

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

# REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL CONTINUA

Volumen 91 N° 1  
ENERO - MARZO 2025



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: [sgperu@gmail.com](mailto:sgperu@gmail.com)

Portal web: [www.sgperu.org.pe](http://www.sgperu.org.pe)

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

Certificado N 95-1567

---

**Vol 91**

**ENERO - MARZO 2025**

**N° 1**

---

En el Perú: N° suelto S/ 15

Suscripción anual: S/ 60.00

En el extranjero suscripción anual: US \$ 50



**SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**  
**CONSEJO DIRECTIVO**  
**(Marzo 2024 – Marzo 2026)**

<b>Presidente</b>	: Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón
<b>Vicepresidente</b>	: Dr. Mario Ceroni Galloso
<b>Secretario</b>	: Mg. Mario Antonio Bolarte Arteaga
<b>Director Administrativo</b>	: Mg. Helmer Helí Lezama Vigo
<b>Tesorero</b>	: Dr. Christian Ronald Jacinto Hernández
<b>Vocales</b>	: 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. 91 – N° 1 – 2025)

- Composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *Grindelia Tarapacana* Phil por, Brando Raul Mendoza Salinas, Jose Elias Zuñiga Calcina, Marco Antonio Sánchez Tito, Ingrid Elida Collantes Díaz. Págs. 1 - 12
- Desarrollo de una hamburguesa plant-based con Harina de Tarwi (*Lupinus mutabilis*), Frejol negro (*Phaseolus vulgaris*) y Harina de Cushuro (*Nostoc sphaericum s.p.*) por, Jose Calos Palacios Carrasco, Diego Carlos Valderrama Pumallihua, Nancy Ascencion Chasquibol Silva. Págs. 13 - 24
- Extracción óptima multi-respuesta de polifenoles presentes en orujo de uva bajo condiciones subcríticas por, Nilton César León Calvo, Karol Cecilia Torres Ramírez, Erik Edwin Allca Alca, Nils Leander Huaman Castilla. Págs. 25 - 35
- Síntesis, caracterización y estudio *in vitro* de N<sup>1</sup>-[(1E)-(2-hidroxi-3-metoxibencilideno)pirazina-2-carbohidrazida frente a *Mycobacterium Tuberculosis* H37Rv y DM97 por, Christian M. Aliaga Paucar, Rocío I. Ramirez Panti, Hugo G. Maihuirí Vargas, Patricia Sheen Cortovaria, Mirko Zimic Peralta, Ana C. Valderrama Negrón. Págs. 36 - 47
- Síntesis, caracterización y evaluación de la actividad antituberculosa *in vitro* de complejos metálicos de Fe(II) y Co(II) con híbrido de isoniácida-pirazinamida por, Rocío I. Ramirez Panti, Christian M. Aliaga Paucar, Fernando Grandez, Patricia Sheen Cortovaria, Mirko Zimic Peralta, Ana C. Valderram Negrón. Págs. 48 - 65
- 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](mailto: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](mailto: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 arábica seguido de punto. A continuación, se coloca la leyenda que explique su significado. La numeración y leyenda en una tabla, cuyo formato debe ser básico 1, se colocan en la parte superior a diferencia de las figuras y los esquemas que se ubican en la parte inferior. Las figuras deben ser originales y de alta resolución.

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

# COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LAS PARTES AÉREAS DE *GRINDELIA TARAPACANA* PHIL

Brando Raul Mendoza Salinas<sup>a</sup>, Jose Elias Zuñiga Calcina<sup>b</sup>, Marco Antonio Sánchez Tito<sup>c</sup>, Ingrid Elida Collantes Díaz<sup>a\*</sup>

## RESUMEN

Las partes aéreas de *Grindelia tarapacana* colectadas en Arequipa - Perú en abril del 2021 fueron sometidas a extracción por hidrodestilación (4 h) para la obtención del aceite esencial, el análisis de la composición química fue realizado por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas, fueron identificados 89 compuestos, que representan el 79,01%. Los componentes mayoritarios identificados fueron acetato de bornilo 5,52%,  $\alpha$ -iso-metilionona 6,49%, germacreno B 8,22%, *E*-nerolidol 5,4%, fokienol 5%, 10-epi- $\gamma$ -eudesmol 6,16% y  $\beta$ -acorenol 4%. El aceite esencial fue sometido a un ensayo exploratorio para verificar la efectividad antibacteriana y antifúngica, con el que se demostró ser altamente efectivo para inhibir el crecimiento de las cepas *S. salivarius*, *E. faecalis* y *C. albicans* a la concentración de 0,0625 % v/v y para *S. mutans* y *S. sanguinis* a la concentración de 0,125 % v/v.

**Palabra clave:** *Grindelia tarapacana*, aceite esencial, cromatografía

## CHEMICAL COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OIL OF THE AERIAL PARTS FROM *GRINDELIA TARAPACANA* PHIL

### ABSTRACT

The aerial parts of *Grindelia tarapacana* collected in Arequipa – Peru in April 2021 were subject to extraction by hydrodistillation (4h) to obtain the essential oil. The analysis of the composition was carried out by gas chromatography coupled to a mass spectrometer. 89 compounds were identified, which represent 79.01%. The major components identified were bornyl acetate 5.52%,  $\alpha$ -iso-methyl ionone 6.49%, germacrene B 8.22%, *E*-nerolidol 5.4%, fokienol 5%, 10-epi- $\gamma$ -eudesmol 6.16% y  $\beta$ -acorenol 4%. The essential oil was subject to an exploratory test to verify the antibacterial and antifungal effectiveness, with which it was shown to be highly effective in inhibiting the growth of the strains *S. salivarius*, *E. faecalis* and *C. albicans* at the concentration of 0,0625 %v/v and for *S. mutans* y *S. sanguinis* at the concentration of 0,125 %v/v.

**Keywords:** *Grindelia tarapacana*, essential oil, chromatography

<sup>a</sup> Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210 Rímac, Lima-Perú. \* [icollantesd@uni.edu.pe](mailto:icollantesd@uni.edu.pe)

<sup>b</sup> Facultad de Biología, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa, Perú

<sup>c</sup> Escuela de dentista, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Privada de Tacna

## INTRODUCCIÓN

El género *Grindelia* ocurre desde Alaska, sur oeste de los Estados Unidos y norte de Méjico, el género no ocurre en centro américa y en sur américa ocurre en Chile, Perú, Uruguay, Paraguay, Argentina y sur de Brasil<sup>1</sup> aproximadamente en norte américa son reconocida 60 especies<sup>2</sup> está representada en sur américa por 28 especies, de las cuales 25 son endémicas<sup>3</sup>. Según las referencias bibliográficas la especie *G. tarapacana* ocurre a una altura por encima de entre 2800 – 3000 msnm<sup>4,5</sup>. Muchas especies del género *Grindelia* tienen actividad antiinflamatoria, expectorante, antiespasmódica y antimicrobial, hipotensivo, así como antiefedante con algunos insectos<sup>3,6</sup> y se caracterizan por la abundante producción de una resina como exudado que cubre toda la superficie de hojas, ramas y los cálices de las flores<sup>7</sup>, es por esta razón que en muchos casos las plantas de este género son llamados de plantas de goma. La resina producida por las *Grindelias* posee propiedades químicas y físicas similares a las obtenidas de los pinos, pueden ser usados en tiendas navales, adhesivos, taquificadores y en la industria de las tintas<sup>6</sup>. *G. tarapacana* según Echevarría et al 2020<sup>8</sup> es usada para dolor de estómago, vómitos y enfermedades del corazón.

A pesar de la ocurrencia del género *Grindelia*, sus aceites esenciales son pocos estudiados comparado con sus extractos. Los aceites esenciales en su composición química tienen metabolitos secundarios volátiles e hidrófobas y, pueden ser obtenidos de raíces, ramas, hojas y flores de las plantas. Los aceites esenciales pueden ser afectados por una condición genética y ambiental como factores climáticos, fase de crecimiento, distribución geográfica, la fertilización mineral del suelo, la intensidad de luz; entonces, el estudio de la composición química del aceite esencial en relación con los factores ambientales puede proporcionar información sobre que determina el polimorfismo químico de las plantas. Los aceites esenciales son los mayores constituyentes de plantas medicinales<sup>9</sup>. Los efectos en la composición química también se ven afectados por factores como bacterias, hongos, virus, parásitos, como se vio en el estudio para ver la diferencia que presenta la composición química del aceite esencial de *G. robusta*, una saludable y otra contaminada con *Candidatus phytoplasma*. Los resultados obtenidos fueron  $\alpha$ -pineno (10,98% y 10,81%), limoneno (4,21% y 9,34%), *trans*-pinocarveol (8,22% y 7,45%), pinocarvona (3,28% y 2,82%), borneol (15,02% y 21,34%), acetato de bornilo (4,44% y 8,91%),  $\beta$ -selineno (4,33% y 3,53%) y  $\beta$ -eudesmol (5,45% y 5,03%) para la planta saludable y contaminada respectivamente; fue observado que la planta enferma produce mayor cantidad de limoneno, borneol y acetato de bornilo, presumiendo que la contaminación con *C. phytoplasma* causa ese efecto en la planta<sup>10</sup>. Los estudios en la composición química de los aceites esenciales reportados en el género *Grindelia* son pocos, como de especies colectadas en Alemania en 1993 *G. robusta* y *G. squarrosa* presentaron como componentes mayoritarios  $\alpha$ -pineno (12,5% y 25,53%), canfeno (5,46% y 4,22%),  $\beta$ -pineno (2,54% y 2,39%), limoneno (3,35% y 3,62%), borneol (2,27% y 1,53%) y acetato de bornilo (12,28% y 1,35%) y  $\beta$ -cariofileno (0,63% y 2,92%) respectivamente<sup>11</sup>; para estas mismas especies colectadas en Alemania (2000), los aceites esenciales fueron extraídos de cada órgano de la planta (flores, hoja y ramas), se obtuvo para *G. squarrosa*,  $\alpha$ -pineno (35,3%, 10,4%, 4,4%),  $\beta$ -pineno (5,2%, 1,7% y 1,9%), limoneno (9,3%, 16,2% y 27,1%), terpinoleno (2,3%, 2% y 0,7%), germacreno D (3,7%, 3,3% y 0,9%), acetato de isobornilo (6,9%, 4,3% y 1,9%) y germacreno B (6,8%, 13,2% y 3%) en flores, hojas y ramas respectivamente; en *G. robusta*,  $\alpha$ -pineno (13,1%, 13,4% y 0,9%),  $\beta$ -pineno (3,2%, 3% y 0,2%), mirceno (1,6%, 7,2% y 0,3%),  $\beta$ -cariofileno (2,4%,

4,1% y 0,4%), germacreno D (10,3%, 23,3% y 5,4%) y germacreno B (4,4%, 8,3% y 0,4%) en flores, hojas y ramas respectivamente<sup>12</sup>. Estas mismas especies colectadas en el 2000 fueron comparadas con *G. humilis* colectada en Egipto. Fue observado  $\alpha$ -pineno (4,9%, 8,8% y 16,1%), mirceno (3,9%, - y 3,4%), limoneno (0,2%, 4,1% y 16,8%), *trans*-pinocarveol (-, 6,1% y 0,5%), borneol (0,2%, 14,8% y 4,5%), *p*-cimen-8-ol (0,1%, 4,1% y -), verbenona (1,1%, 3,3% y 0,1%), acetato de bornilo (5,1%, 5,4% y 1,3%), germacreno D (11,9%, 0,1% y 6,8%), acetato de *E*-lachonofilol (4,1%, - y 0,4%) para *G. humilis*, *G. robusta* y *G. squarrosa* respectivamente<sup>13</sup>. Las partes aéreas de *G. robusta* colectadas en Italia fueron identificados como compuestos mayoritarios  $\alpha$ -pineno 10,3%, limoneno 4,3%, *trans*-pinocarveol 7%, pinocarvona 2,6%, borneol 15,2%, *p*-cimen-8-ol 2,2%, verbenona 2,6%, acetato de bornilo 4,5%,  $\beta$ -selineno 3,2% y  $\beta$ -eudesmol 4,1%, el aceite esencial presento actividad antioxidante<sup>14</sup>. Las partes aéreas de dos especies de *Grindelia* colectadas en Rumania, *G. squarrosa* y *G. hirsutula*, presentaron como componentes mayoritarios  $\alpha$ -pineno (8,3% y 6,2%), limoneno (8,1% y 7%), *trans*-sabinol (3,6% y 1,8%), borneol (3,5% y 3,3%), acetato de bornilo (10,8% y 3,6%), germacreno D (2,4% y 4,2%), 10,11-epoxi-calameneno (3,6% y 4,1%), espatulenol (5,4% y 5,5%) y oxido de cariofileno (4,9% y 3,4%) respectivamente<sup>15</sup>. De las flores y hojas de *G. integrifolia* (Polonia) fue extraído el aceite esencial de cada uno de los órganos y se pudo ver sus diferencias entre flores y hojas,  $\alpha$ -pineno (34,9% y 4,6%),  $\beta$ -pineno (7,3% y 2,1%), mirceno (7,1% y 16,9%), limoneno (13,1% y 10,1%), *trans*-verbenol (2,1% y 0,2%), acetato de bornilo (4,1% y 0,7%)<sup>16</sup>. Las flores y hojas de *G. squarrosa* colectadas en Estados Unidos, el aceite esencial de esta especie presente como componentes principales  $\alpha$ -pineno (24,7% y 23,2%),  $\beta$ -pineno (4% y 3,8%), limoneno (10% y 14,7%), terpinoleno (1,7% y 2%), acetato de bornilo (3% y 5,1%), *trans*-pinocarveol (4,2% y 3,7%), borneol (23,4% y 16,6%), mirtenol (2,5% y 1,7%), *p*-cimen-8-ol (6,1% y 5,8%), espatulenol (3% y 2%), en flores y hojas respectivamente<sup>17</sup>. Las partes aéreas de *G. squarrosa* var. *serrulata* colectadas en Estados Unidos, el aceite esencial presento como componentes mayoritarios  $\alpha$ -pineno (21,9%),  $\beta$ -pineno (4,2%), limoneno (17,1%), terpinoleno (10,6%), *trans*-verbenol (2,2%), borneol (6,5%), acetato de bornilo (3,3%), germacreno D (2,4%), germacreno B (3,5%), el aceite esencial presento actividad antimicrobiana<sup>18</sup>. El presente artículo presenta la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *G. tarapacana* colectada en abril del 2021, fueron identificados 89 componentes, cuyos componentes mayoritarios fueron acetato de bornilo,  $\alpha$ -isometilionona, germacreno B, *E*-nerolidol, fokieol, 10-epi- $\gamma$ -eudesmol y  $\beta$ -acorenol. El análisis instrumental fue realizado por cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas, también fue realizado un ensayo exploratorio para verificar la efectividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de las partes aéreas del *G. tarapacana*. El aceite esencial demostró ser altamente efectivo para inhibir el crecimiento de las cepas estudiadas. *S. salivarius*, *E. faecalis* y *C. albicans*.

## PARTE EXPERIMENTAL

Las partes aéreas de *Grindelia tarapacana* fue colecta e identificada por el Dr. Botánico José Elias Zuñiga Calcina de la Universidad Nacional San Agustín del departamento de Arequipa a una altura de 2459 msnm con coordenadas 16°, 29' 90" S; 71°, 51', 91" W. La colecta fue realizada en abril del 2021 y fue colectado 301 g de muestra.

### Extracción del aceite esencial de las partes aéreas

Los aceites esenciales fueron obtenidos de las partes aéreas por hidrodestilación de 4 horas con aparato tipo Clevenger (Farmacopea), el aceite esencial fue extraído con éter de petróleo (EP) y secado con sulfato de sodio anhidro, el EP fue evaporado a temperatura ambiente y el aceite fue pesado para determinar su rendimiento y guardado en congeladora (-20°C) hasta su análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)<sup>19</sup>.

### Análisis del aceite esencial

La muestra del aceite esencial fue preparada a una concentración de 1 mg/mL. El análisis por cromatografía gaseosa fue realizado en un cromatógrafo a gas acoplado a un espectrómetro de masas (Shimadzu, modelo CGMS-QP2010 Ultra) con las siguientes condiciones de análisis: columna capilar Restek Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); temperatura del inyector 260 °C, temperatura del detector 280 °C; impacto de electrones a 70 eV, con gas de arrastre helio a un flujo de 1,48 mL/min, con split 1/5; con un programa de temperatura de 80°C (5') – 280°C (5'), 8°C/minuto; y con volumen de inyección de 3 µL. La identificación de la composición química fue basada por la comparación de los espectros de masas con el banco de datos del sistema de CG-EM de NIST 14 lib y por análisis de sus espectros<sup>20</sup>.

### Análisis de la actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial

El aceite esencial fue diluido inicialmente (Tabla 1, concentración inicial) al 10%, 5%, 2,5% y 1,25% (v/v) con dimetilsulfóxido (DMSO). Las diluciones fueron mezclados en Vortex por 1 min para asegurar la homogenización. Se emplearon cepas de *Streptococcus mutans* ATCC25175, *S. salivarius* ATCC13419, *S. sanguinis* ATCC10556, *Enterococcus faecalis* ATCC y *Candida albicans* ATCC 10231. Las cepas fueron sembradas en placa Petri conteniendo el medio de cultivo BHA (Brain-Heart Agar) para las bacterias (*Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *E. faecalis*) y TSA (Tripicase Soy Agar) para el hongo *C. albicans*. A partir de los cultivos se preparó una suspensión de microorganismos a una concentración de 0,5 de la escala de Mc Farland, empleando como medio BHI (Brain Heart Infusion) para las bacterias y con TSI (Tripicase Soy Infusion) para el hongo; de la suspensión se transfirieron 190 µL a cada pozo de la microplaca de 96 pocillos. Luego se agregó 10 µL de cada concentración del aceite esencial. Como resultado, las concentraciones iniciales fueron diluidas 20 veces (Tabla 1, concentración final) en el ensayo microbiológico en proporción al volumen de medio de cultivo y el volumen de la dilución del aceite esencial. se emplearon pocillos conteniendo suspensión inoculada y sin inocular como controles positivos y negativos de crecimiento bacteriano, respectivamente<sup>21,22</sup>.

**Tabla 1.-** Concentraciones iniciales y finales del aceite esencial luego del ensayo de microdilución.

Concentración inicial (%)	Concentración final (%)
10	0,5
5	0,25
2,5	0,125
1,25	0,0625

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la colecta de las partes aéreas de *G. tarapacana* fue obtenido 381,6 mg de aceite esencial, que representa el 0,13% de rendimiento; el aceite tiene color amarillo claro.

Con el análisis del aceite esencial por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas fue posible identificar 89 compuestos (Tabla 2) que representa el 79,01%, los componentes mayoritarios (Figura 1) fueron acetato de bornilo 5,52%,  $\alpha$ -iso-metilionona 6,49%, germacrene B 8,22%, *E*-nerolidol 5,4%, fokienol 5%, 10-epi- $\gamma$ -eudesmol 6,16% y  $\beta$ -acoreno 4%. La composición química del aceite esencial está compuesta por hidrocarburos aromáticos 1,99%, monoterpenos oxigenados 7,43%, ésteres alifáticos 1,42%, alilbencenos 0,28%, hidrocarburos sesquiterpénicos 12,3%, cetonas 9,65%, sesquiterpenos oxigenados 41,48%, diterpenos oxigenados 0,3%, cromeno 1,05%, alcohol alifático 0,92%, hidrocarburos aromáticos 0,19% y alcanos 1,27%.

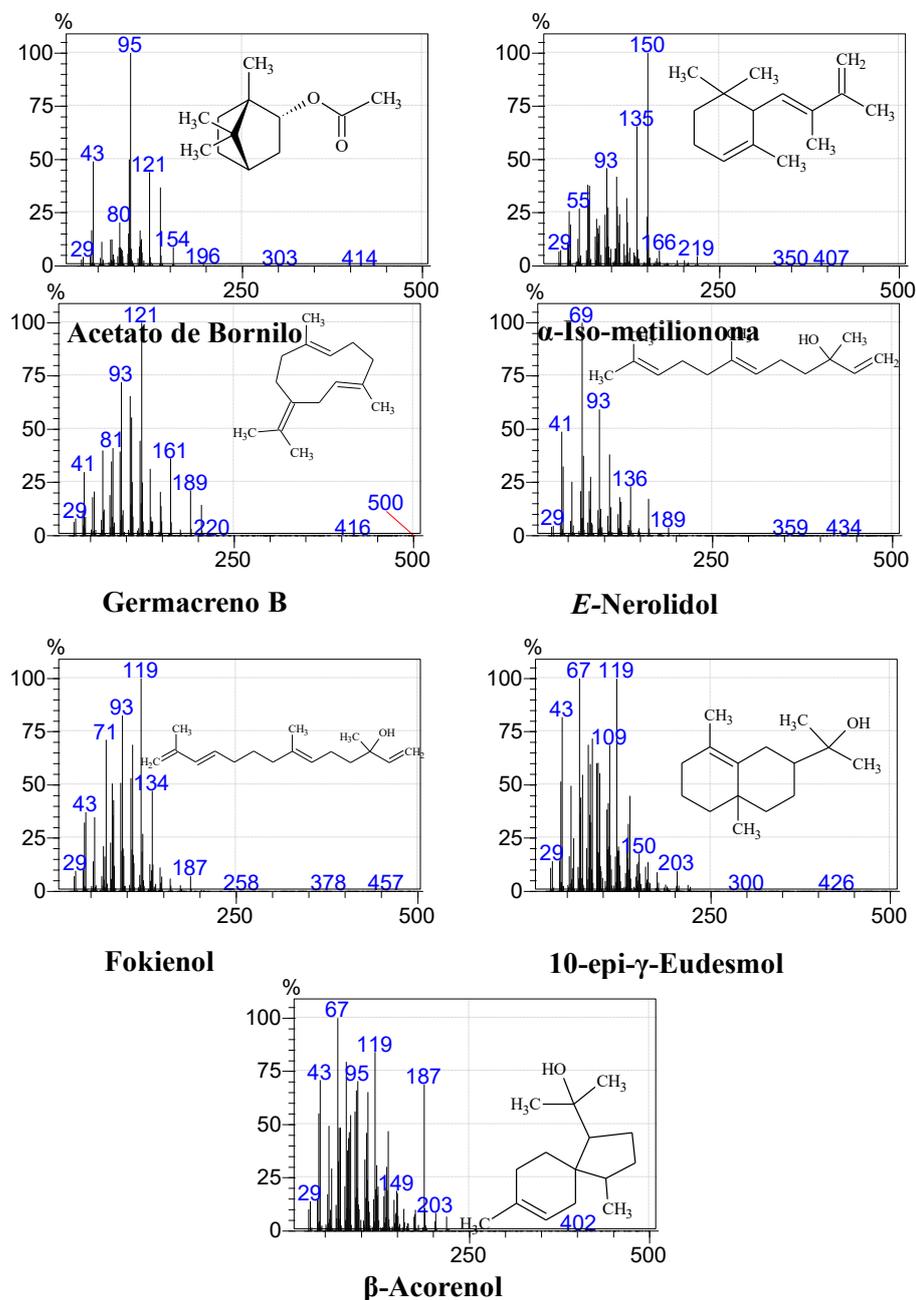
**Tabla 2.-** Composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *Grindelia tarapacana*.

