

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE**



Inhibición de la carbonilación producida por paraquat en plasma humano, por acción del extracto de tejocote (*Crataegus mexicana*)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

PRESENTA:

L.N. Brenda Berenice Tlatelpa Morales

BAJO LA DIRECCIÓN DEL:

**Dr. Daniel Méndez Iturbide
Dra. Edelmira García Nieto**

Tutores:

**Dra. Madaí Romero Muñoz
Dr. Aarón Mendieta Moctezuma**



Ixtacuixtla, Tlax, octubre de 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
 CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
 MAESTRIA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Código: 505-RGE-04
 Publicación: Febrero 2019
 Revisión: 9001:2015 03

LIC. BRENDA BERENICE TLATELPA MORALES
 CANDIDATA A MCSA
PRESENTE

En cumplimiento al artículo 52 fracción "d" del Reglamento General de Evaluación Académica, el comité de titulación ha revisado el trabajo de investigación titulado: "Inhibición de la carbonilación producida por paraquat en plasma humano, por acción del extracto de tejocote (*Crataegus mexicana*)", realizado bajo la dirección del Dr. Daniel Méndez Iturbide. No habiendo encontrado objeción alguna, se autoriza su impresión:

- Dra. Patricia Limón Huitrón
- Dr. Daniel Méndez Iturbide
- Dra. Edelmira García Nieto
- Dr. Aarón Mendieta Moctezuma
- Dr. Héctor Santos Luna Zendejas

Patricia Limón Huitrón

Daniel Méndez Iturbide

Edelmira García Nieto

Aarón Mendieta Moctezuma

Héctor Santos Luna Zendejas

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"
 Ixtacuixtla, Tlax., 04 de octubre de 2019.

Edelmira García Nieto

 DRA. EDELMIRA GARCÍA NIETO
 COORDINADORA GENERAL DEL CIGy Y DEL POSGRADO

c.c.p. Expediente



Documento exclusivo para uso de la dependencia responsable o autoridad correspondiente

Agradecimientos

Jehová, tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son resultado de tu ayuda y cuando caigo y me pones a prueba, aprendo de mis errores y me doy cuenta de que los pones en frente mío para que mejore como ser humano y crezca de diversas maneras, gracias Dios por permitirme vivir y disfrutar de cada día.

Agradezco al Dr. Daniel Méndez Iturbide por creer en mí desde un inicio, no me dejo descansar ni un solo momento hasta lograr la meta. No tengo palabras suficientes para agradecerle por todos los consejos, este logro se lo debo a usted.

Agradezco al comité tutorial, personas de gran sabiduría quienes se han esforzado por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro, sencillo no ha sido, pero gracias a las ganas de trasmitirme sus conocimientos y dedicación, he logrado importantes objetivos como culminar el desarrollo de esta tesis con éxito.

Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por confiar y creer en mí y en mis expectativas día con día. Gracias a mí madre por estar dispuesta a acompañarme en cada larga y agotadora noche de estudio; gracias a mí padre por desear y anhelar siempre lo mejor para mí vida.

Gracias Dios por permitirme tener y disfrutar a mí familia, gracias a ellos por apoyarme en cada decisión y proyecto. Gracias por creer en mí.

La vida es hermosa y una de las principales características es que la podemos compartir y disfrutar con quienes amamos, gracias a mí pareja por entenderme, porque en todo momento ha sido un apoyo incondicional en mí vida, eres la felicidad encajada en una sola persona. Mis sinceras gracias para ti que has sido un pilar muy importante en mi vida, nunca terminaré de agradecerte por tanta ayuda. Te amo.

Mediante estos agradecimientos quiero exaltar la labor de todos mis compañeros, todos aquellos que estuvieron presentes durante toda o la mayor parte de la

realización de tesis, gracias a aquellos que con respeto y decencia realizaron aporte a esta, gracias a todos.

Gracias a la vida porque cada día me demuestra lo hermosa que es y lo justa que puede llegar a ser.

ÍNDICE	PÁGINA
1. RESUMEN	9
2. ABSTRACT	11
3. INTRODUCCIÓN	12
3.1. Historia de los plaguicidas.....	12
3.2. Plaguicidas en México.....	15
3.3. Exposición a los plaguicidas	19
3.4. Paraquat.....	20
3.5. Mecanismos de toxicidad del paraquat	21
3.6. Radicales libres	24
3.7. Proteínas.....	28
3.7.1 Estrés oxidativo de las proteínas	30
3.7.2 Carbonilación de proteínas	33
3.7.2.1 Técnicas para la detección de carbonilación	36
3.8. Antioxidantes.....	40
3.9. El género (<i>Crataegus mexicana</i>).....	44
4. ANTECEDENTES	45
5. JUSTIFICACIÓN	48
6. HIPÓTESIS	49
7. OBJETIVOS	50
7.1. Objetivo general	50
7.2. Objetivos específicos	50
8. METODOLOGÍA	51
8.1. Obtención de los frutos de tejocote	51
8.2. Obtención de extractos	51

8.3.	Toma de muestra sanguínea	52
8.4.	Curva dosis respuesta.....	52
8.5.	Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	53
8.6.	Determinación de grupos carbonilo por el método alcalino DNPH.....	54
9.	RESULTADOS	56
9.1.	Cuantificación de proteína.....	58
9.2.	Curvas dosis respuesta de paraquat.....	59
9.2.1.	Espectro de paraquat	59
9.2.2	Intervalo lineal de paraquat	60
9.2.3	Concentración efectiva media de paraquat.....	61
9.2.3	Concentración máxima inhibitoria media del extracto de acetona de tejojote	62
9.2.4	Inhibición la de carbonilación.....	63
10.	DISCUSIÓN	64
11.	CONCLUSIÓN	69
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Estructura química de algunos plaguicidas usados durante la Revolución Industrial	12
Figura 2. Plaguicidas derivados a partir del nitrógeno.....	14
Figura 3. Estructura química del paraquat.....	14
Figura 4. Ciclo redox del paraquat (PQ)	22
Figura 5. Mecanismo de acción del herbicida paraquat en las plantas	23
Figura 6. Mecanismo de toxicidad del herbicida paraquat en el organismo.	24
Figura 7. Representación esquemática de un radical libre	25

Figura 8. Especies reactivas de oxígeno	26
Figura 9. Factores que incrementan la formación de radicales libres.....	27
Figura 10. Estructura química de las proteínas.	29
Figura 11. Tipos de oxidación de proteínas.....	32
Figura 12. Estructura química de un aminoácido carbonilado	33
Figura 13. Representación química de la oxidación directa de aminoácidos.	34
Figura 14. Hidrolisis de proteínas	35
Figura 15. Adición de Michael.	35
Figura 16. Esquema de la glicación y glicosilación de proteínas.....	36
Figura 17. Proteínas carboniladas producidas por oxidación directa de aminoácidos después de la reacción con especies reactivas de oxígeno. Grupos carbonilo derivatizados con DNPH y el aumento asociado en el peso molecular causado por las modificaciones se muestra en azul.....	39
Figura 18. Antioxidantes endógenos	41
Figura 19. Antioxidantes exógenos, sitio de acción, localización y producción en una célula eucarionte	42
Figura 20. Tipos de flavonoides.....	43
Figura 21. Crataegus mexicana.....	44
Figura 22. Mecanismo de acción del método	54
Figura 23. Obtención de extractos.....	57
Figura 24. Obtención de plasma sanguíneo y cuenta de proteína.	58
Figura 25. Espectro de absorción del paraquat generado a través de las lecturas de absorción UV visible.	59

ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. Uso de pesticidas para cultivos de hortalizas en México.	15
Tabla 2. Plaguicidas prohibidos y restringidos en México por su alto riesgo en la salud humana	16
Tabla 3. Áreas y plaguicidas aplicados por tipo de cultivo	17

Tabla 4. Clasificación de plaguicidas	18
Tabla 5. Peso de extractos secos.	56
Tabla 6. Proteína mg/mL	58
Tabla 7. Absorbancias de paraquat.	60
Tabla 8. Concentración de carbonilación	61
Tabla 9. Inhibición de carbonilación	62
Tabla 10. Carbonilación	63

ÍNDICE DE GRÁFICAS	PÁGINA
Gráfica 1. Intervalo lineal de paraquat.....	60
Gráfica 2. Concentración efectiva 50 de paraquat a 370 nm.....	61
Gráfica 3. Determinación de la IC ₅₀ del extracto de acetona de tejocote a 370 mn.	62
Gráfica 4. Carbonilación a 370 mn.	63

1. RESUMEN

La preocupación del hombre por la actividad agraria se basa principalmente en la necesidad de nutrirse y de alimentar a un grupo de personas cada vez mayor, para ello se requieren de diversas prácticas que contribuyan a una buena producción de alimentos, entre ellas está la preparación del suelo, las prácticas de siembra como la fertilización y el control de plagas y malezas que se da mediante la aplicación de diversos plaguicidas, cuya finalidad es la de prevenir o eliminar cualquier plaga que interfiera en la producción de los alimentos. Entre esta gran variedad de productos químicos se encuentran los insecticidas, acaricidas, fungicidas, nematocidas, fitorreguladores molusquicidas, rodenticidas y herbicidas; dentro de este último encontramos al paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo), el cual es un herbicida que pertenece al grupo de los bipiridilos, que de acuerdo con la OMS es clasificado como moderadamente peligroso tiene una dosis letal media de 3 a 5 g/kg, en México sigue siendo muy utilizado debido a que es un producto de bajo costo, fácil acceso y rápida acción, sin embargo en otros países ha sido prohibido y restringido ya que es considerado altamente tóxico debido a que es productor de radicales libres, los cuales dañan a las diferentes macromoléculas del organismo (DNA, lípidos, proteínas). Las proteínas van a sufrir diversos tipos de oxidación entre ellas la carbonilación, la cual es definida como un proceso postraducciona l irreversible que ataca principalmente a las cadenas laterales de los aminoácidos, dañando su estructura y como consecuencia la función que desempeña cada una de ellas. Para evitar que se desborde el aumento oxidativo, se requieren de sistemas antioxidantes propias del organismo, pero cuando estas son incapaces de contrarrestar este efecto, se requiere de antioxidantes exógenos, que van a ser adquiridos mediante el consumo de alimentos ricos en antioxidantes como es el caso del fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*) que ha demostrado tener gran poder antioxidante de tipo flavonoide que pueden tener efectos positivos para la salud, como: evitar el envejecimiento prematuro y contrarrestar la proliferación de radicales libres, lo cual se ha relacionado con enfermedades crónico degenerativas. Por tanto el presente trabajo propone

evaluar la actividad antioxidante de extractos orgánicos del fruto de tejocote sobre la carbonilación de proteínas humanas.

