbia hyssopifolia* L. against MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line. *J Turkish Chem Soc Sect A Chem.* 2022;9(1):295–310.
18. Tabla de códigos Pantone y RGB - Logorapid [Internet]. 2014 [citado el 01 de Junio del 2024]. Disponible en: <https://www.logorapid.com/pantone>

ESTUDIO FITOQUÍMICO, CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS BAYAS DE LA PLANTA *Jaltomata andagarae*.

Santos Ascate Salinas*^a, Helmer Lezama Vigo^a, Nino Castro Mandujano^b
y Nora Herrera Hernández[†]

RESUMEN

Tomatito es el nombre común que recibe la baya de *Jaltomata andagarae*, ubicada a más de 4000 metros de elevación, esta planta es nativa del cerro Andagara, región La Libertad, Perú y al igual que muchas plantas altoandinas no tiene estudios respecto a las propiedades nutraceuticas de su fruto, pero los pobladores locales consumen las bayas y comentan además de sentir un sabor agradable al consumirlas, una mejora en su estado de ánimo y para darle un respaldo científico se realizó a las bayas un análisis fitoquímico encontrándose diferentes tipos de metabolitos secundarios. Una cuantificación de polifenoles totales usando el reactivo de Folin-Ciocalteu la cual presentó $412,1 \pm 1,60$ mg/Eq de ácido gálico/100 gramos de muestra. También se midió la capacidad antioxidante de las bayas por el método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) y ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) encontrándose una considerable capacidad antioxidante equivalente trolox (TEAC, por sus siglas en ingles) de 51,69 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra y 107,6817 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra, respectivamente, todos estos resultados nos indican que la baya de esta planta puede ser considerada un alimento nutraceutico que ayudaría a la conservación de la salud de los seres humanos.

Palabras clave: *Jaltomata andagarae*. polifenoles, actividad antioxidante.

PHYTOCHEMICAL STUDY, QUANTIFICATION OF TOTAL POLYPHENOLS AND EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF THE BERRIES OF THE *Jaltomata andagarae* PLANT.

ABSTRACT

Tomatito is the common name given to the *Jaltomata andagarae* berry, located at more than 4000 meters above sea level, this plant is native to the Andagara hill, La Libertad region, Peru and like many high Andean plants, there are no studies regarding the nutraceutical properties of its fruit, but local residents consume the berries and comment, in addition to feeling a pleasant flavor when consuming them, an improvement in their mood and to give it scientific support, a phytochemical analysis was performed on the berries, finding different types of secondary metabolites. A quantification of total

^a Facultad de Química, Universidad Nacional Federico Villarreal, Jr. Río Chepén 290, El Agustino, Lima, Perú, santos.ascate17@gmail.com

^b Facultad de Química e Ingeniería química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

polyphenols using the Folin-Ciocalteu reagent which presented $412,1 \pm 1,60$ mg/Eq of gallic acid/100 grams of sample. The antioxidant capacity of the berries was also measured by the DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) methods, finding a considerable trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of $51,69 \mu\text{mol ET/g}$ sample and $107,6817 \mu\text{mol ET/g}$ sample, respectively. All these results indicate that the berry of this plant can be considered a nutraceutical food that would help preserve human health.

Key words: *Jaltomata andagarae*, polyphenols, antioxidant capacity.

INTRODUCCIÓN

El Perú es un país que posee una privilegiada flora y fauna debido a la enorme variedad de productos naturales. Como representante tenemos a una diminuta baya altoandina originario del departamento de la Libertad, de aproximadamente 1,5 cm de diámetro, de color amarillo con cáliz acrescente y mesocarpo jugoso, llamado por los locales de tomatito (*Jaltomata andagarae*).¹

La *J. andagarae* pertenece a la familia de la solanaceae y es una especie psicrófila, por la capacidad que tiene de crecer en lugares fríos o a temperaturas bajas como es el cerro Andagara, además es rupícola porque habita entre rocas grandes en laderas de pajonales, otras cualidades que posee es la de ser heliófila, es decir, requiere abundante luz solar, además de suelos húmedos con abundantes nutrientes por ser una especie eutrofa.¹

Si bien no existe antecedentes químicos reportados para la *J. andagarae*, se tomó antecedentes reportados de plantas de diferentes especies, pero pertenecientes al mismo género *Jaltomata* y otras pertenecientes a la misma familia Solanaceae como lo es *Physalis peruviana* (aguaymanto). En un estudio se evaluó la baya de *J. ventricosa* y los resultados fueron bastante interesantes, ya que este fruto es rico en fitoconstituyentes, también presentó $319,26$ mg/Eq de ácido gálico por gramo de muestra (para la determinación de polifenoles totales) y los resultados de capacidad antioxidante obteniendo como concentración inhibitoria IC_{50} $42,51 \mu\text{g /mL}$.²

Una gran cantidad de publicaciones a nivel mundial confieren a las plantas de la familia de la Solanaceae y del género *Jaltomata* propiedades nutraceuticas y medicinales, estas propiedades muchas veces se le atribuye a su capacidad antioxidante y al contenido de compuestos bioactivos como polifenoles, además de diferentes tipos de vitaminas, que logran evitar efectos dañinos de los radicales libres en organismos vivos.³⁻⁵

Ante la ausencia de un estudio fitoquímico por ser esta una especie nueva¹, entonces existe una necesidad de realizar un estudio fitoquímico a las bayas de la planta *J. andagarae* (Nativa de Perú) dado que esta fruta se consume y vale la pena conocer las bondades de este fruto ya que ayudaría a favorecer y promover su consumo, además conocer la composición de su riqueza en metabolitos secundarios y capacidad antioxidante, contribuiría a fortalecer su cultivo y consumo, dado que las bayas de plantas del mismo género y familia han reportado tener un considerable potencial nutraceutico y antioxidante, se espera obtener resultados similares que ayudarían a darle un valor agregado al consumo de las bayas de la *J. andagarae* ya que podría ayudar a la conservación de la salud respecto a enfermedades crónico-degenerativas.

PARTE EXPERIMENTAL

Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal en la ciudad de Lima y en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de la ciudad de Lima durante los meses de junio del año 2023 a junio del año 2024.

Muestra

Las bayas de la planta *Jaltomata andagarae* se recolectaron en el departamento de La Libertad, en la provincia de Santiago de Chuco, en el cerro Andagara (figura 1) y se utilizó para el análisis 250 gr. de fruto (baya) recolectados de varios arbustos maduros y el muestreo que se realizó, fue de tipo probabilístico (al azar) teniendo en cuenta su maduración. La identificación de la planta fue realizada por el Magister en botánica tropical Hamilton Beltrán Santiago en el museo de historia natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).



Figura 1. Recolección de las bayas de la planta *Jaltomata*.

Reactivos

Etanol absoluto QP, metanol QP, agua destilada, Colorante Sudan III, ácido clorhídrico concentrado, reactivo de Dragendorff, reactivo de Mayer, reactivo de Wagner, reactivo de Hager, reactivo de Baljet, hidróxido de sodio, anhídrido acético, ácido sulfúrico concentrado, carbonato de sodio, reactivo de Fehling, cloruro férrico al 5 %, ninhidrina al 2 %, cinta de magnesio metálico, alcohol amílico, reactivo de Kedde, DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), Trolox (Sigma –Aldrich, USA), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), ácido gálico (Merck) y reactivo de Folin Ciocalteu (Sigma –Aldrich, USA).

Equipos

Balanza Analítica (EUROTECH), espectrofotómetro (GENESYS 10S UV – VIS) y estufa (EUROLAB).

Obtención del extracto de la baya de *Jaltomata andagarae*

En el laboratorio se hizo el tratamiento de limpieza de las bayas recolectadas, el cual consistió en dos fases, la primera fase fue retirar de forma manual parte de los excesos de hojas y tallos adheridos en algunas bayas. La segunda fase del tratamiento de limpieza de las bayas consistió en lavar las bayas con abundante agua potable y una solución de NaClO 5% (Hipoclorito de Sodio al 5%) para luego secarlas con papel toalla y colocarlas en placas Petri (figura 2), se llevaron a una estufa con las siguientes condiciones: temperatura 40°C y tiempo de 24 horas, hasta que toda el agua fuera evaporada.

Posteriormente se pesó 1 gramos de muestra seca, con una bureta volumétrica se adicionó 20 ml de solución de extracción de metanol: agua: ácido acético (80:20:1), luego la mezcla se sonicó durante 20 minutos y se mantuvo en oscuridad por 4 horas, se repitió el sonicado durante 20 minutos y se dejó en oscuridad para reposo por 19 horas con 20 minutos (todo el proceso tuvo una duración de 24 horas), luego con la ayuda de papel Whatman número 40 se filtró la mezcla en una fiola de 25 ml con lavados del solvente de extracción hasta aforo y finalmente la fiola con el extracto se tapó y se cubrió con papel aluminio para ser almacenado a 4°C⁶.



Figura 2. Bayas maduras después del tratamiento de limpieza.

Estudio fitoquímico

Se utilizó el método descrito por Migdalia Miranda⁷ para el estudio fitoquímico, donde la muestra fue sometida a la acción extractiva de solventes de polaridad creciente: diclorometano, etanol y agua, modificando el pH del medio con el objetivo de obtener los

fitoconstituyentes de acuerdo con su solubilidad, posteriormente estos fueron identificados haciendo uso de reactivos de coloración y precipitación.

Cuantificación de polifenoles totales

En un tubo de ensayo se agregó 50 μL del extracto obtenido, se adicionó 3950 μL de agua ultrapura, 250 μL de la solución de Folin Ciocalteu (2N), se agitó por 1 minuto, se agregó 750 μL de carbonato de sodio al 20% y se dejó reaccionar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas, finalmente se midió la absorbancia a 700 nm por espectrofotometría UV-visible. Se elaboró la curva de calibración con ácido gálico cuyas concentraciones estándar fueron 20, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{g/mL}$, cada estándar siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Se calculó la concentración de polifenoles totales del extracto en mg EAG/100g muestra a partir de la curva de calibración obtenida⁶.

Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH

En un tubo de ensayo se agregó 300 μL del extracto obtenido (a concentraciones de 0,04 mg/mL; 0,4 mg/mL y 4,0 mg/mL) y se mezcló con 2700 μL de una solución de DPPH (60 $\mu\text{mol/L}$ en metanol). La solución se agitó y se incubó en oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, finalmente se midió la absorbancia a 515 nm.

Se realizó la curva de calibración con estándar de trolox cuyas concentraciones fueron 20,06; 50,14; 100,28 y 200,57 $\mu\text{mol/L}$ cada estándar siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente⁶.

El porcentaje de inhibición de DPPH se estimó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia de control}}\right) * 100\%$$

Determinación de la capacidad antioxidante por ABTS

Se preparó el radical ABTS a partir de su precursor el ácido 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazolin-6-sulfónico) a una concentración de 7 mM, el cual fue reaccionado con un 1 mL solución de persulfato de potasio 2,45 mM, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, en oscuridad, durante un tiempo de 12 h. Se preparó una solución buffer de fosfatos (8g de NaCl; 0,2 g de KCl y 1,44 g de KH_2PO_4 en 1 Litro de agua destilada). Una vez formado el radical ABTS se tomó una alícuota de 150 μL , se diluyó con 14 mL de solución buffer de fosfatos hasta obtener un valor de absorbancia de 0,700 ($\pm 0,02$) a 734 nm.

Se tomó 990 μL y se adicionó 10 μL del extracto de muestra (a concentraciones de 0,04 mg/mL; 0,4 mg/mL y 4,0 mg/mL), posteriormente se dejó reaccionar durante 6 minutos y se midió la absorbancia a 734 nm.

Se realizó la curva de calibración con estándar de trolox cuyas concentraciones fueron 5,020; 12,550; 25,100; 50,200 y 75,300 $\mu\text{g/mL}$ cada estándar siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente⁸.

El porcentaje de inhibición de ABTS se estimó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Absorbancia de control}}\right) * 100\%$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio fitoquímico:

Se identificaron los fitoconstituyentes presentes en los extractos diclorometánico, etanólico y acuoso de la baya de *J. andagarae* (ver tabla 1) encontrándose en el extracto diclorometánico lípidos, compuestos láctónicos, triterpenos, esteroides y alcaloides. En el extracto etanólico se encontró compuestos lactónicos, triterpenos, esteroides, catequinas, azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, antocianidinas y alcaloides.

Tabla 1. Resumen de los resultados del estudio fitoquímico

Fitoconstituyentes	Ensayo	Resultados		
		Extracto diclorometánico	Extracto etanólico	Extracto acuoso
Lípidos	Sudán	+	-/-	-/-
Compuestos láctónicos	Ensayo de Baljet	+++	+++	-/-
Quinonas	Borotrager	-/-	-	-/-
Triterpenos y esteroides	Lieberman Burchard	++	+++	-/-
Catequinas	Ensayo de catequinas	-/-	+	-/-
Resinas	Ensayo de resinas	-/-	-	-/-
Azúcares reductores	Licor de Fehling	-/-	+++	+++
Saponinas	Espuma	-/-	+	+
Compuestos fenólicos/ Taninos	Cloruro Férrico	-/-	++	++
Aminoácidos	Ninhidrina	-/-	-	-/-
Flavonoides	Shinoda	-/-	+++	+++
Glicósidos cardiotónicos	Reacción de Kedde	-/-	-	-/-
Antocianidinas	Ensayo de Antocianidinas	-/-	+	-/-
Mucílagos	Ensayo de mucílagos	-/-	-/-	+
Alcaloides	Dragendorff	+++	++	+++
	Mayer	+++	++	+++
	Wagner	+++	++	+++

Leyenda: Intensidad: baja (+), media (++), alta (+++). Identificación: positivo (+), negativo (-), no se realizó el ensayo (-/-)

En el extracto acuoso se encontró azúcares reductores, compuestos fenólicos, flavonoides, polisacáridos y alcaloides. Todos estos metabolitos son muy enriquecedores

para esta baya y son muy similares a los que reportan por investigaciones pasadas en el mismo género *Jaltomata*, pero en la especie *J. ventricosa*² esto podría argumentarse ya que estas bayas provienen de plantas de la misma familia Solanaceae y del mismo género *Jaltomata*, pero de diferente especie ya que ellos reportan *J. ventricosa* y la que se empleamos para esta investigación es *J. andagarae*.

Cuantificación de polifenoles totales:

Se midió la absorbancia de las soluciones patrón de ácido gálico (ver tabla 2). Con estos datos se elaboró la curva patrón respectiva (figura 3). El resultado obtenido en la cuantificación de polifenoles totales es de $412,1 \pm 1.60$ mg equivalentes AG/100 gramos de muestra (ver tabla 3), es mayor comparado con los reportados por otra investigación donde registran 149,3; 144,4; 127,9 y 106 mg equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de fruto fresco de aguaymanto provenientes de Huánuco, Junín, Ancash y Cajamarca respectivamente⁹, aquí podemos destacar que ellos usaron fruto fresco y para esta investigación se usó bayas secas.

Tabla 2. Absorbancias del estándar de ácido gálico a 700 nm.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia promedio
20	$0,012 \pm 0,004$
50	$0,026 \pm 0,006$
100	$0,067 \pm 0,005$
200	$0,187 \pm 0,008$
500	$0,473 \pm 0,006$

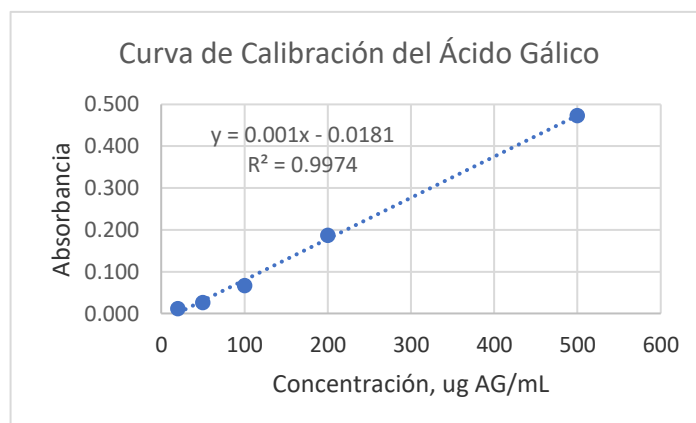


Figura 3. Curva de calibración del ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Tabla 3. Contenido de polifenoles totales en la baya de la planta *Jaltomata andagarae*.

Bayas de la planta	Absorbancia promedio	Concentración, mg equiv. AG/100g muestra seca
<i>J. andagarae</i>	0,1440 ± 0,002	412,1 ± 1,60

Determinación de la capacidad antioxidante por DPPH

Se midió la absorbancia de las soluciones patrón del estándar de trolox (ver tabla 4). Con estos datos se elaboró la curva patrón respectiva (figura 4). En los resultados de la capacidad antioxidante podemos notar por el IC₅₀ la resaltante capacidad antioxidante de las bayas de *J. andagarae* que tiene un valor de IC₅₀ de 1,93 mg/mL (ver tabla 5), capacidad antioxidante equivalente trolox (TEAC, por sus siglas en ingles) de 51,69 μmol ET/g muestra, valores similares comparado con los reportados por otra investigación donde registran IC₅₀ de 1,86; 2,04; 2,24 y 2,36 mg/mL para bayas de aguaymanto provenientes de Huánuco, Junín, Ancash y Cajamarca respectivamente⁹, aquí podemos notar que las bayas de *J. andagarae* tienen una capacidad antioxidante similar al aguaymanto de la región de Huánuco, que es el presenta mejor capacidad de todos las bayas de diferentes regiones empleadas en esa investigación.

Tabla 4. Absorbancias del estándar de trolox a 515 nm.

Concentración (μmol/L)	Absorbancia promedio	% Inhibición
Control DPPH	0,538 ± 0,001	---
20,06	0,434 ± 0,001	19,331
50,14	0,370 ± 0,002	31,227
100,28	0,257 ± 0,001	52,230
200,57	0,073 ± 0,001	86,431

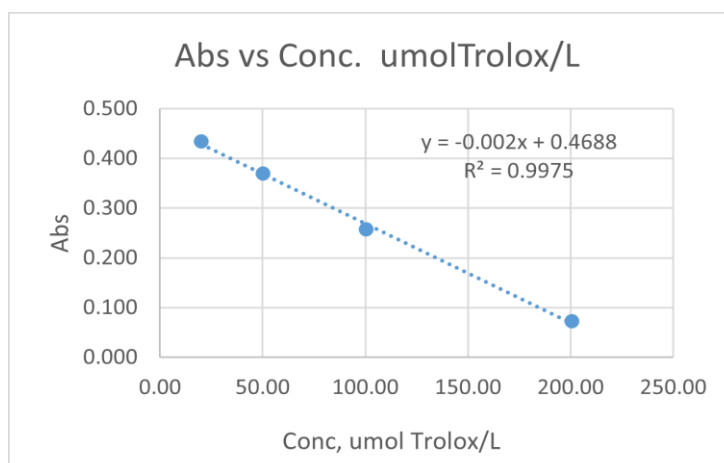
**Figura 4.** Curva de calibración del trolox para la determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH.

Tabla 5. Absorbancias de la muestra a 515 nm.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia promedio	% Inhibición
0,04	0,455 ± 0,001	15,43
0,40	0,372 ± 0,002	30,86
4,00	0,096 ± 0,001	82,16

Determinación de la capacidad antioxidante por ABTS

Se midió la absorbancia de las soluciones patrón del estándar de trolox (ver tabla 6). Con estos datos se elaboró la curva patrón respectiva (figura 5). En los resultados de la capacidad antioxidante podemos notar por el IC₅₀ la resaltante capacidad antioxidante de las bayas de *J. andagariae* que tiene un valor de IC₅₀ de 2,01 mg/mL (ver tabla 7), capacidad antioxidante equivalente trolox (TEAC, por sus siglas en ingles) de 107,6817 μmol ET/g muestra, valores similares comparado con los reportados por otra investigación donde registran IC₅₀ de 1,29; 1,30; 1,47 y 1,55 mg/mL para bayas de aguaymanto provenientes de Huánuco, Junín, Ancash y Cajamarca respectivamente⁹, aquí podemos notar que las bayas de *J. andagariae* tienen una capacidad antioxidante cercana al aguaymanto de la región de Cajamarca.

Tabla 6. Absorbancias del estándar de trolox a 734 nm.