TR	Nombre	%	TR	Nombre	%
8,576	Santolina trieno	0,13	61,215	Isolongifolen-5-ona	1,39
10,165	$\alpha$ -Thujeno	0,43	61,454	Zonareno	0,42
11,259	$\alpha$ -Pino	0,35	61,535	$\gamma$ -Vetiveneno	0,11
13,690	Sabineno	0,14	61,664	Acetato de $\beta$ - <i>E</i> -Ionol	0,94
13,852	$\beta$ -Pino	0,74	61,820	$\alpha$ -Calacoreno	0,12
41,495	Borneol	0,83	62,423	<b>Germacrene B</b>	<b>8,22</b>
42,415	Naftaleno	0,19	62,732	<b><i>E</i>-Nerolidol</b>	<b>5,40</b>
42,493	Terpinen-4-ol	0,28	63,148	$\alpha$ -Cedrene epoxido	3,93
44,327	Metilchavicol	0,09	63,278	Santalenona	0,32
46,138	Formiato de Isobornil	0,56	63,443	oxido de Cariofileno	1,11
46,926	3 <i>Z</i> -Hexenil-2-metil butanoato	0,08	63,644	Presilfiperfolan-8-ol	0,45
47,185	3 <i>Z</i> -Hexenil 3-metilbutanoato	0,11	63,726	$\beta$ -Copaen-4- $\alpha$ -ol	0,30
49,675	Cogeijereno	0,20	63,903	Carotol	1,17
49,885	<b>Acetato de Bornilo</b>	<b>5,52</b>	64,143	<b>Fokienol</b>	<b>5,00</b>
52,016	Acetato de Mirtenilo	0,09	64,511	epoxido de Humuleno II	0,76
52,534	$\delta$ -Elemeno	0,21	64,995	Oxido de $\beta$ -Himachaleno	0,14
53,137	$\alpha$ -Cubebeno	0,05	65,436	<b>10-epi-<math>\gamma</math>-Eudesmol</b>	<b>6,16</b>
54,181	Acetato de neo-iso-Dihidrocarvilo	0,15	65,910	$\alpha$ -Acoreno	2,78
54,380	$\alpha$ -Ylangeno	0,22	66,064	<b><math>\beta</math>-Acoreno</b>	<b>4,00</b>
54,489	Modeph-2-eno	0,19	66,288	epi- $\alpha$ -Cadinol	0,49
54,790	$\beta$ -Bourboneno	0,84	66,422	Desmetoxi encecalina	1,05
54,895	Damascenona	0,11	66,625	$\alpha$ -Cadinol	1,32
55,116	$\beta$ -Cubebeno	0,10	66,915	<i>cis</i> -Calamenen-10-ol	0,06
55,219	$\beta$ -Elemeno	0,53	68,355	2 <i>Z</i> ,6 <i>Z</i> -Farnesal	1,50
55,701	Sativeno	0,06	68,884	5-neo-Cedranol	0,33

55,993	Metil eugenol	0,19	69,630	Eudesma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol	1,08
56,395	<i>E</i> -Caryophylleno	0,60	70,270	Nootkatol	0,68
56,780	4,8- $\beta$ -epoxy Caryofilano	0,16	70,396	2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> -Farnesol	0,41
56,868	$\beta$ -Copaeno	0,24	71,361	iso-Longifolol	0,38
57,137	$\beta$ -Gurjuneno	1,26	71,579	Iso-Biciclogermacrenal	0,32
57,557	<i>cis</i> -Muuroala-3,5-dieno	0,06	73,473	<i>Z</i> -Lanceol	0,48
57,943	$\alpha$ -Humuleno	0,61	73,678	$\beta$ -Acoradienol	0,46
58,317	Oxido de Cabreuva B	0,40	82,984	Metil hexadecanoato	0,05
59,005	<b><math>\alpha</math>-Iso-metilionona</b>	<b>6,49</b>	84,633	Tetrahidro-Rimueno	0,20
59,196	Amorfa-4,7(11)-dieno	2,41	85,718	6 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> -Pseudo fitol Bornil éster del ácido	0,40
59,411	Widdra-2,4(14)-dieno	3,13	88,122	Hidrocinnamico	0,05
59,489	$\gamma$ -metil-Ionona	2,73	89,864	Linoleato de metilo	0,19
59,689	<i>cis</i> - $\beta$ -Guaieno	0,26	90,292	Fitol	0,52
59,810	epi-Cubebol	0,48	95,695	Labd-7,13-dien-15-ol	0,10
59,865	$\alpha$ -Selineno	0,45	96,240	<i>n</i> -Tricosano	0,23
60,085	$\alpha$ -Muuroleno	0,29	99,093	<i>n</i> -Tetracosano	0,18
60,217	Germacrene A	0,33	101,789	<i>n</i> -Pentacosano	0,56
60,324	Iso-valerato de Lavandulil	0,10	104,345	<i>n</i> -Hexacosano	0,12
60,680	Cubebol	0,24	106,793	<i>n</i> -Octacosano	0,18
61,032	$\delta$ -Cadineno	0,46	-	-	-
Hidrocarburos monoterpénicos (%)					1,99
Monoterpenos oxigenados (%)					7,43
Ésteres alifáticos (%)					1,42
Alilbencenos (%)					0,28
Hidrocarburos sesquiterpénicos (%)					12,3
Cetonas (%)					9,65
Sesquiterpenos oxigenados (%)					41,48
Diterpenos oxigenados (%)					0,3
Cromeno (%)					1,05
Alcohol alifático					0,92
Hidrocarburos aromáticos					0,19
Alcanos (%)					1,27
Total de compuestos identificados (%)					79,01

TR: tiempo de retención.

En el aceite esencial de *G. tarapacana* (objetivo de nuestro estudio) los hidrocarburos monoterpénicos no hacen parte de los componentes mayoritarios, por ejemplo  $\alpha$ -pineno está presente como componente mayoritario en *G. robusta*, *G. squarrosa*, *G. humilis*, *G. hirsutula*, *G. integrifolia*, *G. squarrosa* var *serrulata*<sup>11,12,13,14,15,16,17,18</sup>, el  $\beta$ -pineno está



**Figura 1.-** Espectros de masas y estructura molecular de los componentes mayoritarios del aceite esencial de las partes aéreas de *G. tarapacana*.

Presente en *G. robusta*, *G. squarrosa*, *G. humilis*, *G. hirsutula*, *G. integrifolia*, *G. squarrosa* var *serrulata*<sup>11,12,16,17,18</sup>, limoneno está presente como componente mayoritario en *G. robusta*, *G. squarrosa*, *G. humilis*, *G. hirsutula*, *G. integrifolia*, *G. squarrosa* var *serrulata*<sup>11,12,13,14,15,16,17,18</sup>; los monoterpenos oxigenados como el borneol es mayoritario

en *G. robusta*, *G. squarrosa*, *G. hirsutula*, *G. squarrosa* var *serrulata*<sup>13,14,15,17,18</sup> mientras que en *G. tarapacana* es un minoritario 0,83%, el acetato de bornilo presente como mayoritario en *G. robusta*, *G. squarrosa*, *G. humilis*, *G. hirsutula*, *G. integrifolia*, *G. squarrosa* var *serrulata*<sup>11,13,15,16,17,18</sup>, en nuestra especie objetivo de nuestro estudio también es considerada como mayoritario 5,52%. La  $\alpha$ -iso-metilionona (6,49%), *E*-nerolidol (5,4%), fokienol (5%), 10-epi- $\gamma$ -eudesmol (6,16%) y  $\beta$ -Acorenol (4%) sólo está presente en *G. tarapacana*. Germacreno B fue reportado como mayoritario *G. robusta*, *G. squarrosa*, *G. squarrosa* var *serrulata*<sup>12,18</sup> y en *G. tarapacana* ahora.

El acetato de bornilo se usa ampliamente en perfumería y aditivos alimentarios, presenta propiedades farmacológicas como antiinflamatorias e inmunomoduladores, también presenta propiedades sedantes y potencial uso en aromaterapia, en comparación los antiinflamatorios no esteroideos tradicionales<sup>23</sup>. La  $\alpha$ -isometil-*E*-ionona muy usada en la industria cosmética hasta un máximo de 3,69%<sup>24</sup>. *E*-nerolidol es un alcohol sesquiterpénico generado por las plantas para defenderse de algunos insectos y enfermedades<sup>25</sup>, tiene un olor floral, es usado como insumo cosmético y no cosmético, también es usado como aromatizante alimentario y es un candidato químico y farmacológico en la agricultura y medicina<sup>26</sup>. Fokienol, un sesquiterpeno oxigenado presente no sólo en *G. tarapacana*, también es encontrado en *Fokienia hodginsii* (Dunn)<sup>27</sup> y *Centaurea damascena*<sup>28</sup>, fokienol es el componente presente en *Dittrichia viscosa* L. y se le atribuye los efectos de antioxidante, antiviral, antiinflamatorio y antiulceras gástricas<sup>29</sup>. El 10-epi- $\gamma$ -eudesmol es un alcohol sesquiterpénico, es comúnmente encontrado como uno de los componentes mayoritarios del geranio y se caracteriza porque presenta actividad repelente de garrapatas similar al efecto del *N,N*-dietil-*m*-toluamida<sup>30</sup>. El  $\beta$ -acorenol es un sesquiterpeno que también está presente como componente mayoritario en algunas especies de la familia Magnoliaceae<sup>31</sup> y *Tetraclinis articulata*<sup>32</sup> y el sesquiterpeno Germacreno B es uno de los principales constituyentes químicos de los aceites esenciales de diferentes plantas que tienen actividad antibacteriana<sup>33</sup>.

Debido a que siempre que se revisa la literatura se encuentra que cuando el aceite esencial es sometido a ensayo biológico a la concentración del 100% es encontrado que es muy efectivo, es por ello que en el presente artículo se propone el ensayo del aceite esencial diluido.

Con la actividad biológica se comprobó a través de ensayos de susceptibilidad antibacteriana frente a cepas que conforman la microbiota oral. Los resultados están presentados en la tabla 3 en la que se puede observar que a concentraciones del aceite esencial de 10% y 5% no se observa el crecimiento de ninguna de las bacterias y del hongo, a la concentración de 2,5% sólo se observa pequeñas colonias de *S. mutans* y *S. sanguinis*, pero al mismo tiempo no hay crecimiento de *S. salivarius*, *E. faecalis* y *C. albicans*; de estos tres últimos microorganismos se observa crecimiento de colonias a 1,5% de concentración. El control positivo es el medio de cultura con microorganismos inoculadas es por ello que se representa >300, que significa que las bacterias y el hongo crecieron exponencialmente, ya el control negativo demostró la seguridad del ensayo porque solo es el medio de cultura libre de microorganismo y como se puede ver en el resultado no hay crecimiento de bacterias ni del hongo.

**Tabla 3.** Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial frente a los microorganismos (UFC).

Concentración	Microorganismo (UFC)				
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
10%	<3	<3	<3	<3	<3
5%	<3	<3	<3	<3	<3
2,5%	134	250	<3	<3	<3
1,5%	>300	>300	106	77	191
Control (+)	>300	>300	>300	>300	>300
Control (-)	<3	<3	<3	<3	<3

UFC: unidades formadoras de colonias.

El aceite esencial demostró ser altamente efectivo para inhibir el crecimiento de las cepas estudiadas. *S. salivarius*, *E. faecalis* y *C. albicans* fueron particularmente sensibles a concentraciones bajas (0,0625 % v/v) del aceite esencial (Tabla 4).

**Tabla 4.-** Concentración mínima bactericida del aceite esencial frente a bacterias y un hongo.

	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
	CMB(%v/v)				CMF(%v/v)
AEGt	0,125	0,125	0,0625	0,0625	0,0625

AEGt: aceite esencial de las partes aéreas de *G. tarapacana*, CMB: concentración mínima bactericida, CMF: concentración mínima fungicida

## CONCLUSIONES

El presente trabajo presenta la composición química del aceite esencial de *Grindelia tarapacana* colectada en abril del 2021, esta composición química no fue reportada hasta ahora y tiene la característica que no tiene como componentes mayoritarios a hidrocarburos monoterpénicos comparado con otras especies de *Grindelias* estudiadas, no se puede afirmar que quizás es el método de extracción porque lo reportado para este género es el mismo método que hemos empleado (hidrodestilación). Los compuestos mayoritarios fueron acetato de bornilo 5,52%,  $\alpha$ -iso-metilionona 6,49%, germacreno B 8,22%, *E*-nerolidol 5,4%, fokienol 5%, 10-epi- $\gamma$ -eudesmol 6,16% y  $\beta$ -acorenol 4%, siendo estos 4 últimos reportados por primera vez en el género *Grindelia*. Con el ensayo exploratorio para verificar la efectividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial, fue demostrado ser altamente efectivo para inhibir el crecimiento de las cepas estudiadas. *S. salivarius*, *E. faecalis* y *C. albicans* a la concentración de 0,0625 % v/v.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al financiamiento del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería, Proyecto de Investigación Formativa FIQT – PF – 25 – 2021

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS****ART. N° 1**

1. Wollenweber EE, Dörr M, Timmermann BN, Strand J, Fuentes ER. Exudate Flavonoids from *Grindelia tarapacana* of Chile. *Z Naturforsch C*. 1993; 48: 533 – 534.
2. Timmermann BN, McLaughlin SP, Hoffmann JJ. Quantitative variation of grindelane diterpene acids in 20 species of North American *Grindelia*. *Biochem Syst Ecol*. 1987; 15(4): 401 – 410.
3. Alza NP, Pferschy-Wenzig E-M, Ortman S, Kretschmer N, Kunert O, Rechberger GN, Bauer R, Murray AP. Inhibition of NO production by *Grindelia argentina* and isolation of three new cytotoxic saponins. *Chem Biodivers*. 2014; 11: 311 – 322.
4. León JF, Quispe LS, Musaja CC. Asteraceas comunes de la provincia Candarave departamento de Tacna y su importancia como recurso natural. *Ciencia & Desarrollo*. 2003; 7: 20 – 28.
5. Castro MSA, Fuentes ER, Timmermann BN. Germination responses and resin production of *Grindelia glutinosa* and *G. tarapacana* from the Atacama Desert. *J Arid Environ*. 1995; 29: 25 – 32.
6. Ybarra MI, Popich S, Borkosky SA, Asakawa Y, Bardón A. Manoyl oxide diterpenoids from *Grindelia scorzonrifolia*. *J Nat Prod*. 2005; 68: 554 – 558.
7. Mahmoud AA, Ahmed AA, Tanaka T, Linuma M. Diterpenoid Acids from *Grindelia nana*. *J Nat Prod*. 2000; 63: 378 – 380.
8. Echevarría J, Zambrana NP, Bussmann RW. *Grindelia boliviana* Rusby, *Grindelia tarapacana* Phil. Asteraceae. In: Paniagua-Zambrana NY, Bussmann RW, editors. *Ethnobotany of the Andes*. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 919-20. doi:10.1007/978-3-030-28933-1\_133.
9. Akbarian A, Rahimmalek M, Sabzalian MR, Sarfaraz D. Variation in essential oil composition, phenolic, flavonoid and antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff based on three model systems. *J Appl Res Med Aromat Plants*. 2019; 13: 100208. doi:10.1016/j.jarmap.2019.100208.
10. Bertaccini A, Contaldo N, Benni A, Curini M, Genovese S, Epifano F, et al. Effects of “*Candidatus phytoplasma asteris*” on the volatile chemical content and composition of *Grindelia robusta* Nutt. *J Phytopathol*. 2011; 159: 124 – 126.
11. Kaltenbach G, Schafer M, Schimmer O. Volatile constituents of the essential oil of *Grindelia robusta* Nutt. and *Grindelia squarrosa* Dun. *J Essent Oil Res*. 1993; 5: 107 – 108.
12. Schäfer M, Schimmer O. Composition of the essential oils from flowers, leaves and stems of *Grindelia robusta* and *G. squarrosa*. *J Essent Oil Res*. 2000; 12: 547 – 552.
13. El-Shamy AM, El-Hawary SS, El-Shabrawy AO, El-Hefnawy HM. Essential oil composition of three *Grindelia* species. *J Essent Oil Res*. 2000; 12: 631 – 634.
14. Fraternali D, Giamperi L, Bucchini A, Ricci D. Essential oil composition and antioxidant activity of aerial parts of *Grindelia robusta* from central Italy. *Fitoterapia*. 2007; 78: 443 – 445.
15. Veres K, Roza O, Laczkó-Zöld E, Hohmann J. Chemical composition of essential oils of *Grindelia squarrosa* and *G. hirsutula*. *Nat Prod Commun*. 2014; 9(4): 573 – 574.

16. Nowak S, Lisiecki P, Tomaszczak-Nowak A, Grudzinska E, Olszewska MA, Kicel A. Chemical composition and antimicrobial activity of the flowers and leaves of *Grindelia integrifolia* DC. *Nat Prod Commun.* 2019; 33(10): 1535 – 1540.
17. Schepetkin IA, Özek G, Özek T, Kirpotina LN, Khlebnikov AI, Quinn MT. Neutrophil Immunomodulatory Activity of (-)-Borneol, a major component of essential oils extracted from *Grindelia squarrosa*. 2022 Jul 31;27(15):4897. doi: 10.3390/molecules27154897.
18. Poudel A, Dosoky NS, Satyal P, Swor K, Setzer WN. Essential oil composition of *Grindelia squarrosa* from Southern Idaho. *Molecules.* 2023 May 2;28(9):3854. doi: 10.3390/molecules28093854.
19. De Oliveira TS, Bombo AB, De Oliveira ASS, Garcia VL, Appezzato da GB. Seasonal variation of the essential oil two Brazilian native *Aldama* La Llave (Asteraceae) species. *An Acad Bras Ciênc.* 2016; 88(3 suppl.): 1899-1907. doi:10.1590/0001-376520162015-0732.
20. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4th Ed. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation; 2007. 804 p.
21. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica.* 1998; 64(8): 711-3.
22. Silva SJ, Brandão VR, Coutinho SDA, Paciencia MLB, Frana SA, Díaz IEC, et al. Antifungal Activity of the Essential Oils of *Osteophloeum platyspermum* (Myristicaceae) against *Malassezia* spp. and *Candida albicans* Influenced by Seasonality and Climatic Factors. *European J Med Plants.* 2021; 32(12): 31–45.
23. Zhao Z-J, Sun Y-L, Ruan X-F. Bonyl acetate: A promising agent in phytomedicine for inflammation and immune modulation. *Phytomedicine.* 2023 Jun; 114:154781. doi: 10.1016/j.phymed.2023.154781.
24. Lapczynski A, Lalko J, Politano VT, McGinty D, Bhatia S, Letizia CS, et al. Fragrance material review on alpha-iso-methylionone. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45: S280 – S289.
25. Chen S, Zhang L, Cai X, Li X, Bian L, Lou Z, Li Z, Chen Z, Xin Z. (*E*)-Nerolidol is a volatile signal that induces defenses against insects and pathogens in tea plants. *Hortic Res.* 2020 Apr 1;7(1):52. doi: 10.1038/s41438-020-0275-7.
26. Chan W-K, Tan LT-H, Chan K-G, Lee L-H, Goh B-H. Nerolidol: A sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules.* 2016 Apr 28;21(5):529. doi: 10.3390/molecules21050529.
27. Lesueur D, Ban NK, Bighelli A, Muselli A, Casanova J. Analysis of the root oil of *Fokienia hodginsii* (Dunn) Henry et Thomas (Cupressaceae) by GC, GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR. *Flavour Fragr J.* 2006; 21: 171 – 174.
28. Khleifat KM, Matar SA, Jaafreh M, Qaralleh H, Al-Limoun MO, Alsharafa KY. Essential oil of *Centaurea damascena* aerial parts, antibacterial and synergistic effect. *J Essent Oil-Bear Plants.* 2019; 22(2): 356 – 367.
29. Al-Qudah MA, AL-Jaber HI, Mayyas AS, Abu-Orabi ST, Zarga MHA. Chemical compositions of the essential oil from the Jordanian medicinal plant *Dittrichia viscosa*. *Jordan J Chem.* 2010; 5(4): 343 – 348.
30. Tabanca N, Wang M, Avonto C, Chittiboyina AG, Parcher JF, Carroll JF, Kramer M, Khan IA. Bioactivity-Guided investigation of *Geranium* essential oils as natural tick repellents. *J Agric Food Chem.* 2013; 61: 4101 – 4107

31. Yang D, Ma D, Song Z, Yang M, Xu Y. The composition, antioxidant and antibacterial activity of essential oils from five species of the Magnoliaceae family. *Molecules*. 2024 Nov 1;29(21):5182. doi: 10.3390/molecules29215182.
32. Dallahi Y, Chahhou D, El Aboudi A, Aafi A. Distribution mapping and chemical composition of *Tetraclinis articulata* (Vahl.) masters in the site of biological and ecological interest of Kharouba (Central Plateau, Morocco). *J Mater Environ Sci*. 2017; 8(7): 2474 – 2479.
33. Xu H, Dickschat JS. Germacrene B – a central intermediate in sesquiterpene biosynthesis. *Beilstein J Org Chem*. 2023; 19: 186 – 203.

# DESARROLLO DE UNA HAMBURGUESA PLANT-BASED CON HARINA DE TARWI (*Lupinus mutabilis*), FREJOL NEGRO (*Phaseolus vulgaris*) Y HARINA DE CUSHURO (*Nostoc sphaericum* s.p.)

Jose Carlos Palacios Carrasco<sup>a</sup>, Diego Carlos Valderrama Pumallihua<sup>a\*</sup>, Nancy Ascencion Chasquibol Silva<sup>b</sup>

## RESUMEN

La tendencia en el consumo de productos basados en fuentes vegetales va en aumento debido a la creciente preocupación por la sostenibilidad y los efectos ambientales de la producción de productos cárnicos. En este contexto, se elaboró una hamburguesa plant-based con alto contenido de proteína y un perfil balanceado de aminoácidos esenciales, combinando harina de tarwi (*Lupinus mutabilis*), frejol negro (*Phaseolus vulgaris*) y cushuro (*Nostoc sphaericum*). El tarwi es una leguminosa andina rica en proteínas (40-50%) y grasas saludables (20%), mientras que el frejol negro es una fuente importante de fibra y minerales. El cushuro, una cianobacteria altoandina, tiene un alto contenido proteico y minerales como hierro y calcio. Para la formulación de la hamburguesa plant-based, se mezclaron harina de tarwi (45%), harina de cushuro (2,33%), frejol negro (8,77%), zanahoria (3%), huevo (36%), sal de mara (0,85%), orégano en polvo (0,75%), páprika en polvo (1,4%), ajo molido (0,9%) y cebolla en polvo (1%). Los resultados mostraron que la muestra óptima (MO) presentó 30,48% de proteínas, 36,19% de humedad, 22,06% de grasa y 8,91% de carbohidratos, con un perfil equilibrado de aminoácidos, destacando el ácido glutámico ( $196,16 \pm 4,77$  mg/g proteína), arginina ( $145,91 \pm 4,75$  mg/g proteína), ácido aspártico ( $83,00 \pm 4,52$  mg/g proteína). Además, se obtuvo una actividad antioxidante de 1502,19  $\mu$ g trolox/g, y en la evaluación sensorial la MO alcanzó una aceptabilidad del 86,67%, resaltando en sabor, textura y apariencia frente a la muestra de control, lo que demuestra su potencial como alternativa proteica sostenible y nutritiva.

**Palabra clave:** Tarwi, cushuro, hamburguesa plant-based, proteína

---

<sup>a</sup> Facultad de Ingeniería Industrial, Universidad de Lima, v. Javier Prado Este 4600, Urb. Fundo Monterrico Chico, Lima 15023, Perú, \*20192043@aloe.ulima.edu.pe

<sup>b</sup> Laboratorio de Alimentos Funcionales, Facultad de Ingeniería Industrial, Universidad de Lima, v. Javier Prado Este 4600, Urb. Fundo Monterrico Chico, Lima 15023, Perú

## DEVELOPMENT OF A PLANT-BASED BURGER WITH TARWI FLOUR (*Lupinus mutabilis*), BLACK BEANS (*Phaseolus vulgaris*), AND CUSHURO FLOUR (*Nostoc sphaericum s.p.*)

### ABSTRACT

The trend in the consumption of plant-based products is increasing due to the growing concern about the sustainability and environmental effects of meat product production. In this context, a plant-based hamburger with a high protein content and a balanced profile of essential amino acids was made, combining tarwi flour (*Lupinus mutabilis*), black bean (*Phaseolus vulgaris*) and cushuro (*Nostoc sphaericum*). Tarwi is an Andean legume rich in protein (40-50%) and healthy fats (20%), while black beans are an important source of fiber and minerals. The cushuro, a high Andean cyanobacterium, has a high protein content and minerals such as iron and calcium. For the formulation of the plant-based hamburger, tarwi flour (45%), cushuro flour (2.33%), black beans (8.77%), carrots (3%), eggs (36%), mara salt (0.85%), oregano powder (0.75%), paprika powder (1.4%), ground garlic (0.9%) and onion powder (1%) were mixed. The results showed that the optimal sample (OM) presented 30.48% protein, 36.19% moisture, 22.06% fat and 8.91% carbohydrates, with a balanced amino acid profile, highlighting glutamic acid ( $196.16 \pm 4.77$  mg/g protein), arginine ( $145.91 \pm 4.75$  mg/g protein), aspartic acid ( $83.00 \pm 4.52$  mg/g protein). In addition, an antioxidant activity of 1502.19  $\mu\text{g}$  trolox/g was obtained, and in the sensory evaluation the OM reached an acceptability of 86.67%, standing out in flavor, texture and appearance compared to the control sample, which demonstrates its potential as a sustainable and nutritious protein alternative.

**Keywords:** Tarwi, cushuro, plant-based burger, protein

### INTRODUCCIÓN

El tarwi (*Lupinus mutabilis*) es una leguminosa originaria de los Andes, reconocida por su alto contenido de proteínas (40-50%), grasas saludables (20%) y una composición equilibrada de aminoácidos esenciales<sup>1</sup>. Aunque requiere un proceso de remojo y lavado para eliminar sus alcaloides, su valor nutricional y su versatilidad lo hacen una opción viable para el desarrollo de productos innovadores<sup>2</sup>. El frejol negro (*Phaseolus vulgaris*) es una leguminosa ampliamente cultivada en diversas regiones del mundo, particularmente en América Latina<sup>3</sup>. En Perú, su producción se concentra en departamentos como Lambayeque, Piura y La Libertad, donde su cultivo es esencial para la dieta básica<sup>4</sup>. El cushuro (*Nostoc sphaericum*) es una cianobacteria que crece en ambientes acuáticos de alta montaña, como lagunas y riachuelos, en regiones altoandinas del Perú como Junín, Huancavelica, Puno y Cusco; destacando por su alto contenido de proteínas (24-42%), ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, una notable cantidad de aminoácidos esenciales e hidrofóbicos, y minerales como hierro y calcio<sup>5,6</sup>.

En la actualidad, la creciente tendencia hacia la alimentación saludable y sostenible ha llevado a un aumento en la demanda de productos plant-based, como las hamburguesas elaboradas a partir de ingredientes de origen vegetal<sup>7</sup>. Se espera que este crecimiento del

mercado sea impulsado por la Generación Z y los millennials (de 16 a 40 años) con un 66%, estimando un aumento en el consumo de productos plant-based en los próximos 10 años<sup>8</sup>. Las Naciones Unidas estimó que para el año 2050, la población crecerá a 9700 millones de habitantes, este aumento exponencial de la población amenaza con reducir los niveles de seguridad alimentaria<sup>9,10</sup>. A pesar del crecimiento en la producción de alimentos y la diversidad de recursos disponibles, millones de personas aún sufren desnutrición e inseguridad alimentaria; ya que el sistema alimentario actual no ha podido proteger el medio ambiente y no ha garantizado el acceso a alimentos suficientes, sostenibles y nutricionalmente adecuados para todos<sup>11</sup>.