2. ABSTRACT

The concern of man for the agricultural activity is based mainly on the need to nourish and feed a growing group of people for this, several practices that contribute to good food production are required, among them is the preparation of soil the sowing, nutrition and control of pests and weeds that occurs through the application of various pesticides that have the purpose of preventing or eliminating any pest that interferes with the production of food. Among this great variety of chemical products that are used in agriculture to protect crops are insecticides, acaricides, fungicides, nematocides, phyto regulators molluscicides, rodenticides and herbicides; within the latter we find paraquat (1,1-dimethyl-4-bipyridyl), which is a herbicide that belongs to the group of bipyridyls and according to WHO is classified as moderately dangerous, has an average lethal dose of 3 to 5 g/kg, has an average lethal dose of 3 to 5 g/kg, however, in other countries it has been banned and restricted as they consider it highly toxic since it is a producer of free radicals which will damage the different macromolecules of the organism (DNA, lipids, proteins). The proteins will suffer various types of oxidation including carbonylation, which is defined as an irreversible post-translational process that mainly attacks the side chains of the amino acids, damaging their structure and, consequently, the function that each one performs. To prevent the oxidative increase from overflowing, antioxidant systems of the body are required but when these are unable to avoid the effect of free radicals it requires exogenous antioxidants that are going to be acquired through diet, that is, with the consumption of foods rich in antioxidants such as the fruit of hawthorn (*Crataegus mexicana*) that has shown to have great flavonoid antioxidant power and they can have positive effects for health, such as: avoiding premature aging, and counteracting the proliferation of free radicals which has been linked to chronic degenerative diseases. Therefore, the present work proposes the evaluation of the antioxidant activity of organic extracts of the hawthorn fruit on the carbonylation of proteins.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Historia de los plaguicidas.

En el desarrollo del hombre se tuvo la necesidad de crear sustancias capaces de prevenir o eliminar cualquier plaga que interfiera en la producción de los cultivos. Durante la Revolución Industrial surgió la era de las fumigaciones, donde se utilizaban productos elaborados a base de compuestos simples como: el caldo bordelés (una mezcla de sulfato de cobre con cal), el verde de París (acetoarsenito de cobre), el ácido carbólico o fénico, el bromuro de metilo y el disulfuro de carbono, entre otros (Figura 1) (Bedmar, 2011; Del Puerto *et al.* 2014).

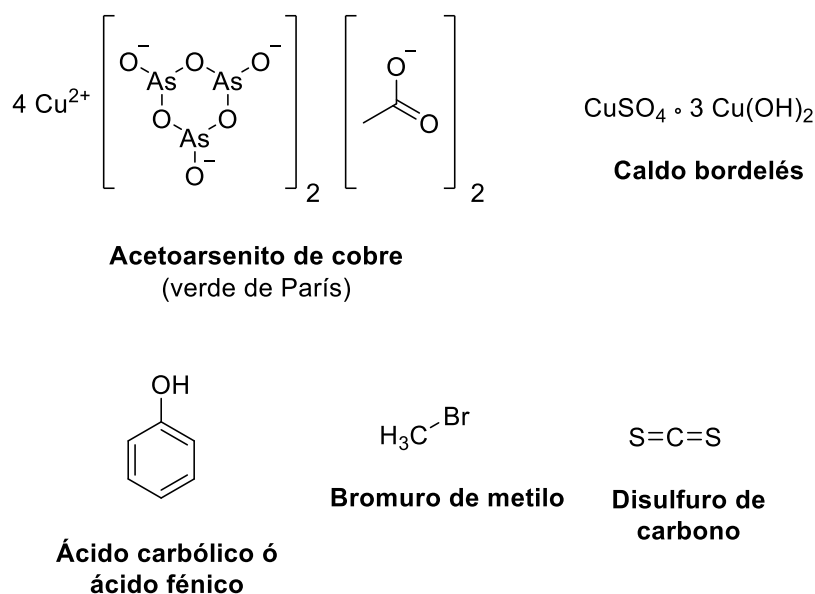


Figura 1. Estructura química de algunos plaguicidas usados durante la Revolución Industrial (Del Puerto *et al.* 2014)

En la década de 1920, en los Estados Unidos de América surgió la era de los productos sintéticos, con la preparación de compuestos derivados a partir de nitrógeno, en esta época se desarrolló la mayoría de los productos sintéticos que son utilizados hoy en día. Sin embargo durante la Segunda Guerra Mundial la producción de herbicidas presentó un incremento exponencial con el desarrollo de insecticidas como el DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis-etano) y para el año de 1945 se comercializaban insecticidas similares, tales como Aldrin, Clordane y Heptacloro,

así como el herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), cuya mezcla con el 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético) se denominó agente naranja y se empleó como defoliante durante la guerra de Vietnam (figura 2) (Bedmar, 2011).

Posteriormente el grupo de los bipyridilos fue producido por vez primera para propósitos comerciales en 1961 y están hoy en día entre los herbicidas más usados por su rápida acción. Para 1969 fue introducido a México y América Latina por un grupo de empresas de la corporación Transquímica de México y por Petroquímica del Bajío, ambas subsidiarias del grupo corporativo Celamex. La Unión Europea autorizó el paraquat, herbicida del grupo de los bipyridilos en el año 2004 debido a un fallo judicial, a causa de un litigio que Suecia apoyada por Dinamarca, Austria y Finlandia mantuvieron contra la Comisión Europea. El 11 de julio de 2007 los tribunales anularon la directiva que autorizaba al paraquat (Figura 3) como una sustancia activa de protección para las plantas prohibiendo desde entonces su comercialización dentro del ámbito de toda la Unión Europea. El uso de paraquat ha sido sujeto de controversia al menos durante dos décadas, especialmente cuando se considera la seguridad de los campesinos y de los trabajadores agrícolas de los países en desarrollo. Desde entonces se creó por síntesis química un gran número de sustancias plaguicidas, pero también la experiencia de su uso, el conocimiento de cómo funcionan en los ecosistemas y el afloramiento en la sociedad de la conciencia ambiental llevaron a la prohibición de muchos de los más antiguos (Bedmar, 2011; Madeley 2002; Wesseling *et al.*, 2001).

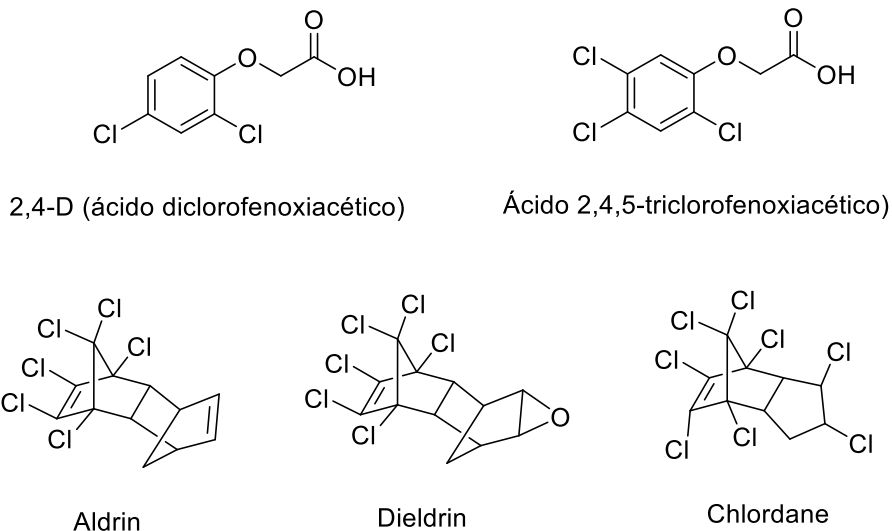


Figura 2. Plaguicidas derivados a partir del nitrógeno (Bedmar, 2011).

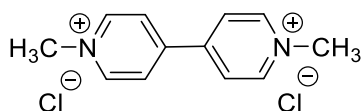


Figura 3. Estructura química del paraquat (Bedmar, 2011).

Cortinas (2000) en su estudio “Proyecto para habilitar a México a formular el Plan Nacional de Implementación (PNI) para dar cumplimiento al Convenio de Estocolmo” documentó los estados y zonas con el mayor uso de plaguicidas en México: Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco-Nayarit-Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México y Puebla-Oaxaca, siendo el mayor consumidor de pesticidas Sinaloa con un 30% y los otros estados en conjunto el restante 70%. Los productos destinados al mercado de exportación son monitoreados para consumo seguro, siendo muy importante la evaluación del contenido de residuos de plaguicidas, en cuyo caso no debe exceder los niveles máximos permitidos (LMRs), así como de metales pesados y calidad microbiológica, para que no exista una amenaza para la salud humana.

3.2. Plaguicidas en México

La tabla 1 muestra la lista de los productos prohibidos y restringidos en México, así como productos prohibidos en otros países, pero permitidos en México. Se destacan productos como endosulfan, metamidofos y monocrotofos que son utilizados frecuentemente en cultivos de hortalizas en México; por lo tanto, estos productos pueden presentar restricciones para el mercado de exportación, en función de los reglamentos fitosanitarios en uso; no habría ninguna de éstas para el mercado nacional, siempre y cuando las regulaciones de registro y de autorización sean respetadas para un cultivo específico, y sobre todo, no estén por encima del LMP de los productos.

Tabla 1. Uso de pesticidas para cultivos de hortalizas en México.

Pesticidas prohibidos	Pesticidas restringidos	Pesticidas prohibidos en otros países, pero autorizados en México
Acetato de fenilo	DDT	Alaclor
Mercurio	BHC	Captan
Aldrin	Lindano	Paraquat
Cianofos	Dicofol	2,4 D
Dialifor	Paraquat	
Dieldrín	Pentaclorofenol	
Dinoseb	Metoxicloro	
Endrin		
Erbon		

INE, 2010.

Pérez *et al.* (2013) citaron que en México no hay un control regulado sobre el uso de plaguicidas ya que aún se autorizan y utilizan algunos plaguicidas prohibidos en otros países (tabla 2).

Tabla 2. Plaguicidas prohibidos y restringidos en México por su alto riesgo en la salud humana

Prohibidos en México	Restringidos en México	Prohibidos en otros países y autorizados en México
Acetato o propionato de fenil, mercurio, Ácido 2,4,5-T; Aldrín, Cianos, Cloranil, DBCP, Dieldrín, Dinoseb, Endrina, Erbon, Formotión, Fluoroacetato de sodio, Fumisel, Kepone/Clordecone, Nitrofen, Mirex y Monuron.	DDT, BHC, Aldicarb, Dicofol, Forato, Lindano, Metoxicloro, Mevinfos, Paraquat, Pentaclorofenol y Quintozeno.	Alaclor; Aldicarb, Azinfos Metílico, Captafol, Carbarilo, Captan, Clordano, DDT, Dicofol, Diurón, Endosulfán, Forato, Fosfamidón, Kadetrina, Linurón, Maneb, Meditación, Metamidofos, Metoxicloro; Mevinfos; Menocrotofos, Ometoato, Oxyfluorfen, Paraquat, Paratión Metílico, Pentaclorofenol, Quitoceno, Sulprofos, Triazofos, Tridemorf, Vamidotión y 2,4-D.

<http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/buscar/tipo/index.html>

Por su parte, Hernández y Hansen (2011) en su proyecto “Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos” observaron que la superficie total sembrada en el DR 063 (Distrito de Riego 063) fue de 166,911 ha mientras que en la ZAR (Zona agrícola de referencia), fue de 173,539, que en el periodo 2007-2008, se aplicaron un total de 707 t de plaguicidas en el DR 063, donde típicamente se tienen dos ciclos agrícolas, mientras que en la ZAR, se aplicaron 521; los plaguicidas provenían de 25 grupos químicos (Tabla 3).