Concentración (μg/mL)	Absorbancia promedio	% Inhibición
Control ABTS	0,700 ± 0,002	---
5,020	0,641 ± 0,006	8,429
12,550	0,593 ± 0,004	15,286
25,100	0,477 ± 0,006	31,857
50,200	0,374 ± 0,002	46,571
75,300	0,240 ± 0,004	65,714

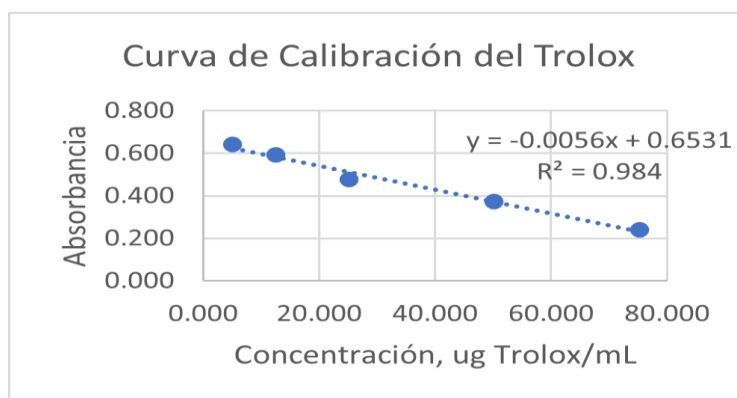
**Figura 5.** Curva de calibración del trolox para la determinación de capacidad antioxidante por el método ABTS.

Tabla 7. Absorbancias de la muestra a 734 nm.

Concentración (mg/mL)	Absorbancia promedio	% Inhibición
0,04	0,535 ± 0,004	23,571
0,40	0,455 ± 0,002	35,000
4,00	0,190 ± 0,004	72,857

CONCLUSIONES

Las bayas secas de *Jaltomata andagarae* son ricas en los siguientes fitoconstituyentes: lípidos, compuestos láctónicos, triterpenos, esteroides, catequinas, azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, antocianidinas, polisacáridos y alcaloides. También fue observado que estos frutos presentan $412,1 \pm 1,60$ mg equivalentes AG/100g muestra. Con respecto a su capacidad antioxidante por el método DPPH y por el método ABTS, se obtuvo los valores de IC_{50} de 1,93 mg/mL, capacidad antioxidante equivalente trolox (TEAC, por sus siglas en ingles) de $51,69 \mu\text{mol ET/g}$ muestra y de IC_{50} de 2,01 mg/mL, capacidad antioxidante equivalente trolox (TEAC, por sus siglas en ingles) de $107,6817 \mu\text{mol ET/g}$ muestra respectivamente para cada método. De acuerdo con lo dicho podemos afirmar que las bayas de *J. andagarae* tiene potencial nutraceutico porque tienen un interesante porcentaje de captación de radicales libres y podría ser empleado en la elaboración de productos que sirvan para mejorar la alimentación de las personas además prevenir enfermedades crónico-degenerativas tanto a nivel local, nacional y mundial¹⁰.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Vicerrectorado de Investigación (VRIN) de la Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), quienes hicieron posible el financiamiento de esta investigación con la resolución rectoral N° 1549-2023-CU-UNFV. A la que en vida fue la Mg. Nora Herrera Hernández, quién me apoyo desde el inicio de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Segundo LG, Thomas M, Leon Y. *Jaltomata andagarae* (Solanaceae) una nueva especie del Norte del Perú. *Arnaldoa*. 2019; 26 (2): 473-484.
- Kelly GT, Yhen JR. Estudio fitoquímico y capacidad antioxidante in vitro del fruto fresco de *Jaltomata ventricosa* [Tesis Licenciatura]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2015.
- Martha MR, Leobardo GB, Iván HR. Capacidad antioxidante del fruto silvestre pipisco (*Jaltomata procumbens*), y su aplicación en la preparación de una salsa. *Mex J Biotechnol*. 2016; 1 (2): 83-96.
- Yahaya M, Yamuna AK, Sani I. Deficiency of antioxidants and increased oxidative stress in COVID-19 patients: A cross-sectional comparative study in Jigawa,

- Northwestern Nigeria. SAGE Open Med. 2021 Feb 1;9:2050312121991246. doi: 10.1177/2050312121991246.
5. Gina CM, Oscar HC, Martín CF. Actividad antioxidante in vitro, de diferentes extractos del fruto de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto). Revista Peruana de Medicina Integrativa. 2019; 4(1): 22-27.
 6. Ordoñez GE, Reátegui DD, Villanueva TJ. Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. Scientia Agropecuaria. 2018; 9 (1): 113-121
 7. Miranda Martinez M. Métodos de análisis de drogas y extractos. La Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad Habana de Cuba; 2002.
 8. 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. 1999 May;26(9-10):1231-7.
 9. Bertha JT, Isabel AA, Leydi VI. Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) de diferentes lugares del Perú. Rev Soc Quím Per. 2016; 82 (3): 272-279.
 10. González-Jiménez FE, Hernández-Espinosa N, Cooper-Bribiesca BL, Núñez-Bretón LC, Reyes-Reyes M. Empleo de antioxidantes en el tratamiento de diversas enfermedades crónico-degenerativas. VertienteS. 2015 ;18(1): 16-21.

ESTUDIO TEÓRICO DFT DE LAS PROPIEDADES DE LA TASPINA Y SU INTERACCIÓN CON LA ACETILCOLINESTERASA MEDIANTE ACOPLAMIENTO MOLECULAR Y DINÁMICA MOLECULAR

Joel C. Rengifo-Maravi^{*a}, Pedro F. Ruiz-Campos^{**b}, Fernando Grandez-Arias^c, Elvis M. Jimenez-Peña^d

RESUMEN

En este trabajo teórico, se emplea la química computacional para estudiar las propiedades de la molécula Taspina y su potencial como inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), una diana clave en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson. El estudio se divide en tres fases. En la primera fase, se utiliza la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) para analizar los descriptores químicos globales y locales de la Taspina, con el fin de caracterizar su reactividad y comportamiento electrónico. En la segunda fase, se realiza un estudio de docking molecular entre la Taspina y la acetilcolinesterasa para evaluar la afinidad de unión y proponer posibles interacciones que estabilicen el complejo. Finalmente, en la tercera fase, se efectúan simulaciones de dinámica molecular para examinar la estabilidad del complejo formado y su comportamiento en el tiempo, proporcionando una visión más profunda de la interacción entre ambas moléculas. Los resultados de este estudio aportan información valiosa sobre las propiedades de la Taspina y su capacidad para inhibir AChE, lo que podría ser útil en el diseño de futuros inhibidores en el campo de la farmacología.

Palabras claves: Taspina, acetilcolinesterasa, DFT, acoplamiento molecular y dinámica molecular.

THEORETICAL DFT STUDY OF TASPINE'S PROPERTIES AND ITS INTERACTION WITH ACETYLCHOLINESTERASE THROUGH MOLECULAR DOCKING AND MOLECULAR DYNAMICS

ABSTRACT

In this theoretical work, computational chemistry is employed to study the properties of the molecule Taspine and its potential as an inhibitor of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), a key target in the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's

^a Departamento Académico de Química, Facultad de Ciencias de la UNALM. jcrengifo@lamolina.edu.pe

^b Departamento de Cursos Básicos. Universidad Científica del Sur. **pruizc@cientifica.edu.pe

^c Departamento de Química, Facultad de Ciencias de la UNI

^d Facultad de Química e Ing. Química de la UNMSM

and Parkinson's. The study is divided into three phases. In the first phase, Density Functional Theory (DFT) is used to analyze the global and local chemical descriptors of Taspine, with the aim of characterizing its reactivity and electronic behavior. In the second phase, a molecular docking study is performed between Taspine and acetylcholinesterase to evaluate the binding affinity and propose potential interactions that stabilize the complex. Finally, in the third phase, molecular dynamics simulations are carried out to examine the stability of the formed complex and its behavior over time, providing a deeper understanding of the interaction between both molecules. The results of this study provide valuable insights into the properties of Taspine and its capacity to inhibit AChE, which could be useful in designing future inhibitors in the field of pharmacology.

Keywords: Taspine, acetylcholinesterase, DFT, molecular docking, molecular dynamics.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y el Parkinson son un gran problema para la salud mundial. Estas enfermedades se caracterizan por una pérdida neuronal progresiva que conduce a un deterioro cognitivo irreversible, deterioro motor y, en última instancia, la muerte. La falta de tratamientos eficaces para estas enfermedades, urgente la necesidad de estrategias terapéuticas innovadoras.^{1, 2, 3}

La acetilcolinesterasa (AChE), una enzima clave en el sistema nervioso central, desempeña un papel fundamental en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas. La AChE es responsable de hidrolizar la acetilcolina, un neurotransmisor crucial para la función cognitiva y la memoria. La desregulación de la actividad de la AChE, que a menudo conduce a un exceso de la enzima, contribuye al agotamiento de los niveles de acetilcolina en el cerebro, lo que contribuye a los déficits cognitivos y motores observados en las enfermedades como el Alzheimer y el Parkinson.^{1, 4}

Los inhibidores de la AChE han surgido como una clase prometedora de agentes terapéuticos para enfermedades neurodegenerativas. La inhibición de la actividad de la AChE, tiene como objetivo aumentar los niveles de acetilcolina en el cerebro, mitigando potencialmente los síntomas y ralentizando la progresión de estas enfermedades debilitantes. La búsqueda de nuevos y efectivos inhibidores de la AChE sigue siendo un área activa de investigación, en la identificación y caracterización de candidatos potenciales.^{1, 2, 3}

La taspina, un alcaloide natural, que ha surgido como un candidato prometedor para la inhibición de la AChE. Estudios previos han indicado el potencial de la taspina para modular la actividad de la AChE, ofreciendo una posible vía terapéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, una comprensión integral de las interacciones de la taspina con la AChE sigue siendo difícil de alcanzar, lo que resalta la necesidad de una mayor investigación.^{1, 2, 4, 5}

En el contexto del descubrimiento de fármacos, los cálculos DFT desempeñan un papel crucial en la comprensión de la reactividad y el comportamiento electrónico de los posibles candidatos a fármacos. Al analizar la estructura electrónica de una molécula, los cálculos DFT pueden proporcionar información valiosa sobre su potencial para

interactuar con una proteína objetivo, lo que en última instancia influye en su actividad farmacológica.^{4,5,6}

Adicionalmente, el acoplamiento molecular es particularmente valioso en las primeras etapas del descubrimiento de fármacos, ya que proporciona un método rentable y eficiente para la selección de un gran número de posibles candidatos a fármacos. Al identificar candidatos prometedores con altas afinidades de unión e interacciones favorables, el acoplamiento molecular puede guiar la selección de compuestos para una evaluación experimental adicional.^{5,6}

El uso de la dinámica molecular se ha consolidado como una metodología de gran importancia. Esta técnica nos ofrece información del comportamiento dinámico de las moléculas en función del tiempo, permitiendo explorar la estabilidad conformacional de las proteínas, dinámicas en las interacciones proteína-ligando, cambios estructurales inducidos e interacciones no covalentes que influyen en los complejos biomoleculares en entornos realistas⁵. El presente estudio nos permitirá estudiar los cambios conformacionales inducidos en la AChE-Taspina, observando como el ligando se comporta en el sitio de unión a lo largo del tiempo en un entorno acuoso.

Para profundizar en el potencial de la taspina como inhibidor de la AChE, este estudio emplea un enfoque de química computacional, utilizando una combinación de teoría funcional de la densidad (DFT), acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular. Este enfoque permite una investigación exhaustiva de las propiedades de la taspina y sus interacciones con la AChE a nivel molecular. Los cálculos DFT brindan información sobre la estructura electrónica y la reactividad de la taspina, el acoplamiento molecular predice la afinidad de unión e identificar interacciones potenciales, mientras que las simulaciones de dinámica molecular simulan el comportamiento dinámico del complejo taspina-AChE a lo largo del tiempo.

PARTE EXPERIMENTAL

Cálculos de química Cuántica

Los cálculos se realizaron con el software ORCA en su versión Orca-5.0.3⁷. Esto se llevó a cabo utilizando el método DFT⁸. Inicialmente, la taspina fue preoptimizada con wB97M y el conjunto base def2-ZVP; luego, se optimizó su geometría con el funcional wB97M-D4^[9] y el conjunto base def2-TZVPP¹⁰, todo en fase gaseosa. Los cálculos de los índices de Fukui también se realizaron con Orca-5.0.3, utilizando las coordenadas obtenidas en la optimización de la geometría. Para esto se empleó también el funcional wB97M-D4 y el conjunto base def2-TZVPP. Los inputs fueron las moléculas de taspina aniónica, catiónica y neutra. Para determinar el gradiente reducido de la densidad (RDG), se utilizaron dos softwares adicionales: VMD y Multiwfn, que es un programa de análisis de funciones de onda¹¹. Todos los cálculos mencionados anteriormente se realizaron usando una computadora personal AMD Ryzen 7 5800X3D, 3.40 GHz, 8 núcleos, 16 hilos de ejecución.

Acoplamiento molecular

Un paso previo antes de realizar el anclaje molecular fue la búsqueda de la enzima que interactúa con la taspina mediante el uso de SwissTargetPrediction ya que permitió

identificar a las posibles proteínas dianas involucradas en su mecanismo de acción. La estructura elegida fue la acetilcolinesterasa (AChE-S) que se descargó del banco de proteínas (RCSB PDB) identificada con el código 4M0E, en la cual se simuló el acoplamiento molecular contra la taspina. La proteína se preparó utilizando el programa UCSF Chimera, donde se removieron las moléculas de agua. Luego, se identificaron los sitios activos de la AChE donde se simularon las interacciones del ligando y los aminoácidos terminales, empleando el servidor en línea CASTp que localizó la cavidad con los sitios activos. Seguido se utilizó la interfaz gráfica AutoDockTools para crear el archivo confing.txt, que contuvo el centro de la caja con las coordenadas en X= 1.154, Y= -41.283 y Z= 13.081, de la cavidad para el acoplamiento. luego, se creó una carpeta de trabajo donde se guardó el archivo config.txt, donde se modificó la exhaustividad a 32 y el número de conformaciones a 1, la taspina y la proteína AChE en formato pdbqt, y un script llamado docking.sh utilizado para realizar el anclaje molecular de forma repetitiva unas 50 veces. Una vez hecha la carpeta de trabajo se empleó el programa AutoDock Vina, desde la terminal de linux ejecutando los comandos `chmod +x docking.sh` y `./docking.sh`. Por último, se realizó una simulación computacional más costosa y exhaustiva mediante el anclaje molecular flexible que nos permite seleccionar una cantidad limitada de los aminoácidos terminales de la cavidad y hacerlos flexibles para que cambien su conformación junto con el ligando durante la simulación.

Método computacional de Simulación de Dinámica Molecular (DM)

Las simulaciones de DM all-atom fueron realizadas considerando las coordenadas atómicas entre la proteína AChE-S y taspina usando Gromacs v5.1.4 con campo de fuerza AMBER99SB y modelo de agua TIP4P. La caja de simulación fue definida con una distancia de 10Å desde el centro del complejo proteína ligando. El sistema preparado fue solvatado con moléculas de agua y neutralizado con la adición de 0.15M de iones Na⁺ y Cl⁻¹³. El proceso de minimización de energía involucró 50000 pasos por cada descenso seguido por gradientes conjugados. Las condiciones PBC fueron definidas por direcciones x, y, z¹⁴ y la simulación fue realizada a temperatura fisiológica de 300K. Se aplicó el algoritmo VERLET para restringir todos los enlaces involucrados con hidrógeno y fuerzas electrostáticas de largo alcance tratadas con PME (Particle mesh Ewald). El sistema fue equilibrado en dos pasos, NVT y NPT a 300K por periodos de 1000ps. Durante la simulación, se utilizaron el termostato V-rescale y Parrinello-Rahman¹⁵ para mantener la presión y la temperatura. Se utilizó el algoritmo LINCS para restringir los enlaces y ángulos. Las interacciones de Van der Waals fueron restringidas con el potencial LJ con un límite de 1.0 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Método de gradiente reducido de la densidad (RDG)

La gradiente reducida de la densidad (RDG) es una herramienta clave en la visualización de interacciones no covalentes^[12]. El análisis del RDG revela diversas interacciones atractivas, de Van der Waals, y repulsivas que influyen en la estabilidad y comportamiento de la molécula. El gradiente reducido de densidad (s), un campo escalar de la densidad electrónica, se describe como:

$$s(r) = \frac{|\nabla\rho(r)|}{2(3\pi^2)^{1/3}\rho(r)^{4/3}}$$

La taspina, al ser una molécula con cuatro anillos aromáticos fusionados, así como grupos éster, éter y una amina primaria, exhibe una red compleja de interacciones intra e intermoleculares. Estas interacciones pueden visualizarse mediante el índice RDG al analizar los valores del parámetro $\lambda_2\rho$, donde la densidad electrónica y su gradiente indican la naturaleza de las interacciones. Donde H-B (atracciones fuertes: tipo enlace puente de hidrógeno), VdW (Interacciones de Van der Waals) y E.E. (Repulsiones fuertes efectos estéricos).

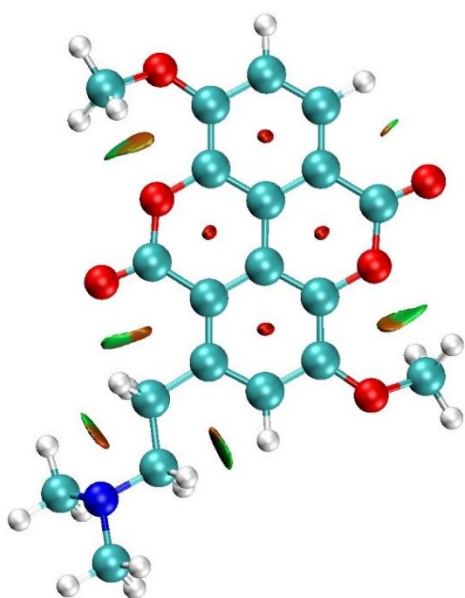


Figura 1(a) Isosuperficie de RDG de la taspina.

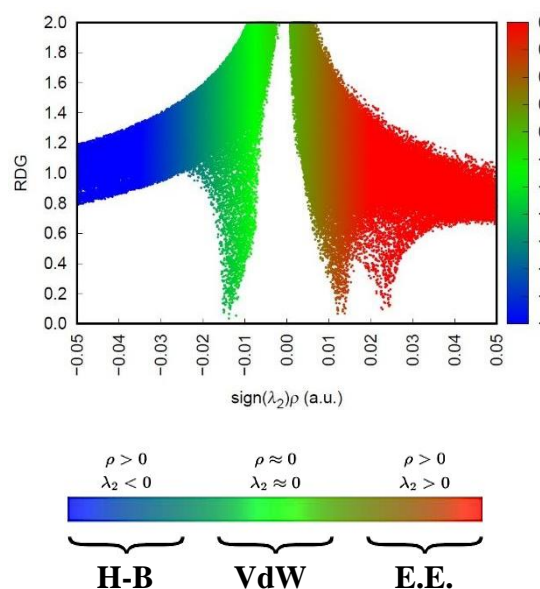


Figura 1(b) Gráfico 2D RGD de la taspina.

En la figura 1(a), no se observa una isosuperficie de color azul, lo que sugiere la ausencia de enlaces por puente de hidrógeno. Esto concuerda con la estructura química de la taspina, la cual no posee átomos dadores de puentes de hidrógeno, pero sus átomos de nitrógeno y oxígeno pueden ser aceptores de puentes de hidrógeno. Sin embargo, se observa otras interacciones, como las de tipo Van der Waals (VdW) y repulsiones estéricas (E.E.), estas se representan mediante isosuperficies de color verde y rojo, respectivamente.

Por otro lado, en la figura 1(b), se observa que los valores asociados a las interacciones fuertes (H-B) se encuentran entre $-0.35 < \text{sign}(\lambda_2)\rho < -0.25$ a.u. Mientras que las interacciones VdW están en el rango de $-0.20 < \text{sign}(\lambda_2)\rho < 0$ a.u., lo que indica la presencia de interacciones Van der Waals en la región ecuatorial de la molécula principalmente. Finalmente, las isosuperficies de color rojo que representan las repulsiones estéricas se localizan principalmente en el centro de los cuatro anillos aromáticos de la taspina, los valores de estas interacciones oscilan entre $0.10 < \text{sign}(\lambda_2)\rho < 0.20$ a.u.

Descriptores Globales y Locales

En la tabla 1 se observan los descriptores globales, estos indican la reactividad general del sistema. La diferencia de energía entre el HOMO y el LUMO da un $\Delta E = 0.0304$ a.u., lo cual sugiere una moderada estabilidad frente a la transferencia electrónica. El valor negativo de la dureza global (η) indica que la molécula es flexible frente a cambios electrónicos, lo que aumenta su reactividad; el valor de la blandura global (s) es el inverso de la dureza, su valor negativo confirma lo mencionado. El valor negativo de la electronegatividad (χ) sugiere que la molécula tiene una baja tendencia a atraer electrones. Por último, el valor de electrofilicidad global (Ψ) sugiere que la taspina tiene baja propensión a aceptar electrones, indicando que se comporta más como nucleófilo que como electrófilo.

Tabla 1. Descriptores globales.