Las proteínas son esenciales para prevenir la desnutrición y favorecer un envejecimiento muscular saludable; sin embargo, los productos cárnicos altos en proteínas generan un impacto ambiental significativo debido a la demanda de grandes cantidades de recursos y por la emisión gases de efecto invernadero<sup>6</sup>. Por ello, la industria alimentaria está explorando nuevos ingredientes de origen vegetal, insectos y algas para desarrollar alimentos y bebidas con un buen perfil nutricional y alto contenido de proteínas, entre otros<sup>12</sup>. El presente estudio tuvo como objetivo diseñar y elaborar una hamburguesa plant-based a partir de frejol negro (*Phaseolus vulgaris*), tarwi (*Lupinus mutabilis*) y cushuro (*Nostoc sphaericum*), con un perfil balanceado de aminoácidos, alto contenido de proteína, grasas saludables y una presencia de niveles significativos de antioxidantes, comparándolas con una hamburguesa de control similar a las disponibles en el mercado y evaluar su potencial como alternativa sostenible y nutritiva.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materia prima

El tarwi (*Lupinus mutabilis*), cushuro (*Nostoc sphaericum*) y frejol negro (*Phaseolus vulgaris*) fueron adquiridos en un mercado local de la ciudad de Lima y llevados al laboratorio de Alimentos Funcionales de la Universidad de Lima para su posterior procesamiento (lavado, secado, triturado, tamizado y mezclado). Los insumos fueron almacenados en una refrigeradora entre 2 a 5 °C.

### Procesamiento de harinas

La harina de tarwi se obtuvo según el procedimiento reportado por Pantoja et al.<sup>1</sup> Para ello, el tarwi precocido fue pelado y lavado manualmente hasta obtener un líquido transparente, luego se secó en un deshidratador por infrarrojo (IRCDi8, P2131) a 56,7 °C durante 5,5 h y molido en la trituradora de alimentos (RETSCH, modelo GM-200) a una velocidad de 10,000 rpm en 4 intervalos de 30 s para luego ser tamizado en un tamiz (Women Wire Mesh Sieves - Ø 120 µm), obteniendo una harina de color blanquecino, la cual se almacenó en bolsas aluminizadas a temperatura ambiente.

El cushuro se lavó y seco a 58 °C durante 24 h en un deshidratador por infrarrojo (IRCDi8, P2131), se molió en la trituradora de alimentos (RETSCH, modelo GM-200) a una velocidad de 10,000 rpm en 2 intervalos de 30 s y se tamizó en un tamiz (Women Wire Mesh Sieves - Ø 300 µm), obteniendo la harina de color verde oscuro, el cual se almacenó en bolsas aluminizadas a temperatura ambiente.

Para la muestra de control, se utilizó harina de quinua, la cual se obtuvo utilizando el método desarrollado<sup>1</sup>. Para ello, la quinua fue lavada, y luego secada en un deshidratador por infrarrojo (IRCDi8, P2131) a 57 °C por 4,5 h y molida en la trituradora de alimentos (RETSCH, modelo GM-200) a una velocidad de 10,000 rpm en 3 intervalos de 30 s para finalmente ser tamizado en un tamiz (Women Wire Mesh Sieves - Ø 120 µm) y luego fue almacenado en bolsas aluminizadas a temperatura ambiente.

Para la preparación de la pasta de frejol negro, primero éste se remojó con agua durante 12 h, según la recomendación de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), para facilitar la digestión y mejorar la absorción de nutrientes<sup>13</sup>. Luego, se cocinó a una temperatura de 130 °C durante 4 h, se almacenó y se enfrió en una refrigeradora (Electrolux Top Mount Frost) durante 1 h y se molió en una licuadora comercial (OSTER 2L BLSTTDG-RGB-053) a 5,000 rpm en 3 intervalos de 50 s hasta formar una pasta de color negro. Finalmente se almacenó en bolsas aluminizadas a 5°C.

### Diseño experimental

El procedimiento se basó en un diseño de mezcla de centroide simplex mediante el software Minitab 19 (Minitab Inc., USA)<sup>14</sup>. Para ello, se definieron dos variables independientes: X1 (harina de cushuro) y X2 (frejol negro), los cuales se muestran en la Tabla 1. Como variables de respuesta (Y), se evaluaron el contenido de humedad (%), proteína (%) y actividad de agua ( $a_w$ ). Por último, se seleccionó la formulación óptima a través del software Minitab 19 (Minitab Inc., USA).

Tabla 1. Diseño experimental (DOE)

Formulaciones	Orden estándar	Orden de ejecución	Tipo de punto	Bloques	Harina de cushuro (%) (X1)	Frejol negro (%) (X2)
M1	2	1	1	1	0	100
M2	5	2	-1	1	25	75
M3	3	3	0	1	50	50
M4	1	4	1	1	100	0
M5	4	5	-1	1	75	25

### Formulación de las muestras

Se prepararon 5 muestras con diferentes cantidades de harina de cushuro (0-11%) y frejol negro (0-11%), basado en el diseño experimental de la Tabla 1; con concentraciones de harina de tarwi (45,00%), zanahoria (3,00%), huevo (36%), sal de mara (0,85%), orégano en polvo (0,75%), páprika en polvo (1,40%), ajo molido (0,90%) y cebolla en polvo (1,00%), como se muestra en la Tabla 2. Todos los ingredientes (20g) se mezclaron y amasaron de manera manual y uniforme en un bol de acero inoxidable; y fue refrigerado durante 15 min para que se termine de compactar. Finalmente, se le dio la forma circular a la masa y se almacenaron en bolsas de polietileno y conservadas en refrigeración (Electrolux Top Mount Frost) a temperatura de 4 °C para su uso posterior. Para la muestra de control (MC) se realizó el mismo procedimiento, reemplazando la harina de tarwi y cushuro por la harina de quinua.

**Tabla 2.** Formulaciones de las muestras de hamburguesa plant-based con harina de cushuro y frejol negro

Ingredientes	Formulaciones (g/%)				
	M1(g / %)	M2(g / %)	M3 (g / %)	M4 (g / %)	M5 (g / %)
<b>Harina de tarwi</b>	9,00 / 45,00	9,00 / 45,00	9,00 / 45,00	9,00 / 45,00	9,00 / 45,00
<b>Harina de cushuro</b>	2,22 / 11,10	1,67 / 8,35	1,11 / 5,55	0,00 / 0,00	0,56 / 2,80
<b>Frejol</b>	0,00 / 0,00	0,56 / 2,80	1,11 / 5,55	2,22 / 11,10	1,67 / 8,35
<b>Zanahoria</b>	0,60 / 3,00	0,60 / 3,00	0,60 / 3,00	0,60 / 3,00	0,60 / 3,00
<b>Huevo</b>	7,20 / 36,00	7,20 / 36,00	7,20 / 36,00	7,20 / 36,00	7,20 / 36,00
<b>Sal de mara</b>	0,17 / 0,85	0,17 / 0,85	0,17 / 0,85	0,17 / 0,85	0,17 / 0,85
<b>Orégano</b>	0,15 / 0,75	0,15 / 0,75	0,15 / 0,75	0,15 / 0,75	0,15 / 0,75
<b>Paprika en polvo</b>	0,28 / 1,40	0,28 / 1,40	0,28 / 1,40	0,28 / 1,40	0,28 / 1,40
<b>Ajo molido</b>	0,18 / 0,90	0,18 / 0,90	0,18 / 0,90	0,18 / 0,90	0,18 / 0,90
<b>Cebolla en polvo</b>	0,20 / 1,00	0,20 / 1,00	0,20 / 1,00	0,20 / 1,00	0,20 / 1,00
<b>Total</b>	20,00 / 100	20,00 / 100	20,00 / 100	20,00 / 100	20,00 / 100

### Análisis proximal

Este análisis se realizó según métodos oficiales de la AOAC<sup>15</sup>. El nitrógeno total se determinó empleando el método Kjeldahl, multiplicando el resultado por un factor de conversión (6,25) para determinar el contenido de proteína. La humedad se determinó a 105 °C hasta peso constante empleando una termobalanza (SARTORIOUS, MA30). Para el contenido de grasa se determinó con éter de petróleo por el método Soxhlet, mientras que las cenizas se determinaron por incineración a 550 °C durante 72 h en una mufla (KALSTEIN, YR05284-1). Como diferencia se calculó el contenido de carbohidratos disponibles, considerando los valores de proteína, humedad, grasa total y cenizas.

### Determinación de perfil de aminoácidos

El perfil de aminoácidos se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Chasquibel et al.<sup>16</sup> Los aminoácidos se determinaron mediante hidrólisis ácida. Las muestras de proteína (4 mg) fueron colocadas en tubos Pyrex con tapa rosca, luego se le agregaron 4 mL de HCl 6 mol.L<sup>-1</sup> y llevados a una estufa (Memmert, TwinDISPLAY) a 110 °C durante 24 h. Las muestras hidrolizadas se secaron en un rotavapor (Heidolph, VV-micro) y luego se redisolviaron en una solución de borato de sodio 1 mol.L<sup>-1</sup> con azida de sodio al 0,02%, ajustando el pH a 9,0. Luego, las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm y se inyectaron en un equipo HPLC (Waters, Acquity Arc), utilizando ácido D,L- $\alpha$ -aminobutírico como patrón interno y una columna de fase reversa de 300 mm  $\times$  3,9 mm. Los resultados fueron analizados a través del software Empower 3. La cuantificación del triptófano se determinó según el método descrito por Yust et al.<sup>17</sup> Todos los análisis se realizaron por triplicado y se presentaron como valores medios.

### Actividad de agua (Aw)

Este parámetro se determinó empleando un medidor de actividad de agua (VTSYIQI, WA-160A)

### Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante se evaluó utilizando el método DPPH a 517 nm<sup>18</sup>, empleando un espectrofotómetro (UV 1280 Vis Spectrophotometer Shimadzu, Kyoto, Japón). Las muestras de 15 mg se resuspendieron en 4,5 mL de una mezcla formada por metanol (1 mL), ácido acético (1,5 ML) y agua (2 mL), luego se agitaron en un vortex (WiseMix, VM-10) durante 1 minuto y se calentaron en un baño María (MEMMERT, WNB-22) por 20 min a 80 °C. Después, se agregaron 3,9 mL de solución de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), se agitaron en un vortex por 1 min y se dejó en reposo en oscuridad por 24 h. Los resultados se expresaron en µg trolox/g.

### Análisis sensorial

Se utilizó un panel de 30 personas, con edades entre 18 y 30 años, quienes calificaron los atributos de color, olor, textura, sabor y apreciación general. La prueba se realizó con base en una escala hedónica de 9 puntos (1 = Me disgusta y 9 = Me gusta).

### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. Las mediciones se determinaron por triplicado. Para el análisis de los resultados obtenidos, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95% mediante el software Minitab 19 (Minitab Inc., EE.UU.).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Optimización de la formulación

Según las variables de respuesta estimadas con el software Minitab 19 (Tabla 3), se empleó la herramienta de optimización de respuestas para determinar la formulación óptima, priorizando un contenido mínimo de humedad y un máximo de proteína. Como resultado, la hamburguesa plant-based optimizada (MO) debe contener 1,75 g de frejol negro y 0,47 g de cushuro, lo que permite obtener un contenido teórico de humedad de  $34,22 \pm 0,49\%$  y un contenido teórico de proteína de  $31,52 \pm 0,58\%$ , como se muestra en la Figura 1.

**Tabla 3.** Composición química promedio (%)

Formulaciones	Harina de cushuro (%) (X1)	Frejol negro (%) (X2)	Humedad (%)	Proteína (%)	Actividad de agua (a <sub>w</sub> )
M1	0	100	33,76 $\pm$ 3,0	31,79 $\pm$ 0,9	0,79 $\pm$ 0,01
M2	25	75	36,38 $\pm$ 1,9	2,14 $\pm$ 1,1	0,77 $\pm$ 0,01
M3	50	50	36,1 $\pm$ 0,6	33,81 $\pm$ 1,0	0,79 $\pm$ 0,01
M4	100	0	32,21 $\pm$ 2,6	30,25 $\pm$ 1,0	0,80 $\pm$ 0,01
M5	75	25	34,35 $\pm$ 1,0	31,23 $\pm$ 0,7	0,80 $\pm$ 0,01

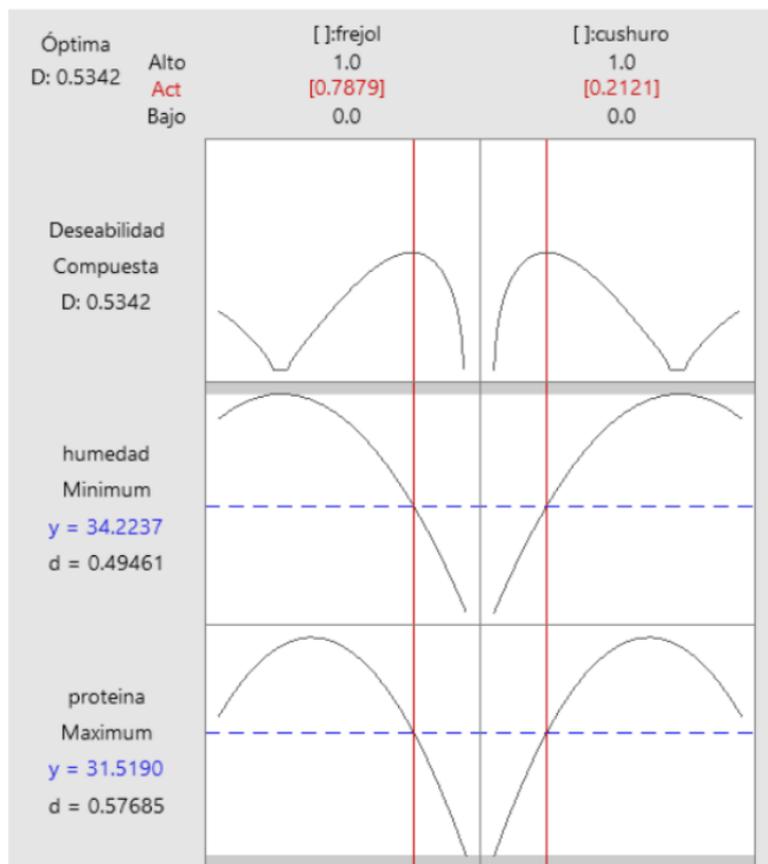


Figura 1. Gráfico de respuestas previstas

### Composición proximal

En la Tabla 4, se presenta la composición proximal de la muestra óptima (MO) y la muestra de control (MC).

**Tabla 4.** Composición proximal de la muestra optimizada

Muestra	% Proteína	% Humedad	% Grasa	% Ceniza	% Carbohidratos
MC	7,68 ± 1,40	38,40 ± 1,36	11,78 ± 0,78	3,62 ± 0,10	38,52 ± 2,20
MO	30,48 ± 0,93	36,19 ± 0,74	22,06 ± 1,80	2,37 ± 0,09	8,91 ± 1,58

De acuerdo con la Tabla 4, el contenido de proteína de la MO (30,48%) fue estadísticamente mayor que la MC (7,68%), debido al aporte proteico de la harina de tarwi (*Lupinus mutabilis*) y cushuro (*Nostoc sphaericum*)<sup>19</sup>. Además, fue superior a lo reportado por Hollweg et al. (11,30%)<sup>7</sup>, Gamarra et al. (13,13%)<sup>20</sup> y Biazotto et al. (13,55%)<sup>8</sup>, esto se debe a que dichos estudios utilizaron proporciones de agua del 10 al 15%, lo que generó una dilución y reducción de los nutrientes, como la proteína, en sus formulaciones<sup>7</sup>. El contenido de humedad de ambas muestras varió entre 36,19-38,40%, lo cual fue menor a lo reportado por Gamarra et al. (57,38%)<sup>20</sup>, quienes utilizaron insumos similares. El contenido de grasa de la MO (22,06%) fue superior que la MC (11,78%) y lo reportado por Gamarra et al. (10%)<sup>20</sup>; esto se debe al aporte de grasa del tarwi, el cual posee mayores cantidades de ácidos grasos monoinsaturados que poliinsaturados y

saturados<sup>21</sup>. El contenido de cenizas de la MC (3,62%) y MO (2,37%) fue menor a lo reportado por Gamarra et al. (8,85%)<sup>20</sup>, pero similar al de Hollweg et al. (2,5%)<sup>7</sup> y Biazotto et al. (2,69%)<sup>8</sup>.

### Perfil de aminoácidos

El perfil de aminoácidos de las muestras MC y MO (Tabla 5), muestra que los aminoácidos predominantes de la MO fueron el ácido aspártico ( $83,00 \pm 4,52$  mg/g proteína), serina ( $57,35 \pm 4,38$  mg/g proteína) y ácido glutámico ( $196,16 \pm 4,77$  mg/g proteína), en comparación con la MC. La proteína del tarwi contiene altos niveles de ácido glutámico y arginina, pero es deficiente en triptófano, resultado que coincide con lo reportado por Camarena et al. ( $0,7$  mg/g proteína)<sup>22</sup> y con el contenido de triptófano de la muestra óptima ( $5,41 \pm 0,88$  mg/g proteína)<sup>23</sup>. Si bien el perfil de aminoácidos esenciales de la MO se ajusta a la cantidad recomendada de la FAO/OMS para una nutrición saludable, presenta limitaciones en tirosina ( $21,02 \pm 2,80$  mg/g proteína), metionina ( $11,66 \pm 0,41$  mg/g proteína) y triptófano ( $5,41 \pm 0,88$  mg/g proteína)<sup>24</sup>. En cambio, la MC cumple con dichas recomendaciones, a excepción de la tirosina ( $33,82 \pm 2,86$  mg/g proteína), lo que sugiere realizar mezclas de pseudocereales andinos (quinua, kiwicha) y leguminosas (tarwi), para mejorar el cómputo aminoacídico y la calidad biológica de la proteína<sup>19</sup>.

**Tabla 5.** Perfil de aminoácidos de la muestra de control (MC) y la muestra hamburguesa optimizada (MO)

Aminoácidos	mg de aminoácidos/ g proteína		
	MC	MO	FAO
Ácido aspártico	$74,70 \pm 2,69$	$83,00 \pm 4,52$	
Ácido glutámico	$112,25 \pm 3,07$	$196,16 \pm 4,77$	
Serina	$44,24 \pm 3,81$	$57,35 \pm 4,38$	
Histidina	$14,21 \pm 3,71$	$22,34 \pm 2,63$	15
Glicina	$45,97 \pm 3,29$	$37,26 \pm 3,68$	
Treonina	$45,36 \pm 4,01$	$40,63 \pm 4,37$	23
Arginina	$147,37 \pm 2,28$	$145,91 \pm 4,75$	
Alanina	$28,52 \pm 4,72$	$4,33 \pm 0,70$	
Prolina	$62,66 \pm 3,41$	$60,60 \pm 4,32$	
Tirosina	$33,82 \pm 2,86$	$21,02 \pm 2,80$	38
Amoniaco	$44,10 \pm 2,97$	$46,13 \pm 3,38$	
Valina	$78,73 \pm 4,71$	$45,86 \pm 3,87$	39
Metionina	$21,81 \pm 3,18$	$11,66 \pm 0,41$	22
Cisteína	$4,40 \pm 0,73$	$4,99 \pm 0,64$	
Isoleucina	$39,61 \pm 2,30$	$43,44 \pm 4,26$	30
Leucina	$89,33 \pm 3,06$	$83,42 \pm 4,45$	59
Fenilalanina	$61,03 \pm 3,83$	$44,39 \pm 4,12$	
Lisina	$45,16 \pm 3,99$	$46,18 \pm 4,16$	45
Triptófano	$6,96 \pm 0,95$	$5,41 \pm 0,88$	6

### Antioxidantes y actividad de agua

En la Tabla 6 se muestran los resultados de la actividad antioxidante y actividad de agua. Los resultados obtenidos indican que la MO presentó una actividad antioxidante de 1502,19  $\mu\text{g}$  trolox/g, la cual fue superior que la MC (1285,01  $\mu\text{g}$  trolox/g) y lo reportado por Kołodziejczak et al. (307,86  $\mu\text{g}$  trolox/g), esto se debe a la baja incorporación de compuestos antioxidantes en su formulación de hamburguesa vegetal a base de papa con aceite de oliva<sup>25</sup>. Sin embargo, fue inferior a lo reportado por Abdullah et al. (2044,87  $\mu\text{g}$  trolox/g) en su elaboración de hamburguesas a base soya<sup>26</sup>; esto se debe a la reducción de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante del tarwi durante el proceso de desamargado y cocción para su conversión en harina, ya que algunos antioxidantes son solubles en agua y sensibles a temperaturas de elevadas<sup>27</sup>. No obstante, la presencia de niveles significativos de antioxidantes de la MO sugiere su potencial como alimentos funcionales, capaces de contribuir a la prevención de enfermedades crónicas asociadas con el estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas<sup>28</sup>.

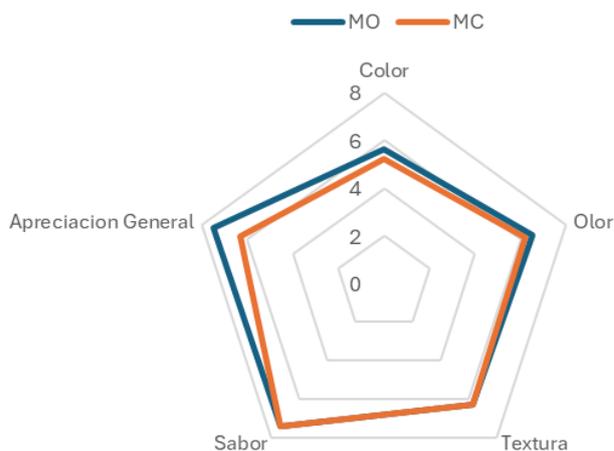
**Tabla 6.** Resultados de antioxidantes y actividad de agua

Muestra	DPPH ( $\mu\text{g}$ trolox/g)	Actividad de agua ( $a_w$ )
MO	1502,19	0,79
MC	1285,01	0,81

La  $a_w$  de la MO y la MC son de 0,79 y 0,81, respectivamente, sin diferencias significativas entre sí ( $p > 0,05$ ). Los alimentos con un  $a_w$  mayor a 0,6 son microbiológicamente inestables, ya que la mayor cantidad de agua libre facilita el crecimiento de microorganismos como bacterias, mohos y levaduras; a su vez, provoca una vida útil más corta debido al deterioro microbiológico que afectan la calidad sensorial del producto<sup>29</sup>. Por ello, es necesario almacenar las hamburguesas plant-based a temperatura de enfriamiento (4 °C) o congelación (-18 °C) de acuerdo con las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

### Análisis sensorial

Los resultados del análisis sensorial se muestran en la Figura 2. La textura y el color mostraron poca variación al comparar la MC con la MO. Aunque todas las hamburguesas contenían muy poca humedad, la muestra de control fue la menos preferida por el sabor ( $4,56 \pm 0,45$ ) así como la textura ( $4,26 \pm 0,51$ ). En contraste, la MO tuvo un mejor sabor ( $8,49 \pm 0,51$ ) y color ( $8,66 \pm 0,81$ ), fue descrita como más “sabrosa” por los panelistas. En resumen, las hamburguesas tuvieron una aceptabilidad del 86,67%, considerando valores iguales o superiores a cinco (6,7). La MO fue la más aceptada por los panelistas con una puntuación de  $7,46 \pm 0,31$ . Este resultado fue similar con lo reportado por Hollweg et al. para hamburguesas vegetales de proteína de soya texturizada<sup>7</sup>.



**Figura 2.** Análisis sensorial de las muestras MO y MC

## CONCLUSIONES

Los resultados mostraron que la hamburguesa plant-based optimizada (MO), elaborada a partir de harina de tarwi (45%), frejol negro (8,75%) y cushuro (2,35%), presentó un alto contenido de proteína ( $30,48 \pm 0,93\%$ ), grasas ( $22,06 \pm 1,80\%$ ) y antioxidantes ( $1502,19 \mu\text{g trolox/g}$ ) en comparación con la muestra de control (MC) y los resultados de estudios anteriores sobre hamburguesas elaboradas con ingredientes similares. Además, la MO presentó un perfil balanceado de aminoácidos esenciales de acuerdo con la cantidad recomendada de la FAO/OMS, siendo mayoritarios el ácido glutámico, arginina, ácido aspártico, prolina, leucina y serina. La evaluación sensorial indicó que los panelistas valoraron favorablemente los atributos de sabor, textura y apariencia de la MO en comparación con la muestra de control (MC), posicionándola como una opción atractiva tanto a consumidores vegetarianos y veganos como para aquellos que buscan opciones sostenibles y saludables. La propuesta resalta el valor de los superalimentos andinos, como el tarwi y el cushuro en el desarrollo de productos innovadores, promoviendo su aprovechamiento y su incorporación en soluciones alimenticias alineadas con las tendencias actuales de sostenibilidad y funcionalidad.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Laboratorio de Alimentos Funcionales de la Universidad de Lima por su asesoramiento en el uso de los equipos de laboratorio y en el análisis de las muestras para el desarrollo de este trabajo de investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pantoja-Tirado L, Prieto-Rosales G, Aguirre E. Caracterización de la harina de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y la harina de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) para su industrialización. Rev Tayacaja. 2020 Jun 30;3(1): 76-83. doi:10.46908/rict.v3i1.72

2. Huaranga-Joaquín A, García-Bendezú S, Pinedo-Taco R, Camarena-Mayta F. Caracterización de las unidades de producción de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Trop Subtrop Agroecosyst. 2023 Sep 1;26(3). doi:10.56369/tsaes.4722.
3. Kaur A, Kaur P, Singh N, Viridi AS, Singh P, Rana JC. Grains, starch and protein characteristics of rice bean (*Vigna umbellata*) grown in Indian Himalaya regions. Food Res Int. 2013 Nov 1;54(1):102–10. doi:10.1016/j.foodres.2013.05.019.
4. Saakshi, Thakur CL, Bhardwaj DR, Sharma U, Bhatia AK, Sharma S, et al. Growth and yield responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to tree lopping and organic manure under Morus-based agri-silvicultural system. Trees For People. 2025 Mar 1;19:100745. doi:10.1016/j.tfp.2024.100745.
5. Chasquibol N, Sotelo A, Tapia M, Alarcon R, Goycoolea FM, Hernández-Álvarez AJ. Evaluation of cushuro (*Nostoc sphaericum*) as an alternative source of minerals, functional protein and bioactive peptides. LWT. 2025 Feb 1;217:117426. doi:10.1016/j.lwt.2025.117426.
6. Ramírez-Rodrigues MM, Estrada-Beristain C, Metri-Ojeda J, Pérez-Alva A, Baigts-Allende DK. *Spirulina platensis* protein as sustainable ingredient for nutritional food products development. Sustainability (Switzerland). 2021 Jun 2;13(12): 6849. doi:10.3390/su13126849.
7. Hollweg G, Trindade PCO, dos Santos BA, Padilha M, Fracari PR, Rosa SC, et al. Development of Plant-Based Burgers with Partial Replacement of Texturized Soy Protein by *Agaricus bisporus*: Effects on Physicochemical and Sensory Properties. Foods. 2024 Nov 1;13(22):3583. doi:10.3390/foods13223583.
8. Biazotto KR, Xavier ACH, de Mattos RR, Furlan JM, Wagner R, Bandoni DH, et al. Plant-Based Burgers in the Spotlight: A Detailed Composition Evaluation and Comprehensive Discussion on Nutrient Adequacy. Foods. 2025 Jan 23;14(3):372. doi: 10.3390/foods14030372.
9. Koyande AK, Chew KW, Rambabu K, Tao Y, Chu DT, Show PL. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. Food Sci Hum Wellness. 2019 Mar 1;8(1):16–24. doi:10.1016/j.fshw.2019.03.001.
10. Naciones Unidas. El fuerte crecimiento poblacional supondrá un reto para lograr un desarrollo sostenible [Internet]. Naciones Unidas. [consultado 12 dic 2024]. Disponible en: <https://www.un.org/es/desa/commission-on-population-and-development52>
11. el Bilali H, Callenius C, Strassner C, Probst L. Food and nutrition security and sustainability transitions in food systems. Food Energy Secur. 2019;8(2):e00154. doi:10.1002/fes3.154.
12. Julianti E, Susanti, Singgih M, Neti Mulyani L. Optimization of extraction method and characterization of phycocyanin pigment from *Spirulina platensis*. J Math Fund Sci. 2019;51(2):168–76. doi:10.5614/j.math.fund.sci.2019.51.2.6.
13. FAO. Beneficios de las legumbres para la salud. [Internet].2016.[consultado 15 dic 2024]. Disponible en: [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/pulses2016/docs/factsheets/Health\\_SP\\_PRINT.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/pulses2016/docs/factsheets/Health_SP_PRINT.pdf)
14. Castañeda P, Chasquibol N. Development of Instant Puree from Native Potatoes (*Solanum andigenum*) and Black Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) Fortified with Black Quinoa (*Chenopodium quinoa*). Biol Life Sci Forum. 2024;37(1):7. doi: 10.3390/blsf2024037007.

15. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., USA: AOAC International; 2005: 1(18):2-45.
16. Chasquibol N, Gonzales BF, Alarcón R, Sotelo A, Márquez-López JC, Rodríguez-Martin NM, et al. Optimisation and Characterisation of the Protein Hydrolysate of Scallops (*Argopecten purpuratus*) Visceral By-Products. *Foods*. 2023 May 15;12(10):2003. doi: 10.3390/foods12102003.
17. Yust MM, Pedroche J, Girón-Calle J, Vioque J, Millán F, Alaiz M. Determination of tryptophan by high-performance liquid chromatography of alkaline hydrolysates with spectrophotometric detection. *Food Chem*. 2004 Apr 1;85(2):317–20. doi:10.1016/j.foodchem.2003.07.026.
18. Chasquibol N, Alarcón R, Gonzales BF, Sotelo A, Landoni L, Gallardo G, et al. Design of Functional Powdered Beverages Containing Co-Microcapsules of Sacha Inchi *P. huayllabambana* Oil and Antioxidant Extracts of Camu Camu and Mango Skins. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jul 22;11(8):1420. doi: 10.3390/antiox11081420.
19. Apaza Ahumada MG. Efecto del consumo de cultivos andinos quinua, cañihua y tarwi sobre el incremento de peso y nitrógeno retenido en ratas wistar. *Rev Investig Altoandin*. 2019 Jul 31;21(3):194–204. doi:10.18271/ria.2019.477.
20. José GCO. Diseño de un sucedáneo de hamburguesa a partir de proteína de origen fúngico (*Aspergillus oryzae*) [Internet]. Repositorio Institucional Séneca, Universidad de los Andes. 2022. [consultado 10 nov 2024]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/1992/55486>
21. Ortiz-Sempértegui J, Ibieta G, Tullberg C, Peñarrieta JM, Linares-Pastén JA. Chemical Characterisation of New Oils Extracted from Cañihua and Tarwi Seeds with Different Organic Solvents. *Foods*. 2024 Jun 24;13(13):1982. doi: 10.3390/foods13131982.
22. Camarena F. Revalorización de un cultivo subutilizado: Chocho o Tarwi, (*Lupinus mutabilis* Sweet). Lima, Perú: UNALM; 2012.
23. Chirinos-Arias. Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) una planta con potencial nutritivo y medicinal. *Rev Bio Ciencias*. 2015;3(3):163–72. doi:10.15741/revbio.03.03.03.
24. Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition. WHO Tech Rep Ser. 935. Geneva, Switzerland: WHO; 2007.
25. Kołodziejczak K, Onopiuk A, Szpicier A, Poltorak A. The Effect of Type of Vegetable Fat and Addition of Antioxidant Components on the Physicochemical Properties of a Pea-Based Meat Analogue. *Foods*. 2023 Dec 24;13(1):71. doi: 10.3390/foods13010071.
26. Abdullah FAA, Dordevic D, Kabourkova E, Zemancová J, Dordevic S. Antioxidant and Sensorial Properties: Meat Analogues versus Conventional Meat Products. *Processes*. 2022 Sep 1;10(9): 1864. doi:10.3390/pr10091864.
27. Jiménez-Martínez C, Hernández-Sánchez H, Dávila-Ortiz G. Diminution of quinolizidine alkaloids, oligosaccharides and phenolic compounds from two species of *Lupinus* and soybean seeds by the effect of *Rhizopus oligosporus*. *J Sci Food Agric*. 2007 May;87(7):1315–22. doi:10.1002/jsfa.2851.
28. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005 Mar 23;53(6):1841-56. doi: 10.1021/jf030723c.
29. Thwe SY, Au DJE, Tan KL, Neo YP, Chew LY. Development of Plant-Based Burger Patties Using Vegan Staples Like Tofu and Tempeh: An Exploration Study Among the Young Adults. *J Culin Sci Technol*. 2024; 1–15. doi:10.1080/15428052.2024.2356840

# EXTRACCIÓN ÓPTIMA MULTI-RESPUESTA DE POLIFENOLES PRESENTES EN ORUJO DE UVA BAJO CONDICIONES SUBCRITICAS

Nilton César León Calvo<sup>a\*</sup>, Karol Cecilia Torres Ramírez<sup>b</sup>, Erik Edwin Allcca Alca<sup>b</sup>, Nils Leander Huaman Castilla<sup>b</sup>

## RESUMEN

El orujo de uva es un residuo agroindustrial con importantes concentraciones de polifenoles, así como de azúcares reductores; los cuales limitan su uso en el desarrollo de alimentos nutraceuticos. Por ello, el objetivo fue evaluar el efecto de la composición del solvente (etanol: 20 – 60%) y temperatura (100 - 160°C) sobre la recuperación de polifenoles y contenido de azúcares a partir de orujo de uva mediante un proceso de extracción subcrítica. Para tal fin, la muestra fue acondicionada dentro de un sistema de extracción por líquidos presurizados. Luego, mediante un diseño central compuesto se establecieron las condiciones óptimas de extracción (temperatura y etanol) para maximizar el contenido de polifenoles con mínima presencia de azúcares reductores (glucosa). Los incrementos en la concentración de etanol (20 - 60%) y altas temperaturas mejoran la recuperación de polifenoles; mientras que la presencia de etanol reduce la extracción de azúcares reductores. Contrariamente, los incrementos de temperatura incrementan la presencia de compuestos no deseados (glucosa). El proceso de optimización permitió maximizar la recuperación de polifenoles con un mínimo contenido de glucosa, cuyos parámetros fueron fijados a 141.9°C con 60.3% de etanol. Por ello, el uso de etanol permite no solo mejorar la recuperación de polifenoles, sino también reduce la presencia de azúcares reductores. Asimismo, la optimización de respuesta múltiple es una técnica que permite maximizar la obtención de compuestos antioxidantes con mínima presencia de compuestos no deseados.

**Palabras clave:** Orujo de uva, extracción líquido presurizada, polifenoles, glucosa, optimización de respuesta múltiple.

## OPTIMAL MULTI-RESPONSE EXTRACTION OF POLYPHENOLS PRESENT IN GRAPE POMACE UNDER SUBCRITICAL CONDITIONS

### ABSTRACT

Grape pomace is an agroindustrial residue with significant concentrations of polyphenols and reducing sugars, which limit its use in developing nutraceuticals. Therefore, the objective was to evaluate the effect of solvent composition (ethanol: 20–60%) and temperature (100–160°C) on polyphenols and sugar content recovery from grape pomace using a subcritical extraction process. To this end, the sample was conditioned within a

---

<sup>a\*</sup> Doctorado en Ciencias Ambientales, Escuela de Posgrado, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Av. Miraflores S/N, Apartado Postal 316, Tacna, Perú. \*niltoncesarleon@gmail.com

<sup>b</sup> Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional de Moquegua

pressurized liquid extraction system. Optimal extraction conditions (temperature and ethanol) were then established using a central composite design to maximize polyphenol content with minimal reducing sugars (glucose). Increased ethanol concentration (20–60%) and high temperatures improve polyphenol recovery, while the presence of ethanol reduces the extraction of reducing sugars. Conversely, temperature increases increase the presence of undesirable compounds (glucose). The optimization process maximized polyphenol recovery with minimal glucose content, with parameters set at 141.9°C with 60.3% ethanol. Therefore, using ethanol not only improves polyphenol recovery but also reduces the presence of reducing sugars. Furthermore, multiple response optimization is a technique that maximizes the yield of antioxidant compounds with minimal presence of undesirable compounds.

**Keywords:** Grape pomace, pressurized liquid extraction, polyphenols, glucose, multiple-response optimization.

## INTRODUCCIÓN

La industria vitivinícola genera residuos orgánicos tales como bagazos, semillas, cascarras, raspones y hojas, los cuales son derivados del procesamiento del vino (1). Estos residuos representan un problema de gestión ambiental debido a la generación de gases de efecto invernadero, así como la contaminación del agua y suelos de las zonas donde se acumulan (2). En particular, el orujo de uva es un residuo compuesto de cascarras y semillas obtenidos después de la fermentación del vino (3) y es considerado una fuente natural rica en compuestos polifenólicos (4).

Los polifenoles son un grupo diverso de compuestos presentes en diversas matrices vegetales, cuya estructura química presenta múltiples grupos hidroxilo unidos a estructuras aromáticas (5). Estos compuestos presentan propiedades bioactivas que ayudan en el tratamiento y prevención de enfermedades crónicas (6). Sin embargo, los métodos de extracción que permitan obtener extractos ricos en polifenoles para aplicaciones alimentarias y farmacéuticas aún son objeto de investigación (7).

Si bien existen diversas técnicas de extracción bajo condiciones atmosféricas que permiten recuperar compuestos fenólicos; estos métodos requieren prolongados tiempos de proceso, grandes cantidades de solvente, así como el uso de solventes tóxicos (metanol, hexano) con bajos rendimientos de recuperación en los compuestos de interés (8). Esto limita el uso de los extractos en futuras aplicaciones alimentarias, así como su escalamiento a nivel industrial (9). Contrariamente, la extracción por líquidos presurizados (ELP) es una técnica emergente amigable con el medio ambiente que trabaja bajo condiciones subcríticas (10). Esta técnica reduce ampliamente los tiempos de proceso y superan los rendimientos de compuestos de interés en comparación con las técnicas de extracción atmosféricas (11).

Existen trabajos en ELP que reportan parámetros óptimos de proceso como temperatura y concentración de etanol sobre la recuperación de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y algunos compuestos interferentes como hidroximetilfurfural (HMF) y metales pesados a partir de frutas y hortalizas (12,13).

Si bien existe mucha información sobre parámetros óptimos de extracción, estos no consideran el análisis de respuesta múltiples que permitan determinar condiciones óptimas que maximicen el contenido de compuestos antioxidantes y minimicen la

presencia de compuestos interferentes. Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar bajo condiciones subcríticas, el efecto del uso de mezclas agua-etanol y temperatura sobre el contenido de polifenoles y azúcares reductores a partir de semilla de orujo de uva. Además, mediante un diseño central compuesto se determinó las condiciones óptimas de extracción considerando respuestas múltiples.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materia prima

~20 kg de orujo de uva de la variedad negra criolla fueron recolectados de la bodega Antonio Biondi e Hijos, Moquegua, Perú. El orujo fue transportado al Laboratorio de Extracción de Compuestos de Alto Valor (LECAV) de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Moquegua. Luego, las muestras fueron congeladas inmediatamente a -20 °C. Posteriormente, las muestras fueron molidas hasta obtener un tamaño de partícula de 2 mm utilizando un molino de pulso Bosch TSM6A013B (Alemania).

### Extracción de polifenoles

5 g de semilla de orujo y 40 g de tierra diatomea fueron mezcladas y colocadas en una celda de extracción de 100 mL dentro del Sistema de Extracción de Líquidos Presurizados (ASE Dionex, Thermofisher, San José, California, USA). Las condiciones de proceso fueron fijadas de 100 a 160°C combinadas con concentraciones de etanol de 20 a 60%. Estos parámetros fueron fijados con 10 atm de presión, con un tiempo de extracción de 5 minutos y 250 segundos de purga de nitrógeno. Los extractos obtenidos fueron almacenados a -20°C en envases ámbar para futuros análisis.

Para encontrar las condiciones óptimas del proceso de extracción, se utilizó un diseño Central Compuesto (DCC), el cual fue establecido en las condiciones óptimas del proceso (posible zona de curvatura), donde las variables independientes fueron la temperatura ( $x_1$ ) y concentración de etanol ( $x_2$ ). La matriz del diseño incluyó un total de 11 tratamientos, de los cuales 4 fueron en condiciones axiales, 4 en condiciones factoriales y 3 fueron en el punto central (Tabla 1).

El procesamiento y análisis de los datos se llevaron a cabo mediante el programa Statgraphics Plus 4.0 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Esto permitió encontrar superficies tridimensionales para cada respuesta en particular (contenido de polifenoles y azúcares). Se evaluaron los efectos de las variables independientes sobre las variables dependientes, y se establecieron regresiones lineales de primer orden o segundo orden según el ajuste de mínimos cuadrados, según el siguiente modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \mathcal{E}$$

Donde: Y es la respuesta (cantidad de polifenoles o azúcares extraídos);  $X_1$  es la temperatura codificada;  $X_2$  es la concentración de etanol codificada;  $\beta$  son los coeficientes del modelo y  $\mathcal{E}$  es el error experimental.

Finalmente, Para encontrar un óptimo de las condiciones de extracción que permitieran la mayor recuperación de polifenoles con concentraciones mínimas de azúcares, se aplicó el enfoque de superficie de respuesta utilizando la función de deseabilidad. La deseabilidad ( $d$ ) se calculó usando la Ecuación 1, donde se buscaba una respuesta máxima prevista para el contenido de polifenoles. La Ecuación 2 se utilizó para la respuesta prevista en el contenido de azúcares donde se deseaba un valor mínimo ( $U$ ).

$$d = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{y} < L \\ \left(\frac{\hat{y}-L}{T-L}\right), & \text{si } L \leq \hat{y} \leq T \\ 1 & \text{si } \hat{y} > T \end{cases} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$d = \begin{cases} 1 & \text{si } \hat{y} < T \\ \left(\frac{U-\hat{y}}{U-T}\right), & \text{si } T \leq \hat{y} \leq U \\ 0 & \text{si } \hat{y} > U \end{cases} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $T$  y  $L$  representan los valores objetivo para la respuesta prevista más alta y más baja dentro del espacio temperatura y concentración de etanol, dependiendo de si se había establecido un valor mínimo o máximo deseado.  $\hat{y}$  representa las respuestas previstas que se derivaran de las regresiones múltiples calculadas anteriormente para cada superficie de respuesta individual.

**Tabla 1.** Matriz para el diseño compuesto central (DCC)

Niveles del diseño		Niveles experimentales		Variables respuesta	
$x_1$	$x_2$	T °C	Etanol %	$y_1$	$y_2$
-1	-1	100	20		
-1	1	100	60		
1	-1	160	20		
1	1	160	60		
-1.414	0	87.57	40		
1.414	0	172.43	40		
0	-1.414	130	11.72		
0	1.414	130	68.28		
0	0	130	40		
0	0	130	40		
0	0	130	40		

Donde:  $y_1$  es el contenido total de polifenoles;  $y_2$  es el contenido de azúcares

### Determinación de Polifenoles Totales

La determinación del contenido de compuestos fenólicos se realizó con el reactivo Folin Ciocalteu, siguiendo el método de Singleton et al. (14), En resumen, un volumen de 3.75 mL de agua destilada, 0.5 mL de muestra y 0.25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (1N) se mezclaron con 0.5 mL de una solución de carbonato de sodio (10% p / v). Luego, la absorbancia se medirá a 765 nm (Espectrómetro UV-Vis Genesys 150, Thermofisher, San José, CA, USA) después un tiempo de reacción de 1 h a temperatura ambiente. Los resultados se expresarán en mg EAG (equivalente de ácido gálico) por gramo de sólido seco.

### Determinación de azúcares reductores

Se cuantificó glucosa siguiendo el procedimiento propuesto por Wilson et al. (15). Primeramente, se realizó la filtración de los extractos de algas pardas con una jeringa acoplada con un filtro de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ , insertando las muestras en viales ámbar de 1,5 mL. El análisis se ejecutó utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplado con un detector de índice de refracción (IR) a 35 °C. El equipo inyectó 1  $\mu\text{L}$  de muestra pretratada a un flujo de 0,75 mL/min. La fase móvil consistió en una mezcla de Acetonitrilo/agua (75/25%), se trabajó en modalidad isocrática. La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna Luna® 5  $\mu\text{m}$  NH2 100 Å. Las concentraciones se hallaron de acuerdo con las curvas de calibración (10 mg/mL – 50 mg/mL) de glucosa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la composición del solvente y temperatura sobre la recuperación de polifenoles.

Los extractos obtenidos mediante condiciones subcríticas presentaron concentraciones de polifenoles que varían de 0.23 a 1.89 mg EAG/ gss (Tabla 2). De acuerdo con nuestros resultados los incrementos de temperatura y etanol presentaron un efecto positivo en la recuperación de polifenoles totales (Tabla 2). Por ejemplo, el uso de 20% de etanol con un incremento de 100 a 160 °C permitió recuperar 3 veces más contenido de polifenoles; mientras que el uso de 60% de etanol con incrementos de 100 a 160°C recupero 2.8 veces más contenido de estos compuestos bioactivos (Tabla 2). Además, el análisis de varianza mostro que la los efectos principales (temperatura y etanol) tuvieron un efecto significativo sobre el contenido de polifenoles ( $P < 0.0001$ ), así como la interacción de ambos factores (temperatura x etanol) tuvieron efecto significativo sobre la variable respuesta ( $P < 0.001$ ).

Comportamientos similares fueron reportados por Huaman et. al. (16) quienes encontraron que los incrementos de temperatura de 90 a 150°C con agua pura y 30% de etanol mejora en 14 y 37% la recuperación de polifenoles. Mariotti et. al. (13) observaron que los incrementos de temperatura de 60 a 90°C mejora en 16 y 28% la recuperación de polifenoles con agua pura y 15% de etanol. Bajo condiciones subcríticas, las altas temperaturas aceleran la energía cinética del solvente, favoreciendo la ruptura de la matriz vegetal (17); consecuentemente los polifenoles son liberados. Además, el uso de etanol permita una mayor solubilidad de los polifenoles debido a la presencia de dos fracciones

polar y no polar en su estructura química, los cuales interactúan con los grupos hidroxilo y aromáticos de los polifenoles, respectivamente (18).

**Tabla 2.** Caracterización química de los extractos obtenidos bajo condiciones subcríticas (ELP).

Etanol (%)	Temperatura (°C)	Contenido de polifenoles (mg EAG/g ss)	Contenido de glucosa (mg/g ss)
130	40	0.685	3.11
100	20	0.36	4.68
160	20	1.36	8.16
100	60	0.78	2.16
160	60	0.91	5.46
130	40	0.71	3.26
87.5736	40	0.21	1.26
172.426	40	1.84	11.04
130	11.7157	0.53	3.18
130	68.2843	0.81	4.86
130	40	0.74	3.21
130	40	0.65	3.09
100	20	0.42	4.92
160	20	1.515	11.34
100	60	0.82	2.52
160	60	1.89	9.09
130	40	1.04	3.12
87.5736	40	0.23	1.38
172.426	40	1.78	10.68
130	11.7157	0.54	3.24
130	68.2843	0.85	5.1
130	40	0.68	3.11

Los valores de contenido de polifenoles y contenido de glucosa son el promedio de 3 repeticiones (n= 3). Las desviaciones estándar varían entre 0.02 y 0.09 para polifenoles totales y entre 0.085 y 0.254 para el contenido de glucosa.

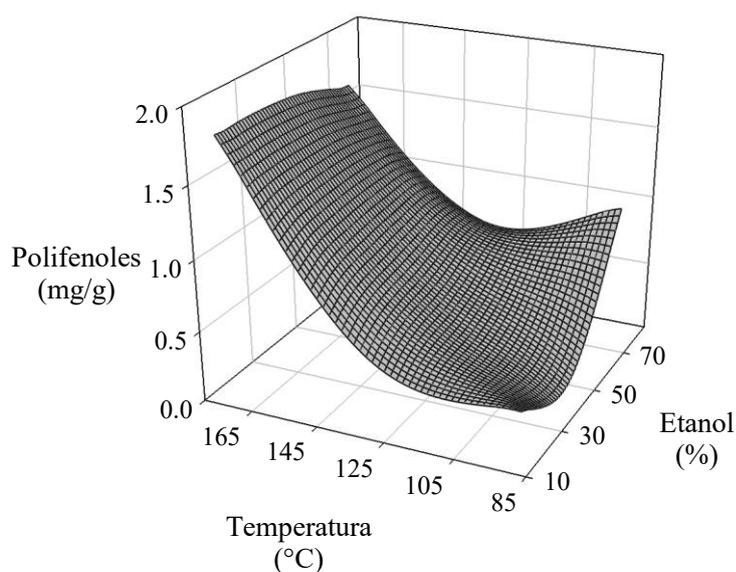
Para explicar el efecto de la temperatura y etanol sobre el contenido de polifenoles, un modelo predictivo de superficie de respuesta fue establecido, el cual cuantifica la relación entre una variable dependiente (CPT) y dos variables independientes (T y E) mediante una ecuación cuadrática (Tabla 3). La inclusión de términos lineales, cuadráticos y de interacción permite modelar efectos no lineales y sinérgicos entre la temperatura y la concentración de etanol sobre la respuesta. Los coeficientes asociados a cada término indican la dirección y magnitud de esta influencia. Por ejemplo, los coeficientes negativos de los términos lineales sugieren una disminución de la respuesta al aumentar individualmente la temperatura o la concentración de etanol, mientras que los términos cuadráticos positivos señalan una posible curvatura en la superficie de respuesta para ambas variables (T y E). La presencia en el modelo de la interacción (TxE) implica que

el efecto de la temperatura sobre la respuesta está condicionado por la concentración de etanol (Tabla 3).

**Tabla 3.** Modelos predictivos del comportamiento del efecto de la temperatura y composición del solvente sobre las respuestas (contenido de polifenoles y azúcares reductores) de los extractos obtenidos.

Respuesta	Modelo	R <sup>2</sup>
Contenido de polifenoles (CPT)	$Y_1 = 4.5224 - 0.0765 \times T - 0.0105 \times E + 0.0003 \times T^2 + 0.0001 \times T \times E + 0.0008 \times E^2$	0.9876
Contenido de azúcares reductores	$Y_2 = 3.4325 + 0.3034 \times T - 0.0798 \times E - 0.0011 \times T^2 - 0.001 \times T \times E + 0.0012 \times E^2$	0.9745

La superficie de respuesta muestra el efecto de la interacción sinérgica entre la temperatura (100 - 160°C) y la concentración de etanol (20 - 60%) sobre la extracción de polifenoles (Figura 1). La respuesta no sigue una tendencia lineal con respecto a las variables independientes, cuyo rendimiento de polifenoles mejora con el incremento de temperatura y concentraciones de etanol (>30%). Interesantemente, las bajas concentraciones de etanol no favorecen una mayor extracción de compuestos fenólicos (Figura 1). Si bien las condiciones óptimas fueron establecidas con 160°C y 60% de etanol, es necesario analizar los datos con la presencia de compuestos no deseados como los azúcares reductores (glucosa) con la finalidad de establecer condiciones de proceso que garanticen una máxima recuperación de polifenoles con una menor presencia de azúcares reductores.



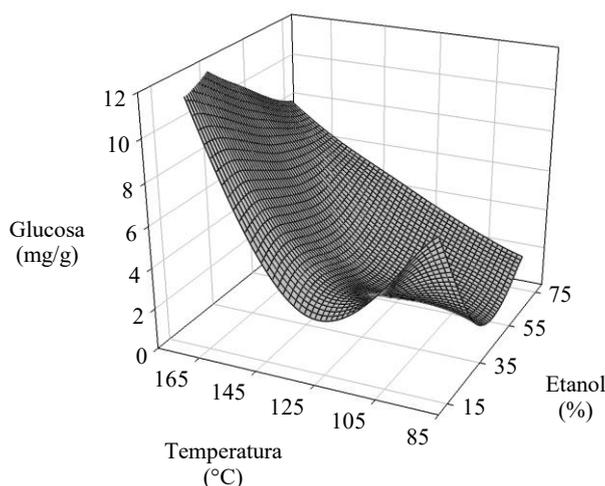
**Figura 1.** Superficie de respuesta del efecto de la composición de solvente y temperatura sobre el contenido de polifenoles.