Tabla 3. Áreas y plaguicidas aplicados por tipo de cultivo

Cultivo	Grupo químico	Ingrediente activo	Superficie (ha)		Cantidad aplicada (t año ⁻¹)	
			DR 063	ZAR	DR 063	ZAR
Cacao	Organofosforado	Paratión	0	8 867	0	7.32
Café	Bipiridilo	Paraquat	0	45 813	0	22.32
	Compuestos de cobre	Oxicloruro de cobre			0	131.94
	Fosfometilglicina	Glifosato			0	33.23
Calabacita	Organofosforado	Metamidofós	595	0	1.23	0
Caña de azúcar	Bipiridilo	Paraquat	0	11 249	0	0.88
	Carbamato	Carbofurán			0	11.25
	Clorofenoxi	2,4-D			0	0.0032
	Derivado de la urea	Diurón			0	5.46
	Fosfometilglicina	Glifosato			0	3.18
	Triazina	Atrazina y ametrina			0	14.17
Cebolla	Piretroide	Zeta cipermetrina	3	0	0.0002	0
Chile verde	Pentaciclina	Abamectina	944	0	0.04	0
	Triazina	Cyromazina			0.29	0
Frijol	Benzimidazol	Benomilo	17 590	0	6.38	0
	Piretroide	Lambda cyalotrina			0.22	0
	Antibiótico	Oxitetraciclina			1.52	0
Jitomate	Pentaciclina	Abamectina	5 247	0	0.22	0
	Triazina	Cyromazina			1.61	0
Maíz	Bipiridilo	Paraquat	116 055	25 160	0	8.35
	Carbamato	Carbofurán			0	5.96
	Clorofenoxi	2,4-D			245.22	0.0062
	Fosfometilglicina	Glifosato			0	5.21
	Organofosforado	Clorpirifós etílico			133.68	2.01
	Piretroide	Cyalotrina			0	22.98
	Sulfonil urea	Nicosulfurón			0	0.18
	Sal de ácido benzóico	Dicamba			267.84	0
	Triazina	Atrazina			1.12	8.21
Mango	Benzimidazol	Benomilo	0	16 442	0	2.06
	Carboxamida	Captán			0	2.74
	Compuestos de cobre	Oxicloruro de cobre			0	5.26
	Ditiocarbamato	Mancozeb			0	4.38
	Inorgánico	Azufre elemental			0	12.74
	Organofosforado	Malatión			0	16.91
	Piretroide	Zeta cipermetrina			0	7.23
Melón	Organofosforado	Metamidofós	79	0	0.04	0
Palma de aceite	Bipiridilo	Paraquat	0	4 203	0	0.74
Papa	Bipiridilo	Paraquat	1 616	0	2.87	0
Papaya	Bipiridilo	Paraquat	0	968	0	2.36
	Ditiocarbamato	Mancozeb			0	3.10

Hernández y Hansen 2011.

En las últimas siete décadas, el control de plagas se ha basado principalmente en el uso indiscriminado de plaguicidas sintéticos; la mayor parte de ellos, son productos químicos que se emplean en la agricultura y horticultura, asimismo, en el combate a vectores. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), los plaguicidas abarcan herbicidas, insecticidas, fungicidas, desinfectantes o cualquier sustancia (pura o mezcla) (tabla 4), que puede prevenir, destruir o controlar plagas; es decir, animales no deseados o especies de plantas que puedan dañar la producción, el procesamiento, el almacenamiento, el transporte o la comercialización de alimentos, de productos agrícolas y de productos de madera (FAO, 2015).

Tabla 4. Clasificación de plaguicidas

INSECTICIDAS	HERBICIDAS	RODENTICIDAS	FUNGICIDAS
Organoclorados	Clorofenoxiacéticos	Fosfuro de zinc	Hexaclorobenceno
Organofosforados	Bipiridilos	Derivados del ácido fluoroacético	Organomercuriales
Piretroides		Alfa naftil tiourea	Pentaclorofenol
Insecticidas botánicos		Anticoagulantes	Ptalimidas
Carbamatos			Ditiocarbamatos

(FAO, 2015).

Si bien la aplicación de plaguicidas favorece el control de plagas, su uso excesivo ha generado efectos colaterales dañinos afectando los ecosistemas y las especies presentes (Mostafalou y Abdollah, 2017). Por lo tanto, la circulación y la acumulación de plaguicidas en agua, aire y cadena alimentaria han incrementado que la población humana este expuesta a ellos, provocando mortalidad infantil, efectos carcinogénicos, neurotóxicos, reproductivos, metabólicos y enfermedades tales como el Alzheimer (Nayara *et al.*, 2017).

3.3. Exposición a los plaguicidas

Las vías de exposición humana a plaguicidas son a través de las vías respiratorias, digestiva y dérmica, asimismo, la toxicidad se manifiesta dependiendo de la vía de exposición.

Exposición oral:

Se refiere a la ingestión "de una sola toma" de un plaguicida, que causa efectos tóxicos en un ser vivo. Puede afectar tanto al manipulador como al resto de la población expuesta, aunque el riesgo de ingerir en una sola dosis la cantidad correspondiente a la DL₅₀ (dosis letal media) oral aguda, sólo puede ocurrir por accidente, error, ignorancia y puede causar rápidamente la muerte, la cual puede ocurrir a raíz de la formación de un orificio en el esófago o por una inflamación grave de la zona que rodea los grandes vasos sanguíneos y las vías respiratorias en la parte media del tórax.

Exposición dérmica:

Se refiere a los riesgos tóxicos debidos al contacto y a la absorción del plaguicida por la piel, aunque es menos evidente y sus dosis letales son siempre superiores a las orales, debido a ello se presenta mayor riesgo para el manipulador que para el resto de la población.

Exposición por inhalación:

Se produce al respirar una atmósfera contaminada por el plaguicida, como ocurre con los fumigantes, o cuando un ser vivo está inmerso en una atmósfera cargada de un polvo insecticida o en pulverizaciones finas (nebulización, rociamiento o atomización (Del Puerto *et al.*, 2014; Plengue *et al.*, 2007).

Muchos factores han causado que las muertes (ocupacionales) sean subestimadas y los suicidios sobreestimados. Los plaguicidas contribuyen significativamente a reducir las pérdidas en los cultivos, pero ha sido evidente que

su uso puede llegar a ser contra productivo cuando no son formulados, almacenados y usados de acuerdo a los estándares nacionales e internacionales de seguridad (Kähkönen, 1999). Se estima que a nivel mundial cada año un 3% de los trabajadores agrícolas sufre un incidente de intoxicación con plaguicidas y que ocurren como mínimo 3 millones de intoxicaciones severas y 20.000 muertes no intencionales por año, la mayoría en países en desarrollo (WHO, 1990; UNEP, 2004).

El territorio mexicano ha sido profundamente alterado por las actividades humanas en los últimos cien años; durante los 70s y 80s los cultivos eran comúnmente rociados con plaguicidas organoclorados (OC), DDT y Toxafeno, que son productos químicos altamente persistentes, lipofílicos y bioacumulables. Después de la prohibición de los pesticidas OC, los organofosforados, los carbamatos y los piretroides (entre otros) son los que se usan intensivamente (Hernández y Hansen, 2011). Un plaguicida se clasifica de acuerdo con diferentes criterios: composición química, los organismos que controlan, el modo de acción y el organismo al que será destinado, es decir, sobre quién ejercerá su mecanismo de acción: insecticidas, bactericidas, acaricidas, molusquicidas, rodenticidas, avicidas, fungicidas, herbicidas (FAO 2015).

3.4. Paraquat

Entre toda esta gama de plaguicidas encontramos al paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) el cual es un herbicida no selectivo y no sistémico, es tóxico y pro-oxidante, de amplia utilización en la agricultura que causa efectos biológicos a través de lesiones por estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, actúa sobre el fotosistema, específicamente en el cloroplasto (figura 4) (Sengupta *et al.* 2017; Rivero *et al.* 2001). El paraquat se utiliza para el control de la maleza en la producción de café, cacao, coco, palma de aceite, caucho, banano, papaya, mango, maíz y caña de azúcar, entre otros (Camacho *et al.* 2017).

En México el paraquat es esparcido sobre los campos en dosis letales para los cultivos y esto afecta a los campesinos y sus familias que por lo general viven junto a ellos, pues aunque el paraquat y el 2,4-D (que también es tóxico) se desintegran gradualmente después de caer en el suelo, es posible que al caer contaminen el agua, a maíz y otros productos alimenticios que son consumidos por los campesinos y sus familiares antes de que el herbicida esté totalmente degradado. El problema puede ser grave tanto por los daños que ocasiona el paraquat en la salud humana como en el ambiente, la Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios (Cofepris) cataloga al paraquat como un herbicida de toxicidad nivel 2 en una escala del 1 al 5, donde el nivel 1 es el nivel máximo de toxicidad. Su dosis letal en humanos es de 35 mg/kg vía oral, por lo que la Cofepris obliga a que su etiquetado incluya una advertencia de “peligro” y que se señale que se trata de una sustancia que puede ser mortal en caso de ingesta, inhalación o contacto con la piel (Cofepris, 2016).

Existen diversas presentaciones comerciales con el compuesto activo de paraquat estas presentaciones vienen formulados en concentraciones variables y se le agregan anticorrosivos, agentes surfactantes, diluyentes y humectantes. La mayoría de las formulaciones tienen un color verde o azul y pueden contener un emético, los mas comunes son: Gramoxone®, Gramuron®, Herbaxone®, Pillarxone®, Radex D®, Gramonol®, Gramocil®, Cyclone®, Speeder®, Katalon®, Uniquat®.

3.5. Mecanismos de toxicidad del paraquat

Su acción como herbicida (figura 4 y 5) está relacionada con la luz solar; forman radicales libres que reaccionan con el oxígeno, generando el radical superóxido, el cual desintegra los tejidos y membranas de las células vegetales. Si se siegan las plantas antes de la exposición a la luz solar este permanece inalterado en la planta. El paraquat ejerce su actividad herbicida al interferir con los sistemas de la transferencia de electrones intracelular a través de la inhibición de la coenzima

nicotinamida adenina nucleótido fosfato oxidada (NADP⁻), la reducción de NADP (NADPH) durante la fotosíntesis reduce los iones del paraquat (PQ^{-2±}) a un radical libre mono-cación (PQ^{•±}) que a su vez puede reaccionar espontáneamente con el oxígeno, lo que conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido (O₂⁻), el oxígeno singulete (¹O₂), el hidroxilo (HO[•]), y los radicales peroxilo (ROO[•]); estas especies puede reaccionar con las membranas celulares de las plantas, causar la peroxidación lipídica y finalmente la muerte celular (Blanco *et al.* 2014).