HOMO	0.0209
LUMO	-0.0095
ΔE	0.0304
Energía de ionización (EI)	-0.0209
Afinidad electrónica (AE)	0.0095
Dureza global (η)	-0.0152
Blandura global (s)	-0.0076
Electronegatividad (χ)	-0.0057
Potencial químico (μ)	0.0057
Electrofilicidad global (Ψ)	-0.00106875

En el análisis de la función de Fukui, al considerar los estados de carga neutro, catiónico (+1) y aniónico (-1), se obtienen los valores de la función de Fukui condensada para ataques nucleofílicos (f^-), electrofílicos (f^+) y radicalarios (f^0), los cuales proporcionan información valiosa sobre los sitios más reactivos de una molécula. Los valores positivos de f^+ y f^- revelan tendencias significativas en los centros carbonados, oxígenos y nitrógenos, indicando su propensión a sufrir ataques nucleofílicos y electrófilos, respectivamente. En la tabla 2, se presentan los descriptores locales calculados para identificar sitios reactivos dentro de la molécula. Los carbonos C6 y C4 presentan valores elevados de f^- de 0.097 y 0.068, respectivamente, lo que indica que estas posiciones son favorables para recibir ataques electrófilos. Por otro lado, los átomos de oxígeno O15 y O7 presentan altos valores de f^+ de 0.065 y 0.054, lo que sugiere que estas posiciones son susceptibles a sufrir ataques nucleofílicos.

Tabla 2. Descriptores locales.

Átomo	f- cación	f0 neutro	f+ anión	Descriptor dual	Dureza local (au)
C1	0.034019	0.042151	0.050283	0.016264	-0.00024721
C10	0.006840	0.018218	0.029597	0.022757	-0.00034591
C12	0.010360	0.023776	0.037192	0.026832	-0.00040785
C14	0.031724	0.024874	0.018024	-0.013700	0.00020824
C17	0.012931	0.012469	0.012008	-0.000923	1.403E-05
C2	0.038276	0.037847	0.037419	-0.000857	1.3026E-05
C21	0.012410	0.008328	0.004245	-0.008165	0.00012411
C24	0.001873	0.002124	0.002374	0.000501	-7.6152E-06
C28	0.006724	0.005907	0.005090	-0.001634	2.4837E-05
C3	0.037324	0.044811	0.052297	0.014973	-0.00022759
C32	0.004645	0.003897	0.003149	-0.001496	2.2739E-05
C36	0.020237	0.032738	0.045240	0.025003	-0.00038005
C37	0.040758	0.048573	0.056388	0.015630	-0.00023758
C39	0.032841	0.031661	0.030481	-0.002360	3.5872E-05
C4	0.068818	0.047036	0.025255	-0.043563	0.00066216
C42	0.007945	0.009551	0.011157	0.003212	-4.8822E-05
C5	0.022658	0.035107	0.047556	0.024898	-0.00037845
C6	0.097263	0.056725	0.016186	-0.081077	0.00123237
C8	0.016054	0.023373	0.030692	0.014638	-0.00022225
C9	0.005421	0.024973	0.044525	0.039104	-0.00059438
H0	0.024424	0.026212	0.028000	0.003576	-5.4355E-05
H18	0.011338	0.010353	0.009367	-0.001971	2.9959E-05
H19	0.022270	0.021062	0.019854	-0.002416	3.6723E-05
H20	0.009366	0.008993	0.008621	-0.000745	1.1324E-05
H22	0.020474	0.014904	0.009334	-0.011140	0.00016933
H23	0.020734	0.014836	0.008937	-0.011797	0.00017931
H25	0.004358	0.004268	0.004178	-0.000180	2.736E-06
H26	0.005620	0.005263	0.004906	-0.000714	1.0853E-05
H29	0.004902	0.004240	0.003577	-0.001325	2.014E-05
H30	0.011857	0.011046	0.010234	-0.001623	2.467E-05
H31	0.008607	0.007625	0.006644	-0.001963	2.9838E-05
H33	0.000103	-0.000810	-0.001724	-0.001827	2.777E-05
H34	0.007395	0.006449	0.005502	-0.001893	2.8774E-05
H35	0.012650	0.011735	0.010820	-0.001830	2.7816E-05
H38	0.024800	0.029324	0.033848	0.009048	-0.00013753
H40	0.020455	0.022017	0.023579	0.003124	-4.7485E-05
H43	0.015812	0.017665	0.019518	0.003706	-5.6331E-05
H44	0.005652	0.006908	0.008163	0.002511	-3.8167E-05
H45	0.004232	0.005996	0.007760	0.003528	-5.3626E-05
N27	0.007171	0.004416	0.001661	-0.005510	8.3752E-05
O11	0.069724	0.066168	0.062613	-0.007111	0.00010809
O13	0.029320	0.025738	0.022155	-0.007165	0.00010891
O15	0.037285	0.051372	0.065458	0.028173	-0.00042823
O16	0.039352	0.032372	0.025391	-0.013961	0.00021221
O41	0.018685	0.020916	0.023146	0.004461	-6.7807E-05
O7	0.054304	0.036814	0.019324	-0.034980	0.0005317

Adicionalmente, los descriptores duales confirman regiones de ambivalencia química en sitios como C17 y C2, donde los valores de f^+ y f^- son muy similares de 0.00001 a.u. y 0.00002 a.u., sugiriendo su capacidad para actuar como nucleófilos o electrófilos dependiendo del contexto de la reacción. Finalmente, estos descriptores locales complementan la caracterización global del sistema molecular al proporcionar información detallada de los puntos más reactivos y sus posibles interacciones, permitiendo una predicción precisa de las rutas de reacción más probables.

Estudios de anclaje molecular

La búsqueda de las posibles Dianas mediante el SwissTargetPrediction¹⁷, dio como resultado un listado de enzimas candidatas, dentro de las cuales se encuentran los receptores acoplados a proteínas G, kinasas, proteasas e hidrolasas. El programa elige en función de la similitud molecular y la alta probabilidad estadística dada por la herramienta bioinformática que seleccionó a la acetilcolinesterasa (AChE-S) clasificada como hidrolasa (figura 2).

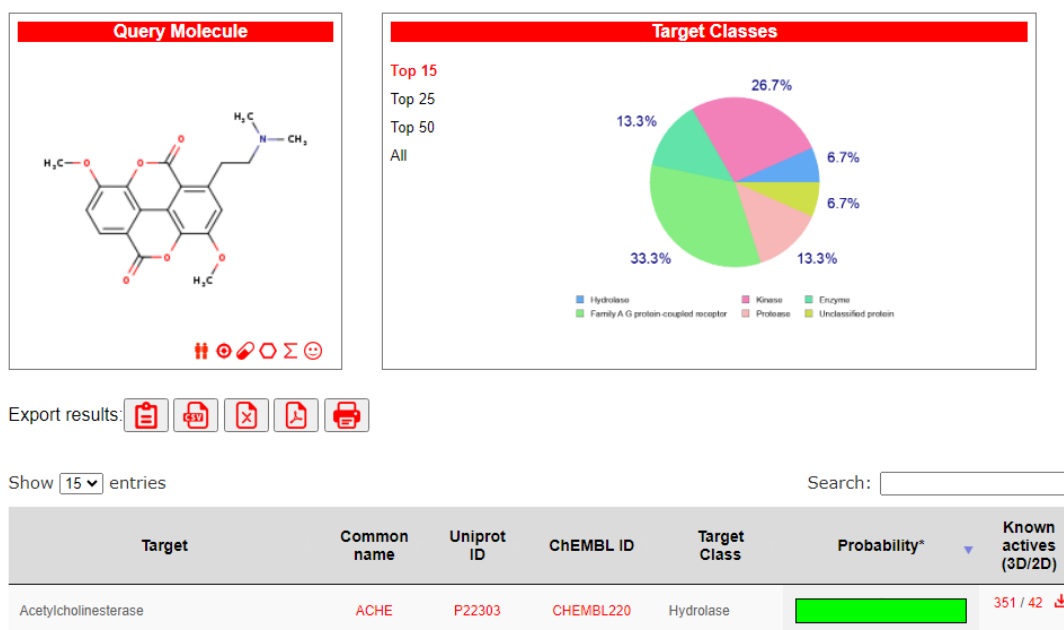


Figura 2. Interfaz del servidor SwissTargetPrediction donde se muestra a la taspina con los diferentes tipos de Dianas seleccionadas.

El análisis de la estructura de la AChE empleando el servidor en línea CASTP¹⁸, evidenció una cavidad cuyo sitio activo presentó un volumen de 933 Å³ y una superficie de 599.6 Å² (Figura 3). En esta región con el programa UCSF Chimera¹⁹, se identificó a los aminoácidos terminales activos que aparecen de color verde en la figura. Estos aminoácidos fueron ASN 233, PRO 235, GLU 313, ILE 316, ASN 317, VAL 367, VAL 370, HIS 405, CYS 409, PRO 410, ALA 412, GLN 413, GLY 416, ARG 417, TYR 503, ALA 505, GLN 508, LEU 524, ALA 526, CYS 529, ALA 530, TRP 532, ASN 533, ARG 534, LEU 536, PRO 537, LYS 538 y LEU 540.

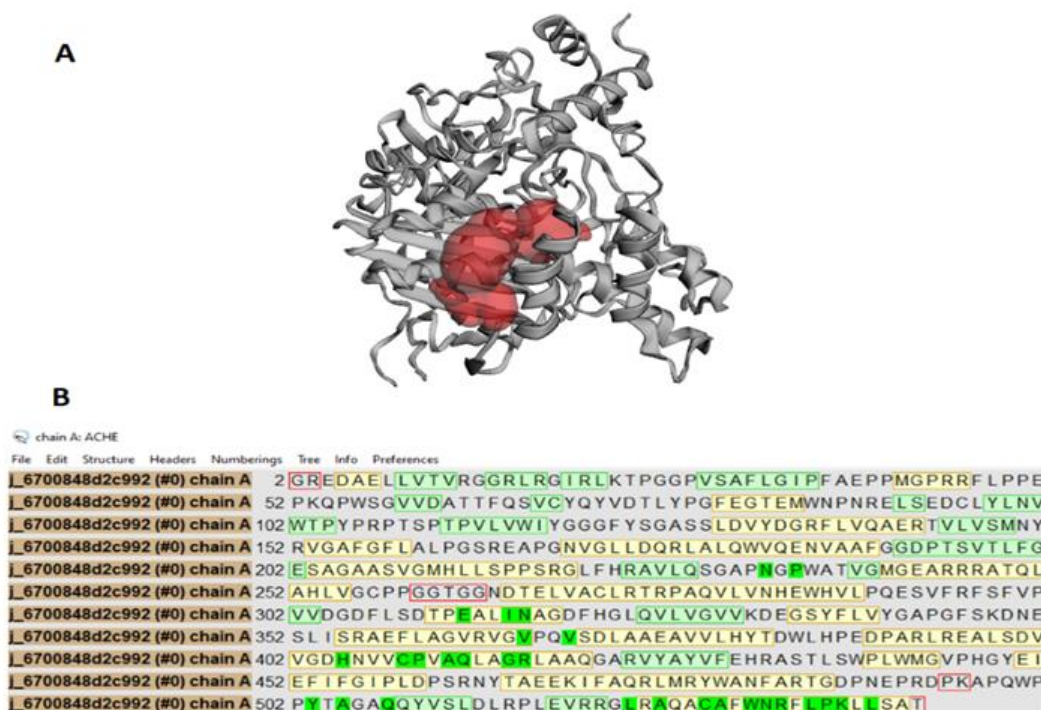


Figura 3 (a) Cavidad seleccionada por el CASTP de la AChE de color rojo. **Figura 3 (b)** Secuencia completa de aminoácidos de la AChE-S, donde los de color verde corresponden a los aminoácidos terminales activos.

Respecto a las simulaciones por anclaje molecular que se realizaron 50 veces entre la taspina y la enzima acetilcolinesterasa presentaron en promedio una energía mínima de unión -7.1 Kcal/mol, y al realizar el anclaje molecular flexible la energía llegó hasta los -8.71 Kcal/mol, lo cual significa que la formación del complejo taspina/acetilcolinesterasa es estable, favorable y espontánea. El análisis post docking se realizó con el Discovery Studio Visualizer V24^[20], con el cual se identificaron interacciones más importantes en el sitio activos correspondientes a los aminoácidos PRO 290, ARG 296, VAL 239, GLY 240, PRO 235 y HIS 405 (figura 4). Así como la estructura de la superficie hidrofóbica (figura 5) donde se aprecia la cavidad en la cual se fijó la taspina durante el acoplamiento molecular.

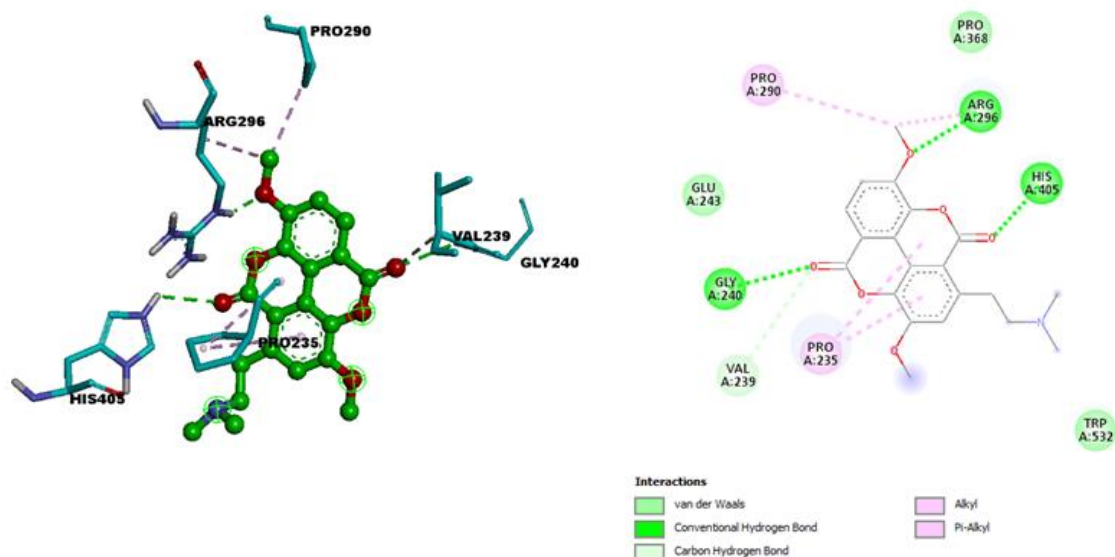


Figura 4. En la imagen de la izquierda se muestran las interacciones de los aminoácidos terminales más representativos con la tacpina. En la imagen de la derecha aparecen los diferentes tipos de interacciones no covalentes más importantes en el momento del acoplamiento.

En el programa también se identificaron interacciones no covalentes que influyeron en el valor de la energía mínima de unión en el complejo (Figura 4). Las más importantes fueron el convencional puente de hidrógeno, enlace de carbono-hidrógeno, alquil y pi-alquil. En la tabla 2, se registraron junto con las distancias a la cual actuaron frente al ligando.

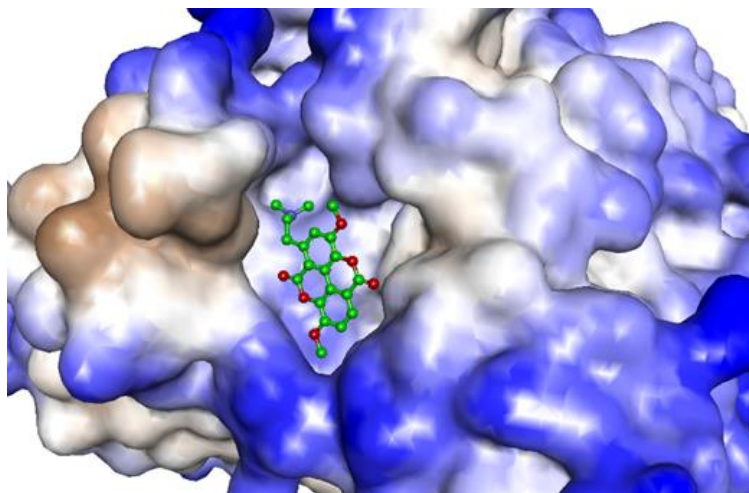


Figura 5. Superficie hidrofóbica de la AChE donde se muestra la cavidad donde se acopló la tacpina.

Tabla 3. Listado de los aminoácidos terminales que interactuaron con la AChE.

	Categoría	Inicio	Final	Distancia (Å°)
AChE/Taspina	Enlace de hidrógeno	GLY 240: H (dador de enlace hidrógeno)	Taspina: O (Aceptor de enlace)	2.162
	Enlace de hidrógeno	ARG 296: H (dador de enlace hidrógeno)	Taspina: O (Aceptor de enlace)	2.131
	Enlace de hidrógeno	HIS 405: H (dador de enlace hidrógeno)	Taspina: O (Aceptor de enlace)	2.910
	Enlace de hidrógeno	VAL 239: C (dador de enlace hidrógeno)	Taspina: O (Aceptor de enlace)	3.324
	Hidrofóbico	Taspina: C (Alquil)	PRO 290 (alquil)	4.594
	Hidrofóbico	Taspina: C (alquil)	ARG 296 (alquil)	4.161
	Hidrofóbico	Taspina (orbitales-pi)	PRO 235 (alquil)	5.238
	Hidrofóbico	Taspina (orbitales-pi)	PRO 235 (alquil)	5.441

Estudios de simulación de Dinámica Molecular (DM)

Se utilizó la mejor posición del análisis de docking molecular y se realizó la simulación de DM all-atoms en un periodo de 15ns a temperatura fisiológica. Las interacciones de la AChE y taspina se analizaron mediante la investigación de los gráficos de RMSD, Rg,

SASA y RMSF, como se muestran en las figuras 6-9. La Figura 6, muestra que el RMSD del complejo AChE-Taspina presenta un equilibrio estable a aproximadamente 0.7 - 0.9 nm, estos valores pueden deberse a factores como flexibilidad intrínseca de la proteína, o cambios conformacionales en esta. El backbone de la proteína con RMSD en 0.2 - 0.3 nm indica que la estructura es bastante estable a lo largo de la simulación, lo que nos indica que la proteína no ha sufrido grandes cambios conformacionales, al menos en su cadena principal. El ligando con un RMSD 0.1 - 0.2 nm indica que ha tenido una desviación mínima durante la simulación, lo que sugiere que el ligando ha mantenido una posición fija con respecto a la posición inicial, mostrando una fuerte interacción entre el ligando y la proteína.

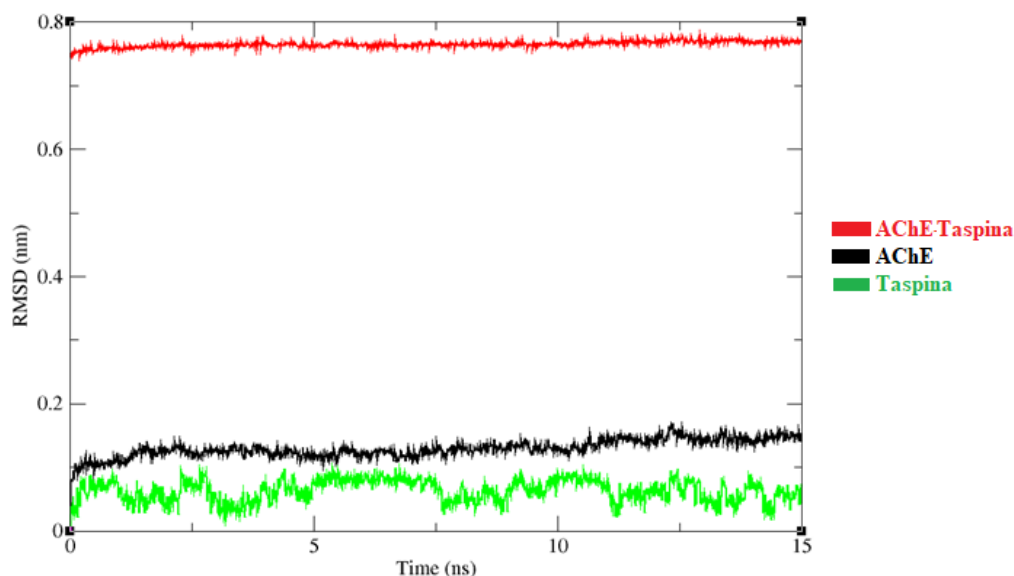


Figura 6. Valores de RMSD del complejo, backbone y ligando.

En la figura 7, se determinó el radio de giro del sistema a lo largo de 15 ns, donde nos muestra que ambas curvas estabilizan desde el inicio y no exhiben grandes fluctuaciones, lo que nos indica que la proteína y el complejo han alcanzado un equilibrio sin presentar grandes cambios conformacionales, demostrando flexibilidad dinámica de la proteína y su interacción con el ligando. En la proteína, el radio de giro se encuentra entre 2.25 - 2.3 nm, lo que indica una estructura bastante compacta. Con respecto al complejo, se observa que presenta un valor ligeramente más alto, con un valor de 2.3 - 2.35 nm, lo que sugiere que el ligando aumenta el tamaño del sistema, pero sin una contribución significativa por un buen acoplamiento a la proteína.