### **Efecto de la composición del solvente y temperatura sobre la recuperación de compuestos no deseados (azúcares reductores).**

Bajo condiciones subcríticas, el contenido de azúcares reductores presentes en los extractos varía de 1.26 a 11.34 mg/gss (Tabla 2). De acuerdo con nuestros resultados los incrementos de temperatura mejoran la recuperación de azúcares; contrariamente, la presencia de etanol tiene un efecto negativo sobre estos compuestos (Tabla 2). Por ejemplo, los cambios incremento de 100 a 160 °C permite incrementar en 75 y 35% la recuperación de azúcares con 20 y 60% de etanol, respectivamente (Tabla 2). El análisis de varianza mostro que el efecto positivo de la temperatura ( $P < 0.0005$ ) y efecto negativo del contenido de etanol ( $P < 0.002$ ); mientras la interacción de ambos factores presento un efecto significativo sobre la variable respuesta (contenido de azúcares) ( $P < 0.0012$ ). Mariotti et. al. (13) demostró que los incrementos de etanol en la composición del solvente de extracción de 0 a 15% a 90°C reducen la presencia en el contenido de glucosa en 18%. Mamani-Parí et. al. (18) demostraron que la presencia de etanol a altas temperaturas reduce la presencia de azúcares reductores en los extractos obtenidos. Bajo condiciones subcríticas, la polaridad del solvente es reducida drásticamente, limitando la formación de puentes hidrogeno (19,20); consecuentemente es probable que las interacciones de los azúcares con las moléculas de agua se reduzca limitando su solubilidad y extracción.

El modelo predictivo de superficie de respuesta muestra la relación entre el contenido de azúcares y dos variables independientes temperatura (T) y etanol (E) mediante una ecuación cuadrática (Tabla 3). Los términos lineales, cuadráticos y de interacción permite modelar efectos no lineales y sinérgicos entre la temperatura y la concentración de etanol sobre la respuesta. Los coeficientes positivos indican que los incrementos de temperatura favorecen la recuperación de azúcares, mientras que los términos negativos lineales sugieren que la presencia de etanol disminuye la presencia de azúcares (Tabla 3).

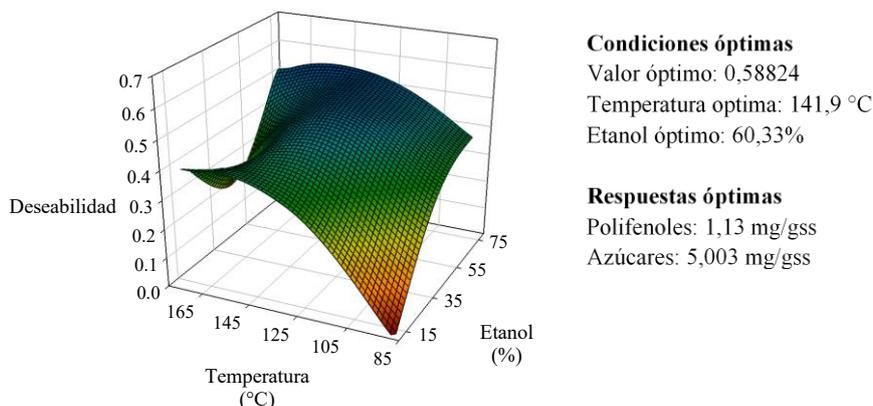
La superficie de respuesta (Figura 2) muestra la influencia significativa de la temperatura (100 - 160 °C) y la concentración de etanol (20 - 60%) sobre la obtención de glucosa (1.23 – 11.34 mg/g). Existe una tendencia general a la disminución en la recuperación de glucosa a medida que la concentración de etanol incrementa. En contraste, Las altas temperaturas favorecen una mayor extracción de glucosa. La superficie muestra una pendiente descendente desde la región de baja temperatura y baja concentración de etanol hacia la región de alta temperatura y alta concentración de etanol. Esto sugiere que para optimizar el rendimiento de glucosa se deben considerar temperaturas intermedias (125°C) con altas concentraciones de etanol (30%).



**Figura 2.** Superficie de respuesta del efecto de la composición de solvente y temperatura sobre el contenido de polifenoles.

### Optimización de respuestas múltiples

Como se describió previamente, la recuperación de polifenoles mejora a temperaturas más altas. Sin embargo, la extracción de azúcares reductores como la glucosa también se acelera a temperaturas más altas; mientras la presencia de etanol reduce la presencia de estos compuestos no deseados. Entonces, si consideramos ambas respuestas (polifenoles y azúcares) de manera individual no existe una condición de extracción óptima que satisfaga los criterios de obtener un extracto con un elevado contenido de polifenoles y mínima presencia de azúcares reductores. Por ello, la función deseabilidad permitió determinar la condición óptima de extracción, cuyo mayor contenido de polifenoles y menor presencia de azúcares se alcanzó a 141.9 °C con 60.33% de etanol (Figura 3). No obstante, es importante recordar que las altas temperaturas no solo favorecen la recuperación de azúcares, sino también podrían inducir la formación de compuestos tóxicos como el hidroximetil furfural y acrilamida, los cuales también deberían ser materia de análisis en futuras investigaciones.



**Figura 3.** Superficie de respuesta de la función deseabilidad que indica las condiciones óptimas de extracción.

## CONCLUSIONES

Si bien las altas temperaturas favorecen la recuperación de polifenoles, también favorecen la extracción de azúcares. No obstante, el uso de etanol como cosolvente de extracción reduce la presencia de azúcares en los extractos obtenidos. Además, las condiciones subcríticas reducen la polaridad del solvente reduciendo las interacciones de los azúcares con las moléculas de agua. Por ello, el proceso de optimización establecido las condiciones óptimas de extracción que permitirán obtener extractos con elevado contenido de polifenoles y menor presencia de azúcares reductores. Estos resultados muestran que la composición de solvente en un proceso de extracción no solo mejora la recuperación de metabolitos secundarios, sino también reduce la presencia de compuestos polares no deseados.

## AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Moquegua-Perú por financiar este proyecto (Resolución de Comisión Organizadora N° 059-2021-UNAM).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amaya-Chantaca D, Flores-Gallegos AC, Iliná A, Aguilar C, Sepúlveda-Torre L, Ascacio-Vadlés J, et al. La industria vinícola como fuente de valiosos residuos agroindustriales The wine industry as a source of valuable agro-industrial wastes. *CienciaAcierta*. 2021;(67):123–45.
2. Chowdhary P, Gupta A, Gnansounou E, Pandey A, Chaturvedi P. Current trends and possibilities for exploitation of Grape pomace as a potential source for value addition. *Environ Pollut*. 2021;278:116796. doi:10.1016/j.envpol.2021.116796.
3. Garcia-Lomillo J, González-San José M. Applications of Wine Pomace in the Food Industry Approaches and Functions. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2017 Jan;16(1):3-22. doi: 10.1111/1541-4337.12238.
4. Huaman-Castilla NL, Mariotti-Celis MS, Perez-Correa JR. Polyphenols of Carménère Grapes. *Mini Rev Org Chem*. 2017;14(3):176–86.
5. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010;15(10):7313–52.
6. Adebooye OC, Alashi AM, Aluko RE. A brief review on emerging trends in global polyphenol research. *J Food Biochem*. 2018;42(4): e12519. doi: 10.1111/jfbc.12519.
7. Cheng Y, Xue F, Yu S, Du S, Yang Y. Subcritical water extraction of natural products. *Molecules*. 2021 Jun 30;26(13):4004. doi: 10.3390/molecules26134004.
8. Souilem S, Fki I, Kobayashi I, Khalid N, Neves MA, Isoda H, et al. Emerging Technologies for Recovery of Value-Added Components from Olive Leaves and Their Applications in Food/Feed Industries. *Food Bioprocess Technol*. 2017;10(2):229–48.
9. Al-Suod H, Ratiu IA, Górecki R, Buszewski B. Pressurized liquid extraction of cyclitols and sugars: optimization of extraction parameters and selective separation. *J Sep Sci*. 2019;42(6):1265–72.

10. Huamán-Castilla NL, Díaz Huamaní KS, Palomino Villegas YC, Allcca-Alca EE, León-Calvo NC, Colque Ayma EJ, et al. Exploring a Sustainable Process for Polyphenol Extraction from Olive Leaves. *Foods*. 2024 Jan 15;13(2):265. doi: 10.3390/foods13020265.
11. Huamán-Castilla NL, Mariotti-Celis MS, Martínez-Cifuentes M, Pérez-Correa JR. Glycerol as Alternative Co-Solvent for Water Extraction of Polyphenols from Carménère Pomace: Hot Pressurized Liquid Extraction and Computational Chemistry Calculations. *Biomolecules*. 2020 Mar 20;10(3):474. doi: 10.3390/biom10030474.
12. Vergara-Salinas JR, Bulnes P, Zúñiga MC, Pérez-Jiménez J, Torres JL, Mateos-Martín ML, et al. Effect of pressurized hot water extraction on antioxidants from grape pomace before and after enological fermentation. *J Agric Food Chem*. 2013;61(28):6929–36.
13. Mariotti-Celis MS, Martínez-Cifuentes M, Huamán-Castilla N, Pedreschi F, Iglesias-Rebolledo N, Pérez-Correa JR. Impact of an integrated process of hot pressurised liquid extraction–macroporous resin purification over the polyphenols, hydroxymethylfurfural and reducing sugars content of *Vitis vinifera* ‘Carménère’ pomace extracts. *Int J Food Sci Technol*. 2018;53(4): 1072-1078.
14. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965 Jan;16(3):144 LP – 158.
15. Wilson AM, Work TM, Bushway AA, Bushway RJ. HPLC determination of fructose, glucose, and sucrose in potatoes. *J Food Sci*. 1981;46(1):300–10.
16. Huamán-Castilla NL. The impact of temperature and ethanol concentration on the global recovery of specific polyphenols in an integrated HPLC/RP process on Carménère pomace extracts. *Molecules*. 2019 Aug 29;24(17):3145. doi: 10.3390/molecules24173145.
17. Huamán-Castilla NL, Gajardo-Parra N, Pérez-Correa JR, Canales RI, Martínez-Cifuentes M, Contreras-Contreras G, et al. Enhanced Polyphenols Recovery from Grape Pomace: A Comparison of Pressurized and Atmospheric Extractions with Deep Eutectic Solvent Aqueous Mixtures. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Jul 18;12(7):1446. doi: 10.3390/antiox12071446.
18. Parí SM, Juárez MLM, Vilca FZ, Vilca OML, Alca EEA, Escobedo-Pacheco E, et al. Alternative green extraction techniques to enhance recovery of antioxidant compounds from red peel prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). *Discov Food [Internet]*. 2024;4:58. doi:10.1007/s44187-024-00140-5.
19. Galanakis CM. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci Technol*. 2012;26(2):68–87.
20. Galanakis CM, Goulas V, Tsakona S, Manganaris GA, Gekas V. A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *Int J Food Prop*. 2013;16(2):382–96.

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO *IN VITRO*  
DE N'-[(1E)-(2-HIDROXI-3-  
METOXIBENCILIDENO)PIRAZINA-2-  
CARBOHIDRAZIDA FRENTE A *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* H37R<sub>v</sub> y DM97**

Christian M. Aliaga Paucar<sup>a</sup>, Rocio I. Ramirez Panti<sup>a</sup>, Maihuiri Vargas Hugo G.<sup>a</sup>,  
Patricia Sheen Cortovaria<sup>b</sup>, Mirko Zimic Peralta<sup>b</sup>, Ana C. Valderrama Negron<sup>\*a</sup>

**RESUMEN**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), donde la pirazinamida (PZA) es un fármaco de primera línea utilizado en su tratamiento. Nuevas propuestas de fármacos son urgentes, dada la mayor resistencia a antimicrobianos como la PZA. En este trabajo, hemos sintetizado y caracterizado la N'-[(1E)-(2-Hidroxi-3-metoxibencilideno) pirazina-2-carbohidrazida (C3), para evaluar su actividad antituberculosa *in vitro* en MTB H37R<sub>v</sub> (cepa sensible) y DM97 (cepa resistente a PZA). El compuesto C3 fue sintetizado y caracterizado por Análisis elemental, UV-Vis, FT-IR y RMN <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C. El compuesto C3 es una hidrazona derivada de PZA. En el ensayo de microplaca de tetrazolio (TEMA) realizado en MTB H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> a pH 6,0 y 6,8, se encontró que PZA tiene mayor actividad antituberculosa que C3 en H37R<sub>v</sub>, sin embargo, en DM97, C3 (MIC = 64 µg/mL a pH 6,0; MIC = 256 µg/mL a pH 6,8) presentó mayor actividad antituberculosa que PZA (MIC > 800 µg/mL a pH 6,0; MIC > 800 µg/mL a pH 6,8), lo que demuestra el potencial antituberculoso de C3 frente a esta cepa resistente a PZA.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, antituberculosos, hidrazona, TEMA.

**SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO*  
STUDY OF N'-[(1E)-(2-HYDROXY-3-  
METHOXYBENZYLIDENE)PYRAZINE-2-  
CARBOHYDRAZIDE AGAINST *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* H37R<sub>v</sub> AND DM97**

**ABSTRACT**

Tuberculosis is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), where pyrazinamide (PZA) is a first-line drug used in its treatment. New drug proposals are urgently needed, given the increased resistance to antimicrobials such as PZA. In this

<sup>a</sup> Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Rímac, Lima, Perú, \*[anitacvn29@yahoo.com.mx](mailto:anitacvn29@yahoo.com.mx)

<sup>b</sup> Unidad de Bioinformática y Biología Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, SMP, Lima, Perú

work, we have synthesized and characterized *N*'-[(1*E*)-(2-Hydroxy-3-methoxybenzylidene)pyrazine-2-carbohydrazide (C3), to evaluate its in vitro antituberculosis activity in MTB H37Rv (sensitive strain) and DM97 (PZA-resistant strain). C3 was synthesized and characterized by elemental analysis, UV-Vis, FT-IR and <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C NMR. The compound C3 is a hydrazone derivative of PZA.

In the tetrazolium microplate assay (TEMA) performed on MTB H37Rv at pH 6.0 and 6.8, PZA was found to have greater antituberculosis activity than C3 in H37Rv, however, in DM97, C3 (MIC = 64 µg/mL at pH 6.0; MIC = 256 µg/mL at pH 6.8) presented greater antituberculosis activity than PZA (MIC > 800 µg/mL at pH 6.0; MIC > 800 µg/mL at pH 6.8), which demonstrates the antituberculosis potential of C3 against this PZA-resistant strain.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, antituberculosis, hydrazone, TEMA.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una infección causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Según el informe del año 2023 dado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la tuberculosis, el número de personas tratadas contra la tuberculosis ha aumentado de 10,3 millones en el 2021 a 10,6 millones en el 2022. Aproximadamente 1,3 millones de personas que padecían tuberculosis en todo el mundo murieron en el 2022. La tuberculosis es considerada la enfermedad infecciosa más peligrosa del mundo <sup>1</sup>. Una de las causas del aumento de los casos de tuberculosis ha sido la aparición de la tuberculosis multirresistente (MDR-TB) y la tuberculosis extremadamente resistente a los fármacos (XDR-TB), lo que ha dejado a muchos pacientes sin otras opciones de tratamiento<sup>2</sup>. Según el Ministerio de Salud de Perú (MINSa), en el 2019 se reportaron 23282 casos de morbilidad de TB, 20546 nuevos casos de TB, 1147 nuevos casos de MDR-TB y 76 nuevos casos de XDR-TB<sup>3</sup>. La pirazinamida (PZA) es un profármaco y un análogo estructural de la nicotinamida, utilizado como fármaco de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis, debido a su excelente efecto esterilizante sobre los bacilos tuberculosos en estado semilátente o latente<sup>4</sup>. Se sabe que la PZA se convierte en su forma activa, el ácido pirazinoico (POA), por la acción de la enzima pirazinamidasa (PZasa). Sin embargo, el mecanismo de acción y la resistencia a la PZA no están completamente dilucidados. Se han documentado muchas mutaciones en el *gen pncA*, responsable de la síntesis de PZasa, que es probablemente la principal razón de la resistencia frente a PZA<sup>4</sup>. Las hidrazonas son bases de Schiff (-CH-N-NH-C=O-) que han atraído especial atención de los investigadores en los últimos años debido a su conocida capacidad de quelación y flexibilidad estructural<sup>5</sup>, así como a sus actividades biológicas y farmacológicas en algunas enfermedades, incluida la tuberculosis. Teniendo en cuenta la alta resistencia a la PZA que existe en el tratamiento de la TB, existe la necesidad de evaluar nuevos fármacos frente al estado latente de la MTB. En el presente trabajo, se realizó la síntesis y caracterización del *N*'-[(1*E*)-(2-Hidroxi-3-metoxibencilideno)pirazina-2-carbohidrazida (C3), un derivado de PZA unido covalentemente a un grupo hidrazona. Además, se realizaron pruebas biológicas *in vitro* frente a cepa sensible (MTB H37Rv) y cepa resistente (MD97) para evaluar su actividad en MTB. Es importante mencionar que Wang en el 2019 sintetizó y cristalizó el compuesto C3 monohidratado por otra metodología de síntesis, realizó estudios de DR-X de monocristal mostrando la estructura tridimensional,

pero no realizó la caracterización espectroscópica, ni evaluó su actividad antituberculosa para cepas sensibles H37Rv (ATCC 27294) o cepas resistentes (DM97)<sup>6</sup>.

## PARTE EXPERIMENTAL

Todos los productos químicos fueron comprados a Sigma-Aldrich. Los solventes eran de grado espectroscópico. Los puntos de fusión se determinaron con el kit Thermo Fisher Scientific IA9100. El análisis elemental se determinó utilizando un analizador elemental EAI Exeter Analytical CE-440. Los espectros electrónicos se registraron en un espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV1800 utilizando una celda de cuarzo de 1 cm a temperatura ambiente en un rango de 200-400 nm. Los espectros infrarrojos se registraron con gránulos KBr en el rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  en un espectrofotómetro Shimadzu FT-IR Prestige 21. El espectro de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C se obtuvo utilizando un espectrómetro Bruker Ascend de 500 MHz con *d*<sub>6</sub>-dimetilsulfóxido (DMSO-*d*<sub>6</sub>) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno ( $\delta\text{H}=0,0$  ppm) a temperatura ambiente.

### Síntesis de pirazin-2-carbohidrazida (2)

Se añadió hidracina monohidratada (1,77 mL, 1,81 g, 36,2 mmol) a una solución etanólica de 5 mL de metilpirazina-2-carboxilato (1) (0,5 g, 3,62 mmol). La mezcla se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. El disolvente se retiró a presión reducida y el residuo se purificó mediante lavado con Et<sub>2</sub>O frío (20 mL) para obtener el producto (2) sólido<sup>7</sup>.

### Síntesis de *N'*-(1*E*)-(2-Hidroxi-3-metoxibencilideno)pirazin-2-carbohidrazida (C3)

La pirazina-2-carbohidrazida (2) (0,138 g, 1 mmol) se disolvió en 10 mL de etanol, luego se añadieron lentamente 5 mL de solución etanólica de 2-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído (0,152 g, 1 mmol) y 4 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 M y la mezcla se calentó a 40 °C durante 2 horas. Posteriormente, se dejó enfriar hasta la precipitación de un sólido insoluble (C3), luego se filtró, lavó con etanol y se recristalizó con DMF, este procedimiento de síntesis es diferente al reportado por Zhaodong (2019)<sup>4</sup>.

### Evaluación antimicrobiana

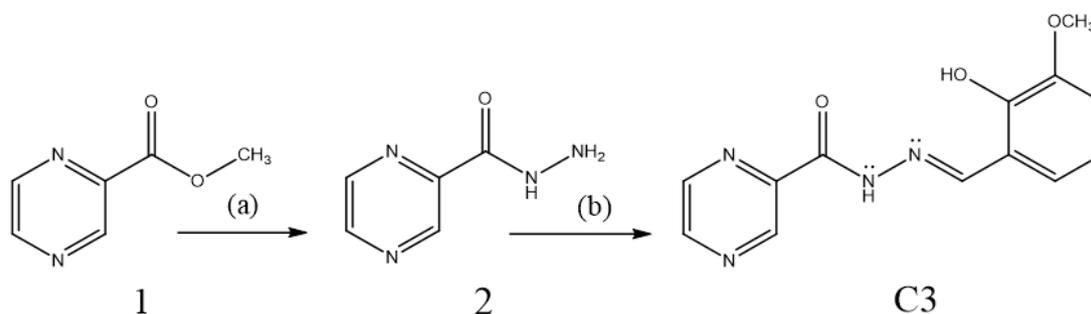
La prueba de susceptibilidad a la pirazinamida (PZA) de las cepas de MTB H37Rv y DM97 se realizó en un laboratorio de bioseguridad de nivel III utilizando el ensayo de microplaca de tetrazolio (TEMA) para la viabilidad celular (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeníl-tetrazolio) (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.), que se basa en el cambio de color de amarillo a azul mediante la reducción de bromuro de tetrazolio en células viables<sup>8</sup>. Mediante esta técnica, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los fármacos por triplicado a pH 6,0 y 6,8. Las soluciones de PZA y C3 se esterizaron por filtración (22  $\mu\text{m}$ ) y se mezclaron con el medio 7H9. Los controles fueron cultivos de MTB no tratados. Para el inóculo se preparó la suspensión de MTB a partir de un cultivo primario en medio agar 7H10 previamente incubado durante 3-4 semanas. La masa bacteriana se cosechó en un tubo de vidrio con 100  $\mu\text{L}$  de Tween 80 al 10% y perlas de vidrio de 3 mm de diámetro. Después de la homogeneización con vortex, la turbidez se ajustó a la escala McFarland #1 ( $3 \times 10^8$  UFC/mL) con medio 7H9. Finalmente, la cepa McFarland #1 se diluyó 1:25 en medio

7H9. Por cada pozo se transfirieron 100  $\mu$ L de suspensión MTB 1:25. Las microplacas se colocaron en bolsas Ziploc y se incubaron a 37 °C durante 6 días para el cultivo a pH 6.8 y 10 días para el cultivo a pH 6. Se añadieron cincuenta microlitros de un tetrazolio a un pocillo de control. Las placas se reincubaron a 37 °C durante 24 h. Si el pocillo de control se volvía azul, la mezcla de reactivos se añadía a todos los pocillos de la microplaca. Las microplacas las incubamos durante 24 h adicionales a 37 °C, y se registraron los colores de todos los pocillos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Síntesis del compuesto C3

El compuesto C3 se obtuvo por la condensación de pirazina-2-carbohidrazida con 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (Figura1).



**Figura 1.** Condiciones de síntesis; a) Hidracina monohidrato (98%), EtOH y b) 2-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído, EtOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (6 M).

**Fuente:** Elaboración propia

### Pirazin-2-carbohidrazida (2)

Sólido blanco. 85% de rendimiento. Punto de fusión 158-159°C. IR (KBr): 3382, 3087, 3060, 1718, 1638, 1262 cm<sup>-1</sup>. RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 4,56 (s, 2H, NH<sub>2</sub>); 8,69 (dd, 1H, *J* = 1,5 y 2,6 Hz, H-5); 8,82 (d, 1H, *J* = 2,6 Hz, H-6); 9,12 (d, 1H, *J* = 1,5 Hz, H-3); 10,11 (s, 1H, CONH). RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 143,7 (C-5); 144,0 (C-3); 145,4 (C-2); 147,8 (C-6); 162,0 (CONH).

### N'-[(1E)-(2-Hidroxi-3-metoxibencilideno)pirazin-2-carbohidrazida (C3)

Sólido amarillo. 89% de rendimiento. Punto de fusión 186-187 °C. IR (KBr): 3476, 3424, 3264, 3066, 3013, 1671, 1608, 1574, 1530, 1361, 1410, 1250, 1149 cm<sup>-1</sup>. RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 3,82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 6,87 (t, 1H, *J* = 7,9 Hz); 7,05 (dd, 1H, *J* = 1,4 Hz); 7,12 (dd, 1H, *J* = 7,9 Hz); 8,80 (dd, 1H, *J* = 2,45 Hz); 8,85 (s, 1H); 8,93 (d, 1H, *J* = 2,45 Hz); 9,28 (d, 1H, *J* = 1,5Hz); 10,98 (s, 1H, OH); 12,60 (s, 1H, CONH). RMN-<sup>13</sup>C (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ (ppm): 159,93; 150,71; 148,44; 148,41; 147,84; 144,78; 144,67; 143,85; 121,49; 119,55; 119,26; 114,52; 56,00.