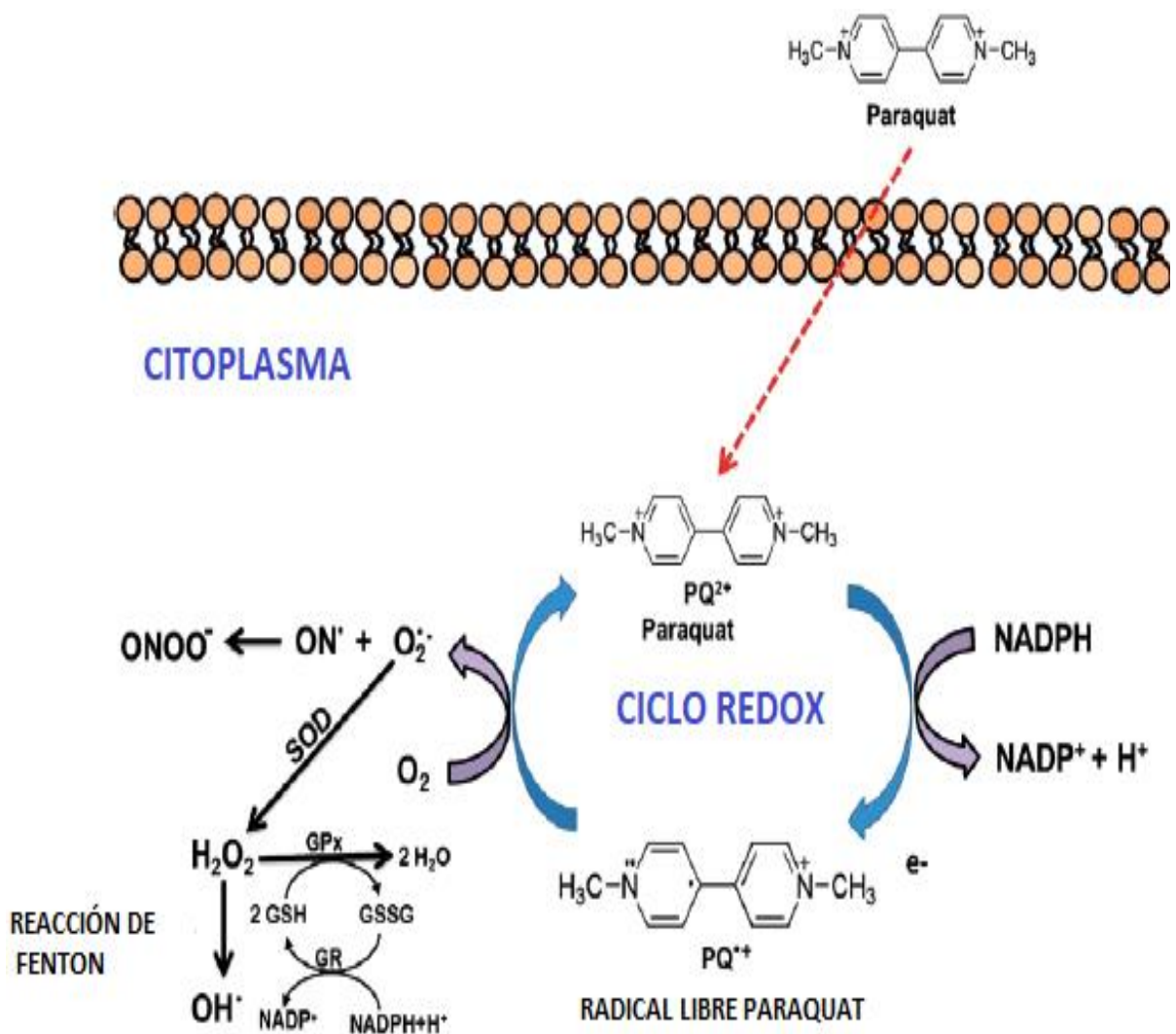


Figura 4. Ciclo redox del paraquat (PQ) (Blanco *et al.* 2014).

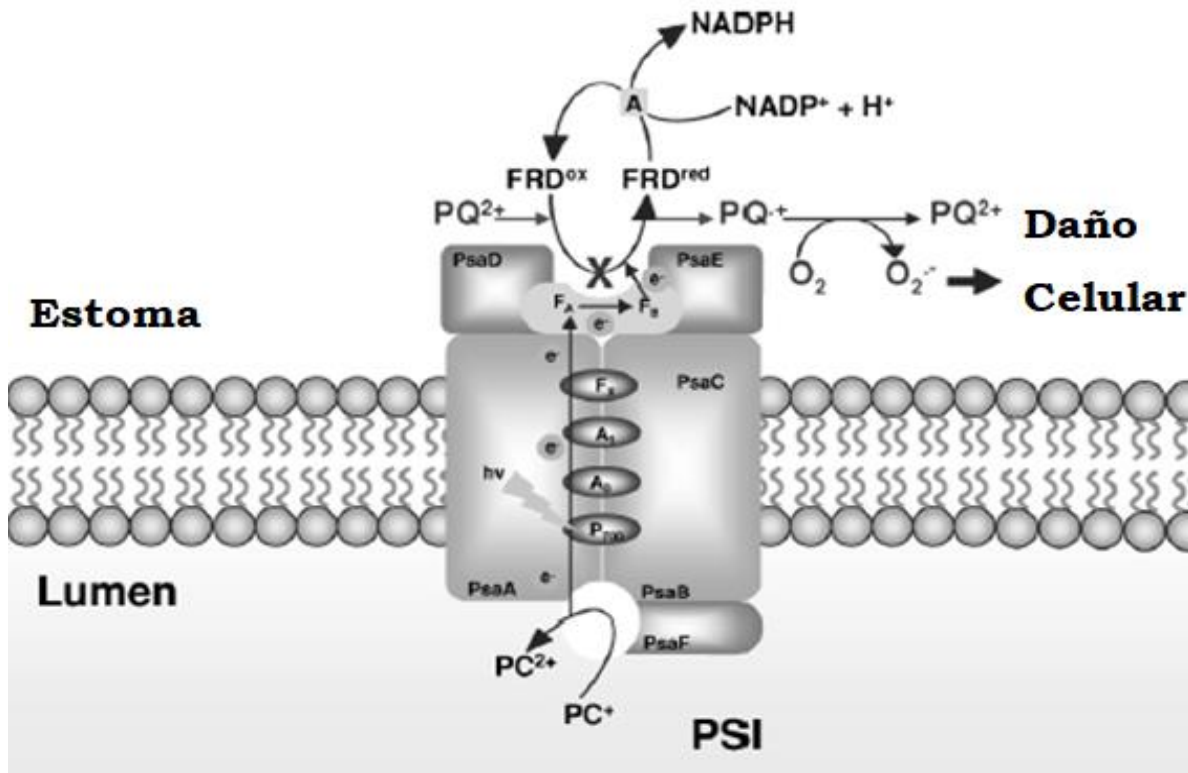


Figura 5. Mecanismo de acción del herbicida paraquat en las plantas (Blanco *et al.* 2014).

El Paraquat es un herbicida cuyo mecanismo de toxicidad se ve reflejada mediante la generación de radicales libres que pueden afectar el sistema nervioso, pulmones, cerebro y piel, ocasionando diversas enfermedades (Guo *et al.*, 1996).

El paraquat se reduce con ayuda del NADPH; posteriormente, se reoxida por medio del O₂ con la producción concomitante de radicales superóxidos, que atacan y dañan a los lípidos insaturados de la membrana celular. La toxicidad sistémica del paraquat está mediada por la producción de un radical superóxido, que por medio de un intermediario reacciona con los lípidos para formar hidroperóxidos, que causan la destrucción de las membranas celulares e interfieren con la función surfactante pulmonar. El daño celular se manifiesta por inflamación, edema y posteriormente fibrosis. Este radical superóxido se forma rápidamente en presencia de oxígeno; por eso, el órgano diana es el pulmón; también es el responsable de desencadenar la cascada del ácido araquidónico,

estimulando la síntesis de prostaglandinas, que producen un incremento de líquido en el espacio intracelular, originando edema pulmonar. Los iones superóxido son responsables de otras lesiones de membrana y necrosis secundaria en el tracto digestivo superior, túbulos renales, hígado y glándulas adrenales (Figura 6). (Blanco *et al.* 2014; Marín y Berrouet, 2016).

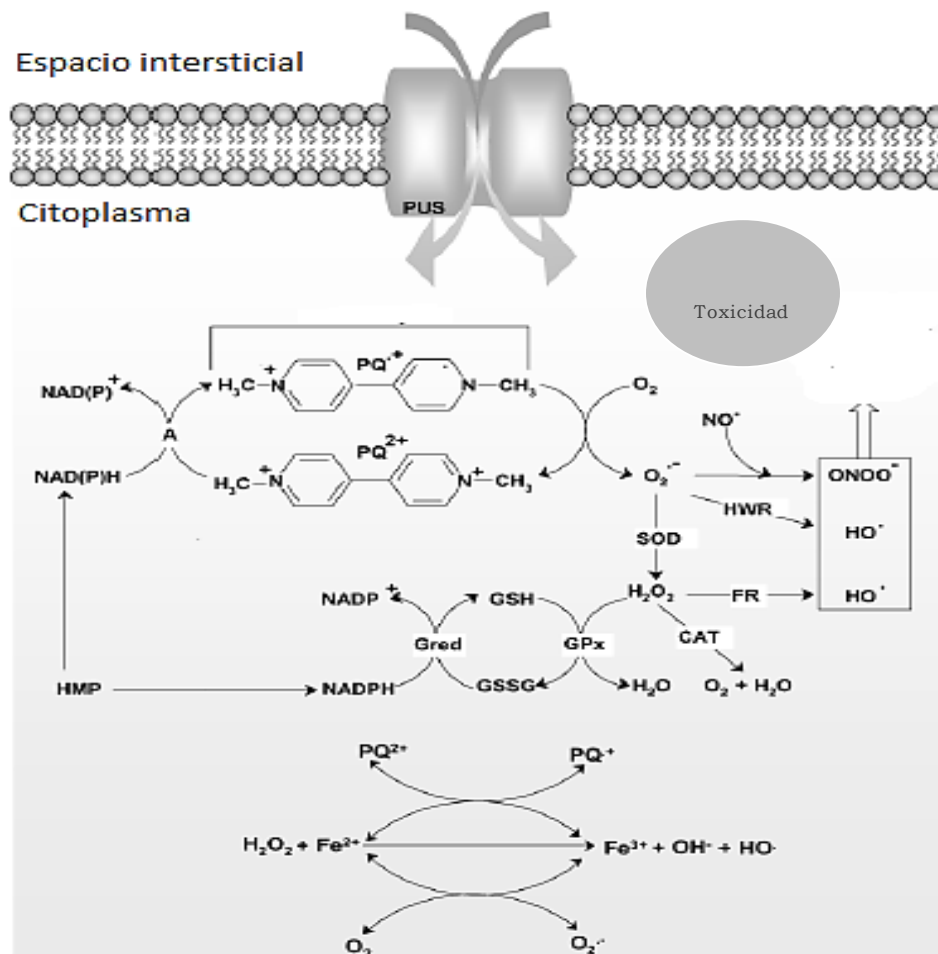


Figura 6. Mecanismo de toxicidad del herbicida paraquat en el organismo (Blanco *et al.* 2014).

3.6. Radicales libres

Un radical libre son todas aquellas especies químicas átomos o moléculas, que contiene un electrón desapareado en su orbital exterior que les da una configuración espacial de gran inestabilidad (Figura 7). Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan

cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar (Maldonado *et al.*, 2010; Cheesman y Slater, 1998; Basaga, 1989); se consideran como contaminantes incoloros, insípidos y casi imperceptibles por el cuerpo humano (Guoying *et al.* 2017). Éstos se producen de forma natural en nuestro organismo a través de procesos metabólicos oxidativos, son extremadamente útiles en situaciones en que se requiere la activación del sistema inmunológico. Los macrófagos utilizan el peróxido de hidrógeno para destruir bacterias y otros elementos extraños. También se generan durante la desintoxicación de drogas y en la producción del factor relajante endotelial; el óxido nítrico, extremadamente importante en los procesos que desencadenan la relajación de los vasos sanguíneos (Dornelles y Reischak, 2004).