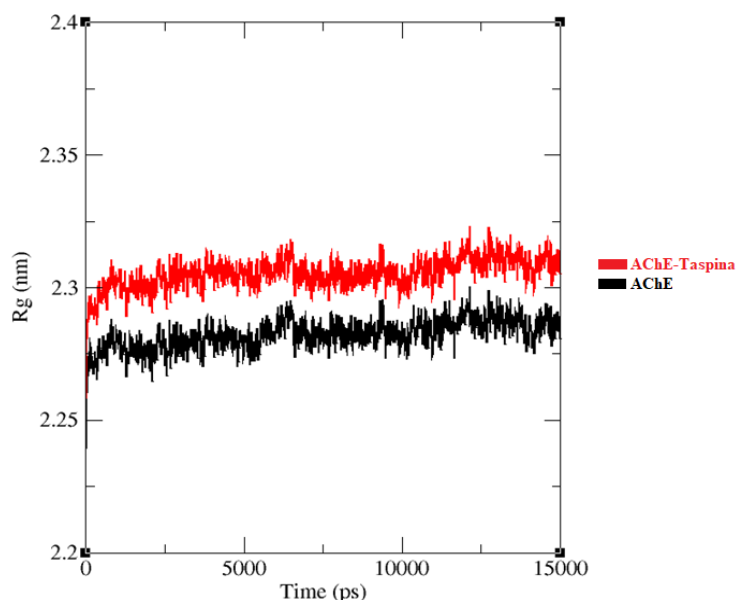


Figura 7. Valores de Radio de Giro (R_g) del complejo y backbone de la proteína.

La figura 8, nos muestra el análisis del Área Superficial Accesible al Solvente (SASA) que mide el área de la superficie de la molécula que está expuesta al solvente¹⁶. Las fluctuaciones que se observan son típicas en una simulación de dinámica molecular que corroboran que no hubo cambios drásticos en la exposición al solvente a lo largo del tiempo de simulación. Este gráfico denota que después de los 5ns tanto el complejo como el backbone alcanzan un equilibrio, con fluctuaciones menores, lo que indica que la proteína y el ligando han alcanzado un estado estable en términos de interacción con el solvente. Adicionalmente, observa que el SASA del complejo es un poco menor al backbone, esto sugiere que el ligando está bien acoplado a la proteína y posiblemente protegido por la estructura proteica, esto es un indicio favorable entre el ligando y proteína, denotando que el ligando no está demasiado expuesto al solvente.

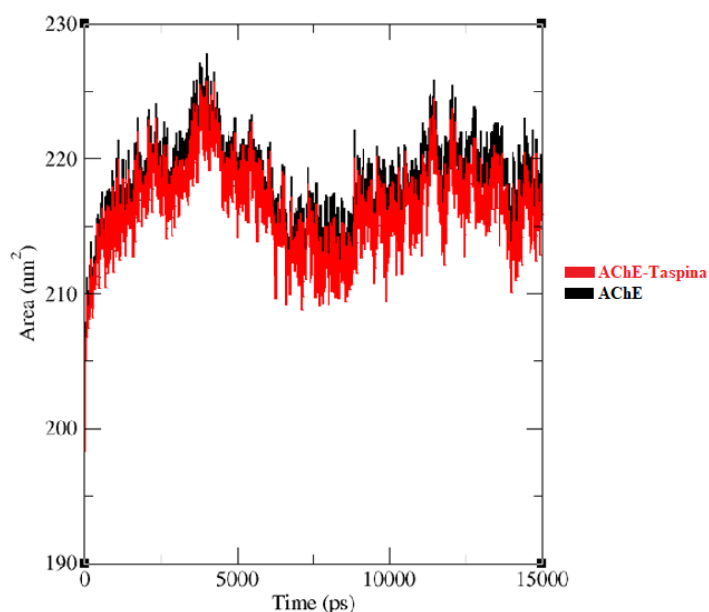


Figura 8. Análisis SASA del complejo y backbone de la proteína.

En la figura 9, se representa el análisis RMSF que nos permite evaluar la flexibilidad de cada residuo de la proteína a lo largo de la simulación. Ambas curvas muestran valores de RMSF bajos, lo que indica que la proteína ha permanecido bastante estable durante la simulación, denotando ser un buen indicador de estabilidad en la dinámica. Se observan dos picos (el primero y último) con elevados valores de RMSF que alcanzan los 0.5 - 0.6 nm. Siendo esto común en las proteínas, ya que los extremos suelen ser más flexibles y no están restringidos estructuralmente. Aunque las dos curvas están superpuestas, los valores de curva roja tienden a ser ligeramente más altos, lo que indica que la presencia del ligando puede estar contribuyendo a fluctuaciones adicionales en la estructura de la proteína. Esto una vez más nos muestra que la simulación de dinámica molecular ha sido bien equilibrada y que la proteína ha mantenido su estructura durante la simulación.

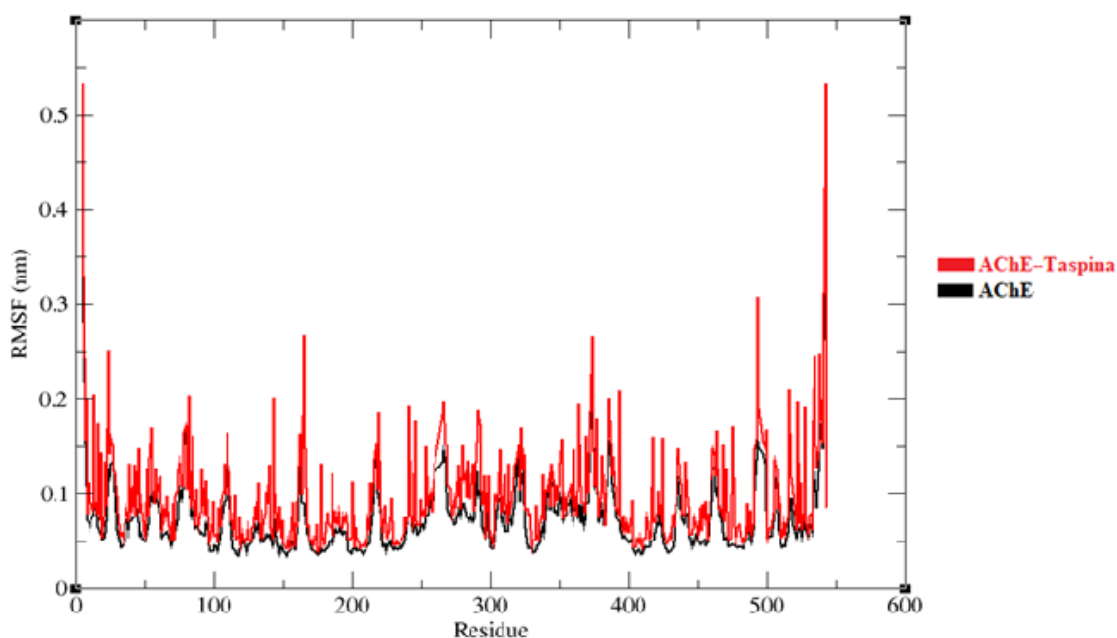


Figura 9. Análisis RMSF del complejo y backbone de la proteína.

Estos análisis de la simulación de Dinámica Molecular revelan en conjunto una estabilidad estructural entre el AchE y taspina, lo que sugiere que podría ser un buen inhibidor potencial de la enzima, ya que podría estar bien acoplada al sitio de unión.

CONCLUSIONES

El análisis mediante el método de gradiente reducido de la densidad (RDG) confirma la ausencia de enlaces por puente de hidrógeno, pero resalta la presencia de interacciones Van der Waals en la región ecuatorial y repulsiones estéricas en los anillos aromáticos. Los descriptores globales indican una moderada estabilidad electrónica y una tendencia a comportarse como nucleófilo. A nivel local, el análisis de la función de Fukui revela que algunos carbonos y oxígenos específicos son los sitios más reactivos para ataques nucleofílicos y electrófilos.

Los resultados obtenidos de las simulaciones de docking molecular entre la taspina y la enzima acetilcolinesterasa, con una energía mínima de unión de -8.71 kcal/mol, confirman la estabilidad y espontaneidad del complejo. Estos valores indican que la interacción es termodinámicamente favorable, lo que sugiere un buen ajuste entre la

taspina y el sitio activo de la enzima. Los residuos clave responsables de las interacciones más significativas son PRO 290, ARG296, VAL239, GLY240, PRO235 y HIS 405, proporcionan información crítica para entender los mecanismos moleculares de inhibición de la acetilcolinesterasa por la taspina. Además, la cavidad identificada en la superficie hidrofóbica de la enzima refuerza el acoplamiento estable y específico de la taspina, lo cual abre nuevas oportunidades para el diseño de inhibidores basados en este modelo de interacción.

El estudio de dinámica molecular revela que la interacción entre la AChE y taspina presenta un acoplamiento favorable y estructura proteica estable durante el tiempo de simulación. Esto fue corroborado con análisis de RMSD, Rg, SASA y RMSF, que muestran a la taspina como un inhibidor potencial de la enzima AChE debido a la limitada exposición al solvente de esta y su interacción estable, lo que sugiere una buena afinidad al sitio de unión.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo fue realizado sin financiamiento y con recursos propios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Walczak-Nowicka ŁJ, Herbet M. Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Neurodegenerative Diseases and the Role of Acetylcholinesterase in their Pathogenesis. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 27;22(17):9290. doi: 10.3390/ijms22179290.
2. Adebambo K, Ojoh OC. In Silico Investigation of Novel Compounds as Inhibitors of Acetylcholinesterase Enzyme for the Treatment of Alzheimer's Diseases. *Int J Alzheimers Dis.* 2024 Feb 8;2024:2988685. doi: 10.1155/2024/2988685.
3. da Cunha EFF, Resende JE, Franca TCC, Gonçalves MA, de Souza FR, Santos-Garcia L, et al. Molecular Modeling Studies of Piperidine Derivatives as New Acetylcholinesterase Inhibitors against Neurodegenerative Diseases. *J Chem.* 2013;2013(1):278742. doi: 10.1155/2013/278742.
4. Patil DN, Patil SA, Sistla S, Jadhav JP. Comparative biophysical characterization: A screening tool for acetylcholinesterase inhibitors. *PLoS One.* 2019 May 31;14(5):e0215291. doi: 10.1371/journal.pone.0215291.
5. Rollinger JM, Schuster D, Baier E, Ellmerer EP, Langer T, Stuppner H. Taspine: bioactivity-guided isolation and molecular ligand-target insight of a potent acetylcholinesterase inhibitor from *Magnolia x soulangiana*. *J Nat Prod.* 2006 Sep;69(9):1341-6.
6. Chandar NB, Efremenko I, Silman I, Martin JML, Sussman JL. Molecular dynamics simulations of the interaction of Mouse and Torpedo acetylcholinesterase with covalent inhibitors explain their differential reactivity: Implications for drug design. *Chem Biol Interact.* 2019 Sep 1;310:108715. doi: 10.1016/j.cbi.2019.06.028.
7. Neese F. Software update: The ORCA program system—Version 5.0. *WIREs Comput Mol Sci.* 2022;12(5):e1606. doi: 10.1002/wcms.1606.
8. Becke AD. Density Functional Calculations of Molecular Bond Energies. *J Chem Phys.* 1986; 84: 4524-4529.

9. Najibi A, Goerigk L. DFT-D4 counterparts of leading meta-generalized-gradient approximation and hybrid density functionals for energetics and geometries. *J Comput Chem*. 2020 Nov 15;41(30):2562-2572.
10. Weigend F, Ahlrichs R. Balanced Basis Sets of Split Valence, Triple Zeta Valence and Quadruple Zeta Valence Quality for H to Rn: Design and Assessment of Accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005; 7:3297-3305.
11. Lu T, Chen F. Multiwfn: a multifunctional wavefunction analyzer. *J Comput Chem*. 2012 Feb 15;33(5):580-92.
12. Johnson ER, Keinan S, Mori-Sánchez P, Contreras-García J, Cohen AJ, Yang W. Revealing noncovalent interactions. *J Am Chem Soc*. 2010 May 12;132(18):6498-506.
13. Joung IS, Cheatham TE 3rd. Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations. *J Phys Chem B*. 2008 Jul 31;112(30):9020-41.
14. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: an N log(N) method for Ewald sums in large systems, *J Chem Phys*. 1993; 98 (12): 10089–10092.
15. Parrinello M, Rahman A. Crystal Structure and Pair Potentials: a Molecular-Dynamics Study, *Phys Rev Lett*. 1980; 45(14): 1196–1199.
16. Pandey P, Meena NK, Prakash A, Kumar V, Lynn AM, Ahmad F. Characterization of heterogeneous intermediate ensembles on the guanidinium chloride-induced unfolding pathway of β -lactoglobulin. *J Biomol Struct Dyn*. 2020 Mar;38(4):1042-1053.
17. Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Res*. 2014 Jul;42(Web Server issue):W32-8. doi: 10.1093/nar/gku293.
18. Tian W, Chen C, Lei X, Zhao J, Liang J. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jul 2;46(W1):W363-W367. doi: 10.1093/nar/gky473.
19. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004 Oct;25(13):1605-12.
20. Gao YD, Huang JF. [An extension strategy of Discovery Studio 2.0 for non-bonded interaction energy automatic calculation at the residue level]. *Dongwuxue Yanjiu*. 2011 Jun;32(3):262-6. Chinese. doi: 10.3724/SP.J.1141.2011.03262.

METABOLOMICS OF *POLYLEPIS RACEMOSA* AND USE OF THE AQUEOUS EXTRACT OF ITS STEM IN THE SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES

José Francisco Román Ferreyra^{*a}, José Monteza^b, Julio César Santiago contreras^c

ABSTRACT

The green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) by the action of extracts of plant species has a promising future due to its multiple applications. In this work, we prepare AgNPs with an aqueous extract of *Polylepis racemosa* rhytidomes, a typical South American plant species whose phytochemistry has been little studied. The metabolomic study of this extract by UHPLC-MS allowed us to identify some organic acids, N-acetylglutamic acid, two glycosylated derivatives of ellagic acid (one of them is a new compound) and three glycosylated triterpenes. Aqueous extracts of *Polylepis racemosa* rhytidome with extraction times of 2, 6, 12 and 30 minutes were used for the synthesis of AgNPs. By SEM it was observed that the size of the AgNPs was approximately 12 nm, obtained with extracts of 2, 6 and 12 minutes. Finally, by comparing the scans by UHPLC-MS before and after the synthesis of AgNPs, and by the characteristics of the metabolites present, it is deduced that the organic acids of the extract stabilized the nanoparticles generated by the reducing groups present. It is concluded that the extract extraction time is an important study variable in the green synthesis of AgNPs with *Polylepis racemosa* rhytidome.

Key words: AgNPs, extraction time, dicarboxylic acid, ellagic acid derivatives, glycosylated triterpenes.

METABOLÓMICA DE *POLYLEPIS RACEMOSA* Y UTILIZACIÓN DEL EXTRATO ACUOSO DE SU TALLO EN LA SÍSTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA

RESUMEN

La síntesis verde de nanopartículas de plata (AgNPs) mediante la acción de extractos de especies vegetales tiene un futuro prometedor debido a sus múltiples aplicaciones. En este trabajo preparamos AgNPs con un extracto acuoso de ritidomas de *Polylepis racemosa*, una especie vegetal típica de América del Sur cuya fitoquímica ha sido poco estudiada. El estudio metabolómico de este extracto mediante UHPLC-MS permitió identificar algunos ácidos orgánicos, ácido N-acetilglutámico, dos derivados glicosilados

^a CITBM - Centro de Investigaciones Tecnológicas Biomédicas y Medioambientales, Jr. José Santos Chocano 199, Bellavista 07006, Callao, Perú, 22fcoroman@gmail.com

^b Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería. Av. Túpac Amaru 210, Rímac 15333, Perú.

^c Facultad de Química e Ing. Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Calle Germán Amézaga 375, Lima 1, Perú.

del ácido elágico (uno de ellos es un nuevo compuesto) y tres triterpenos glicosilados. Para la síntesis de AgNPs se utilizaron extractos acuosos de ritidoma de *Polylepis racemosa* con tiempos de extracción de 2, 6, 12 y 30 minutos. Por SEM se observó que el tamaño de las AgNPs fue de aproximadamente 12 nm, obtenido con extractos de 2, 6 y 12 minutos. Finalmente, al comparar los escaneos por UHPLC-MS antes y después de la síntesis de AgNPs, y por las características de los metabolitos presentes, se deduce que las nanopartículas generadas por los grupos reductores presentes fueron estabilizadas por los ácidos orgánicos del extracto. Se concluye que el tiempo de extracción del extracto es una variable de estudio importante en la síntesis verde de AgNPs con ritidoma de *Polylepis racemosa*.

Palabras claves: AgNPs, tiempo de extracción, ácido dicarboxílico, derivados del ácido elágico, triterpenos glicosilados.

INTRODUCTION

Polylepis is a genus that includes 28 species of trees and shrubs distributed throughout the Andes Mountains, from the north of Venezuela to the north of Chile and Argentina, mainly between 3,500-4,800 m.a.s.l.^{1,2} The genus is characterized by having compound leaves and a woody trunk that has outer layers, called rhytidome, dead bark tissue that is shed throughout the life cycle of the species. In Peru it is known as Queñual and 19 species are reported, being in this way the country that presents the greatest diversity of this genus.³ It is used to extract a natural dye, in traditional medicine, as fuel and as food for animals.⁴

There are not many studies of the secondary metabolites present in *Polylepis* species. The ethanolic extract of *Polylepis tomentella* leaves is known to contain oleanolic acid, 4.49 mg/g, determined by HPLC-DAD.⁵ On the other hand, from a CHCl₃-MeOH extract from *P. incana* leaves it was possible to isolate and identify triterpenoids (nigaichigoside, 23-hydroxytormentonic acid, corosolic acid) and flavonoids (kaempferol, quercetin, catechin, quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside, kaempferol-3-O-β-D-(6'-O-feruloyl)glucopyranoside, tiliroside, quercetin-3-arabinoside, apigenin and luteolin).^{6,7}

On the other hand, silver nanoparticles (AgNPs) are being intensively studied due to their multiple applications (catalysis, antibacterial, biosensors, and surface-enhanced Raman scattering (SERS)).⁸ Ag nanoparticle is an interesting material, especially in the field of medicine. The AgNPs are strong antibacterial due to their ability to damage bacterial cell walls (decreases the membrane permeability), inhibit bacterial cell growth, and disrupt cell metabolism because of the interaction between Ag ions with macromolecules (proteins, DNA, etc.) in cells, and eventually leads to cell death.⁹ The properties of AgNPs largely depend on the shape and size of the nanoparticles. In general, for the synthesis of AgNPs a precursor (AgNO₃), a reducing agent (to carry out the Ag⁺ → Ag⁰ process) and a stabilizing agent of AgNPs (to control their size) are required. Depending on the type of reducing agent used, the synthesis of AgNPs can be classified as chemical, biological and physical.¹⁰ Each of these methods has its advantages and disadvantages.

The chemical method is by far the most widely used to prepare AgNPs. However, the use of chemicals in the synthesis of AgNPs results in the adsorption of toxic chemicals (reducing agents, stabilizing agents and organic solvents) on the surface of the material so that it will have adverse and harmful effects, especially on biomedical applications.

Green synthesis methods for synthesizing nanoparticles using natural products can be used to address the problem by utilizing plant extract (source of reducing secondary metabolites) or microorganisms (such as yeast, fungi, and bacteria) which provide reducing and stabilizing agents.^{9,11} Biomolecules present in plant extracts can be used to reduce metal ions to nanoparticles in a single-step green synthesis process. Additionally, the biosynthesized AgNPs exhibit good biological activity with less cytotoxicity.¹² This biogenic reduction of metal ions to base metal is quite rapid, readily conducted at room temperature and pressure, and easily scaled up. The involved reducing agents include the various water-soluble plant metabolites (e.g. alkaloids, phenolic compounds, terpenoids) and co-enzymes. AgNPs have a particular focus on plant-based synthesis.¹³ Within this category, most of the works use extracts from leaf,¹⁴ or bark,^{15,16} but there are other biological materials used to obtain AgNPs.¹⁷

This work presents a study on the secondary metabolites present in an aqueous extract of *Polylepis racemosa* rhytidomes carried out by UHPLC-ESI-MS/MS. It discusses the influence of the composition of the extracts on the green synthesis of silver nanoparticles.