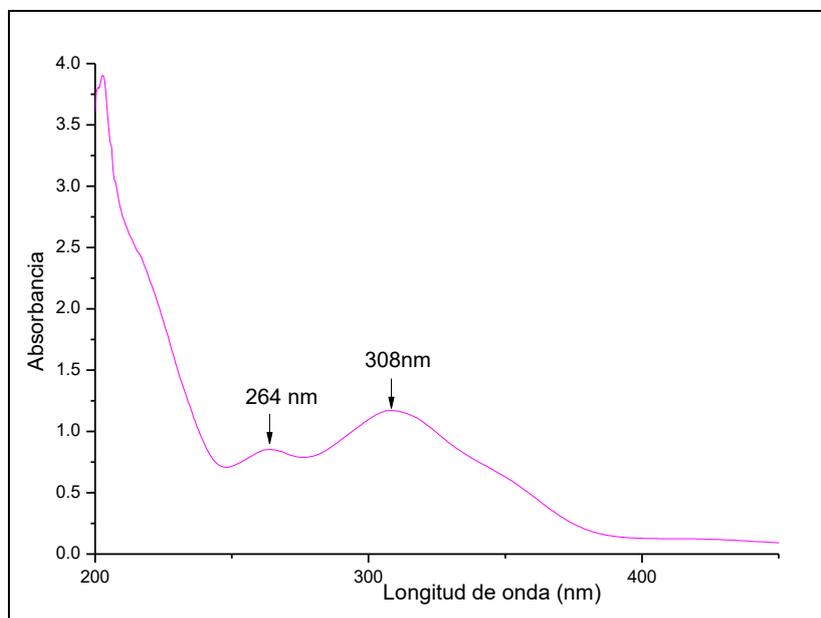
El compuesto C3 es soluble en dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF), pero insoluble en disolventes polares como el agua, el metanol y el etanol. Las propiedades físicas y analíticas se observan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Propiedades físicas y analíticas del C3.

Fórmula empírica	Rendimiento (%)	Color	Punto de fusión (°C)	Análisis elemental encontrado (calculado)		
				%C	%H	%N
C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	89	Amarillo	186-187	54,27	4,46	19,15
		claro		(55,35)	(4,44)	(20,08)

### Espectroscopía UV-Visible

El espectro de absorción UV-Vis del compuesto C3 (Figura 2) presenta dos bandas de absorción. La primera, alrededor de 264 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ), corresponde a la excitación de los electrones del grupo carbonilo (C=O) y al anillo aromático de la pirazina (C=N). El segundo pico alrededor de 308 nm (transición  $n \rightarrow \pi^*$ ) corresponde a la excitación de los electrones no enlazantes del átomo de O (grupo carbonilo) y del átomo de N (pirazina en anillo). La señal de esta última transición se extiende hasta alrededor de 400 nm, debido a la presencia de la transición  $n \rightarrow \pi^*$  del grupo hidrazona (NN=C)<sup>9,10</sup>.

**Figura 2.** Espectro UV-Vis del compuesto C3

### Espectroscopía infrarroja

El espectro FT-IR (Figura 3) muestra un pico ancho en el rango de 3300 a 3600  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la tensión O-H del fenol, otro grupo importante es la presencia de un pico estrecho de intensidad media a 3264  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la tensión del enlace N-H, así mismo se observa que el carbonilo de la amida (N-C=O) se observa como un pico agudo y estrecho a 1671  $\text{cm}^{-1}$ . También se observa otras señales importantes a menor número de onda, a 1608  $\text{cm}^{-1}$  se observa una señal de intensidad media propio de la tensión C=N del grupo hidrazona, a 1530  $\text{cm}^{-1}$  se observa una señal intensa producto de

la tensión C=C del grupo fenol y a  $1250\text{ cm}^{-1}$  otra señal intensa que corresponde a la tensión C-O del grupo fenol. Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente en la literatura para moléculas de similar estructura<sup>7</sup>.

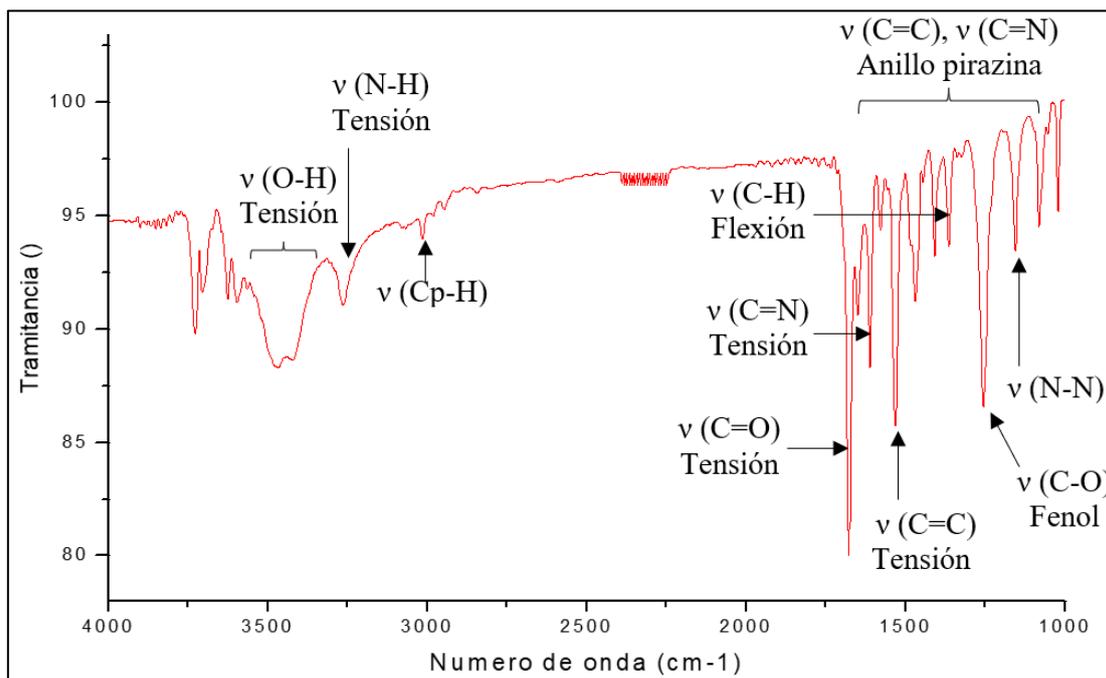


Figura 3. Espectro FT-IR del compuesto C3

### Resonancia Magnética de Nuclear del compuesto C3

El espectro RMN-<sup>1</sup>H del compuesto C3 (Figura 4) muestra a campo bajo las señales del protón del grupo hidrazona ( $\delta = 12,60\text{ ppm}$ , <sup>1</sup>H) y del protón del grupo OH del fenol ( $\delta = 10,98\text{ ppm}$ , <sup>1</sup>H), en ambos casos se observó un singlete porque no tiene átomos de hidrógeno cercanos con los que pueda acoplarse. El anillo pirazina muestra tres señales características a  $9,28\text{ ppm}$  (H-3),  $8,80\text{ ppm}$  (H-5) y  $8,93\text{ ppm}$  (H-6), el cual guarda relación con las *N*-acilhidrazona ya reportadas<sup>11</sup>.

El análisis cuidadoso de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto C3 indicó la diastereoselectividad de la etapa de condensación, el cual se evidencia por la presencia de una sola señal de iminohidrógeno ( $\text{N}=\text{CH}$ ) para el derivado de *N*-acilhidrazona ( $\delta = 8,85\text{ ppm}$ , 1H), que se atribuyó al diastereoisómero (E) debido a que esta señal característica sale en el rango de  $8,32\text{ a }8,82\text{ ppm}$ <sup>12</sup>. Además, es importante mencionar que este tipo de derivado de la *N*-acilhidrazona tiene mayor estabilidad al formar el diastereómero tipo (E)<sup>4,13</sup>. La tabla 2 muestra los desplazamientos químicos ( $\delta$ ), multiplicidad, integral y constante de acoplamiento (*J*) que le corresponden a las diez señales mostradas del espectro de RMN-<sup>1</sup>H.

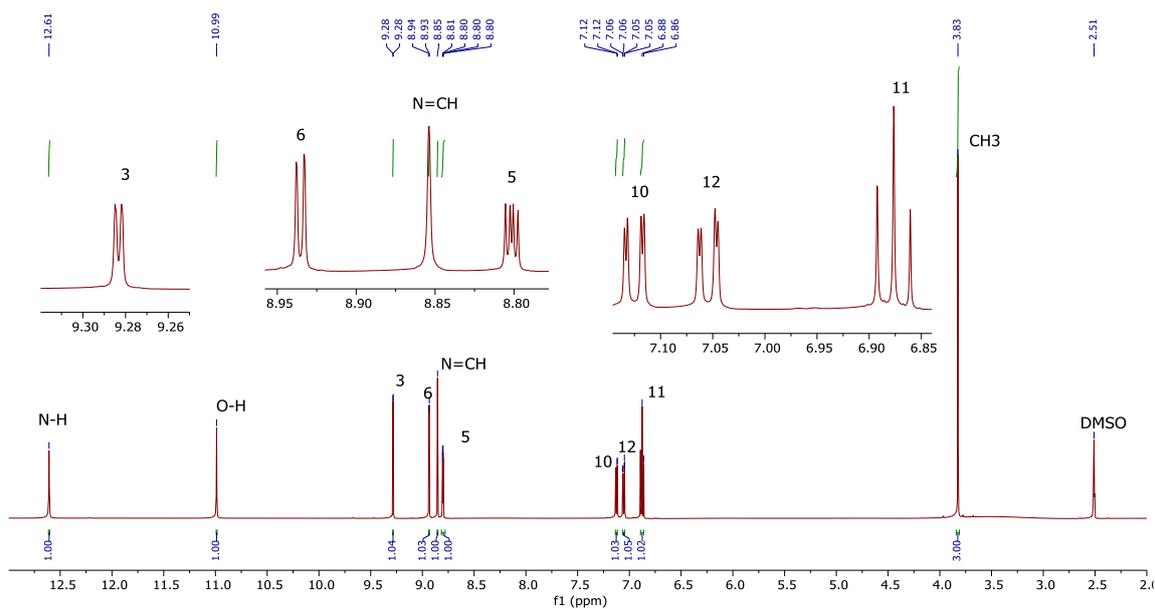
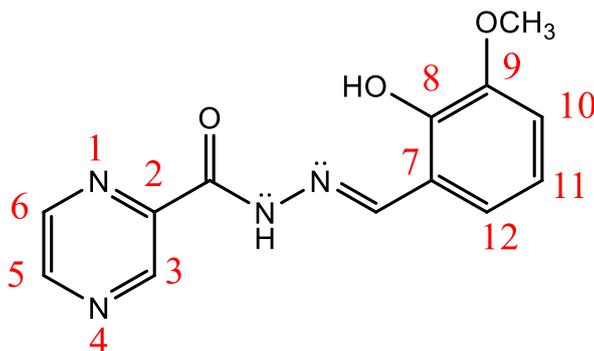


Figura 4. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto C3 ( $\text{DMSO-}d_6$ , 500 MHz).

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2. Señales obtenidas en RMN- $^1\text{H}$  para el compuesto C3 (500 MHz, ppm,  $\text{DMSO-}d_6$ , J Hz)

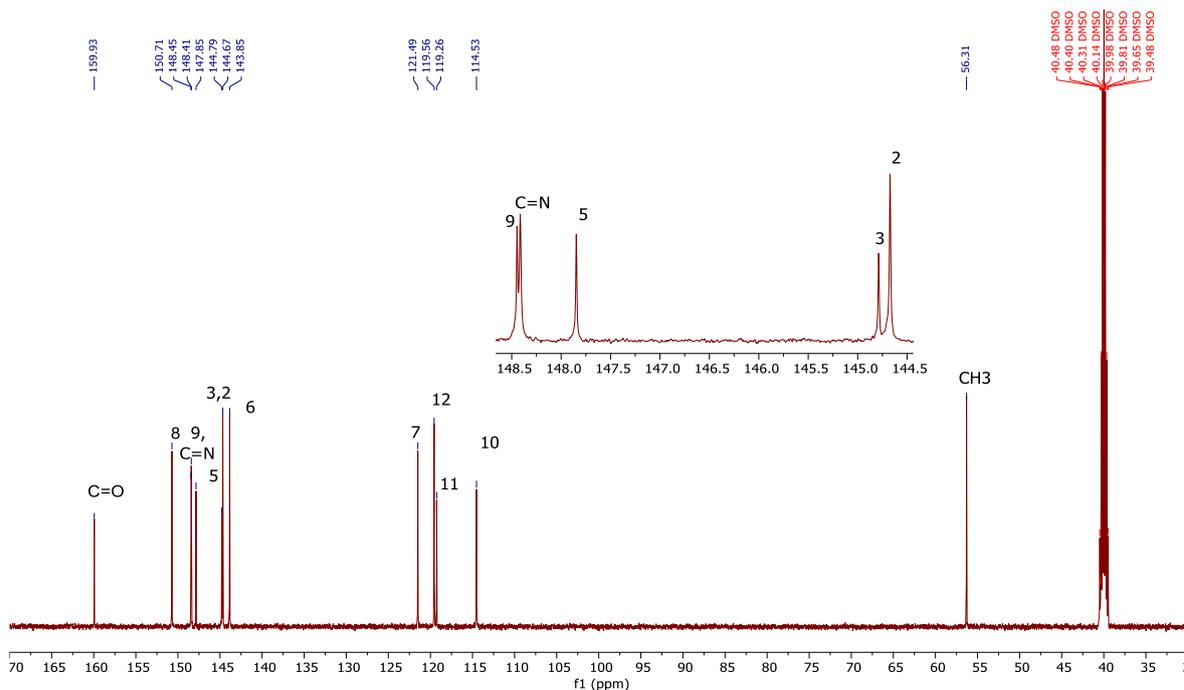


Numeración de los hidrógenos presentes en el compuesto C3

N° Hidrógeno	$\delta$ (ppm) Experimental	Multiplicidad	J (Hz)	Integral
N-H	12,603	Singlete	-	1H
O-H	10,989	Singlete	-	1H
3	9,284 9,281	Doblete	$4J_{H3,H5} = 1,50$	1H
6	8,937 8,933	Doblete	$3J_{H6,H5} = 2,45$	1H
N = CH	8,853	Singlete	-	1H
5	8,805	Doble	$3J_{H5,H6} = 2,45$	1H
	8,802			
	8,800	Doblete	$4J_{H5,H3} = 1,50$	
	8,797			
10	7,134	Doble	$3J_{H10,H11} = 7,90$	1H
	7,131			
	7,118	Doblete	$4J_{H10,H12} = 1,40$	
	7,115			
12	7,064	Doble	$3J_{H12,H11} = 7,90$	1H
	7,061			
	7,047	Doblete	$4J_{H12,H10} = 1,40$	
	7,045			
11	6,892	Triplete	$3J_{H11,H10} = 7,90$ $3J_{H11,H12} = 7,90$	1H
	6,876			
	6,860			
-CH <sub>3</sub>	3,825	Singlete	-	3H

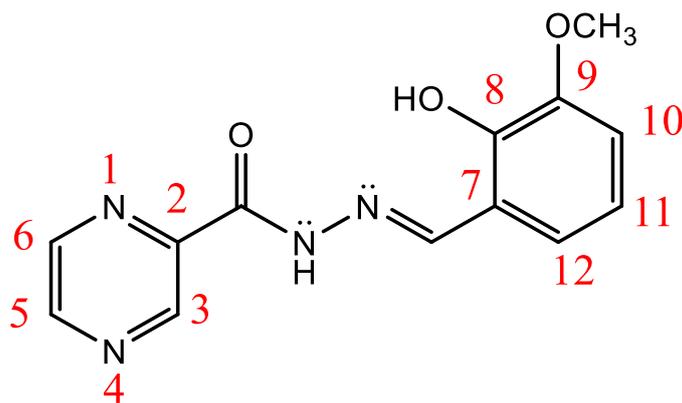
En el espectro RMN-<sup>13</sup>C (Figura 5) se observan 13 señales correspondientes a los carbonos del compuesto C3. El carbono que aparece en el campo inferior ( $\delta = 159,93$  ppm) es del grupo carbonilo (C = O)<sup>7,13</sup>.

Las señales de C-9 y CH=N, así como C-3 y C-2, aparentemente tienen el mismo desplazamiento químico, sin embargo, al expandirse podemos diferenciar claramente ambas señales, donde el carbono de CH=N ( $\delta = 148,41$  ppm) está ligeramente más protegido que el carbono C-9 ( $\delta = 148,44$  ppm), y el carbono C-3 ( $\delta = 144,78$  ppm) está menos protegido que el C-9 ( $\delta = 144,67$  ppm). Las señales obtenidas del espectro RMN-<sup>13</sup>C se resumen en la Tabla 3 y son datos característicos para compuestos tipos *N*-acilhidrazona<sup>11,14</sup>.



**Figura 5.** Espectro RMN-<sup>13</sup>C del compuesto C3 (DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz)  
**Fuente:** Elaboración propia

**Tabla 3.** Señales obtenidas en el RMN-<sup>13</sup>C para el compuesto C3 (500 MHz, ppm, DMSO-d<sub>6</sub>)

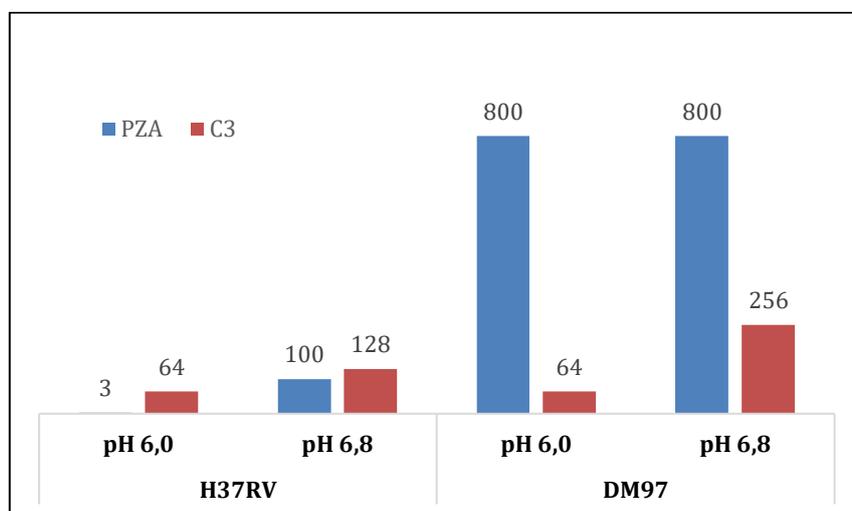


*Numeración de los carbonos presentes en el compuesto C3*

N° carbono	Desplazamiento químico (ppm)
<b>C=O</b>	159,93
<b>8</b>	150,71
<b>9</b>	148,44
<b>C=N</b>	148,41
<b>5</b>	147,84
<b>3</b>	144,78
<b>2</b>	144,67
<b>6</b>	143,85
<b>7</b>	121,49
<b>12</b>	119,55
<b>11</b>	119,26
<b>10</b>	114,52
<b>-CH<sub>3</sub></b>	56,30

### Evaluación antimicrobiana

De acuerdo con los resultados de prueba TEMA (Figura 6), la CMI para PZA disminuye de 100 a 3,125  $\mu\text{g/mL}$  cuando el pH disminuye de 6,8 a 6,0 para H37Rv. Mientras que para DM97 tienen una CMI de 64  $\mu\text{g/mL}$  y 128  $\mu\text{g/mL}$  para H37Rv a pH 6,0 y 6,8, respectivamente. La CMI de C3 en DM97, tanto a pH 6,0 (MIC = 64  $\mu\text{g/mL}$ ) como a pH 6,8 (MIC = 256  $\mu\text{g/mL}$ ) muestran concentraciones más bajas en comparación con la PZA (MIC > 800  $\mu\text{g/mL}$ ).<sup>15,16</sup>



**Figura 6.** Concentración inhibitoria mínima (CMI) de PZA y C3 a pH 6,0 y 6,8 para MTB H37Rv y DM97. **Fuente:** Elaboración propia

## CONCLUSIONES

N'-[(1E)-(2-Hidroxi-3-metoxibencilideno)pirazina-2-carbohidrazida (C3) se preparó por condensación entre pirazina-2-carbohidrazida con 2-Hidroxi-3-metoxibenzaldehído con un rendimiento del 89%. La caracterización química (UV-Vis, FT-IR, RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C) permitió corroborar la estructura propuesta por Zhaodong (2019). Por otro lado, los estudios *in vitro* permitieron encontrar una CMI más bajo en la DM97 de MTB para C3 a pH 6,0 (CMI = 64 µg/mL) y pH 6,8 (CMI = 256 µg/mL) en comparación con la PZA (MIC > 800 µg/mL a pH 6,0 y 6,8). Al ser MTB DM97 resistente a PZA, esta hidrazona derivada de PZA arroja nueva luz sobre el uso de hidrazonas para el desarrollo de fármacos asociados con la resistencia a los antimicrobianos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020.
2. Kardan-Yamchi J, Kazemian H, Battaglia S, Abtahi H, Foroushani AR, Hamzelou G, et al. Whole Genome Sequencing Results Associated with Minimum Inhibitory Concentrations of 14 Anti-Tuberculosis Drugs among Rifampicin-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Iran. *J Clin Med*. 2020 Feb 7;9(2):465. doi: 10.3390/jcm9020465.
3. Ministerio de Salud. Perfil de la tuberculosis en el Perú. [Internet. ]2019 [Consultado 12 dic 2024]. Disponible en: <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/DashboardDPCTB/PerfilTB.aspx>.
4. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr*. 2014 Aug;2(4):MGM2-0023-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0023-2013.
5. Shebl M, Saleh AA, Khalil SM, Dawy M, Ali AA. Synthesis, spectral, magnetic, DFT calculations, antimicrobial studies and phenoxazinone synthase biomimetic catalytic activity of new binary and ternary Cu(II), Ni(II) and Co(II) complexes of a tridentate ONO hydrazone ligand. *Inorg Nano-Met Chem*. 2020; 51(2):195–209.
6. Wang Z. N'-(2-Hydroxy-3-methoxy-benzylidene)pyrazine-2-carbohydrazide monohydrate. *IUCrdata*. 2020 Jan 10;5(Pt 1):x191731. doi: 10.1107/S2414314619017310.
7. Vergara FM, Lima CH, Henriques Md, Candéa AL, Lourenço MC, Ferreira Mde L, et al. Synthesis and antimycobacterial activity of N'-[(E)-(monosubstituted-benzylidene)]-2-pyrazinecarbohydrazide derivatives. *Eur J Med Chem*. 2009 Dec;44(12):4954-9.
8. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J Neurochem*. 1987; 69(2): 581-593.
9. Bhaskar RS, Ladole CA, Salunkhe NG, Barabde JM, Aswar AS. Synthesis, characterization and antimicrobial studies of novel ONO donor hydrazone Schiff base complexes with some divalent metal (II) ions. *Arab J Chem*. 2020;13(8):6559-67.

10. Ramírez RI, Aliaga CM, Grandez F, Brillo P, Zimic MJ, Cauna Y, et al. Pyrazinamide–isoniazid hy-brid: synthesis optimisation, characterisation, and antitu-berculous activity. *Rev Colomb Quim.* 2022; 50(3): 16-23.
11. Da Silva YK, Augusto CV, de Castro Barbosa ML, de Albuquerque Melo GM, de Queiroz AC, de Lima Matos Freire Dias T, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine N-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. *Bioorg Med Chem.* 2010 Jul 15;18(14):5007-15.
12. Karabatsos GJ, Taller RA. Structural studies by nuclear magnetic resonance. V. Phenylhydrazones. *J Am Chem Soc.* 1963; 85(22):3624–3629.
13. Lima CH, Henriques MG, Candéa AL, Lourenço MC, Bezerra FA, Ferreira ML, Kaiser CR, de Souza MV. Synthesis and antimycobacterial evaluation of N'-(E)-heteroaromaticpyrazine-2-carbohydrazide derivatives. *Med Chem.* 2011 May;7(3):245-9.
14. Ferreira M, Candea AL, de O Henriques GM, Kaiser CR, da S Lima CH, de Souza MV. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Disubstituted N-Acylhydrazones Pyrazinecarbohydrazide Derivatives. *Lett Drug Des Discov.* 2010;7(4):275-80.
15. Peterson ND, Rosen BC, Dillon NA, Baughn AD. Uncoupling Environmental pH and Intrabacterial Acidification from Pyrazinamide Susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Dec;59(12):7320-6.
16. Piddington DL, Kashkouli A, Buchmeier NA. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a defined medium is very restricted by acid pH and Mg(2+) levels. *Infect Immun.* 2000 Aug;68(8):4518-22.

# SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA *IN VITRO* DE COMPLEJOS METÁLICOS DE Fe(II) Y Co(II) CON HÍBRIDO DE ISONIACIDA-PIRAZINAMIDA

Rocio I. Ramirez Panti<sup>a</sup>, Christian M. Aliaga Paucar<sup>a</sup>, Fernando Grandez<sup>a</sup>, Patricia Sheen Cortovaria<sup>b</sup>, Mirko Zimic Peralta<sup>b</sup>, Ana C. Valderrama Negron<sup>\*a</sup>

## RESUMEN

La tuberculosis es la séptima causa de muerte en el mundo. Un tercio de la población mundial está infectada de la enfermedad de tuberculosis causada por el *Mycobacterium tuberculosis*, el cual ha desarrollado mecanismos de resistencia a diversas drogas de primera y segunda línea que resultaron extremadamente difíciles de tratar.

En este trabajo se presenta la síntesis de los complejos metálicos de Fe(II) y Co(II) con el híbrido (IP) de dos fármacos antituberculosos de primera línea: isoniacida (INH) y pirazinamida (PZA), todavía desconocido en la literatura científica, con la finalidad de potenciar la actividad antituberculosa de ambos fármacos.

Experimentalmente se obtuvo los complejos de Fe(II) y Co(II), y se determinó la actividad antituberculosa de los mismos.

La caracterización de los complejos metálicos se realizó mediante análisis elemental, espectroscopía infrarroja (FT-IR), espectroscopía Raman, espectroscopía UV-Vis, conductividad y análisis termogravimétrico (TGA), mostrando que se obtuvieron los complejos deseados.

Los ensayos de actividad biológica se realizaron mediante el Método Susceptibilidad TEMA en metalocomplejos de pirazinamida e isoniacida y sus sales precursoras; donde el complejo de cobalto y el híbrido (IP) presentan actividad antituberculosa.