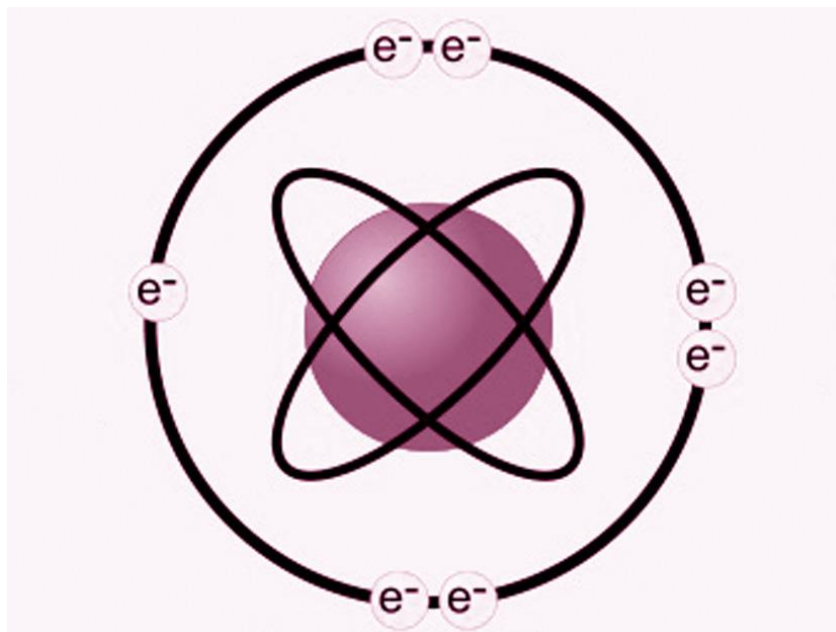


Figura 7. Representación esquemática de un radical libre (<https://nutricionanimal.info>.)

El oxígeno tiene una estructura molecular única y es abundante en las células, acepta fácilmente electrones libres generados por el metabolismo oxidativo normal dentro de la célula, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) que incluyen el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo ($HO\bullet$) (Richard y Davis, 2009). La primera reacción en la reducción parcial del oxígeno molecular es la adición de un electrón para formar $O_2^{\bullet-}$, éste

puede ser protonado a pH bajo ($pK_a = 4.8$) para formar el radical perhidroxilo (HO_2); el $O_2^{\cdot-}$ y el HO_2 sufren una dismutación espontánea para producir H_2O_2 , que es estable y menos reactivo que el $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, en presencia de metales de transición reducidos como el Fe^{2+} , que pueden estar libres o en complejos con agentes quelantes o proteínas, puede ocurrir la formación del $HO\cdot$ dependiente de H_2O_2 , y el $O_2^{\cdot-}$ puede actuar como el agente reductor inicial para el metal; el $HO\cdot$ es un oxidante muy fuerte y puede iniciar reacciones en cadena de radicales con una gran variedad de moléculas orgánicas, esto puede llevar a la peroxidación de lípidos, la inactivación de enzimas y la degradación de ácidos nucleicos (Figura 8). La mayoría de las moléculas biológicas no son radicales y cuando un radical libre reacciona con un no radical se forma un nuevo radical y sucede una reacción en cadena (Benezer *et al.*, 2008).

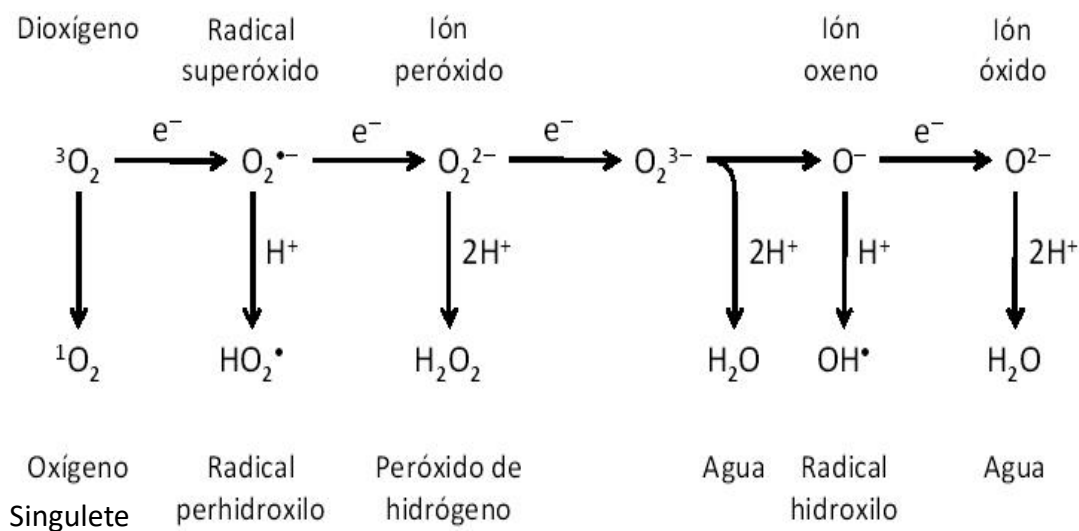


Figura 8. Especies reactivas de oxígeno (Benezer *et al.* 2008).

Cuando la capacidad de control de las sustancias oxidantes es superada, se establece una situación conocida como estrés oxidativo. Éste es una condición que se manifiesta en el organismo cuando la producción de sustancias altamente reactivas supera los mecanismos antioxidantes y está relacionado con numerosas enfermedades como cáncer, diabetes y alteraciones cardiovasculares. Los efectos del estrés oxidativo dependen de la magnitud de estos cambios, si la célula es

capaz de superar las pequeñas perturbaciones y de recuperar su estado original. (Maldonado *et al.*, 2010; Viada *et al.*, 2017).

Los radicales libres son el resultado de los procesos fisiológicos propios del organismo, como el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio, o bien son generados por factores ambientales como la radiación y contaminación industrial, asimismo, la adicción al tabaco, al consumo de medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y los pesticidas (Figura 9) (Velázquez *et al.*, 2004).

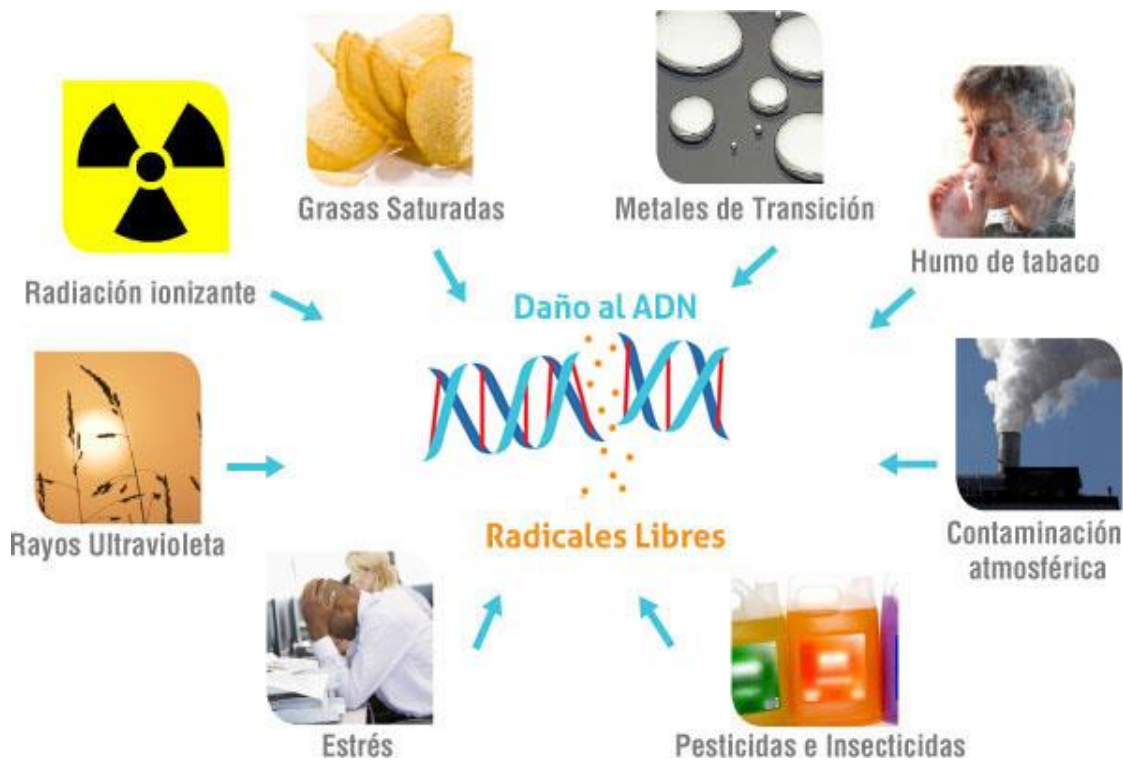


Figura 9. Factores que incrementan la formación de radicales libres
(<https://www.biorigenes.com/que-son-los-radicales-libres.>)

Este desbalance entre la generación de radicales libres y los sistemas antioxidantes del organismo es el responsable de producir daño oxidativo a diversos macro componentes de la célula; ADN, lípidos y proteínas. La investigación de los mecanismos de oxidación de proteínas se ha intensificado en los últimos 20 años, debido a la creciente evidencia que ha correlacionado

procesos como el envejecimiento y diversas patologías humanas con el aumento de la oxidación proteica (Sarangarajan *et al.*, 2017).

3.7. Proteínas

Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas de aminoácidos (Figura 10) (Cuevas y Covarrubias, 2011). El término proteína deriva del griego "proteos" (lo primero, lo principal) y habla de su gran importancia para los seres vivos. Estas constituyen el 50% del peso seco de la célula por lo que representan la categoría de biomoléculas más abundante después del agua. Son el principal componente estructural y funcional de las células y realizan numerosas e importantes funciones dentro del organismo, que van desde su papel catalítico (enzimas), en la motilidad corporal (actina, miosina), mecánico (elastina, colágeno), de transporte y de almacén (hemoglobina, mioglobina, citocromos), además de protección (anticuerpos) y regulación (hormonas), etc. (Gil, 2005).

La unidad estructural y funcional de una proteína la constituyen los aminoácidos, que presentan un sólo elemento en común dentro de una gran variabilidad en cuanto a estructura, el alfa-amino-carboxilo, formado por carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno, éste último determinante de la estructura y función de los aminoácidos. Las proteínas se clasifican atendiendo a distintos puntos de vista como son: solubilidad, composición, forma, propiedades físicas, función y estructura tridimensional, entre otros. Las proteínas conforman aproximadamente el 17% de la masa corporal. A pesar de su diversidad funcional (enzimática, de transporte y almacén, mecánica, motilidad, protección, reguladora, etc.) un 25% es proteína estructural y hemoglobina (Mataix y Sánchez, 2018; Martínez y Martínez, 2006).