EXPERIMENTAL SECTION

Material

Polylepis racemosa specimen was collected at Chinancocha lac (9°04'44.4"S 77°39'03.2"W) at Yungay, Ancash, Peru, in 2017 at an altitude of 3850 m. A voucher specimen (register 316186) was deposited in the Museo de Historia Natural from the Universidad Mayor de San Marcos (Lima, Peru) and biologists Mg. A. Cano and W. Mendoza confirmed its identity.

Rhytidome extracts

The clean and mechanically purified rhytidome was carefully separated into its sheets, cut, weighed and covered with filter paper, then immersed in ultra-pure water (Type I), previously filtered (Millipore Type GNWP 0.20 µm). The extraction (0.9 grams of rhytidomes per 35 mL of water) was carried out at room temperature and protected from sunlight, during the established time of 2, 6, 12 and 30 minutes for each extract, called Extract 2, Extract 6, Extract 12 and Extract 30, correspondingly.

Synthesis of AgNPs

5 mL of extract (0.9 g of rhytidomes/35 mL of H₂O) and 1 mL of 0.01 M AgNO₃ solution were mixed with minimal stirring, at room temperature, protected from light and kept refrigerated. For their subsequent characterization, the AgNPs solutions were centrifuged at 6000 RPM for 30 minutes (Ultracentrifuge LABWE model BT20R). The UV-Vis, DLS, UHPLC-ESI-MS / MS readings were performed after 14 hours of synthesis.

Characterization

a) **pH and conductivity.**- Aqueous extracts of *Polylepis racemosa* (0.9 g of rhytidomes/35 mL of H₂O) were stirred at 400 rpm and pH and conductivity readings were made every 30 seconds with a Milwaukee MW 801 conductivity meter calibrated with standards, at 27.3 °C.

- b) UV-Vis.-** Aqueous extracts of *Polylepis racemosa* (0.9 g of rhytidomes/35 mL of H₂O) with different extraction times, and colloidal solutions of AgNPs, were read with a UV-Vis Thermo Scientific Model Hēlios γ spectrophotometer, with quartz cells, between 200 and 600 nm, with water as blank.
- c) Voltammetry.-** 1 mL of an aqueous extract of *P. racemosa* (1.0 g of rhytidomes/100 mL of H₂O, 12 minutes of extraction) was diluted to 25 mL, with a phosphate buffer solution (pH 7 approximately). Working electrode: 3 mm diameter vitreous carbon, previously polished in 0.5-micron alumina, washed in deionized water and ultrasound. Counter electrode: Platinum wire. Reference Electrode: 1 M silver/silver chloride (Ag/AgCl) electrode. Nitrogen gas purging was performed for approximately 15 minutes before each measurement. Measurements were made with an AUTOLAB potentiostat.
Cyclic Voltammetry: From -0.2 V to 0.6 V, at a sweep speed of 100 mV / s and a potential step of 0.00244 mV. The voltamperogram of the blank, which contained 25 mL of phosphate buffer, was also determined.
Differential Pulse Voltammetry: The applied conditions were: Start potential: -0.5 V, End potential: 0.6 V, Step potential 0.005 V, Modulation amplitude: 0.025 V, Modulation time: 0.05 s, time interval 0.5 s.
- d) DLS.-** About 0.2 mL of the colloidal AgNPs were placed inside a Nicomp 380 nanoparticle size analyzer (Particle sizing system) to measure the hydrodynamic sizes of the AgNPs through programmed cycles of time and the results of the Dispersion are recorded using histograms of intensity, volume and number of particles
- e) UHPLC-MS/MS.-** Each of the samples (aqueous extracts or AgNPs colloidal solution) was filtered through a 0.45 μm syringe filter into a vial and the solution was stored at -20 °C until use. A volume of 10 μL was injected into the Dionex Ultimate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific) Luna © Omega C18 100 Å Column, Phenomenex (150 mm x 2.1 mm x 1.6 μm). Column temperature: 30 °C. UV: 270, 280, 430 and 530 nm Flow: 0.3 mL/min Injection temperature: 18 °C Eluents: A: H₂O 1% HCOOH (90%) B: Acetonitrile 1% HCOOH (10%). Mass spectrometer Instrument: Q Exactive Plus (Thermo Scientific) Full MS scan parameters Range: 110-1500 m/z Resolution: 35000 MS2 parameters Resolution: 17500 Ionization source parameters Ionization source and mode: ESI (positive and negative) Spray voltage: 3.5/2.5 KV Capillary temperature: 260 °C Carrier gas: N₂ (Sheath gas flow rate: 48, Sweep gas flow rate: 2) Gas heater temp: 270/270 °C S-lens RF level: 100.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characteristics of the extracts

pH and conductivity

The pH and conductivity data of the aqueous extracts of *P. racemosa* rhytidomes are shown in Figure 1. It is observed that as the extraction time increases, both the pH and the conductivity increase. The initial pH of the aqueous extract is slightly acidic, due to the presence of weak organic acids present. Then the pH is increased from 6.5 to 8.5. The same happens with the conductivity, varying from 10 to 100 μS/cm⁻¹ as a function of the extraction time, which could be attributed to the flow of ions due to the osmotic effect of the interior of the rhytidomes cells of *Polylepis racemosa*.

Absorption spectra

Figure 2 corresponds to the scans of the aqueous extracts of *P. racemosa* rhytidomes, with extraction times of 2, 6, 12 and 30 min. Initially, the absorbance increases rapidly, reaching a maximum after 6 minutes of extraction, stabilizing until 12 minutes, and then decreasing rapidly.

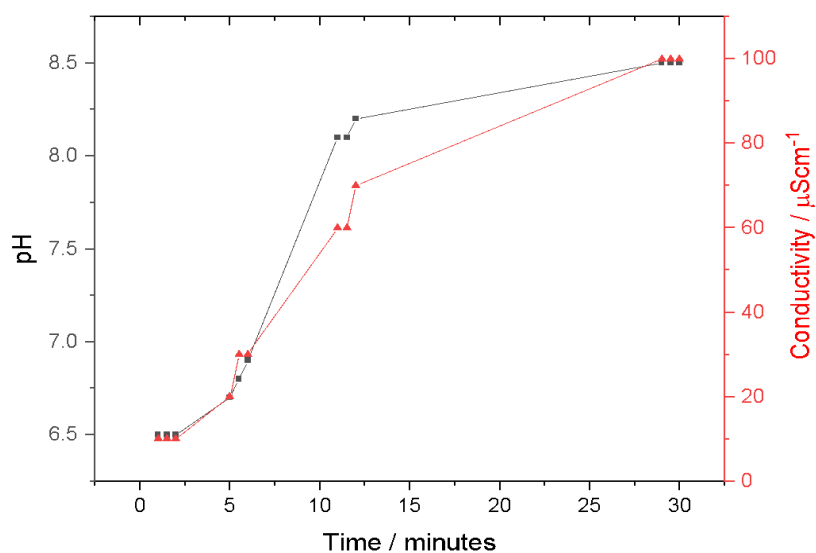


Figure 1. Evolution of pH and conductivity as a function of the extraction time of the rhytidomes in water.

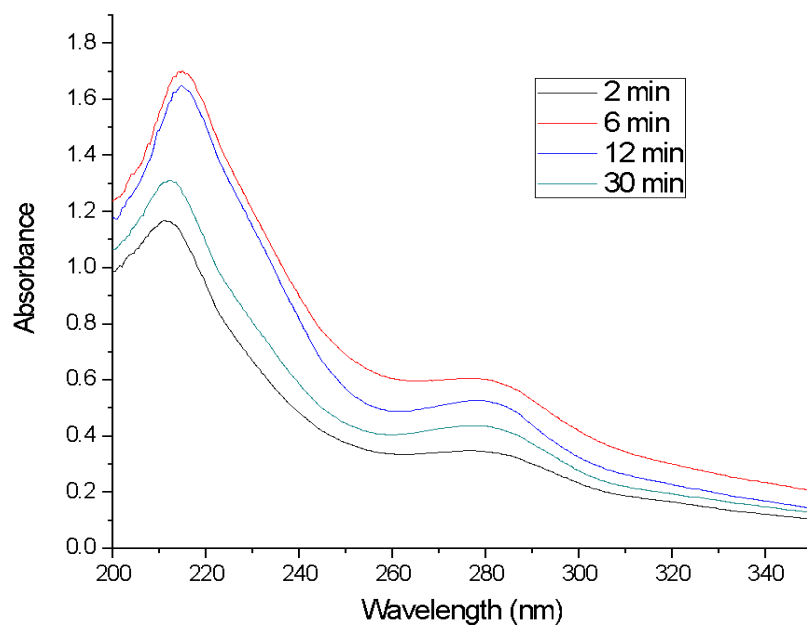


Figure 2. Absorption spectrum of the aqueous extracts of *P. racemosa* at different extraction times.

Voltammetry

The cyclic voltammogram for the *P. racemosa* rhytidome sample for Extract 12 is shown in Figure 3a. The values of the anodic (E_{pa}) and cathodic (E_{pc}) peak potentials are detailed in the Table 1. The number of electrons transferred (n) was calculated by equation (1), while the half-wave potential was obtained by equation (2):

$$\Delta E \text{ (mV)} = E_{pa} - E_{pc} = 59/n \quad (1)$$

$$E_{1/2} \text{ (mV)} = (E_{pa} + E_{pc})/2 \quad (2)$$

Table 1. Anodic and cathodic potentials of the aqueous extract of rhytidomes (12 minutes of extraction)

E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	ΔE ($E_{pa} - E_{pc}$)	Electrons transferred (n)	Half wave potential $E_{1/2}$ (mV)
242	168	74	0.79	205

The value of n , in this case, represents the average of many oxidation-reduction processes, so the value calculated for n is not very representative. Studies carried out on antioxidants found in plants show that reversible and irreversible transfer processes can occur, likewise more than one electron may be involved, due to the presence of more than one functional group as well as oxidative dimerization of these compounds.^{18,19} The differential pulse voltammogram shows a signal around 200 mV, ratifying what is observed by the cyclic voltammetry, Figure 3b. This potential is the one corresponding to the half-cell potential that can be calculated from the voltammetry cyclical. Additionally, a weak signal is also observed around -150 mV which can be attributed to some process that could not be observed by cyclic voltammetry. This weak signal could be related to the oxidation process of ellagic acid, which has been characterized as a pH-dependent, two-step quasi reversible process.²⁰

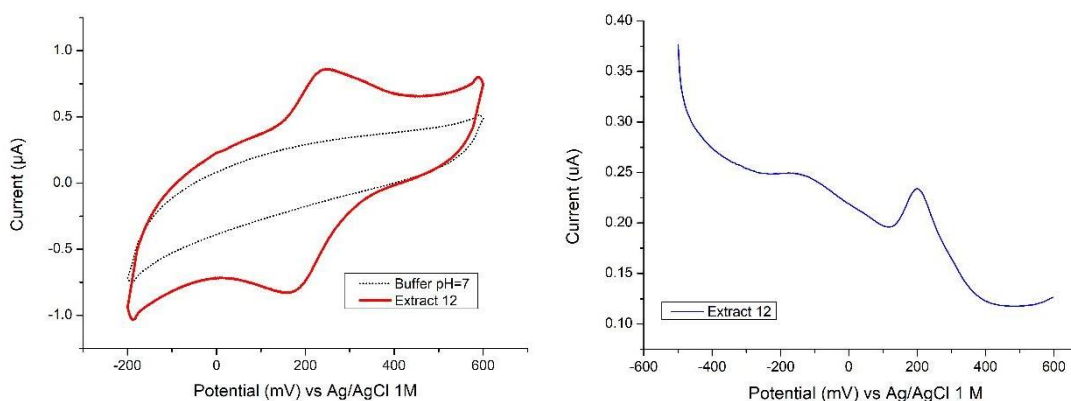


Figure 3. a) Cyclic voltammetry, and b) Differential pulse voltammetry of the extracts obtained of the extract obtained at a 12-minute extraction time.

Determination of the metabolites present in the aqueous extract of *Polylepis racemosa* rhytidomes

Thirteen compounds were identified for the first time in the aqueous extract from *Polylepis racemosa*. All of them were elucidated based on their ESI-MS-MS fragmentation patterns (negative mode) and UV data, and the use of a freely accessible database.^{21,22} Based on the examined information (Figure 4a and Table 2) it was identified uric acid, an amino acid derivative (N-acetylglutamic acid), three aliphatic carboxylic acids (malic acid, suberic acid and azelaic acid), two aromatic carboxylic acids (acid 3-, 4-dihydroxybenzoic acid, salicylic acid), a trihydroxylated carboxylic acid (9,12,13-trihydroxyoctadec-10-enoic acid), a polyphenol (Ellagic acid 4-O-xylopyranoside) and three glycosylated triterpenes (2,3,6, 19-Tetrahydroxy-12-oleanen-28-O-glucopyranosyl ester, rosamultin, 2,3,19-Trihydroxy-12-ursen-28-oic acid). These results are summarized in Table 1. All these compounds are new for *P. racemosa*, since it has not been studied much, however, compound **8** has a molecular peak and fragmentation that does not appear in the latest version of the Natural Products Dictionary database, so we assume it's a new metabolite and call it racemosoic acid.

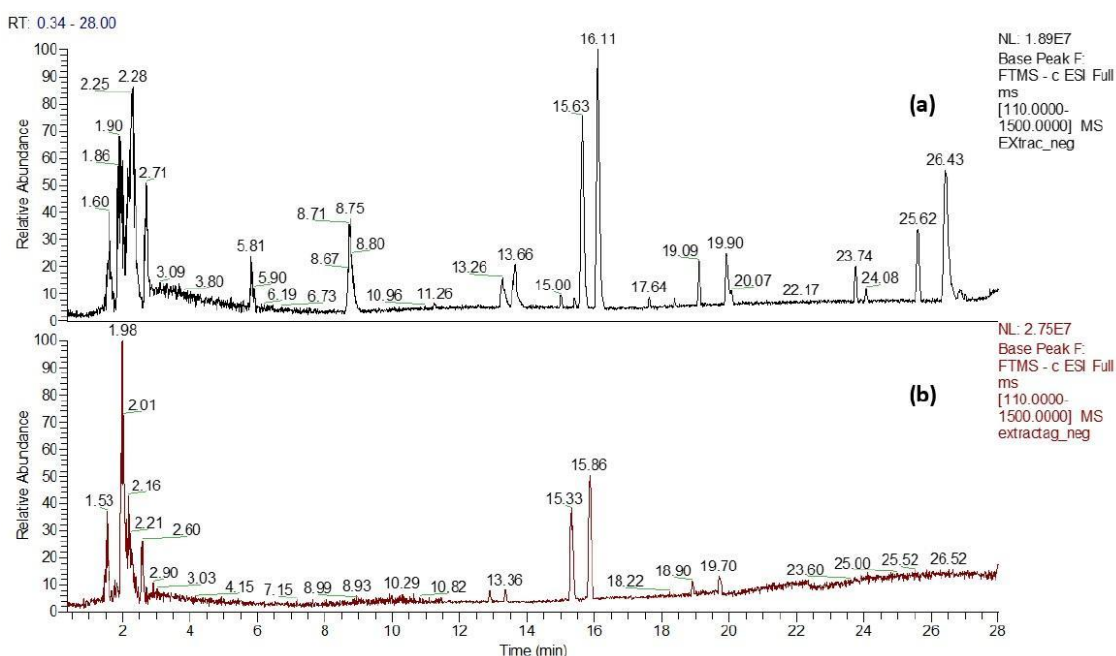


Figure 4. Chromatogram in the negative mode of the aqueous extract of *P. racemosa* rhytidome, obtained by UHPLC-MS. a) Avant and b) before AgNPs synthesis.

The carboxylic acids, compounds **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **9** and **13**, show the characteristic fragmentation (loss of the OH group, in the form of water, and of the carboxylic group). However, compound **12** did not present the loss of the carboxylic group in its fragmentation, but instead presented the loss of successive three water molecules. Compound **7**, ellagic acid 4-O-xylopyranoside ($t_R = 13.26$ min) presents, apart from the molecular peak (M-H) - at 433.0414 ($C_{19}H_{14}O_{12}$; 434.0414), an m/z signal, at 300.9990, corresponding to the loss of the xylopyranoside group.²³

Table 2. Compounds identified by UHPLC-MS from the aqueous extract of *Polylepis racemosa*, with 12 minutes of extraction.

Compound	t _R (min)	MS-ES-	Nominal MW	Molecular Formule	Chemical structure
1	2.08	167.0204 [M-H]	168	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	Uric acid
2	2.28	133.0134 [M-H]	134	C ₄ H ₆ O ₅	Malic acid
3	2.71	188.0560 [M-H]	189	C ₇ H ₁₁ NO ₅	N-Acetyl-L-glutamic acid
4	5.81	153.0187 [M-H]	154	C ₇ H ₆ O ₄	3,4-Dihydroxybenzoic acid
5	8.75	137.0237 [M-H]	138	C ₇ H ₆ O ₃	Salicylic acid
6	13.26	173.0814 [M-H]	174	C ₈ H ₁₄ O ₄	Suberic acid
7	13.26	433.0414 [M-H]	434	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	Ellagic acid 4-O-xylopyranoside
8	13.66	491.0470 [M-H]	492	C ₂₁ H ₁₆ O ₁₄	Racemosoic acid
9	15.63	187.0981 [M-H]	188	C ₉ H ₁₆ O ₄	Azelaic acid
10	16.11	711.3969 [M+FA-H]	666	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₁	2,3,6,19-Tetrahydroxy-12-oleanen-28-O-Glucopyranosyl ester
11	19.09	695.4016 [M+FA-H]	650	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	Rosamultin
12	19.90	329.2335	330	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	9,12,13-trihydroxyoctadec-10-enoic acid
13	23.74	293.1761	294	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	Unknow
14	25.62	487.3430	488	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	2,3,19-trihydroxy-12-ursen-28-oic acid

Compound **8** ($t_R = 13.26$ min) could not be unequivocally identified. The proposed structure was made based on the mass spectrum, which is typical for an ellagic acid derivative, with a methoxy group and a carboxylated xylopyranoside group. The mass spectrum of **8** (racemosoic acid) presents, apart from the molecular peak (M-H) - at 491.0470 ($C_{21}H_{16}O_{14}$), an m/Z signal, at 315.0150, corresponding to the loss of the xylopyranoside group, followed by the loss of a group methyl.²⁴ The tentative structure of the compound is shown in Figure 5, however, to attribute the correct position of the methyl group and the sugar in the molecule, a subsequent nuclear magnetic resonance study will be necessary.

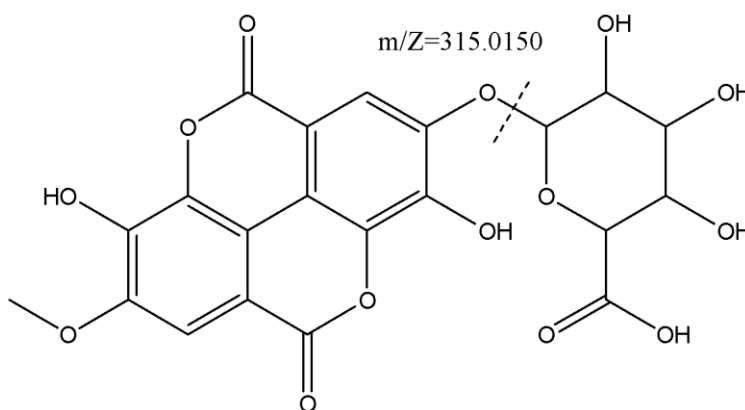


Figure 5. Racemosoic acid (**8**), (6-((3,8-dihydroxy-7-methoxy-5,10-dioxo-5,10-dihydrochromeno[5,4,3-cde]chromen-2-yl)oxy)-3,4,5-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid), proposed structure, showing the loss of xylopyranoside group

Compounds **10** and **11** are structurally similar: they both have 5 fused rings linked by an ester to a glucopyranosyl group. The molecular peak is obtained by subtracting the molecular weight of formic acid, since the [M-FA-H] adduct was formed in both cases. One of the fragmentation peaks corresponds to the loss of the glucopyranosyl group, followed by the loss of H_2O .²⁵

It is interesting to note the characteristics of the aqueous extract of *P. racemosa* as a source of carboxylic acids (especially dicarboxylic acids), glycosylated compounds and saponins. The case of the glycosylated derivatives of ellagic acid is worth noting since it would be a solution to the low solubility and bioavailability of ellagic acid, which has been reported to exert a beneficial effect against severe pathologies associated with oxidative damage (cancer and diseases cardiovascular and neurodegenerative).²⁶

Likewise, the anti-biofilm activity of glycosylated ellagic acid has been reported (Fontaine, 2017). Similarly, Rosamultin (**11**), a pentacyclic triterpenoid saponin, has pharmacological properties.²⁷

Synthesis of silver nanoparticles

For this synthesis, extracts of *P. racemosa* were used with extraction times of 2, 6, 12 and 30 minutes. In all cases, the reaction mixture rapidly changed color to reddish brown and became slightly cloudy.