**Palabras clave:** isoniacida, pirazinamida, tuberculosis y complejos metálicos.

## SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE *IN VITRO* ANTITUBERCULOSIS ACTIVITY OF METAL COMPLEXES OF Fe(II) AND Co(II) WITH ISONIACIDE-PYRAZINAMIDE HYBRID

## ABSTRACT

Tuberculosis is the seventh cause of death in the world. One third of the world's population is infected with tuberculosis disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*,

---

<sup>a\*</sup> Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Rímac, Lima, Perú, \*[anitacvn29@yahoo.com.mx](mailto:anitacvn29@yahoo.com.mx)

<sup>b</sup> Unidad de Bioinformática y Biología Molecular, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, SMP, Lima, Perú

which has developed resistance mechanisms to various first- and second-line drugs that have proven extremely difficult to treat.

This work presents the synthesis of Fe(II) and Co(II) metal complexes with the hybrid of two first-line antituberculosis drugs: isoniazid (INH) and pyrazinamide (PZA), still unknown in the scientific literature, with the purpose of enhancing the anti-tuberculosis activity of both drugs.

Experimentally, obtained to then obtain the Fe(II) and Co(II) complexes, and determined their antituberculous activity.

The characterization of the metal complexes was carried out by elemental analysis, infrared spectroscopy (FT-IR), Raman spectroscopy, UV-Vis spectroscopy, conductivity and thermogravimetric analysis (TGA), showing that the desired complexes.

Biological activity assays were carried out using the TEMA Susceptibility Method on pyrazinamide and isoniazid metal complexes and their precursor salts; where the cobalt complex and the hybrid present antituberculous activity.

**Keywords:** isoniazid, pyrazinamide, tuberculosis and metal complexes.

## INTRODUCCIÓN

La química bioinorgánica estudia las relaciones que existe entre elementos y compuestos inorgánicos en procesos biológicos.<sup>1,2</sup> La investigación de los metalofármacos es una nueva expectativa para la medicina y farmacología que surge de la unión de un compuesto orgánico con un metal. Este puede haber sido usado para combatir bacterias, parásitos, virus o tumores cancerígenos, potenciando la actividad biológica de los compuestos iniciales, resultando más eficaces para el tratamiento de algunas enfermedades, como por ejemplo la tuberculosis<sup>2</sup>.

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa producida por *Mycobacterium tuberculosis* que convive con la humanidad desde sus antigüedades. Así como las civilizaciones han evolucionado, el Bacilo de Koch también lo ha hecho, resistiéndose a quedar atrás en la historia; este fenómeno surge debido a que la bacteria se ha vuelto extremadamente resistente al tratamiento con los fármacos que se usan actualmente<sup>3</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en su Informe sobre la Tuberculosis 2022, señala que, si bien hay un descenso de 47% de la mortalidad por TBC desde 1990, aún se sitúa como la principal causa de muerte por enfermedad infecciosa, por encima del SIDA, y esto se ha convertido en una amenaza global.<sup>1,3</sup>

Por ello, es necesario obtener derivados o nuevos fármacos que puedan contrarrestar la TB, utilizando metales de transición para conseguir un efecto sinérgico. Este presente trabajo está enfocado a la síntesis de complejos con centros metálicos de Fe(II) y de Co(II) todavía desconocidas en la literatura científica. La investigación se realizó en dos etapas: i) síntesis de los complejos metálicos de Fe(II) y Co(II) y su caracterización con técnicas espectroscópica y ii) estudios de la actividad biológica de los complejos metálicos (Susceptibilidad TEMA)

## PARTE EXPERIMENTAL

### Síntesis del complejo de cobalto (CO-IP)

Se disolvieron 2 mmol del híbrido (IP) en metanol (20 mL) y se añadió 1 mmol de cloruro de cobalto hexahidratado ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) sólido. Las soluciones se mezclan lentamente con agitación continua a temperatura ambiente durante 3 h en atmósfera inerte, se obtuvo un precipitado de color anaranjado y después de una hora de agitación se torna anaranjado oscuro. Después de enfriar, el precipitado se filtró, se lavó con metanol y se secó al vacío.

### Síntesis del complejo de hierro ((Fe-IP)

Se utilizaron 2 mmol del híbrido (IP) en metanol (20 mL) y se añade 1 mmol de sulfato de hierro heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) en sólido. Las soluciones se mezclan lentamente con agitación continua a temperatura ambiente en atmósfera inerte durante 3 horas. Se obtuvo un precipitado de color morado oscuro. Después se filtró, se lavó con metanol y se secó al vacío.

### Técnicas de caracterización de los complejos

#### Análisis elemental de los complejos metálicos (C, H y N)

El análisis de CHNS Modelo Thermo Scientific Flash 2000 de los complejos metálicos se realizaron en el Instituto de Ciencias Exactas de la Universidad Federal de Juiz de Fora. Se analizó el contenido de carbono (%C), hidrógeno (%H) y nitrógeno (%N) en las muestras obtenidas, con la finalidad de determinar su grado de pureza y la relación estequiométrica. Laboratorio de Química Bioinorgánica y catálisis (LaQBIC) – Instituto de Ciencias Exactas de la Universidad Federal de Juiz de Fora – Brasil.

#### Análisis Termogravimétrico

Esta técnica se realizó para observar la pérdida de masa con respecto a la temperatura, mostrando el porcentaje de descomposición del híbrido (IP) y los complejos metálicos. Se realizó en el Laboratorio de investigación de Fisicoquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería – Perú. Las lecturas se realizaron en el rango de 35 – 900°C con una rampa de 10°C/min en el equipo PerkinElmer TGA 4000.

#### Espectrometría Raman

Los espectros de Raman de los complejos metálicos se obtienen con un espectrofotómetro Raman Horiba One Xplora. Las lecturas se realizaron en el rango de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  en la Universidad Nacional de Ingeniería – Perú.

#### Análisis de conductividad

El análisis de conductividad de las muestras en disolución se basa en la disociación del complejo con sus iones conocidos como electrolitos, estos conducen la corriente eléctrica en disolución. La determinación de la conductividad de una disolución de un compuesto de coordinación, resulta útil para la caracterización del compuesto, ya que se puede así

conocer el tipo de electrolito de que se trata. La lectura se realizó en la Universidad Nacional de Ingeniería – Perú.

### **Espectrofotometría UV-Visible**

Los espectros UV-Vis se obtuvieron mediante el espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV1800 a 293 K, con lámpara de deuterio, celdas de cuarzo de 1 cm de espesor; rango de 200-400 nm, como solvente se utilizó agua destilada. Las medidas se realizaron en la Universidad Nacional de Ingeniería – Perú. En este análisis se obtuvieron espectros UV-Vis para identificar las transiciones d-d correspondientes al ión metálico y el desplazamiento de bandas correspondientes a la formación de nuevos productos.

### **Espectroscopía Infrarroja**

Los espectros FTIR se obtuvieron con un espectrofotómetro Shimadzu IR Prestige 21 en el Laboratorio de Química Analítica e Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería - Perú. Las lecturas se hicieron en modo de transmitancia en el rango de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  en pastillas de KBr. Grado de pureza 99%, fue secada a alto vacío para eliminar la humedad. Se analizaron los espectros infrarrojos del híbrido derivado de isoniácida y pirazinamida y de los complejos metálicos con la finalidad de identificar los grupos funcionales y comparar las diferencias existentes entre cada par de compuestos evidenciando la formación de sus enlaces metal-ligando.

### **Evaluación de la actividad biológica**

La evaluación de la actividad biológica in vitro de los complejos metálicos de Fe(II) y Co(II) con el híbrido Isoniacida-Pirazinamida se realizaron por el método TEMA en el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por Mirco Zimic Peralta y colaboradores. Los aislamientos de las cepas de *Micobacterium tuberculosis* (H37Rv) se obtuvieron del Hospital Universitario Cayetano Heredia. Sus suspensiones se prepararon en Tween 80 al 10% (v/v) (Sigma Chemical) de modo que sus turbideces coincidieran con las del estándar de turbidez McFarland N°1 (aproximadamente  $3 \times 10^7$  UFC / mL). Por lo tanto, las suspensiones se diluyeron 1:25 en caldo 7H9 (4.7 g de base de caldo Middlebrook 7H9 [Difco, Detroit, Mich.], 20 mL de glicerol al 10%, 1 g de Bacto Casitone [Difco], 880 ml de agua destilada, 100 mL de ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa. Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – Perú.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Síntesis de los complejos de cobalto y de hierro**

De la síntesis de los complejos se obtuvieron dos sólidos no cristalinos de color mostaza (complejo de cobalto) y color morado oscuro (complejo de hierro). Los rendimientos de las reacciones fueron de 60 % y 65 %, respectivamente. Además, se determinó que ambos complejos se descomponen a temperaturas mayores a 300 °C.

### Análisis elemental

De acuerdo, con la medida de conductividad el complejo de cobalto presenta una relación metal: ligando (M:L) de 1:1, donde la fórmula propuesta  $[\text{CoCl}(\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y peso molecular 454.13 g/mol muestra concordancia dentro de los valores calculados %C, H y N y los valores experimentales. Para el complejo de hierro presenta una relación metal: ligando (M:L) de 1:1, los resultados concuerdan con la estequiometría propuesta  $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})_2]\text{SO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$  son mostrados en el Tabla 1.

**Tabla 1.** Contenido de C, H y N calculado y experimental del complejo de cobalto (Co-IP) y del complejo de hierro (Fe-IP).

Elemento	CoIP		FeIP	
	Calculado	Experimental	Calculado	Experimental
%C	31.73	31.73	30.46	31.60
%H	3.55	3.91	3.38	2.75
%N	18.50	18.40	16.64	15.84
%S	-	-	6.74	7.11

### Análisis de conductividad

Realizamos el análisis de conductividad teniendo en cuenta el solvente a usarse, el complejo de cobalto es soluble tanto en agua y DMSO. La conductividad molar depende del tipo de disociación del electrolito, estos conducen la corriente eléctrica en disolución. De acuerdo con la fórmula molecular propuesta  $[\text{CoCl}(\text{IP})(\text{H}_2\text{O})]\text{Cl}$ , esta se disocia en un anión de Cl y un catión  $[\text{CoCl}(\text{IP})(\text{H}_2\text{O})]$ , según Velho<sup>4</sup> y Geray<sup>5</sup>, la conductividad obtenida para el complejo de cobalto (II) está de acuerdo con el tipo de electrolito 1: 1 (20 – 62  $\mu\text{S}$ ) a 25 °C en DMSO con una concentración de  $10^{-3}$  M, donde probablemente un cloro actúa como contraión y el otro como ligante de la forma  $[\text{CoCl}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]\text{Cl}$ . Los resultados de las mediciones conductimétricas se comparó la conductividad entre el híbrido, sulfato de hierro (II) y el complejo de hierro (FeIP); la conductividad obtenida para el complejo de hierro está de acuerdo con los complejos metálicos de tipo de electrolito 1: 1 (87 – 168  $\mu\text{S}$ ) a 25°C en agua con una concentración de  $10^{-3}$  M, concordando con los datos de Velho<sup>4</sup>, donde el sulfato actúa como contraión de la forma  $[\text{Fe}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{SO}_4$ , y no como ligando. El híbrido IP no presenta conductividad en agua. Intervalos de conductividad molar para distintos tipos de electrolitos en las mismas condiciones experimentales que los complejos estudiados en esta tesis se presenta en la Tabla 3. Por esto que la determinación de la conductividad de una disolución de un compuesto de coordinación, resulta útil para la caracterización del compuesto, ya que se puede así conocer el tipo de electrolito de que se trata. En la Tabla 2, se muestra las conductividades de cada compuesto.

**Tabla 2.** Conductividad del híbrido (IP), sales y los complejos metálicos

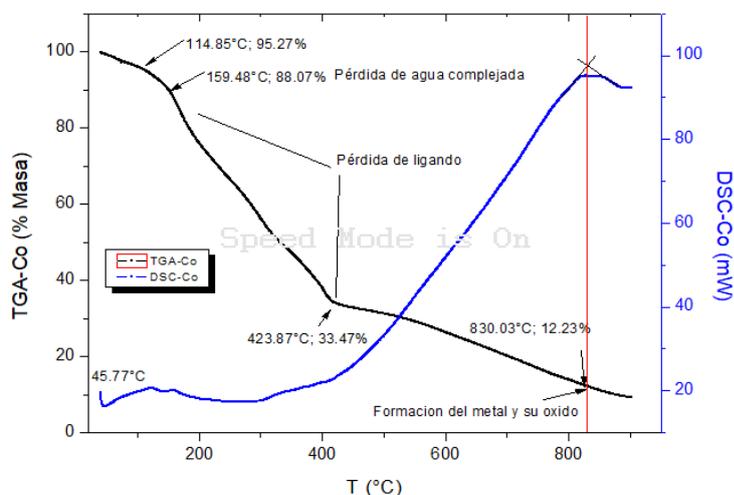
Componentes	$\Lambda$ DMSO ( $\mu\text{S}$ ) a 25°C	$\Lambda$ agua ( $\mu\text{S}$ ) a 25°C
IP	1.6	6.0
Sal de cobalto	49.3	-
CoIP	29.6	-
Sal de hierro	-	198
FeIP	-	163

**Tabla 3.** Intervalos de conductancia molar para los distintos electrolitos en DMSO y agua a 25°C.

N°	Tipo de electrolito	Rango ( $\mu\text{S}$ ) en DMSO	Rango ( $\mu\text{S}$ ) en agua
1	1:1	20 – 62	87 – 168
2	2:1	54 – 110	168 – 310
3	3:1	-	350 – 425

### Análisis Termogravimétrico de los complejos metálicos

En los termogramas TGA y DSC del complejo CoIP de la Figura 1, se observan varias etapas de descomposición. La descomposición térmica del complejo exhibe una pérdida de masa entre 45.77°C - 114.85°C se puede atribuir a la pérdida de dos aguas de hidratación o humedad.<sup>6</sup> Se asume que la presencia de humedad en la muestra es despreciable y probablemente el complejo tendría 2 moléculas de agua de hidratación y 1 de complejación. Dado que se propone una estructura en la que hay 3 moléculas de agua y que en el final del segundo pico endotérmico a 159.48°C existe una pérdida porcentual teórica de masa: 88.07% (experimental) y 88.09% (calculada), siendo una molécula de agua coordinada al metal.

**Figura 1.** Termograma del complejo de cobalto

La pérdida de masa entre 159.48°C y 423.87°C se puede atribuir a la descomposición del híbrido siendo el valor calculado de 32.57% y resultados experimentales de 33.47%.

Finalmente, a 830.03°C se observa lo que, en porcentaje de masa, se podría atribuir a la presencia de cobalto metálico siendo el valor experimental y teórico a 12.23% y 12.97%, respectivamente. Cabe mencionar que el porcentaje de las pérdidas de masa experimentales con la teórica difieren en menos de 1% con los resultados teóricos, lo cual nos indica que la fórmula química propuesta es la correcta (Tabla 4).

% Calculado del metal:

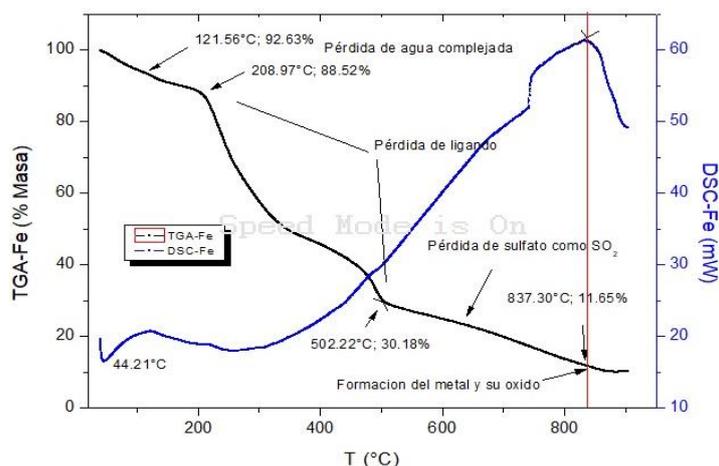
Masa del complejo (454.13) → 100%

Masa del metal Co (58.93) → 12.97%

**Tabla 4.** Datos obtenidos del termograma del complejo de cobalto

Componentes	T° (°C)	% Calculado	% Experimental	Δ%
3H <sub>2</sub> O	45.77 – 159.48	88.09	88.07	0.02
Híbrido (IP)	159.48 – 423.87	32.57	33.47	0.90
Metal (Co)	423.87 – 830.03	12.97	12.23	0.74

Las curvas TGA y DSC del complejo FeIP de la Figura 2 muestran varias etapas de descomposición. Se inicia con la pérdida de aguas de hidratación o humedad a 44.21, también se observan picos endotérmicos que se pueden atribuir a la pérdida de agua coordinada al ion metálico a 121.56 °C - 208.97°C con un porcentaje de pérdida de masa experimental de 88.52%, concordando con el porcentaje de pérdida de masa teórica a 88.65%.



**Figura 2.** Termograma del complejo de hierro

Por tanto, asumiendo que la presencia de humedad en la muestra es despreciable, se tendría que el complejo tiene 1 moléculas de agua de hidratación y 2 de complejación. La pérdida de masa entre 208.97°C y 502.22°C, se puede atribuir a la pérdida del híbrido, pues el valor teórico es 31.90% y el valor experimental es 30.18%. La diferencia entre ambos valores debe evaluarse más detalladamente para determinar su causa. Finalmente, a 837.30°C se observa lo que, en porcentaje de masa, se podría atribuir a la presencia de hierro metálico, pues los valores experimental y teórico son 11.65% y 11.72%, respectivamente (Tabla 5).

% Calculado del metal:

Masa del complejo (454.13) → 100%

Masa del metal Co (58.93) → 11.72%

**Tabla 5.** Datos obtenidos del termograma del complejo de hierro

Componentes	T°(°C)	% Teórico	% Experimental	Δ%
H <sub>2</sub> O hidratada	44.21	92.43	92.63	0.20
2H <sub>2</sub> O complejada	121.56 - 208.97	88.65	88.52	0.13
Hibrido (IP)	502.22	31.89	30.18	1.71
Metal (Fe)	837.30	11.72	11.65	0.07

### Espectroscopía infrarroja de los complejos metálicos

El estudio del espectro infrarrojo del complejo proporciona información sobre la naturaleza de la unión del híbrido (IP) que actúa como un ligando unido al átomo central. En el híbrido (IP) las asignaciones se centran en 8 grupos donadores: anillo de la pirazinamida (N=C), anillo de isoniácida (N=C), amida terciaria (C=O), amida secundaria (C=O), base de schiff (N=C) y amina secundaria (NH); las vibraciones de los enlaces se desplazan a bajas y altas frecuencias cuando se produce la unión del ligando al metal.

El espectro del híbrido (IP) (Figura 4) presenta dos bandas características el grupo amida secundaria (3263 cm<sup>-1</sup>) y terciaria (3207 cm<sup>-1</sup>). El espectro del complejo de cobalto se observa la desaparición de los picos N-H con respecto al espectro del híbrido y la disminución de la intensidad de las bandas, esto probablemente debido a la existencia del solapamiento con una banda ancha de hidratación existente en el complejo, la banda característica del H<sub>2</sub>O aparece en el espectro del complejo indicando que está hidratada o que se encuentra coordinada con el metal.<sup>5</sup>

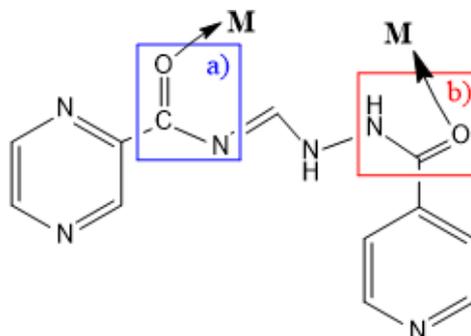
Cuando el átomo de nitrógeno del grupo amida está involucrado en una coordinación, disminuye la frecuencia de la tensión N-H<sup>7,8</sup>. El espectro del complejo aparece una banda a 3362 cm<sup>-1</sup> asignada a NH—N; mientras que en el híbrido esta banda no aparece. Sin embargo, esto no es suficiente para indicar la coordinación del metal con las bandas de N-H del híbrido. En este estudio, también se observan que los picos C-H del híbrido son 3092, 3068 y 3052 cm<sup>-1</sup> se desplazan a bajas y altas frecuencias con respecto al espectro del complejo de cobalto a 3158, 3057 y 2960 cm<sup>-1</sup>, respectivamente; es de destacar que esto ha sido también observado por Ramirez<sup>9</sup> y Ferrari<sup>10</sup>.

En el espectro del complejo FeIP no se observan los picos N-H del híbrido. Sin embargo, esto no es suficiente para indicar la coordinación del metal con las bandas de N-H del híbrido. Aparece una banda ancha a 3414 cm<sup>-1</sup> perteneciente al H<sub>2</sub>O probablemente debido a la hidratación o coordinación con el metal. Los picos C-H del complejo de cobalto se desplazan a 3147, 3057 y 2956 cm<sup>-1</sup> con respecto al espectro del híbrido como se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Asignaciones de los grupos funcionales del híbrido y el complejo CoIP de  $\nu$  3600 a  $3000\text{ cm}^{-1}$ 

Asignación	IP ( $\text{cm}^{-1}$ )	CoIP ( $\text{cm}^{-1}$ )	FeIP
$\nu(\text{NH})$	-----	3362	-----
	3263	-----	-----
	3207	-----	-----
$\nu(\text{CH})$	3092	3158	3147
	3068	3057	3057
	3052	2960	2956

Los puntos de coordinación involucrados en esta región son el oxígeno del grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) y el N de los dos anillos aromáticos del híbrido y de la base de schiff  $\text{N}=\text{C}$ . Cuando el grupo carbonilo está coordinando su frecuencia de tensión disminuye con respecto al ligando libre<sup>7,11,12</sup>. El espectro del complejo la banda del grupo carbonilo de la amida secundaria se encuentra a menores frecuencias desplazándose  $1679\text{ cm}^{-1}$  con respecto al híbrido, mientras que la amida terciaria se desplaza solo  $1659\text{ cm}^{-1}$ . Por ende, podemos indicar en la Figura 3 la formación del enlace metal-ligando.

**Figura 3.** Estructura química del híbrido. Posibles coordinaciones con el metal a) amida terciaria o b) amida secundaria

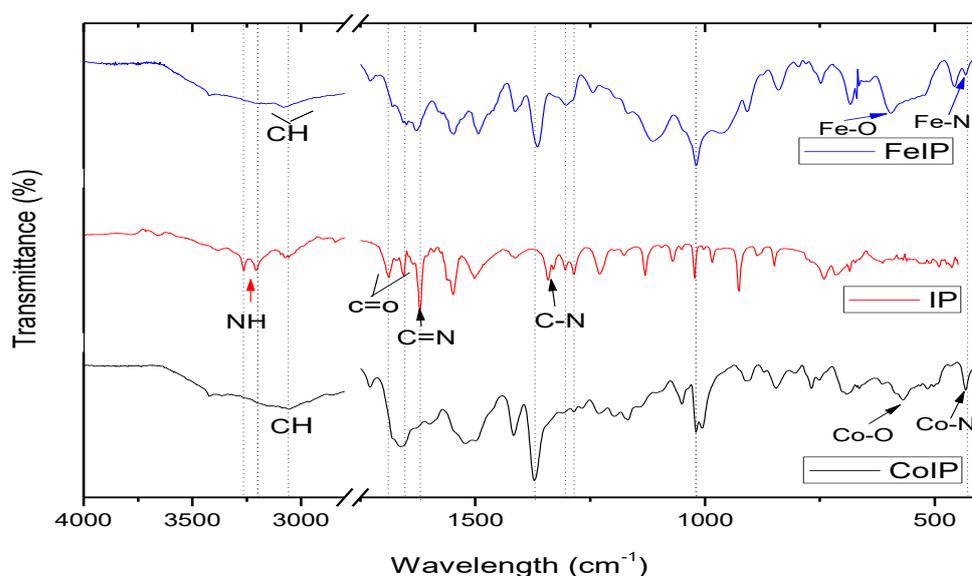
La banda de base de schiff  $\text{C}=\text{N}$  en el espectro CoIP se desplaza a  $1625\text{ cm}^{-1}$  disminuyendo la intensidad de la banda. En el espectro del híbrido IP (Figura 4) se aprecia una banda NH, esta se desplaza a menores frecuencias en el espectro de CoIP indicando que este pico está involucrado en la coordinación. La banda  $\text{CO-N}$  en el espectro de CoIP se desplaza  $1371\text{ cm}^{-1}$  con respecto al híbrido; lo que nos proporciona un indicio de que el nitrógeno puede estar enlazado al metal. Por otro lado, también la banda NH se desplazó  $1521\text{ cm}^{-1}$  en el espectro del complejo.