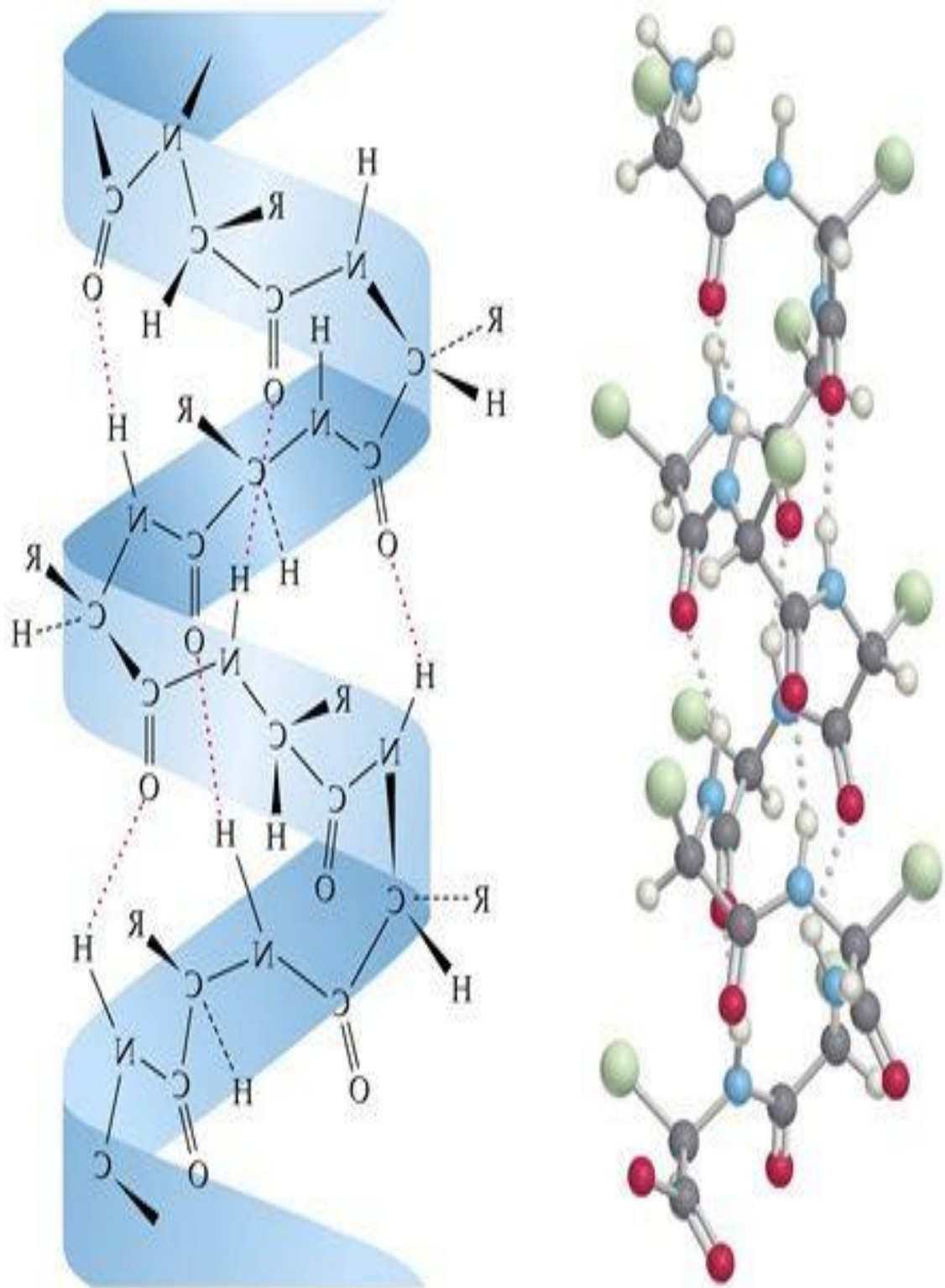
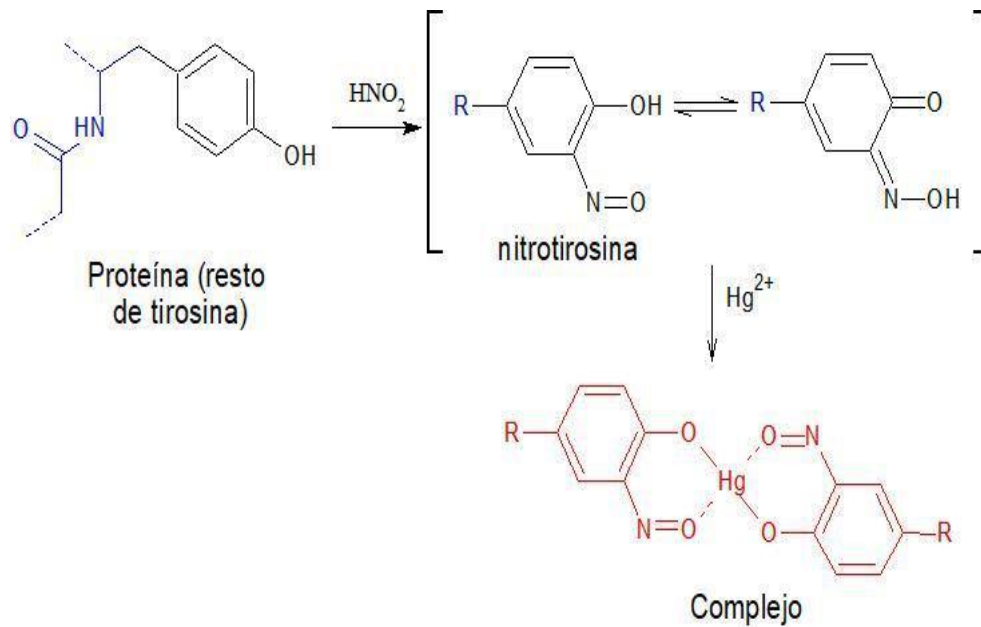


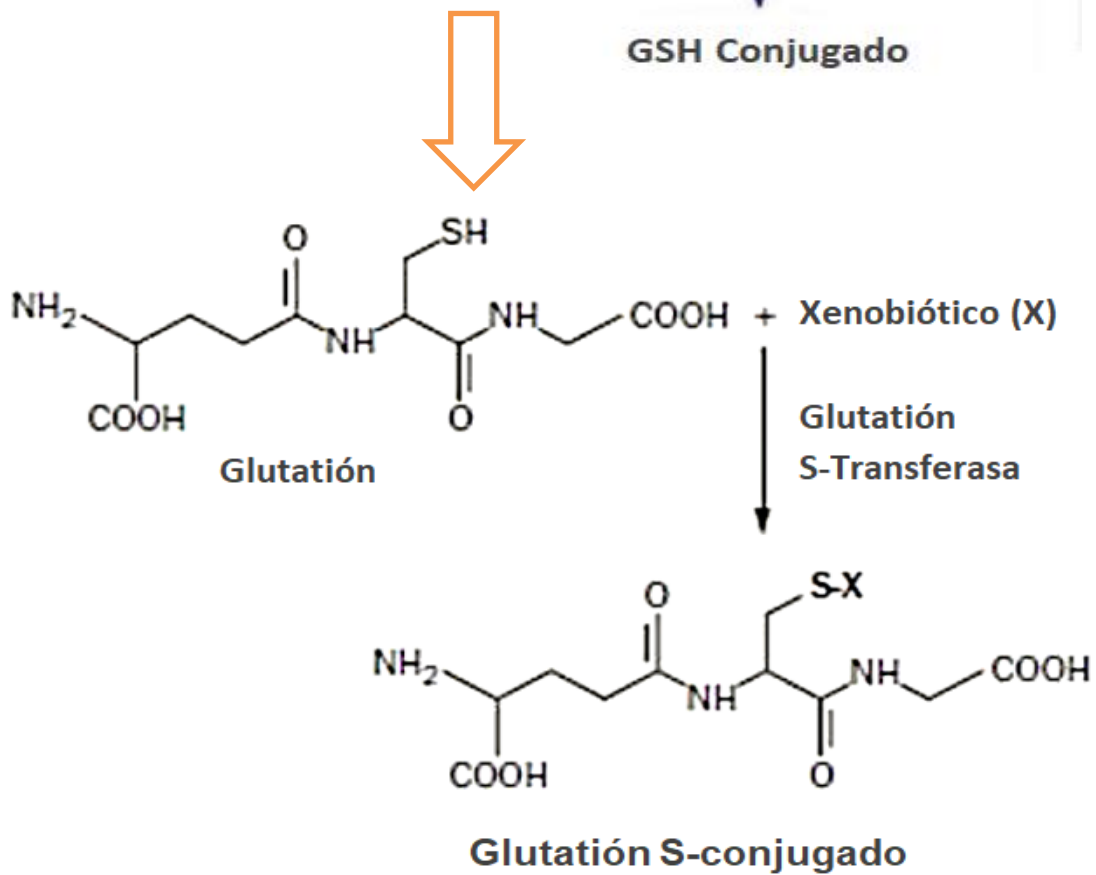
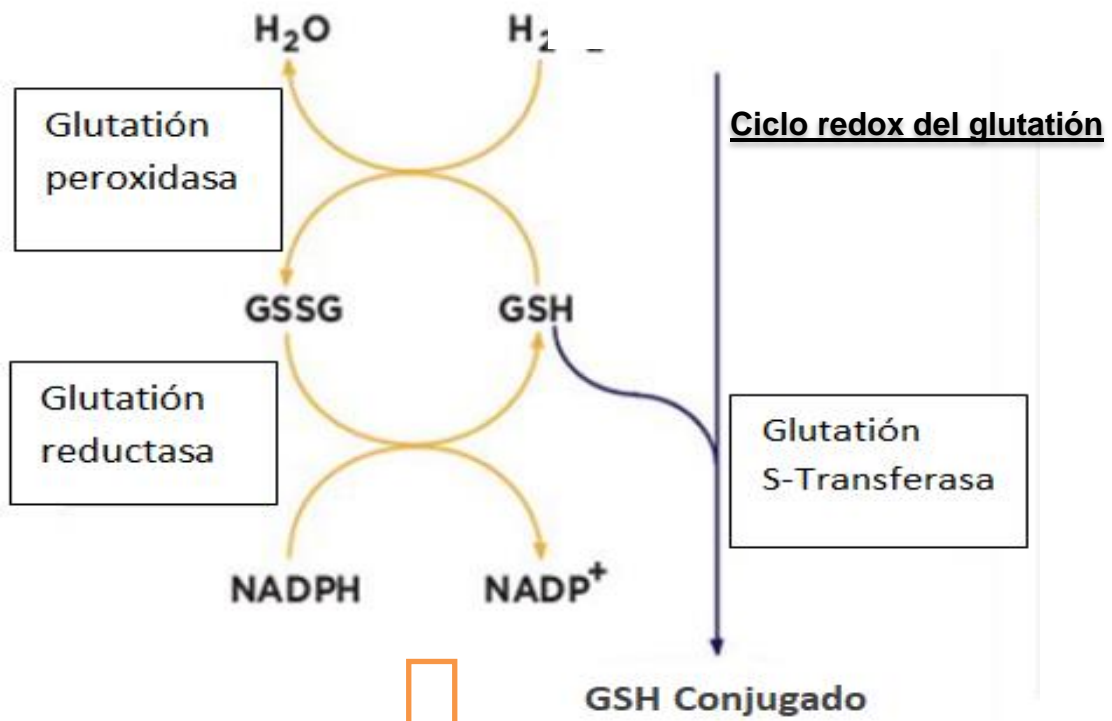
Figura 10. Estructura química de las proteínas (Mataix y Sánchez, 2018).