Absorption spectrum of AgNPs

The absorption spectrum of these mixtures, Figure 6, shows that the highest absorbance, in the UV range, corresponds to the 2-minute extract, and then decreases to 12 minutes. After this time there are no more changes: the 12 and 30-minute curves are identical. However, comparing Figures 3 and 6 it is observed that the extracts before the synthesis of AgNPs show well-differentiated bands one at 213.5 nm with 1.44 U.A. and another band at 277 nm with 0.48 U.A., which after the synthesis of the AgNPs move to 218 nm with 2.21 U.A. and the other band at 255.5 nm with 1.33 U.A.

On the other hand, in the visible region, broadband is observed between 323 to 600 nm, centered at 430 nm, corresponding to the surface plasmon generated by the interaction of light and AgNPs (inset of Figure 6). It is observed that the extraction time that allows obtaining the highest amount of AgNPs is 12 minutes, since the highest absorbance is obtained, but then decreases for the 30-minute extract.

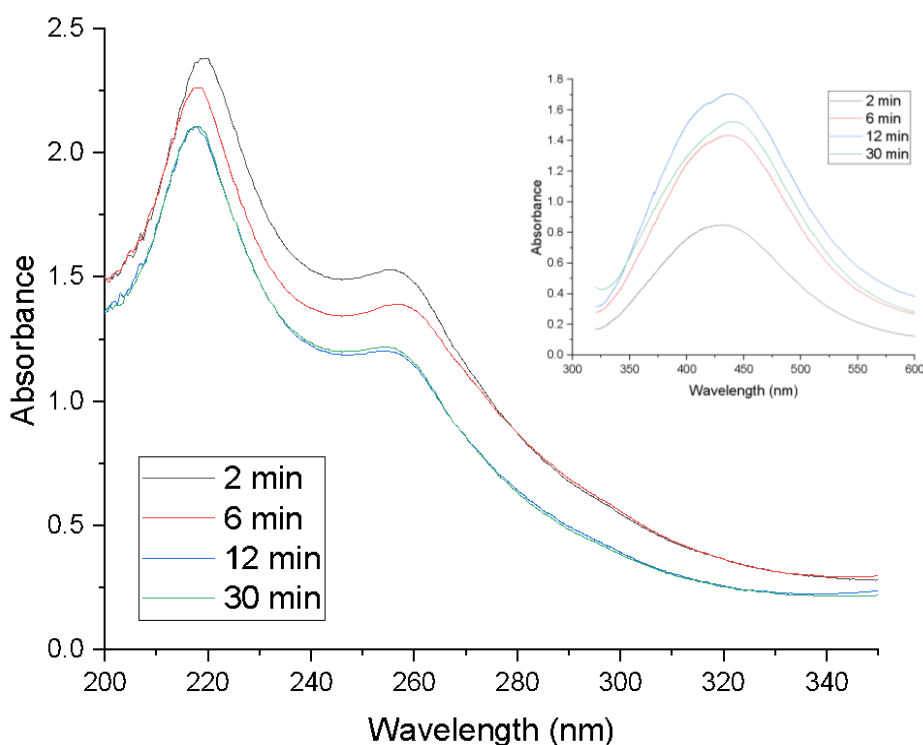


Figure 6. The absorption spectrum of the aqueous extracts of *P. racemosa* at different extraction times after the synthesis of AgNPs. The inset shows surface plasmon uptake of AgNPs.

Analysis by UHPLC-MS

From the compounds present in the extract, and identified by UHPLC/MS, we can deduce that those with the potential to reduce silver are dihydroxybenzoic acid (**4**)²⁸ and ellagic acid derivatives (**7** and **8**).²⁰ Likewise, those compounds that present glycosylated groups in their structure (**8**, **10** and **11**) are possible reducers due to their structural analogy with D-glucose.²⁹ Comparing the UHPLC-MS chromatograms of the aqueous extract of *P. racemosa* before and after the synthesis of the AgNPs (Figure 4), it is observed that practically all the signals disappear, especially those of $t_R = 2.28, 2.71, 5.81, 8.75, 23.74$ and 25.62 minutes, corresponding to organic acids and some glycosylated triterpenes. As already mentioned, the compounds with the ability to reduce Ag^+ ions are compounds **4**,

7, 8, 10 and **11**. Both the oxidized species of these compounds and the organic acids (including the amino acid) would bind to the nanoparticles to stabilize them, which would explain the disappearance of these signals in the chromatograms.²⁹⁻³²

Hydrodynamic diameter with DLS

The solutions after the synthesis of the AgNPs were taken to the DLS equipment, where the following results were obtained. Figure 7 shows four volume-weight graphs for the extract readings at different extraction times. It can be seen from the three graphs between 2 and 12 minutes that as the extraction time increases, the relative % of nanoparticles larger than 150 nm decreases. The significant presence of 11.7 nm nanoparticles is also appreciated. In contrast, the 30-minute fraction does not present 11.7 nm nanoparticles, and the relative % of larger nanoparticles increases (22.5 nm and 106.9 nm). Therefore, the extraction time affects the result in the hydrodynamic diameter of the nanoparticles and their percentage distribution in the mixture, the extract being obtained at a time of 12 minutes, with a conductivity of 70 $\mu\text{S}/\text{cm}$ and pH 8.2; which allows us to obtain the smallest size of nanoparticles and less polydispersity. Several reports indicate that pH is an important parameter in the stability of AgNPs, indicating that a basic pH allows the formation of small and stable nanoparticles, due to an increase in the reaction rate, with the consequent nucleation of small-sized AgNPs.^[33] On the other hand, at pH 8 organic acids are not deprotonated, allowing a greater interaction with AgNPs, preventing their coalescence.

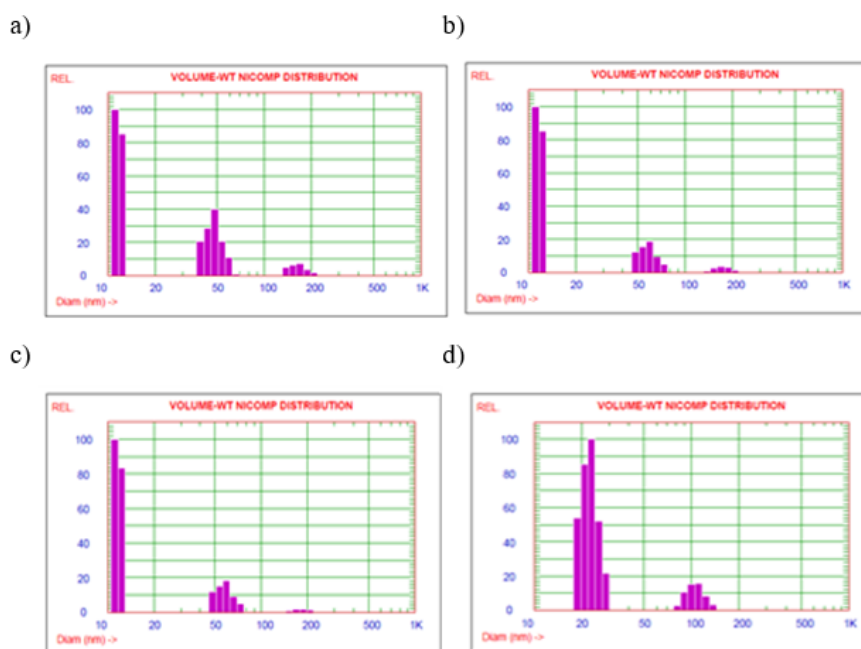


Figure 7. Volume - Weight Distribution of the solutions after the synthesis of AgNPs with the extracts with a) 2 min, b) 6 min, c) 12 min, and d) with 30 min extraction.

Analysis by scanning electron microscopy

Figure 8 shows a SEM micrograph of the AgNPs obtained with Extract 12. It is observed that the average size of the nanoparticles is around 11.7 nm and they are spherical in shape.

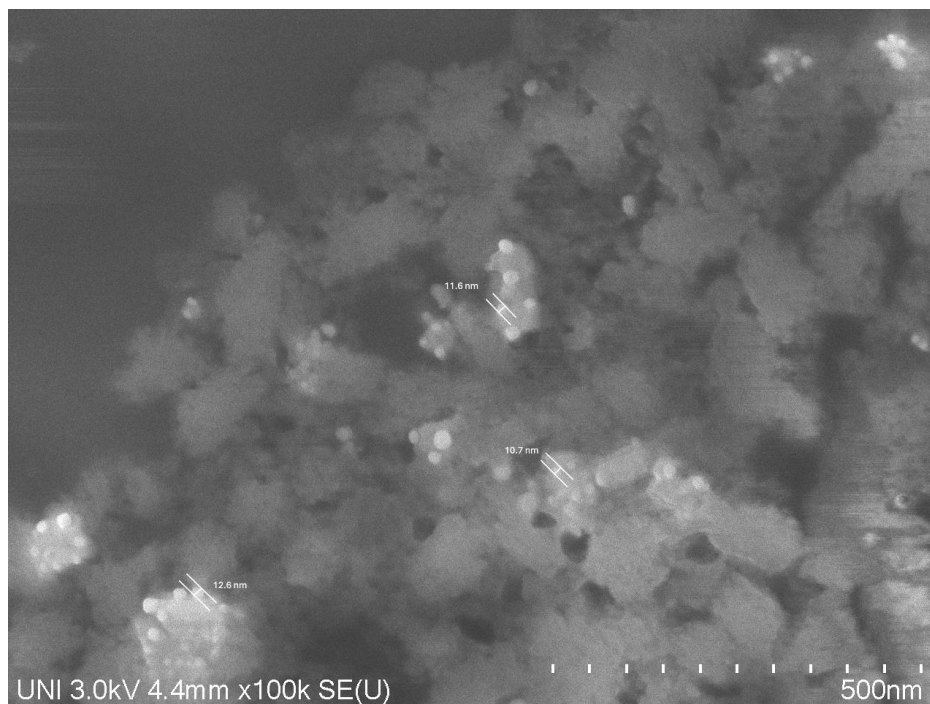


Figure 8. Analysis of the AgNPs obtained with a 12-minute extract.

As can be seen from the DLS and SEM results, varying the extraction time of the *P. racemosa* extract, in addition to modifying the pH and conductivity, also varies the size of the AgNPs. The size of the AgNPs obtained is within the range of values of these nanoparticles obtained by green synthesis. For example, using aqueous extracts of *Impatiens balsamina* and *Lantana camara*, AgNPs of 12 nm to 20 nm were obtained for *I. balsamina* and 3.2 nm to 12 nm for *L. camara*, depending on the molar concentration of silver nitrate.⁹ Likewise, when fungi or yeasts are used the size of the obtained AgNPs varies between 5 and 30 nm depending on the species used.¹¹

It is important to mention that the size and shape of AgNPs affect their antibiotic and cytotoxic properties. However, it was observed that there is no linear correlation between size and antibiotic or cytotoxic properties.¹⁰ The small size is important for applications and the way they are presented also greatly influences the activity of AgNPs. AgNPs of 89 nm size applied by spray obtained 255 and 4 times more efficacy against *S. aureus* and *C. albicans*, respectively. It was also shown that the cytotoxic effect was much lower than the control.¹²

CONCLUSIONS

The phytochemical study of the aqueous extract of *Polylepis racemosa* rhytidomes, carried out by UHPLC-MS, has allowed the identification of organic acids, N-acetylglutamic acid, two glycosylated derivatives of ellagic acid (one of them is a new compound, racemosaic acid) and three glycosylated triterpenes. Despite the relatively few metabolites present in the aqueous extracts, they provided reducing species to obtain Ag(0) and also a capping agent for the stabilization of the synthesized nanoparticles preventing their aggregation.

The extraction time of the aqueous extracts of *P. racemosa* plays an important role in their physicochemical characteristics and, consequently, in the synthesis of AgNPs. The extract obtained with 12 minutes of extraction allowed us to obtain the smallest AgNPs, with hydrodynamic diameters of 50.8 nm, measured by DLS; while by SEM a diameter of approximately 12 nm was determined. Finally, by comparing the scans by UHPLC-MS before and after the synthesis of the AgNPs, and by the characteristics of the metabolites present, it is deduced that the nanoparticles generated by the reducing groups present were stabilized by the organic acids present in the extract.

The metabolites identified in the aqueous extract of *P. racemosa* are interesting from the pharmacological point of view, mainly due to the presence of glycosylated derivatives of ellagic acid and rosmultin, which should encourage the phytochemical study of the genus *Polylepis*, which has not yet received the attention of the scientific community.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the CITBM Center of Excellence, for financing part of this research, to Eileen Cornelio from the LabNanoInTec laboratory for the conductivity measurements, and to Billy Cabanillas from the LID of the UPCH for the identification of compounds with UHPLC-ESI-MS/MS.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Segovia-Salcedo M, Domic A, Boza T, Kessler M. Situación taxonómica del género *Polylepis*. Implicancias para los estudios ecológicos, la conservación y la restauración de sus bosques. *Ecología Austral*. 2018; 28: 188-201.
2. Mendoza W, Cano A. El género *Polylepis* en el Perú: taxonomía, morfología y distribución. Saarbrücken: Editorial Academica Española; 2012.
3. Mendoza W, Cano A. Diversidad del género *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) en los Andes peruanos. *Rev Peru Biol*. 2011; 18: 197-200.
4. Castañeda R, Albán J. Importancia cultural de la flora silvestre del distrito de Pamparomás, Ancash, Perú. *Ecología Aplicada*. 2016; 15: 151-169.
5. Lozano M, Flores Y, Almanza G. High contents of oleanolic acid in highland Bolivian plants. *Rev Bol Quim*. 2017; 34: 28-32.
6. Catalano S, Cioni PL, Martinozzi M, De Feo V, Morelli I. Chemical investigation of *Polylepis incana* (Rosaceae). *Biochem Syst Ecol*. 1995; 23(1):105-7.
7. Catalano S, Bilia A, Martinozzi M, Morelli I. Kaempferol 3-O, β -D-(6''-Feruloyl)glucoside) from *Polylepis incana*. *Phytochem*. 1994; 37: 1777-1778.
8. Zhang Z, Shen W, Xue J, Liu Y, Liu Y, Yan P, et al. Recent advances in synthetic methods and applications of silver nanostructures. *Nanoscale Res Lett*. 2018 Feb 18; 13(1):54. doi: 10.1186/s11671-018-2450-4.
9. Aritonang HF, Koleangan H, Wuntu AD. Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract of Medicinal Plants' (*Impatiens balsamina* and *Lantana camara*) Fresh Leaves and Analysis of Antimicrobial Activity. *Int J Microbiol*. 2019 Jul 1; 2019:8642303. doi: 10.1155/2019/8642303.

10. Haider A, Kang I. Preparation of Silver Nanoparticles and Their Industrial and Biomedical Applications: A Comprehensive Review. *Adv Mater Sci Eng.* 2015;2015(1):165257. doi:10.1155/2015/165257.
11. Gour A, Kumar N. Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019; 47: 844–851.
12. Fernandes RA, Berretta AA, Torres EC, Buszinski AFM, Fernandes GL, Mendes-Gouvêa CC, et al. Antimicrobial Potential and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles Phytosynthesized by Pomegranate Peel Extract. *Antibiotics (Basel).* 2018 Jun 26;7(3):51. doi: 10.3390/antibiotics7030051.
13. Kumar A, Chisti Y, Chand U. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv.* 2013; 31: 346-356.
14. Banerjee P, Satapathy M, Mukhopahayay A, Das P. Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. *Bioresour Bioprocess.* 2014; 1:3. doi: 10.1186/s40643-014-0003-y
15. Burlacu E, Tanase C, Coman NA, Berta L. A Review of Bark-Extract-Mediated Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Applications. *Molecules.* 2019 Nov 28;24(23):4354. doi: 10.3390/molecules24234354.
16. Nayak D, Ashe S, Rauta PR, Kumari M, Nayak B. Bark extract mediated green synthesis of silver nanoparticles: Evaluation of antimicrobial activity and antiproliferative response against osteosarcoma. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016 Jan 1;58:44-52.
17. Ahmad S, Munir S, Zeb N, Ullah A, Khan B, Ali J, Bilal M, Omer M, Alamzeb M, Salman SM, Ali S. Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles - an ecofriendly approach. *Int J Nanomedicine.* 2019 Jul 10;14:5087-5107.
18. Hotta H, Nagano S, Ueda M, Tsujino Y, Koyama J, Osakai T. Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Aug 15;1572(1):123-32.
19. Hotta H, Sakamoto H, Nagano S, Osakai T, Tsujino Y. Unusually large numbers of electrons for the oxidation of polyphenolic antioxidants. *Biochim Biophys Acta.* 2001 May 3;1526(2):159-67.
20. Simic A, Verbic T, Sentic M, Vojic M, Juranic I, Manojlovic D. Study of ellagic acid electro-oxidation mechanism. *Monatsh Chem.* 2013; 144: 121–128.
21. Tsugawa H. CompMSInnovative data science in biology [Internet]. [citado 12 oct 2024]. Disponible en: <https://systemsomicslab.github.io/compms/index.html>
22. NIST 14 Mass Spec Library and Search Programs - User Manual [Internet]. [citado 27 nov 2024]. Disponible en: <https://www.sisweb.com/manuals/nist.htm>
23. Saha A, Pawar V, Jayaraman S. Characterisation of Polyphenols in Terminalia arjuna Bark Extract. *Indian J Pharm Sci.* 2012; 74: 339-347.
24. Kumar S, Singh A, Kumar B. Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of Phyllanthus species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *J Pharm Anal.* 2017 Aug;7(4):214-222.
25. Wu C, Yao M, Li W, Cui B, Dong H, Ren Y, et al. Simultaneous Determination and Pharmacokinetics Study of Six Triterpenes in Rat Plasma by UHPLC-MS/MS after Oral Administration of Sanguisorba officinalis L. Extract. *Molecules.* 2018 Nov 15;23(11):2980. doi: 10.3390/molecules23112980.
26. Ceci C, Graziani G, Faraoni I, Cacciotti I. Strategies to improve ellagic acid bioavailability: from natural or semisynthetic derivatives to nanotechnological

- approaches based on innovative carriers. *Nanotechnology*. 2020 Sep 18;31(38):382001. doi: 10.1088/1361-6528/ab912c.
27. Wu Y, Wei J, Yu Y, Chen F, Li X, Li Y, et al. Pharmacokinetics study of rosamultin, a major bioactive component from the root of *Potentilla anserina* L. (Rosaceae) by HPLC-MS/MS. *Anal Methods*. 2019; 11: 5160-5168.
 28. Natsuki J, Natsuki T, Hashimoto Y. A Review of Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Properties and Applications. *Int J Mater Sci Eng*. 2015; 4: 325-332.
 29. Sambalova O, Thorwarth K, Heeb NV, Bleiner D, Zhang Y, Borgschulte A, Kroll A. Carboxylate Functional Groups Mediate Interaction with Silver Nanoparticles in Biofilm Matrix. *ACS Omega*. 2018 Jan 31;3(1):724-733.
 30. Ivanišević I, Rukavina V, Kassal P, Milardović S. Impact of Weak Organic Acids on Precipitation of Poly(acrylic acid) Stabilized Silver Nanoparticles; an Electrochemical Approach. *Croat Chem Acta*. 2018; 91: 491–499.
 31. Kalhapure R, Akamanchi K, Mocktar C, Govender T. Synthesis and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Capped with a Carboxylic Acid-terminated Generation 1 Oleodendrimer. *Chem Lett*. 2014; 43: 1110–1112.
 32. Song C, Ye F, Liu S, Li F, Huang Y, Jid R, et al. Thorough utilization of rice husk: metabolite extracts for silver nanocomposite biosynthesis and residues for silica nanomaterials fabrication. *New J Chem*. 2019; 43: 9201-9209.
 33. Anigol B, Charantimath J, Gurubasavaraj P. Effect of Concentration and pH on the Size of Silver Nanoparticles Synthesized by Green Chemistry. *Org Med Chem IJ*. 2017, 3(5):555622. doi: 10.19080/OMCIJ.2017.03.555622

ESTUDIO DEL BENZOATO DE METILO: CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN INSECTICIDA EN *Aedes SPP.*

Américo Castro Luna^{*a}, Norma Ramos Cevallos^a, Felix Castillo Morales^a, Adil Barrientos Amau^a, Maricielo Puma Puma^a, Ronaldo Villagra Ccasa^a, Nacarid Caso Francia^a, Sofia Otori Querevalu^a, Christian Trujillo Ramos^a, Rocio Reynoso Landacay^a

RESUMEN

El benzoato de metilo es un compuesto químico orgánico que según literatura previa podría representar una alternativa segura como insecticida. El objetivo del presente proyecto fue sintetizar y evaluar la actividad insecticida del benzoato de metilo en un modelo *in vivo* frente al género *Aedes*. La síntesis del compuesto se realizó mediante esterificación de Fischer, seguida de un análisis físico-químico que incluyó técnicas como cromatografía en capa fina (TLC), prueba de miscibilidad, índice de refracción, método de Siwoloboff para el punto de ebullición, método del picnómetro, e índice de acidez. La caracterización se realizó mediante espectroscopia infrarroja utilizando un espectrómetro FTIR Nicolet™ iS™ 10. Luego, se analizó el efecto fumigante en insectos del género *Aedes*, y se calculó el porcentaje de mortalidad en un periodo de 24 horas mediante la concentración letal (LC50), según la metodología descrita por Jian Chen. Los resultados indicaron que, a las cinco horas de exposición, se alcanzó una mortalidad del 50% de los mosquitos, siendo la concentración de 1.08 µg/mL la de mayor eficacia. Además, se desarrolló una formulación insecticida simple para facilitar el uso del benzoato de metilo, optimizando su difusión en el ambiente y prolongando el tiempo de exposición del compuesto activo al insecto.