En el espectro del complejo de hierro (Figura 4) presenta dos bandas asignadas al grupo carbonilo de la amida secundaria y terciaria ambas desplazándose  $1680$  y  $1661\text{ cm}^{-1}$  con respecto al híbrido. La banda de base de schiff  $\text{C}=\text{N}$  disminuye significativamente la intensidad del pico y se desplaza a  $1628\text{ cm}^{-1}$ , lo que puede atribuirse al enlace metal-ligando o al solapamiento que le origina la banda de la amida terciaria. Además, la banda asignada como  $\text{CO-N}$  se desplaza  $1368\text{ cm}^{-1}$  con respecto al híbrido lo que muestra que este grupo participa en la coordinación al metal. La banda  $\text{C-N}$  tiene dos picos

característicos el primero se desplazó  $1300\text{ cm}^{-1}$ , mientras que el segundo pico no aparece, como se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Asignaciones de los grupos funcionales del ligando y de los complejos de  $1700$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$

Asignación	IP ( $\text{cm}^{-1}$ )	CoIP ( $\text{cm}^{-1}$ )	FeIP ( $\text{cm}^{-1}$ )
$\nu(\text{C=O})_{\text{sec.}}$	1687	1679	1680
$\nu(\text{C=O})_{\text{ter.}}$	1654	1659	1661
$\nu(\text{N=C})_{\text{schiff}}$	1620	1625	1628
$\nu(\text{NH})$	1548	1521	1548
$\nu(\text{CO-N})$	1341	1371	1368
$\nu(\text{=C-N})$	1303	1306	1300



**Figura 4.** Comparación de los espectros FT-IR del híbrido y complejos metálicos

En el espectro del complejo CoIP la banda N-N se desplazó  $1198\text{ cm}^{-1}$  indicando su posible participación en la coordinación al metal. De la misma manera exhiben dos bandas CH desplazadas  $906$  y  $765\text{ cm}^{-1}$  con respecto a las bandas del ligando en C-H a  $926$  y  $739\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Según la literatura<sup>13,14</sup> y en este estudio concuerda la presencia de las bandas de los enlaces Co-O a  $565\text{ cm}^{-1}$  y Co-N a  $430\text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro del complejo FeIP la banda N-N se desplazó significativamente  $1198\text{ cm}^{-1}$  con respecto al espectro IP, indicando su participación en la coordinación del metal. Así mismo, la banda C-N del anillo heteroaromático se desplazó  $1132\text{ cm}^{-1}$ . El espectro del complejo FeIP exhibe dos bandas CH desplazándose  $25$  y  $8\text{ cm}^{-1}$  con respecto a las bandas del ligando que aparecen en  $926$  y  $739\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Numerosas investigaciones<sup>11,12,13,14,15</sup> y en este estudio concuerda con los picos de los enlaces Fe-O a  $568\text{ cm}^{-1}$  y Fe-N a  $433\text{ cm}^{-1}$  (Tabla 8). Según la literatura<sup>8</sup>, se aprecia bandas del sulfato a  $691\text{ cm}^{-1}$ .

**Tabla 8.** Asignaciones de los grupos funcionales del ligando y de los complejos de 1200 a 400  $\text{cm}^{-1}$ 

Asignación	IP ( $\text{cm}^{-1}$ )	CoIP ( $\text{cm}^{-1}$ )	FeIP ( $\text{cm}^{-1}$ )
v(N-N)	1171	1198	1198
v(N-C)ring INH	1130	1136	1132
v1(SO4)	----	-----	1112
v(C-C)	1070	1055	----
v(N-C)ring PZA	1022	1019	1019
v2(SO4)	----	----	969
v(C-H)	926	906	901
	739	765	747
v(Fe-O)	----	-----	593
v(Co-O)		565	----
v3(SO4)	----	---	457
v(Fe-N)	----	---	433
v(Co-N)	----	430	----

### Espectroscopía Raman de los complejos metálicos

El espectro Raman muestra modos de frecuencia experimentando un desplazamiento bajo o alto. El espectro del complejo de Co (Figura 5) presenta desplazamiento de algunas bandas del híbrido. En los espectros de los complejos metálicos las bandas que corresponde a la amida secundaria y terciaria se desplazan 1660 y 1637  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente con respecto a las observadas en el híbrido, lo que indicaría que existe formación del enlace metal-ligando. La banda de la base de schiff  $\text{N}=\text{C}$  se desplazó a menor frecuencia y aparece en 1559  $\text{cm}^{-1}$ . En la Tabla 9 se muestra las bandas del híbrido (IP) y de los complejos metálicos.

**Tabla 9.** Identificación de las bandas del complejo metálico e IP

Asignación	IP ( $\text{cm}^{-1}$ )	CoIP ( $\text{cm}^{-1}$ )	FeIP ( $\text{cm}^{-1}$ )
v(C=O)amida sec.	1653	-----	1660
v(C=O)amida ter.	1595	1589	1637
v(N=C)schiff	1566	----	1559
v(NH)	1523	1525	1522
v(=C-N)	1305	1289	1296
	1265	1266	---
v(N-N)	1105	1104	----
v(C-N)anillo PZA	1015	1018	----
v(NH)	621	----	----

En el espectro del complejo de cobalto presenta una banda de la amida terciaria C=O a menores frecuencias 1589  $\text{cm}^{-1}$  con respecto al híbrido. Torregiari<sup>15</sup> indica que al desaparecer la banda de la amida hay formación del enlace metal-ligando, mientras que en nuestro estudio la banda de la amida secundaria desaparece. La banda de base de schiff N=C desaparece tras la formación del complejo. Observando la formación una banda ancha por lo que tal vez existe un solapamiento con la banda del carbonilo. En caso de la banda N-H de la amida, hay un ligero desplazamiento a 1525  $\text{cm}^{-1}$ .

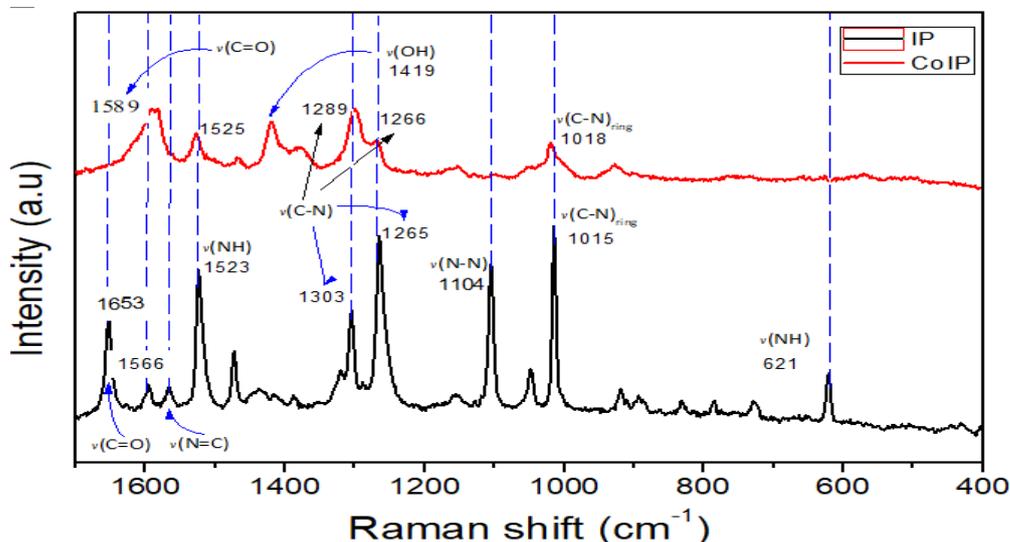


Figura 5. Comparación de los espectros Raman del híbrido IP y el complejo de cobalto CoIP

Por otro lado, existe un ligero desplazamiento de 1018  $\text{cm}^{-1}$  de las bandas de C-N de los anillos aromáticos de pirazinamida e isoniacida mostrando que no forman parte del enlace metal-ligando. En el espectro de híbrido (IP) la banda de tensión de NH a 621  $\text{cm}^{-1}$ , ya no se observa en el espectro del complejo.

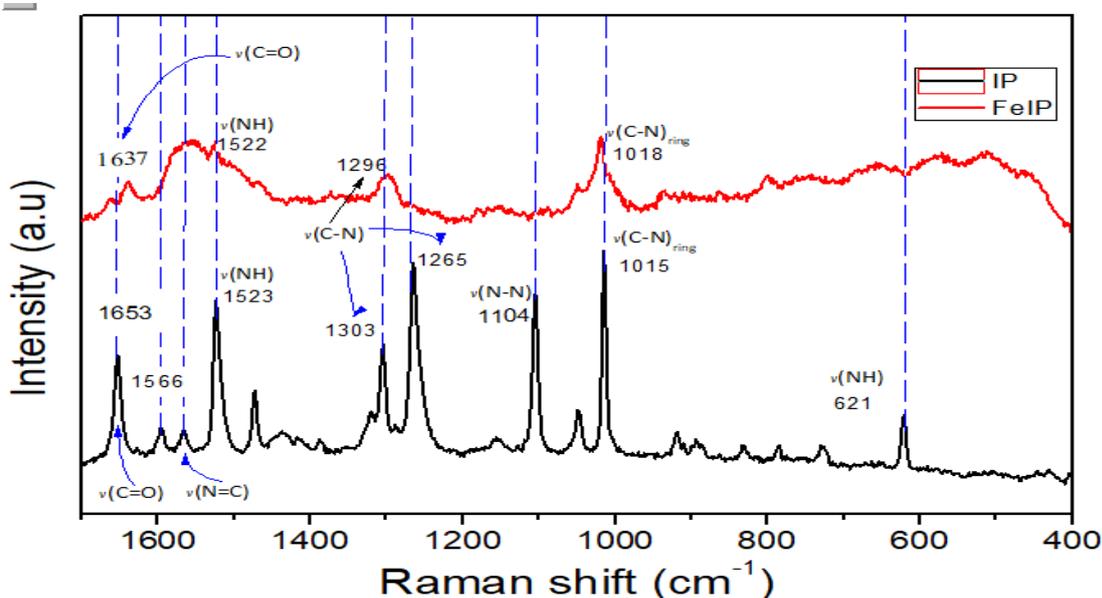


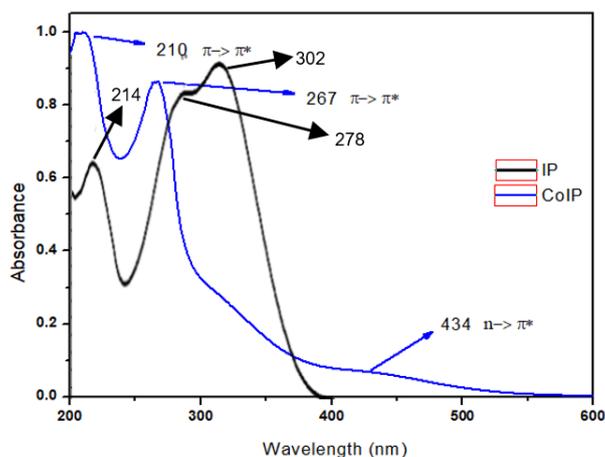
Figura 6. Espectros Raman de IP y complejo de hierro FeIP.

Para el enlace de unión C-N de los fármacos libres (pirazinamida e isoniácida) se presentó en 1303 y 1265  $\text{cm}^{-1}$  en el híbrido mientras que en el complejo se desplazó 1296  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas N-N, C-N y  $\nu 2\text{NH}$  del híbrido ya no se observan más en el espectro del complejo de hierro (Figura 6). Además, no se puede apreciar las bandas de sulfato en el espectro Raman como en el espectro infrarrojo, ya que probablemente exista un solapamiento con las otras bandas.

### Espectroscopía UV-Visible

El espectro del híbrido (línea azul) (Figura 7) presenta dos bandas, la primera a 214 nm (transición  $\pi \rightarrow \pi^*$ ) y la segunda a 278 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ), se puede atribuir a la presencia de heteroátomos y grupos sustituyentes con capacidad de donar sus electrones libres al anillo aromático. El espectro del complejo de Co (II) (línea negra) (Figura 7) la primera banda (210 nm) y segunda banda (267 nm) se desplazan a menores frecuencias con respecto al híbrido.

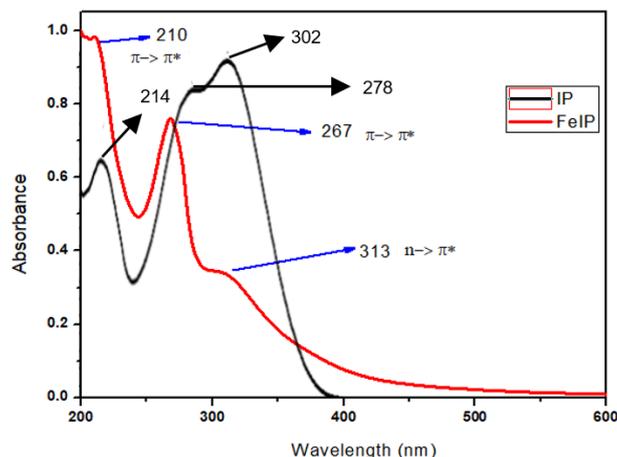
La banda del complejo se encuentra 434 nm donde probablemente el metal se encuentra coordinado a los grupos C=O ó C=N del híbrido. En la Figura 7 se muestra que la formación del complejo metálico provocó desplazamientos con respecto a las bandas del híbrido.



**Figura 7.** Espectro UV-Visible del híbrido IP y del complejo de Cobalto

En el espectro del complejo de hierro (línea negra) (Figura 8) se presentan 3 bandas, la primera y la segunda banda se generan debido a la presencia de heteroátomos y grupos sustituyentes con capacidad de donar sus electrones libres el anillo aromático desplazándose a menor longitud de onda 4 y 11 nm respectivamente. La tercera banda se encuentra a 313 nm desplazándose 11 nm con respecto al híbrido, mostrando la probable participación en la coordinación al metal; concordando con los datos de Taylor<sup>16</sup> y Kosasy<sup>17</sup> que sintetizaron complejos metálicos con grupos C=O y C=N presentes en el híbrido, esto nos indica que el metal se está enlazando con esos grupos.

Kamounah<sup>18</sup> y Herzfeld<sup>19</sup> han descrito los espectros de numerosos complejos de metales de transición que contienen diferentes ligandos de base de schiff.



**Figura 8.** Espectro UV-Visible de IP y FeIP

Las bandas observadas en ambos espectros de los complejos metálicos presentan transiciones de  $n \rightarrow \pi^*$ , transiciones de energía grande a menor longitud de onda por ello en ambos espectros UV-Vis no sobrepasa los 500 nm, tal vez debido a la naturaleza del ligando de campo fuerte generando transiciones de gran energía. Debido a los desplazamientos de las bandas nos indica que hay un indicio de la formación de los complejos metálicos en comparación del híbrido.

### Estructura propuesta para los complejos metálicos

Tomando en cuenta la información extraída del análisis elemental, las técnicas espectroscópicas y termogravimetría, los complejos metálicos con fórmula:  $[\text{Co}(\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})_2]\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Figura 9 y 10, respectivamente)

En el complejo CoIP presenta una estructura octaédrica donde el análisis elemental coincide con la presencia de dos cloros en la estructura del compuesto de coordinación. Además, la prueba de conductividad eléctrica evidencia un ion cloruro como contraión y otro como coordinado al átomo central. En diversos trabajos de investigación se reporta al cobalto(II) con un número de coordinación igual a 6, el híbrido (IP) actúa como un ligando unido por cuatro puntos de coordinación, dando lugar a que los otros dos puntos de coordinación estén ocupados por un cloro coordinado al átomo central y una molécula de agua de coordinación, esta propuesta se corroboró en el análisis termogravimétrico que evidencia la pérdida de una sola molécula de agua de coordinación en el rango de temperatura de 120 a 160 °C.

Por otro lado, el complejo FeIP está coordinado con 2 moléculas de agua. En ambos complejos contiene dos moléculas de agua de hidratación. FT-IR nos indica que por la amida secundaria ( $\text{C}=\text{O}$ ) se desplaza a menor frecuencias, el pico N-N se desplaza a mayor frecuencia, el pico C-N se desplaza a mayor frecuencia y muestra picos característicos al enlace Co-N y Co-O.

Espectroscopía Raman en el espectro la banda de la amida secundaria y base de schiff desaparece. El análisis elemental y la conductividad nos proporciona información de la fórmula química propuesta. Así mismo el TGA.

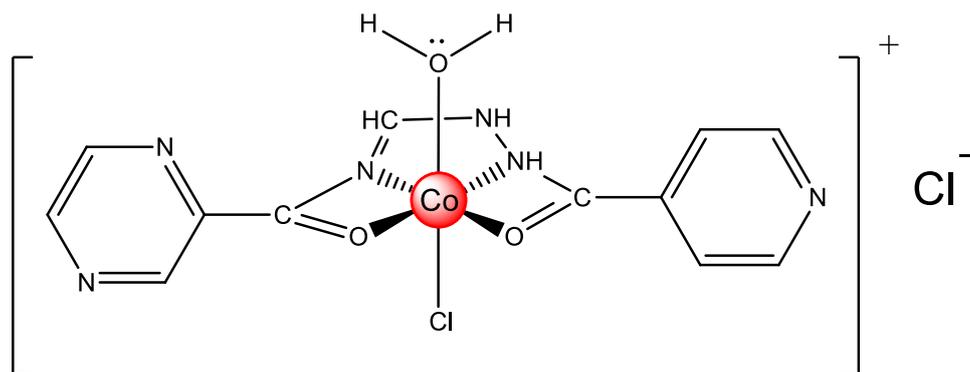


Figura 9. Propuesta de la estructura molecular del complejo Co-IP

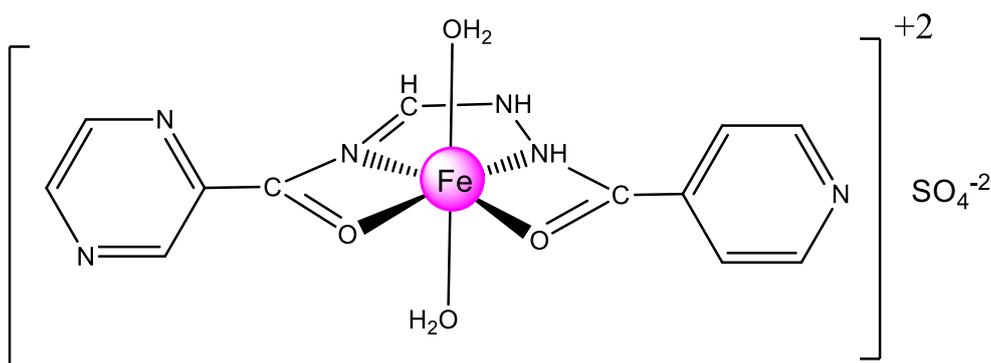


Figura 10. Propuesta de la estructura molecular del complejo Fe-IP

### Evaluación de la actividad biológica

De acuerdo con los resultados de TEMA, la actividad antimicrobiana de pirazinamida fue desarrollado a un pH 6 y pH 6.7; siguiendo el método de Ensayo de microplaca de tetrazolio para la viabilidad celular (TEMA) de acuerdo con Luz Caviedes<sup>20</sup>

En la Tabla 10, se observa que la pirazinamida no afectó de manera absoluta el crecimiento de las micobacterias a pH 6.7. Sin embargo, se podría mencionar que las bacterias depositadas en los pozos con pirazinamida mayor o igual a 0.8 ug/mL podrían haber sido afectadas en alguna vía de señalización de la respiración celular.

Se observa el cambio de color con tetrazolio hasta 0.025 mM en la sal de cloruro de cobalto, las micobacterias no crecieron y tampoco se observó viraje de color; dicha concentración inhibe completamente el crecimiento de las micobacterias a pH 6.7 El compuesto sulfato ferroso tuvo efecto sobre la respiración celular a 3.25 mM, mas no inhibió el crecimiento. Cabe señalar que hubo precipitación de este compuesto, probablemente por la presencia de BSA en el medio de cultivo.

El complejo de hierro y el híbrido IP redujeron el crecimiento de las micobacterias a partir de 0.025 mM, similar a isoniazida, y tampoco se observó viraje de color a partir de dicha concentración. A diferencia de la respuesta del híbrido IP a pH 6.7, este compuesto inhibió drásticamente el crecimiento de las micobacterias a partir de 0.013 mM y no se

observó viraje de color a partir de 0.013 mM. La diferencia de la respuesta de crecimiento es explicada por el pH ácido (6.0), y se puede mencionar que esta condición favorece la acción de los compuestos.

Los valores de concentración mínima inhibitoria (Tabla 10) fueron considerados aquellas concentraciones con las que se inhibió la multiplicación de las micobacterias. Los valores con símbolo > son las de mayor concentración con respecto a un determinado compuesto que, probablemente empleando mayores concentraciones se lograría inhibir el crecimiento, y los valores con símbolo < son las de menor concentración del compuesto, lo que significa que a concentraciones menores tales compuestos podrían inhibir el crecimiento. Para la reacción negativa de viraje con tetrazolio, se consideraron los puntos de concentración del compuesto en el que no se observó cambio de color de amarillo ámbar a púrpura o azul violeta.

**Tabla 10.** Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria y Reacción negativa de viraje de color con tetrazolio a pH 6.0 y 6.7 de los compuestos precursores de pirazinamida.

Compuesto	Concentración	Reacción	Concentración	Reacción	OBSERVACIONES
	Mínima Inhibitoria (mM)	negativa de viraje con tetrazolio	Mínima Inhibitoria (mM)	negativa de viraje con tetrazolio	
	a pH 6.0		a pH 6.7		
Cloruro de cobalto	ND	ND	0.2	0.05	
Complejo de cobalto	ND	ND	<0.025	0.025	
Híbrido IP	<0.013	0.013	0.025	0.025	
Sulfato ferroso	ND	ND	>3.25	3.25	Precipitación >3.25 mM
Complejo de hierro	ND	ND	1.63	0.025	

ND: No Determinado.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron los complejos de Co(II) y Fe(II) con el híbrido pirazinamida-isoniacida; Adaptándose a los parámetros de atmosfera inerte, temperatura, relación molar metal: ligando (1:2) bajo estas condiciones se obtiene mayor rendimiento (30% más) y se evita la oxidación del metal. Las fórmulas moleculares propuestas con base en los resultados de la caracterización para los complejos fueron  $[\text{Co}(\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  para el complejo Co-IP y  $[\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})_2]\text{SO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$  para el complejo Fe-IP, en ambos complejos el centro metálico del metal se encuentra en un entorno octaédrico donde las moléculas del híbrido IP se ubican en el plano horizontal y los ligandos cloro y sulfato en

el plano axial de la molécula. La Evaluación de la actividad biológica del Complejo de cobalto  $[\text{Co}(\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e híbrido pirazinamida-isoniacida ( $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_6\text{O}_2$ ) inhibieron el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a concentraciones inferiores 0.025 y 0.8 respectivamente en comparación con la concentración mínima inhibitoria de Pirazinamida, lo cual demuestra que la actividad antituberculosa de la pirazinamida aumenta cuando se encuentra enlazada al metal.

## AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado mediante el acuerdo de gestión N° 208-2015-FONDECYT al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería. Agradecemos a la Dra. Maribel Navarro Acosta (Laboratorio de Bioinorgánica y Catálisis, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil) quien registró los espectros y el análisis elemental significativo, tanto en la investigación, como en la redacción del artículo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Tuberculosis. [Internet]. 2022 [Consultado 14 mayo 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
2. Aguilar O, Castro R, Sánchez J, Lopez H, Barba N. Química inorgánica medicinal: Vanadio, platino, oro. Educ Quím. 2012; 23(1), 33-40.
3. Mendoza A, Gotuzzo E. Extremely resistant tuberculosis, history and current situation. Acta Med Per. 2008; 25(4): 236-246.
4. García Velho R. Medidas de condutividade na caracterização de complexos inorgânicos: um levantamento bibliográfico. [Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra)]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2006.
5. Geary J. The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds. Coord Chem Rev. 1991; 7 (1): 81-122.
6. Herzfeld R, Nagy P. Roles of the Acidity and Basicity of the Solvent in the Solvent Effect Observed in the Absorption Spectra of Certain Types of Schiff Bases. Spectrosc Lett. 1999; 32(1), 57-71.
7. Socrates G. Infrared and Raman characteristic group frequencies tables and charts. Third edition. Chichester, UK: J. Wiley and Sons; 2001.
8. Nakamoto K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry. 6th edition. Chichester, UK: J. Wiley and Sons; 2009. doi: 10.1002/9780470405888.
9. Ramírez RI, Aliaga CM, Grandez F, Brillo P, Zimic MJ, Cauna Y, et al. Pyrazinamide–isoniazid hy-brid: synthesis optimisation, characterisation, and antitu-berculous activity. Rev Colomb Quim. 2022; 50(3): 16-23.
10. Ferraresi-Curotto V, Eccheverria G, Piro O. Synthesis and characterization of a series of isoniazid hydrazones. Spectroscopic and theoretical study. J Mol Struct. 2016; 1133: 436-447.

11. Bhatia S, Kaushik NK, Sodhi GS. Studies on organomercury(II) complexes of isoniazid. *J Inorg Biochem.* 1987 Mar;29(3):181-6.
12. Bamigboye MO, Obaleye JA, Lawal M, Yakubu A. Synthesis, characterization and antimicrobial study of mixed isoniazid- pyridoxine metal drug complexes. *Nat Sci.* 2012; 10(8), 103–105.
13. Zinner LB, Crotty DE, Anderson TJ, Glick MD. Synthesis and Structure of Complexes of Lanthanide Nitrates and Isonicotinic Acid Hydrazide. *Inorg Chem Commun.* 1979; 18(7): 2045–2048.
14. Ali M, Qader SA, Shahid F, Arayne MS, Mumtaz M. Synthesis, characterization and enzyme inhibitory activity of new pyrazinamide iron complexes. *Pak J Pharm Sci.* 2017 May;30(3):825-831.
15. Torreggiani A, Taddei P, Fini G. Characterization of Dioxygenated Cobalt (II)–Carnosine Complexes by Raman and IR Spectroscopy. *Biopolymers.* 2002;67(1):70-81.
16. Kishore D, Kumar D. Cadmium and tin complexes of Schiff-base ligands. *J Coord Chem.* 2011; 64, 2130-2156.
17. El kosasy AM, Ghonim OAA, Ayada MF, Abdel-Fattah LE. Spectrophotometric kaand potentiometric determination of the stability constant of pyrazinamide-Fe(III) binary complex. *ACAIJ.* 2011; 10(3), 165–169.
18. Kamounah FS, Salman SR, Mahmoud A. Substitution and solvent effect of some substituted hydroxy Schiff bases. *Spectrosc Lett.* 1998; 31(7), 1557-1567.
19. Herzfeld R, Nagy P. Roles of the Acidity and Basicity of the Solvent in the Solvent Effect Observed in the Absorption Spectra of Certatn Types of Schiff Bases. *Spectrosc Lett.* 1999; 32(1), 57-71.
20. Caviedes L, Delgado J, Gilman RH. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2002 May;40(5):1873-4.