3.7.1 Estrés oxidativo de las proteínas

Las proteínas sufren varios tipos de oxidación como son la S-nitración, glutationilación, ruptura de enlaces peptídicos, formación de enlaces proteína-proteína, nitración y la carbonilación); uno de ellos es la formación de grupos carbonilo, que ha sido utilizada metodológicamente para evaluar el grado de daño oxidativo en diferentes sistemas biológicos (figura 11).



Nitración



Papel del glutatión s-transferasa en la s- glutationilación

Carbonilación

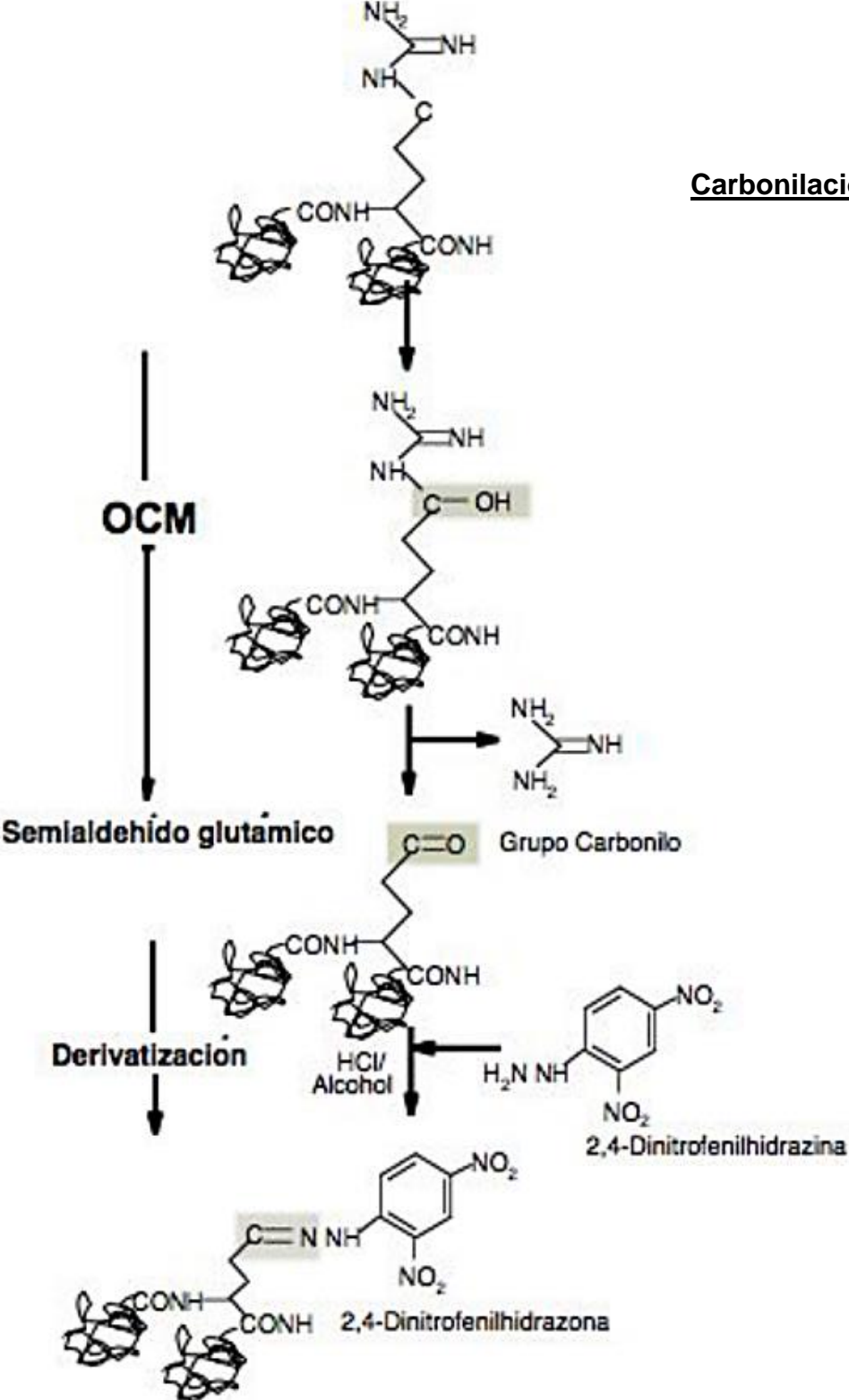


Figura 11. Tipos de oxidación de proteínas (Hlaváčková et al. 2017).

3.7.2 Carbonilación de proteínas

La carbonilación de proteínas causada por EROS, que se define como una modificación oxidativa postraduccional irreversible de las cadenas laterales de aminoácidos, desempeñando un papel importante en procesos de señalización (figura 12) (Hlaváčková *et al.* 2017).

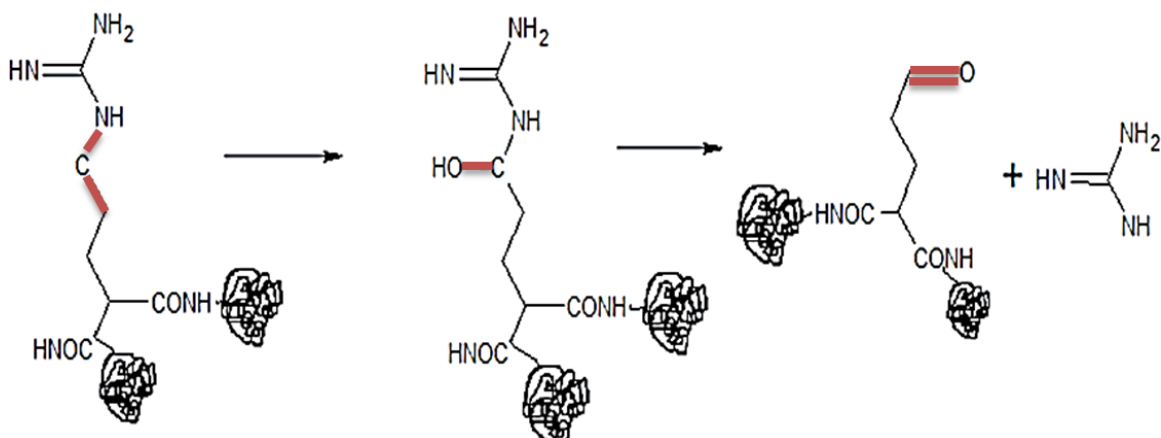


Figura 12. Estructura química de un aminoácido carbonilado (Elaboración propia).

La detección y cuantificación de los grupos carbonilo en muestras de proteínas es una manera indirecta de determinar el nivel de estrés; en la actualidad, la carbonilación de proteínas es un marcador aceptado e irreversible de la oxidación de proteínas y cientos de artículos publicados han informado la cuantificación de estos grupos carbonilos (Colombo *et al.*, 2016). Aunque la carbonilación es un indicador de oxidación no específico, analíticamente ha resultado más factible y reproducible la medición del grado de carbonilación que el de otros tipos de oxidación proteica como la conversión de tirosina a 3-clorotirosina, 3-nitrotirosina o ditirosina. En general, otros marcadores de oxidación proteica ocurren con una frecuencia menor en varios órdenes de magnitud, comparados con la carbonilación; por lo que se requiere de métodos mucho más sensibles y con frecuencia más costosos (Díaz y Membrillo, 2006; Castroa *et al.*, 2013). De acuerdo con Colombo *et al.* (2016) la carbonilación de proteínas incluye muchas

sustancias químicas y modificaciones que ocurren a través de diferentes mecanismos de reacción que se resumen de la siguiente manera:

- 1) Oxidación directa de varios residuos de aminoácidos inducida por radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$): este radical puede ser generado por la reacción de Fenton de cationes metálicos con peróxido de hidrógeno o por radiaciones ionizantes. El radical $\text{HO}\cdot$ induce la oxidación de la prolina y las cadenas laterales de residuos de arginina, lisina y treonina a aldehídos o cetonas (Figura 13). Se obtienen dos productos de oxidación, el semialdehído glutámico y semialdehído aminoalópico de la arginina; y la oxidación de lisina, respectivamente.

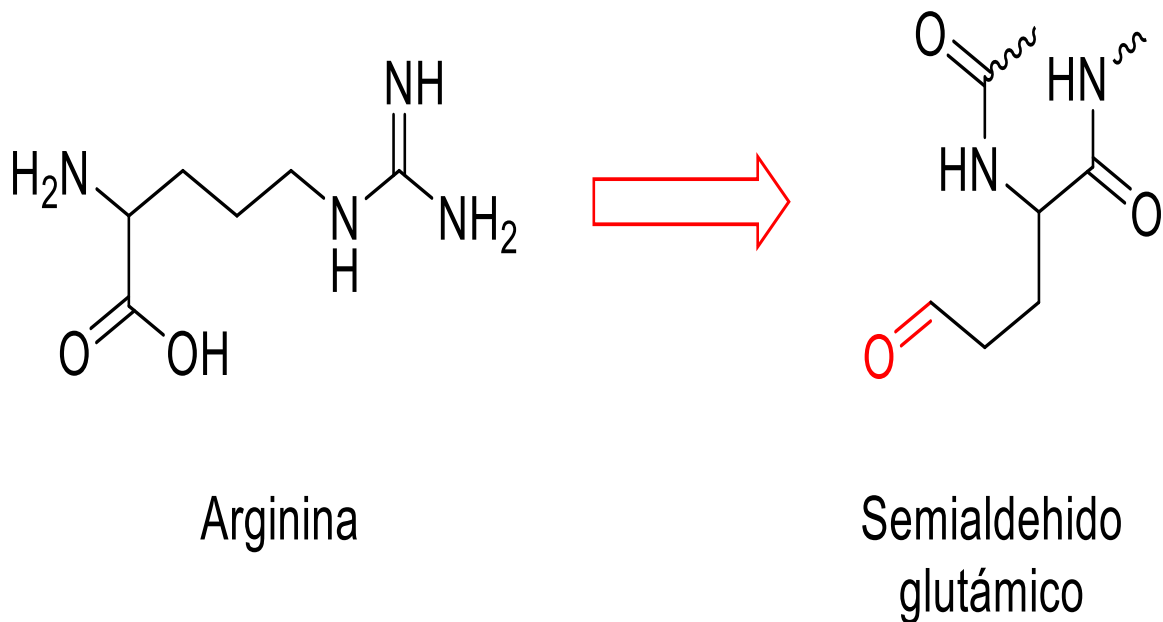


Figura 13. Representación química de la oxidación directa de aminoácidos. (Díaz y Membrillo, 2006)

- 2) Hidrólisis de la cadena principal de proteínas: se lleva a cabo un ataque del radical hidroxilo a la proteína induciendo una hidrólisis a través de la vía de aminación (Figura 14).