Palabras clave: *Insecticida, síntesis orgánica, Aedes, benzoato de metilo.*

STUDY OF METHYL BENZOATE: CHARACTERIZATION AND INSECTICIDAL APPLICATION IN *Aedes SPP.*

ABSTRACT

Methyl benzoate is an organic chemical compound that, according to previous literature, could represent a safe alternative as an insecticide. The objective of the present project was to synthesize and evaluate the insecticidal activity of methyl benzoate in an *in vivo* model against the genus *Aedes*. The synthesis of the compound was performed by Fischer esterification, followed by physicochemical analysis including techniques such as thin layer chromatography (TLC), miscibility test, refractive index, Siwoloboff's method for boiling point, pycnometer method and acid number. Characterization was performed by

^a Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Jr. Puno N.º 1002, Lima, Perú.

*Autor de correspondencia: acastrol@unmsm.edu.pe

infrared spectroscopy using a Nicolet™ iS™ 10 FTIR spectrometer. Then, the fumigant effect on insects of the genus *Aedes* was analyzed, and the percentage of mortality in a 24-hour period was calculated using the lethal concentration (LC50), according to the methodology described by Jian Chen. The results indicated that, after five hours of exposure, 50% mortality of the mosquitoes was achieved, with the concentration of 1.08 µg/mL being the most effective. In addition, a simple insecticide formulation was developed to facilitate the use of methyl benzoate, optimizing its diffusion in the environment and prolonging the exposure time of the active compound to the insect.

Key words: *Insecticide, organic synthesis, Aedes, methyl benzoate*

INTRODUCCIÓN

Los insectos como los mosquitos del género *Aedes* representan un gran riesgo para la salud debido a que son vectores de diversas infecciones virales como dengue, chikungunya y zika¹. Perú es un país endémico de dengue en donde la mayor incidencia se registra en las regiones de la zona norte. En los últimos años se registraron un aumento de los casos de dengue, siendo el 2023 el peor brote de dengue que se ha experimentado en el país². El control de estos insectos, por lo general, se lleva a cabo utilizando insecticidas químicos sintéticos como organofosforados y piretroides. Sin embargo, el uso excesivo de los insecticidas sintéticos conduce a la resistencia de los vectores, efectos negativos en otros organismos vivos y degradación ambiental^{3,4}. Por ello, es de vital importancia el desarrollo de nuevos productos químicos para el control de vectores y las infecciones que transmiten, para esto una de las alternativas es la búsqueda de compuestos orgánicos con actividad insecticida derivados de plantas con la finalidad de asegurar una menor toxicidad y daño al medio ambiente. Entre las opciones se encuentra el benzoato de metilo. El benzoato de metilo es un compuesto de éster volátil con un olor floral utilizado como fragancia y como aditivo alimentario⁵. En el 2018 Mostafiz et al., demostraron que el benzoato de metilo al 1% tiene un efecto tóxico sobre los adultos de *Bemisia tabaci* con una mortalidad de 96,5% a las 10 horas, además demostró tener efecto inhibitorio sobre el desarrollo de ninfas con lo que se evidencia la actividad insecticida del benzoato de metilo⁶. En un estudio realizado por Chen et al. (2019) se analizó la toxicidad por contacto y fumigación de 15 tipos de benzoato comerciales contra la hormiga obrera *Solenopsis invicta* donde se obtuvo como resultado que dentro de los fumigantes más potentes contra *S. invicta* se encuentra el benzoato de metilo con un valor medio de LC50 de 0,75 µg/mL, con lo que se concluye que es factible utilizarse como fumigante de hormigas a largo plazo y para ello se requiere una formulación adecuada⁷. Por otro lado, Larson et al. (2021), demostraron mediante pruebas de laboratorio que el benzoato de metilo y sus análogos pueden tener un efecto tóxico para las hembras *Aedes aegypti* tratadas por vía tópica, los análogos más tóxicos fueron benzoato de butilo, benzoato de n-pentilo, benzoato de vinilo y 3-metoxibenzoato de metilo, pero aún se espera el desarrollo de formulaciones para utilizar dichos compuestos⁴. De esta manera las investigaciones antes mencionadas nos llevan a sintetizar, determinar la actividad insecticida en un modelo *in vivo* frente al género *Aedes* y formular un insecticida de benzoato metilo.

PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis de benzoato de metilo por el método de esterificación de Fischer

La síntesis de benzoato de metilo se realizó mediante el método de esterificación por medio de una sustitución nucleofílica según Fischer⁸. En un matraz se dispusieron 12.2 g de ácido benzoico, 40 ml de metanol absoluto y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se añadieron támaras de ebullición, se adaptó un refrigerante y la solución se calentó a reflujo durante 50 minutos. Pasado ese tiempo, la solución se enfrió y se vertió sobre 75 ml de agua fría, para luego extraerse con 50 ml de éter dietílico. La fase orgánica se lavó primero con 30 ml de solución de hidróxido sódico al 5% y después con 30 ml de agua. Finalmente, se secó con sulfato sódico anhidro, se filtró y se evaporó en una campana de extracción.

Análisis fisicoquímico del benzoato de metilo sintetizado

- a) **Cromatografía en capa fina.**- Se realizó en placa de TLC del producto sintetizado versus el estándar, con ayuda de un aplicador o capilar. Posteriormente se preparó la mezcla de disolventes adecuada como eluyente. Los solventes utilizados fueron una mezcla de n-hexano y acetato de etilo (9:1). Se colocó la placa de TLC en una cámara de cromatografía que contenía el eluyente. Además, se aseguró que el nivel del eluyente fuera inferior a la línea donde se aplicó la muestra⁹. Una vez que el eluyente recorrió casi toda la longitud de la placa de TLC, se retiró la placa de la cámara y se dejó que el disolvente se evaporara. Luego se visualizaron las manchas bajo luz ultravioleta y utilizando un revelador adecuado como los vapores de yodo. Se midió la distancia recorrida por cada mancha (muestra y estándar) desde la línea base hasta el centro de la mancha. Por último, se calculó el factor de retención (Rf) tanto de la muestra como del estándar y se compararon¹⁰.
- b) **Densidad (Método del picnómetro).** - Se pesó el picnómetro vacío y se registró su masa (mp), luego se llevó a enrase el picnómetro con agua y se pesó (mp+w) una vez pesado se retiró el agua y se secó. Después se llenó el picnómetro con el benzoato de metilo y se midió su masa total (mp+d). Finalmente se calculó la densidad relativa de benzoato de metilo, para ello se dividió el peso del benzoato y el peso del agua (se restó el peso del picnómetro a los dos) y a todo esto multiplicado por la densidad del agua^{11,12,13}.
- c) **Punto de ebullición (Método de Siwoloboff).** - Se tomó un capilar de vidrio y se selló por un extremo utilizando el mechero Bunsen. Para sellarlo, se sostuvo de un extremo mientras el otro se acercó a la llama del mechero en la zona más caliente; se giró de manera constante sobre sí mismo para crear un sello uniforme. Posteriormente, se retiró la llama y se observó si el capilar se había sellado. Luego, se dejó enfriar. Se tomó el termómetro y se fijó un tubo de vidrio pequeño a su costado. El tubo quedó firmemente atado al termómetro, pero se evitó aplicar demasiada fuerza para no romper ni el tubo de vidrio ni el termómetro¹⁴.

Con la ayuda de una pipeta Pasteur, se añadieron aproximadamente 0,5 mL del líquido a medir y luego se colocó el capilar dentro del tubo, con el extremo abierto sumergido en el líquido. Se realizó el montaje indicado. Se llenó el tubo de Thiele hasta $\frac{3}{4}$ de su capacidad con aceite mineral y se introdujo el conjunto termómetro-tubo-capilar de tal forma que el tubo quedó cubierto en $\frac{3}{4}$ partes por el aceite, evitando que el aceite

ingresara en su interior. Todas las piezas del montaje se aseguraron de estar secas previamente para evitar salpicaduras de aceite al iniciar el calentamiento¹⁵.

Se calentó el sistema controlando el ascenso de temperatura mientras se observaba la muestra, cuidando de no sobrecalentar el sistema. Se observó el líquido dentro del tubo de vidrio mientras se monitoreaba la temperatura (es ideal realizar el ensayo entre dos personas: una observa la sustancia mientras la otra controla la temperatura, para que el benzoato de metilo se encuentre aproximadamente entre 198–200 °C)¹⁶. Se observó el extremo inferior del capilar sumergido en el líquido y se continuó calentando hasta que se evidenció un flujo continuo de burbujas saliendo del extremo abierto del capilar. Al observar este fenómeno, se suspendió el calentamiento y se mantuvo la observación sobre el sistema. En el momento en que el líquido entró y comenzó a ascender a través del capilar, se anotó la temperatura indicada en el termómetro, la cual correspondió a la temperatura de ebullición del líquido. Finalmente, se dejó enfriar el montaje y se retiró el conjunto termómetro-tubo-capilar^{17,18,19}.

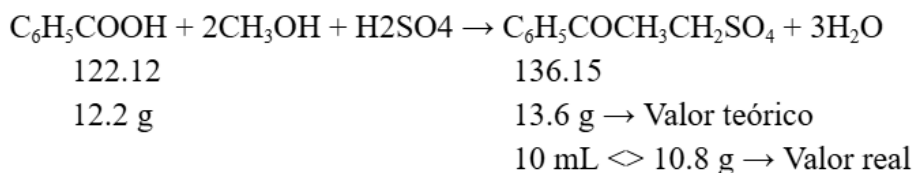
- d) **Índice de refracción.-** El índice de refracción se obtuvo en un refractómetro Brix DAUERHAFT, equipado con prisma refractante de alta transmitancia, instrumentos ópticos y electrónicos de alta precisión, con una resolución del 0.1%. Se añadieron 2 a 3 gotas de muestra sobre el prisma del equipo, que previamente se había limpiado y secado, asegurándose de que no se generen burbujas de aire entre el prisma y la muestra y de que esta quedará distribuida de manera uniforme. Finalmente, el refractómetro mostró el índice de refracción del benzoato de metilo en un tiempo de 2 a 3 segundos.^{20,21,22}.
- e) **Índice de acidez.-** El índice de acidez de la muestra se determinó mediante el método oficial de la AOCS. Se preparó una solución de hidróxido de potasio (KOH) en alcohol isopropílico y tolueno 0,1 N. En un matraz se pesó cierta cantidad de benzoato de metilo y se añadieron 1 o 2 gotas de fenoltaleína. La titulación se realizó con la solución de hidróxido de sodio preparada hasta alcanzar el punto de equivalencia que se observó un cambio de color de la fenoltaleína. Se registró el volumen empleado de la solución de hidróxido de potasio (KOH) durante la titulación²³.
- f) **Miscibilidad.-** Se midió aproximadamente 1 ml de benzoato de metilo en un tubo de ensayo utilizando una pipeta. El benzoato de metilo es miscible con alcohol (95%), cloroformo, éter, aceites, acetona, benceno, metanol y éter de petróleo^{24,25,26}. Por lo tanto, se realizó la experiencia con disolvente mencionado. Se añadió el mismo volumen del disolvente seleccionado (1 ml) al tubo de ensayo que contenía el benzoato de metilo. Se tapó el tubo de ensayo y se agitó vigorosamente durante unos segundos. Se observó la mezcla; si se formó una sola fase (es decir, si no se observó ninguna división clara en el líquido), entonces se consideró que el benzoato de metilo era miscible con el disolvente seleccionado. Si se formaron dos fases (es decir, si se observó una división clara en el líquido), se concluyó que el benzoato de metilo no era miscible.
- g) **Caracterización por espectroscopia infrarroja .-** Los espectros se obtuvieron en un espectrómetro FTIR Nicolet™ iS™ 10, Thermo Scientific™, de resolución mayor que 0.4 cm⁻¹, con detector de Sulfato de triglicina deuterado (DTGS) de recuperación rápida en rango de 7 800 cm⁻¹ y 350 cm⁻¹. La muestra analizada consistió en una alícuota de benzoato de metilo, aplicándose una gota sobre el cristal ATR, asegurando una cobertura uniforme sin formación de burbujas. Las asignaciones de las principales bandas de absorción en los espectros se realizaron de acuerdo con el software para el análisis de espectros IR ASIR Versión 2.0²⁷.

Actividad insecticida *in vivo* frente al género *Aedes* por fumigación

Para la evaluación de toxicidad por fumigación en mosquitos del género *Aedes*, se utilizaron matraces de 500 mL de capacidad. El material biológico se recolectó de su ambiente natural en una fuente de alimento cercana (áreas verdes de Lima Norte). Se emplearon 3 concentraciones de benzoato de metilo disueltas en etanol al 96% (1 µg/mL, 2.16 µg/mL y 43.2 µg/mL), y cada concentración se preparó por duplicado. En cada matraz se colocaron 10 mosquitos, y los matraces se taparon con papel parafilm, previamente humedecido con 20 µL de la concentración correspondiente, con la parte húmeda del papel parafilm orientada hacia el interior del matraz. Se calculó el porcentaje de mortalidad en un periodo de 24 horas y, posteriormente, con las concentraciones, se determinó la concentración letal (LC50). Los mosquitos que no pudieron valerse por sí mismos se consideraron muertos. Todo este modelo *in vivo* se comparó con un grupo control, que solo contenía el solvente del benzoato de metilo (etanol al 96%)^{28,4}.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de realizada la síntesis mediante el método de esterificación de Fisher con 12,2 g de ácido benzoico utilizado se obtuvieron 10 mL de benzoato de metilo. Según la siguiente fórmula de reacción.



Ecuación estequiométrica de la reacción de esterificación y cálculo del rendimiento para la síntesis de benzoato de metilo.

Tabla 1. Rendimiento de la síntesis de benzoato de metilo

<i>Valor teórico</i>	<i>Valor real</i>	<i>Rendimiento porcentual</i>
13.6 g	10.8 g	79.41 %

Elaboración propia

La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó en una placa de sílica gel como fase estacionaria. El benzoato de metilo, el cual es menos polar debido a su estructura, interactúa más con la fase móvil que con la fase estacionaria porque la mezcla de n-hexano y acetato de etilo (9:1) utilizada como fase móvil tiene una polaridad baja. Se utilizaron dos métodos para la visualización, primero la lámpara ultravioleta como revelador físico debido a que el benzoato de metilo presenta un anillo bencénico con electrones pi conjugados. Estos electrones absorben la luz UV haciendo que el benzoato de metilo sea visible a una longitud de onda de 254 nm. Asimismo, los vapores de yodo sirvieron como revelador químico porque el yodo se adsorbe en el benzoato de metilo formando manchas oscuras sobre la placa²⁹. Ambos métodos de revelado permiten la

obtención del valor R_f , en este caso 0.75 en la muestra sintetizada y 0.73 en el estándar. La cercanía de los dos valores de R_f confirma la identidad del benzoato de metilo en la muestra sintetizada (Figura 1).

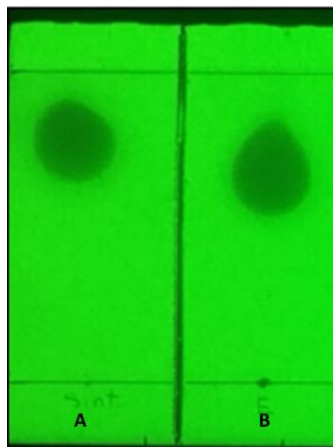


Figura 1. Cromatograma del análisis del benzoato de metilo. (A) Benzoato de metilo sintetizado y (B) Estándar comercial de benzoato de metilo.

Al realizar la evaluación de las propiedades fisicoquímicas del benzoato de metilo mediante las metodologías descritas, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 2. Constantes fisicoquímicas del benzoato de metilo sintetizado

<i>Propiedades fisicoquímica</i>	<i>Valor obtenido</i>	<i>Valor teórico</i>	<i>Referencias</i>
Densidad Relativa	1.08 g/mL	1.08 g/mL ³⁰	Haynes et al 2014-2015
Punto de ebullición	199.8 °C	198-200 g/mL ³³	Dias et al 2014
Índice de refracción	1.5575 a 25 °C	1.5164 a 20 °C ³⁰	Haynes et al 2014-2015
Índice de acidez	1.122 mg KOH/g.	≤1 mg KOH/g ³⁵	Fishersci.es et al 2021

Elaboración propia

La densidad del benzoato de metilo sintetizado, que resultó ser de 1.08 g/mL, similar con el valor teórico esperado de 1.08 g/mL³⁰. La coincidencia en los valores obtenidos respalda la calidad del proceso de síntesis y la pureza del producto obtenido, indicando que el compuesto sintetizado es equivalente al esperado en términos de sus propiedades físicas fundamentales.

El punto de ebullición es una constante física intrínseca de una sustancia que puede ser útil para la determinación de pureza de una muestra. El método de Siwoloboff se caracteriza por su simplicidad al utilizar equipos de laboratorio típicos. La elevación de la temperatura no es acelerada; además, la formación de corrientes en el aceite permiten

que la temperatura se mantenga uniforme en el sistema. Se puede afirmar que el método de Siwoloboff ofrece una medición indirecta, debido a que la temperatura registrada corresponde con la temperatura que alcanza el aceite, por lo que emplear dispositivos como termómetro digital o calefactoras digitales podrían refinar el resultado y simplificar la técnica³¹. La bibliografía considera que el benzoato de metilo tiene un punto de ebullición moderadamente estable que se encuentra entre los 198 y 200 °C, lo que coincide con los resultados obtenidos experimentalmente utilizando el método de Siwoloboff^{32,33}.

El índice de refracción del benzoato de metilo obtenido experimentalmente fue de 1.557 a una temperatura de 25.9 °C, mientras que el valor teórico esperado es de 1.5164 a 20 °C³⁰. Esta variación en los valores podría deberse a varios factores que afectan la medición. El índice de refracción de una sustancia suele disminuir con el aumento de la temperatura. Esto se debe a que, al calentarse, el líquido se expande, lo que reduce la densidad y, en consecuencia, disminuye su capacidad para desviar la luz. En este caso, la medición se realizó a 25.9 °C, una temperatura superior a la teórica de 20 °C. Sin embargo, se observa un valor de índice de refracción mayor, lo cual es inusual y sugiere la posibilidad de otros factores como la pureza del sintetizado, presión atmosférica, humedad relativa, etc³⁴.

El análisis del índice acidez, tanto del estándar como el sintetizado es de 1.122 mg KOH/g. Dado que el valor resultó ser el mismo, podría decirse que en términos de acidez, el benzoato sintetizado es comparable al estándar. Sin embargo el valor aproximado de acuerdo a la ficha técnica es de 1 mg KOH/g máx³⁵. Los ésteres, como el benzoato de metilo, en teoría no poseen grupos carboxílicos libres disponibles para donar protones (H⁺). Además, en condiciones normales, debería poseer un valor cercano a cero porque los grupos carboxílicos en el ácido benzoico han sufrido una esterificación³⁶. Una posible explicación para el aumento del índice de acidez podría ser la exposición del benzoato a condiciones de almacenamiento inadecuadas, que facilitan la absorción de humedad o la oxidación, favoreciendo la hidrólisis parcial y la presencia de ácido benzoico libre en la muestra.

La miscibilidad del benzoato de metilo fue evaluada con los siguientes solventes, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 3. Miscibilidad del benzoato de metilo.

<i>Solvente</i>	<i>Miscibilidad</i>
Agua	-
Etanol	+
Metanol	++
Acetona	++

Leyenda: Muy soluble (+++), poco soluble (++) , ligeramente soluble (+), insoluble (-).

Elaboración propia.

El benzoato de metilo, al ser un éster, presenta poca miscibilidad con el agua, aunque es capaz de mezclarse con los solventes orgánicos. Como pudo comprobarse experimentalmente, el benzoato de metilo presenta solubilidad en solventes orgánicos como etanol, metanol, benceno y cloroformo. La miscibilidad es información importante en la formulación de soluciones, mezclas y productos de la industria farmacéutica³⁷.

El benzoato de metilo es una molécula en la que el grupo éster se encuentra en el mismo plano que el anillo bencénico, lo que confiere una estructura plana, exceptuando los dos átomos de hidrógeno del grupo metilo, que se posicionan fuera del plano. En los resultados de la espectroscopía infrarroja (IR), se observan picos característicos. Según Roy y Maiti³⁸, los enlaces C-H se localizan en la región de 2800–3100 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones del anillo aromático y del grupo metilo, lo que coincide con nuestros resultados espectroscópicos. Por otro lado, el pico ubicado alrededor de 1700 cm^{-1} se atribuye al estiramiento del grupo carbonilo (C=O). Esto coincide con el trabajo de Feng et al.³⁹, quienes reportan un pico en la región de 1725 cm^{-1} , correspondiente a la vibración del estiramiento del grupo C=O. Además, estos autores mencionan un pico en 1275 cm^{-1} , asociado a la vibración de estiramiento C-O, indicando la presencia del grupo éster.

Por último, los estiramientos de los éteres, que también presentan enlaces C-O, son difíciles de identificar mediante espectroscopia infrarroja. Sin embargo, se aprecian vibraciones en la región de 1050–1150 cm^{-1} , las cuales corresponden a estiramientos C-O⁴⁰

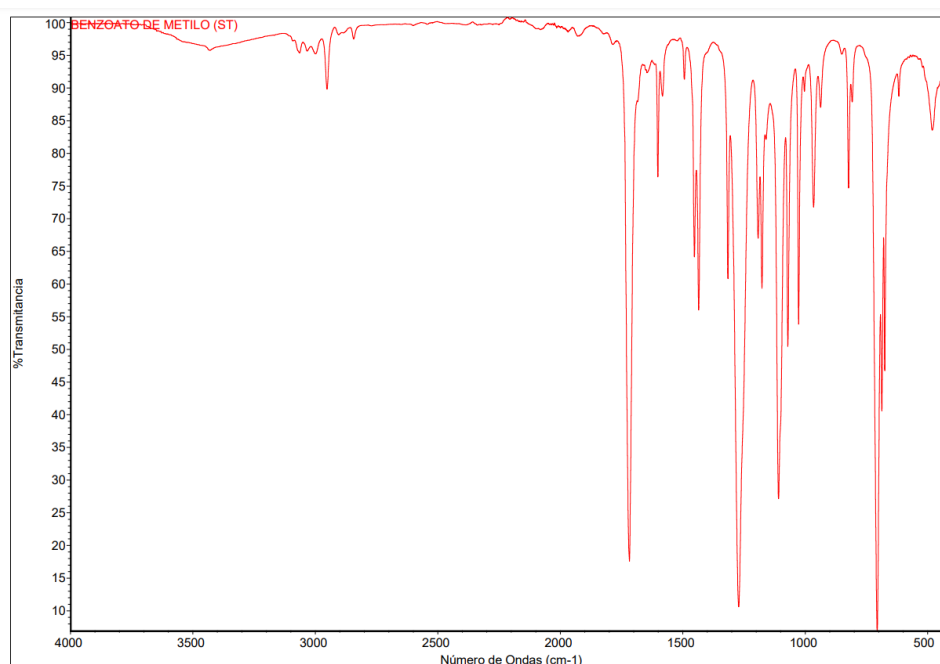


Figura 2. Espectroscopia infrarroja del benzoato de metilo sintetizado.

El ensayo de la actividad insecticida in vivo fue realizado por duplicado, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4, se observó la muerte del 50% de los mosquitos al transcurrir las cinco horas, siendo la concentración de 1.08 $\mu\text{g/mL}$ la de mayor eficacia.

Tabla 4. Letalidad del benzoato de metilo frente a mosquitos del género *Aedes*.

<i>Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>Réplicas</i>	<i>Mosquitos expuestos</i>	<i>Letalidad en 5 horas (%)</i>
1.08 $\mu\text{g/mL}$	2	10	87.50
2.16 $\mu\text{g/mL}$	2	10	66.66
43.2 $\mu\text{g/mL}$	2	10	55.00

Elaboración propia

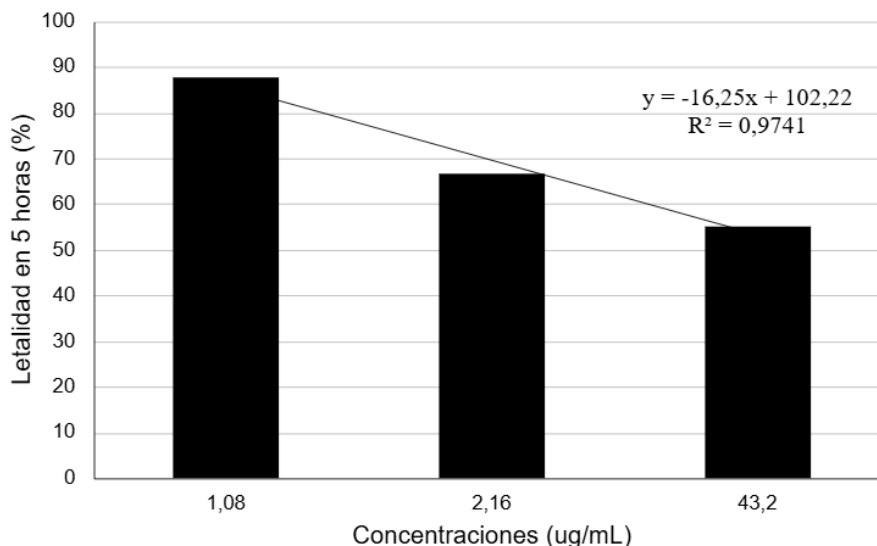


Figura 3. Porcentaje de letalidad del benzoato de metilo.
Elaboración propia.

El estudio de la actividad insecticida del benzoato de metilo sintetizado frente a mosquitos del género *Aedes* mostró resultados positivos en términos de letalidad en función del tiempo. Sin embargo, no se observó una correlación directa entre la concentración del compuesto y el porcentaje de letalidad alcanzado. Este fenómeno podría estar influido por factores externos, como la volatilidad y el tiempo de contacto del benzoato de metilo, que permitirían una mayor difusión en el matraz y un incremento del contacto con los mosquitos²⁸.

Además, se evaluó la presión de vapor de piretroides para analizar su toxicidad contra mosquitos de los géneros *Aedes*, *Culex* y *Anopheles*. Se encontró una correlación entre el nivel de contacto y el grado de volatilización de los compuestos químicos, lo cual se debe a que los vapores de dichos compuestos pueden atravesar la endocutícula de los mosquitos, facilitando su penetración y afectando posteriormente su sistema nervioso⁴⁰. En el caso de los mosquitos del género *Aedes*, el momento del día en que se realizan las pruebas también puede influir en los resultados, debido a que el modelo *in vivo* se realizó durante la tarde y la noche, sin controlar el ciclo circadiano del género *Aedes*. Según Odufuwa et al.⁴¹, los mosquitos de este género, al ser de naturaleza diurna, presentan una mayor activación de genes relacionados con la degradación de toxinas durante el día, lo que podría conferirles una mayor resistencia a diversos compuestos químicos. Esto podría explicar las variaciones observadas en la relación entre concentración y letalidad.

Para evidenciar mejor la capacidad insecticida del benzoato de metilo contra el género *Aedes*, sería conveniente realizar las pruebas durante la mañana, cuando la actividad genética relacionada con la resistencia es mayor. El benzoato de metilo continúa siendo una de las alternativas más prometedoras para la formulación de insecticidas con menores repercusiones ambientales y con un efecto significativo sobre los mosquitos del género *Aedes*. No obstante, se requieren estudios de campo adicionales para confirmar su efectividad en diferentes condiciones ambientales.

Formulación de un insecticida para el género *Aedes*

Para facilitar el uso del benzoato de metilo se buscó una formulación simple, que permita una menor difusividad en el ambiente y un mayor tiempo de exposición del activo con el insecto⁶.

Tabla 5. Formulación de un insecticida de benzoato de metilo al 1%.

<i>Ingrediente</i>	<i>Cantidad para 100 mL</i>	<i>Concentración (p/v)</i>	<i>Función</i>
Benzoato de metilo	1 g	1.00 %	Ingrediente activo (insecticida)
Polisorbato 80	1 g	1.00 %	Emulsificante
Polisorbato 20	1g	1.00 %	Emulsificante
Etanol	5 mL	5.00 %	Solvente
Benzoato de sodio	0.5 g	0.5 %	Conservante
Agua	91.5 mL	91.5 %	Disolvente base
Total	100 mL	100 %	

Elaboración propia

CONCLUSIONES

La síntesis del benzoato de metilo se reflejó en los análisis fisicoquímicos, cuyos resultados se mantuvieron dentro de los valores teóricos esperados. Además, la espectroscopía infrarroja confirmó la estructura del compuesto. Sin embargo, en cuanto a la actividad insecticida, no se pudo evidenciar una efectividad significativa contra el género *Aedes*, probablemente debido a la volatilidad del benzoato de metilo. Esta volatilidad podría haber reducido la concentración efectiva del compuesto en el ambiente, disminuyendo su capacidad para actuar como insecticida. A pesar de este contratiempo, los resultados obtenidos en los análisis fisicoquímicos y espectroscópicos apoyan la factibilidad de continuar con el desarrollo de una formulación insecticida basada en benzoato de metilo. Es recomendable ajustar la formulación para mejorar la estabilidad y reducir la volatilidad del compuesto, con el fin de potenciar su actividad insecticida. Esto podría involucrar la incorporación de agentes que disminuyan la tasa de evaporación o la combinación con otros compuestos que complementan su acción.

AGRADECIMIENTO

Al Vicerrectorado Académico de Investigación y Posgrado de la UNMSM por el apoyo brindado en el desarrollo del proyecto "Síntesis del benzoato de metilo y análisis

fisicoquímico, espectroscopia infrarroja, actividad insecticida y formulación de un insecticida para el género *Aedes*", con código: Código A24043201, conforme a lo establecido en la Resolución Rectoral N° 004305-R-24, que se desarrolló durante el periodo 2024.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zahran, Hossam El-Din M., Hamdy K. Abou-Taleb, y Samir A. M. Abdelgaleil. «Propiedades adulticidas, larvicidas y bioquímicas de los aceites esenciales contra *Culex pipiens* L». *Journal of Asia-Pacific Entomology* 20, n.º 1 (1 de marzo de 2017): 133-39. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.12.006>.
2. Maguiña Vargas, Ciro. «El brote de dengue en Perú: Análisis y perspectivas». *ACTA MEDICA PERUANA* 40, n.º 2 (11 de julio de 2023). <https://doi.org/10.35663/amp.2023.402.2663>.
3. Mostafiz, Md Munir, Jihun Ryu, Ashraf Akintayo Akintola, Kwang Shik Choi, Ui Wook Hwang, Errol Hassan, y Kyeong-Yeoll Lee. «Larvicidal Activity of Methyl Benzoate, a Volatile Organic Compound, Against the Mosquitoes *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae)». *Journal of Medical Entomology* 59, n.º 2 (1 de marzo de 2022): 788-94. <https://doi.org/10.1093/jme/tjab230>.
4. Larson, Nicholas R., Mahalet Nega, Aijun Zhang, y Mark Feldlaufer. «Toxicity of Methyl Benzoate and Analogs to Adult *Aedes aegypti*». *Journal of the American Mosquito Control Association* 37, n.º 2 (28 de junio de 2021): 83-86. <https://doi.org/10.2987/19-6896.1>.
5. Feng, Yan, y Aijun Zhang. «A Floral Fragrance, Methyl Benzoate, Is An Efficient Green Pesticide». *Scientific Reports* 7, n.º 1 (9 de febrero de 2017): 42168. <https://doi.org/10.1038/srep42168>.
6. Mostafiz, Mohammad Munir, Pijush Kanti Jhan, Jae-Kyoung Shim, y Kyeong-Yeoll Lee. «Methyl benzoate exhibits insecticidal and repellent activities against *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae)». *PLOS ONE* 13, n.º 12 (4 de diciembre de 2018): e0208552. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208552>.
7. Chen, Jian, Tahir Rashid, Guolei Feng, Yan Feng, Aijun Zhang, y Michael J Grodowitz. «Insecticidal Activity of Methyl Benzoate Analogs Against Red Imported Fire Ants, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae)». *Journal of Economic Entomology* 112, n.º 2 (21 de marzo de 2019): 691-98. <https://doi.org/10.1093/jee/toy360>.
8. Morrison, R. T.; Boyd, R. N. *Química orgánica*, quinta edición; Addison Wesley : Prentice Hall : Pearson Educación: México, 1998.
9. Gandón-Hernández J, Torres-Baratute, Yanelis C, García-Díaz M. Caracterización de un biocombustible obtenido a partir de aceite vegetal de desecho. *Tecnología Química [Internet]*. 2017 [cited 2024 Jan 6];37(2):236–48. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2224-61852017000200007
10. Mubarak Oloduowo Ameen, Olatunji GA. The preparation of methyl benzoate and methyl salicylate on silica gel column [Internet]. ResearchGate. unknown; 2009 [cited 2024 Jan 4]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/233387146_The_preparation_of_methyl_benzoate_and_methyl_salicylate_on_silica_gel_column

11. Sánchez Muñoz, Ángela Geomayra. Análisis de la resistencia a compresión del hormigón al sustituir parcialmente el cemento hidráulico tipo GU por ceniza volcánica. Utaeduc [Internet]. 2022 [cited 2024 Jan 6]; Available from: <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/35974>
12. Práctica Número 2 Determinación De Densidad: Método Del Picnómetro I. Objetivo [Internet]. Available From: <https://Fisica.Unison.Mx/Wp-Content/Uploads/2022/08/Fluidos-Lab02.Pdf>
13. Álvarez Gélvez, Duinny Dayana, Lozano C, Lisbeth A, Andrea P. Medida del ángulo de humectación de superficies oleofóbicas de lentes oftálmicos a través del método óptico de perfilometría. Ustaeduc [Internet]. 2022 [cited 2024 Jan 6]; Available from: <https://repository.usta.edu.co/handle/11634/44872?show=full>
14. Dias F, Silva, Campos Vr, Cunha Ac, Ferreiravf, Angelo N. Reviving An Efficient Method For Determining The Boiling Point Of Organic Substances: Percolatorversussiwoloboff. Química Nova [Internet]. 2014 Jan 1 [Cited 2024 Jan 4]; Available From: <https://Www.Scielo.Br/J/Qn/A/Xc6jdpqpppsypnmqjsjd9qsd/#>
15. Soares, BG; Souza, NA; Pires, DX; Química Orgánica: Teoría y Técnicas para la preparación, purificación e identificación de compuestos orgánicos, Guanabara: Río de Janeiro, 1988.
16. ICSC 1187 - Benzoato De Metilo [Internet]. Ilo.org. 2018 [cited 2024 Jan 4]. Available from: https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=1187&p_version=2&p_lang=es
17. Vogel, AI; Análisis orgánico cualitativo, vol. 2, 2ª ed., Longman: Londres, 1966.
18. Roberts, RM; Gilbert, JC; Rodewald, LB; Wingrove, AS; Química orgánica experimental moderna, 4ª ed., Holt-Sauders International Editions: Nueva York, 1985.
19. Engel, RG; Kriz, GS; Lampman, GM; Pavía, DL; Química Orgánica Experimental: Técnicas a pequeña escala, 3ª ed., Cengage Aprendizaje: São Paulo, 2012.
20. Castro R. Calidad de mieles en San Pedro, Buenos Aires y zonas aledañas. Intagobar [Internet]. 2018 [cited 2024 Jan 6]; Available from: <https://repositorio.inta.gob.ar/handle/20.500.12123/15187>
21. Victoria, Weiss JR, Marcos EGC. Entendiendo los mecanismos genéticos que sustentan las emisiones de volátiles [Internet]. Upct.es. Universidad Politécnica de Cartagena; 2019 [cited 2025 Jan 30]. Available from: <https://repositorio.upct.es/entities/publication/13e9b92a-11a6-4c1b-8722-4cd8584a02a5>
22. Murty Mantravadi, Shukla RP. SIMPLE METHOD FOR MEASURING THE REFRACTIVE INDEX OF A LIQUID. ResearchGate [Internet]. 1979 Mar [cited 2025 Jan 30];18(2):177–80. Available from: https://www.researchgate.net/publication/292806046_SIMPLE_METHOD_FOR_MEASURING_THE_REFRACTIVE_INDEX_OF_A_LIQUID
23. Cho YJ, Kim T, Gil B. Correlation between refractive index of vegetable oils measured with surface plasmon resonance and acid values determined with the AOCS official method. LWT [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2024 Jan 6];53(2):517–21. Available from:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643813001102?via%3Dihub>
24. Methyl benzoate [Internet]. ChemicalBook. [citado 2024 jan 4]. Disponible en: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8252119.htm
 25. O'Neil MJ, editor. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge (UK): Royal Society of Chemistry; 2013. p. 1118.
 26. METHYL BENZOATE - Ataman Kimya [Internet]. Ataman Kimya. 2020 [cited 2024 Nov 13]. Available from: https://www.atamanchemicals.com/methyl-benzoate_u24213/
 27. Gregori BS, Hoz Y de la, Alba L, Guerra M, Ochoa E. Síntesis de poliuretanos. Caracterización por espectrometría infrarroja [Internet]. Redalyc.org. 2008 [citado el 3 de enero de 2024]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223120667001.pdf>
 28. Jian C, Rashid T, Feng GD, Yan F, Zhang A, Grodowitz MJ. Insecticidal Activity of Methyl Benzoate Analogs Against Red Imported Fire Ants, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). Journal of Economic Entomology [Internet]. 2018 Dec 10 [cited 2024 Jan 6];112(2):691–8. Available from: <https://academic.oup.com/jee/article/112/2/691/5236974>
 29. Dueñas-Deyá A, Castañeda-Bauta R, Martín-Cruz L, Ojito-Ramos K, Guerra-de-León JO. Estudio fitoquímico de la especie endémica cubana *Zanthoxylum pseudodumosum*, una planta con potencial actividad antifúngica. Rev cuba quim [Internet]. 2020 [citado 1 de septiembre de 2024];32(3):406-19. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212020000300406
 30. Haynes WM, editor. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 95th ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2014-2015. p. 3-360.
 31. Troyer TL, Mounsey KR, King WJ, Givens LM, Hutton JA, Benges MH, et al. Modified siwoloboff–Wiegand procedure for the determination of boiling points on a microscale. J Chem Educ [Internet]. 2018;95(8):1406–10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00839>
 32. Ics 1187 - methyl benzoate [Internet]. Ilo.org. [citado el 1 de septiembre de 2024]. Disponible en: https://chemicalsafety.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_version=2&p_card_id=1187
 33. Portacio AA, Jiménez AF, del, Portacio AA, Jiménez AF, del. Estudio teórico sobre el cambio de índice de refracción y la absorción óptica en un punto cuántico en presencia de un campo magnético uniforme. Revista mexicana de física [Internet]. 2016 [cited 2024 Sep 1];62(4):330–5. Available from: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0035-001X2016000400330
 34. Benzoato de metilo, 99 %, Thermo Scientific Chemicals | Fisher Scientific [Internet]. Fishersci.es. 2021 [cited 2024 Sep 1]. Available from: <https://www.fishersci.es/shop/products/methyl-benzoate-99-thermo-scientific/10102990>
 35. Patel NK, Shah SN. Biodiesel from Plant Oils. Elsevier eBooks [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2024 Sep 1];277–307. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128002117000119>
 36. The Merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, 14th ed. 2007;129(7):2197–2197. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/ja069838y>

37. Roy S, Maiti KS. Structural sensitivity of C H vibrational band in methyl benzoate. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* [Internet]. 2018;196:289–94. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2018.02.031>
38. Feng X, Chen T, Yin Y, Xu Y. A detail study of the microstructure of methyl benzoate/methanol mixture proved by IR spectra, excess infrared wavenumber, and physicochemical properties. *J Mol Liq* [Internet]. 2020;302(112521):112521. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112521>
39. McMurry J. *Química orgánica*. 7a ed. México, D.F.: Cengage Learning Editores; 2008. ISBN: 978-607-481-349-4.
40. Bibbs CS, Tsikolia M, Bloomquist JR, Bernier UR, Xue R, Kaufman PE. Vapor toxicity of five volatile pyrethroids against *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, and *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci* [Internet]. 2018;74(12):2699-706. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/ps.5088>
41. Odufuwa OG, Bradley J, Ngonyani S, Mpelepele AB, Matanila I, Muganga JB, et al. Time of exposure and assessment influence the mortality induced by insecticides against metabolic resistant mosquitoes. *Parasit Vectors* [Internet]. 2024;17(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-024-06190-z>