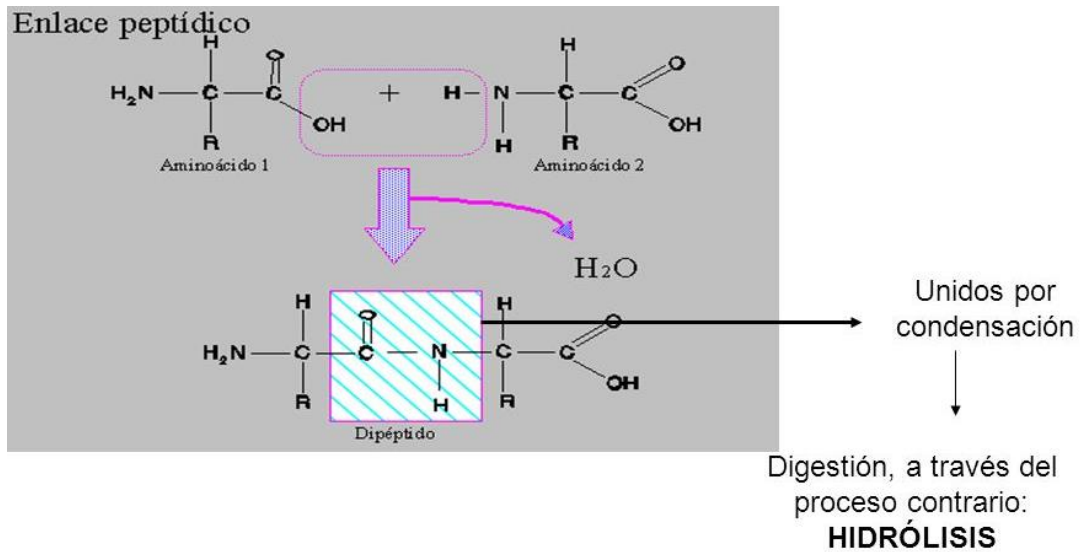


Figura 14. Hidrolisis de proteínas (Castroa *et al.*, 2013).

3) Reacciones de "adición de Michael": los residuos de los aminoácidos cisteína, histidina y lisina pueden reaccionar con especies de carbonilo, como 4-hidroxinonanal (4-HNE), 2-propenal (acroleína) y malondialdehído, generados durante la peroxidación lipídica (Figura 15).

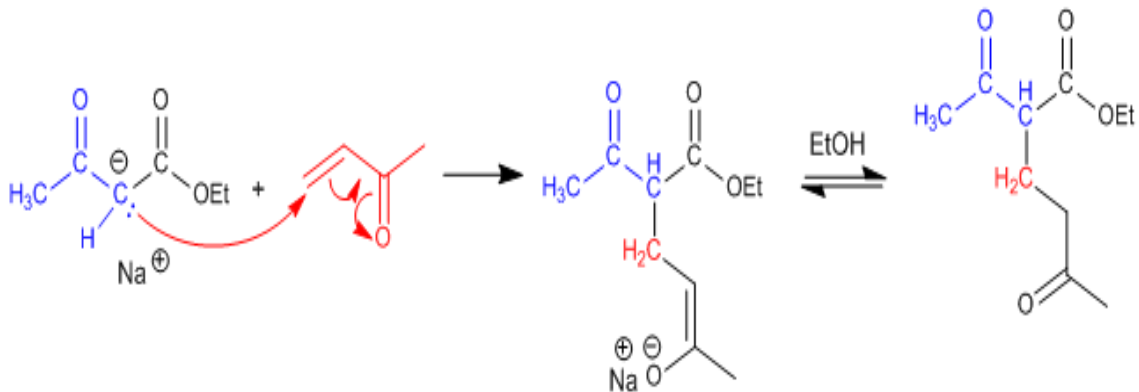


Figura 15. Adición de Michael (Castroa *et al.*, 2013).

4) Reacciones de glicación/glicoxidación: el grupo amino de la lisina puede reaccionar con azúcares reductores o con sus productos oxidados para generar especies de carbonilo como carboximetil-lisina (Figura 16).

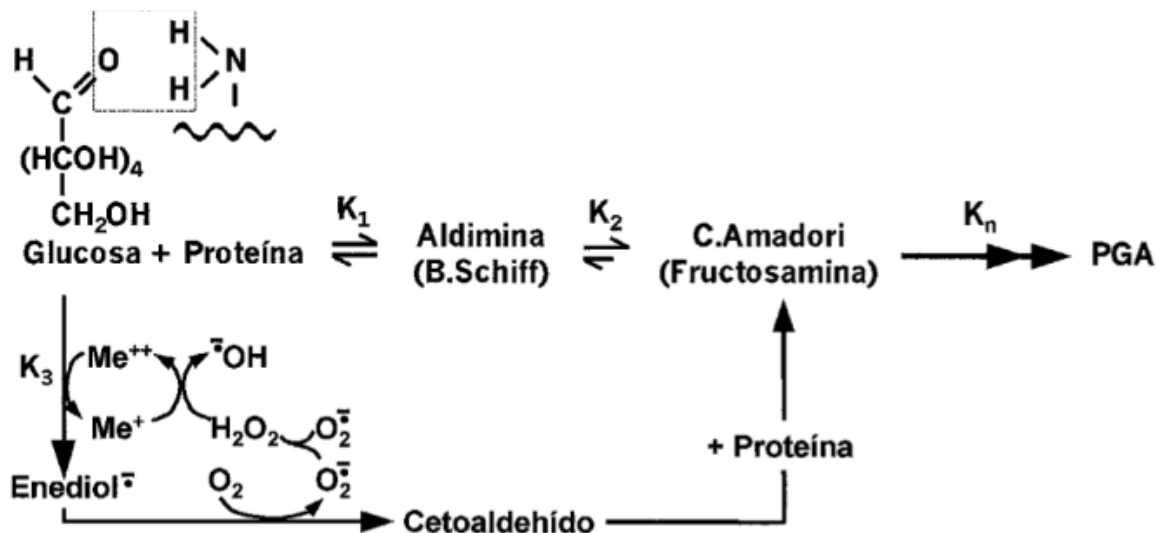


Figura 16. Esquema de la glicación y glicosilación de proteínas (Castroa *et al.*, 2013).

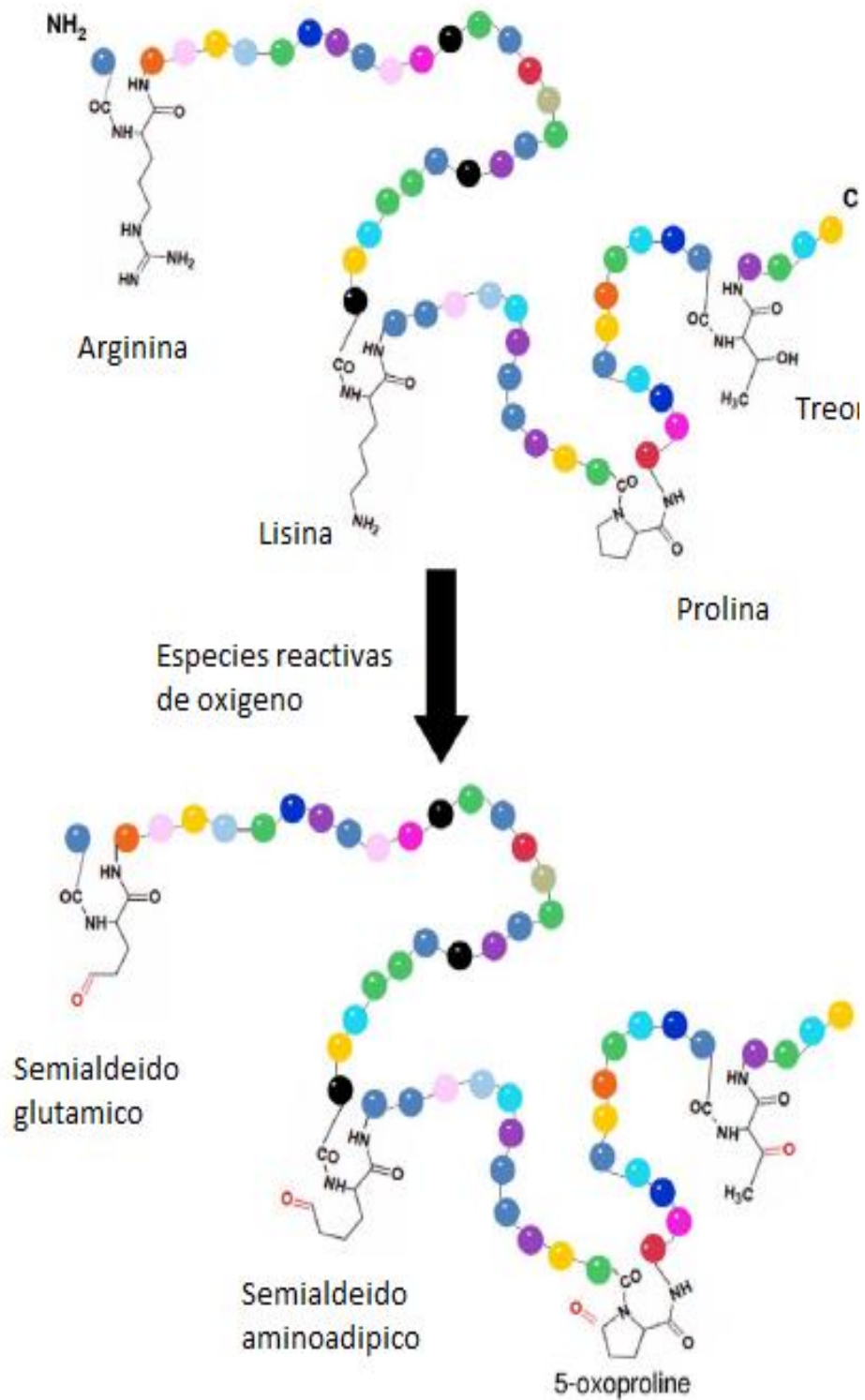
3.7.2.1 Técnicas para la detección de carbonilación

Existen muchos métodos utilizados para la evaluación del contenido de proteínas carboniladas, entre ellos, el más empleado se basa en la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Figura 17) que originalmente fue desarrollado por Levine (1990). Éste es el método más exitoso que consiste en la derivatización de la proteína carbonilada con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) y el consiguiente ensayo espectrofotométrico. Este ensayo permite una cuantificación global del contenido de proteínas carboniladas debido a la capacidad de la DNPH que reacciona con un carbonilo dando lugar a un aducto capaz de absorber a 370 nm.

Otra técnica para la detección de grupos carbonilo es por inmunodetección con un anticuerpo anti-DNP en un Western Blot, cuya técnica analítica es ampliamente utilizada para el estudio de proteínas. Este método, descrito por primera vez por Towbin (1979), permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. La especificidad de Western Blot se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés. Con la técnica de Western Blot se puede estimar el tamaño de una proteína, confirmar la presencia de modificaciones post-traduccionales como la fosforilación,

y ser utilizado para comparar cuantitativamente los niveles de proteína entre muestras.

En la última década, se han desarrollado muchos enfoques de espectrometría de masas (EM) para la identificación de las proteínas carboniladas y los residuos de aminoácidos relativos modificados a derivados de carbonilo. Aunque estos métodos de EM están mucho más centrados y detallados debido a su capacidad para identificar los residuos de aminoácidos que se someten a carbonilación, todavía requieren equipos demasiado caros y, por lo tanto, su distribución es limitada. (Colombo *et al.*, 2016).



DNPH

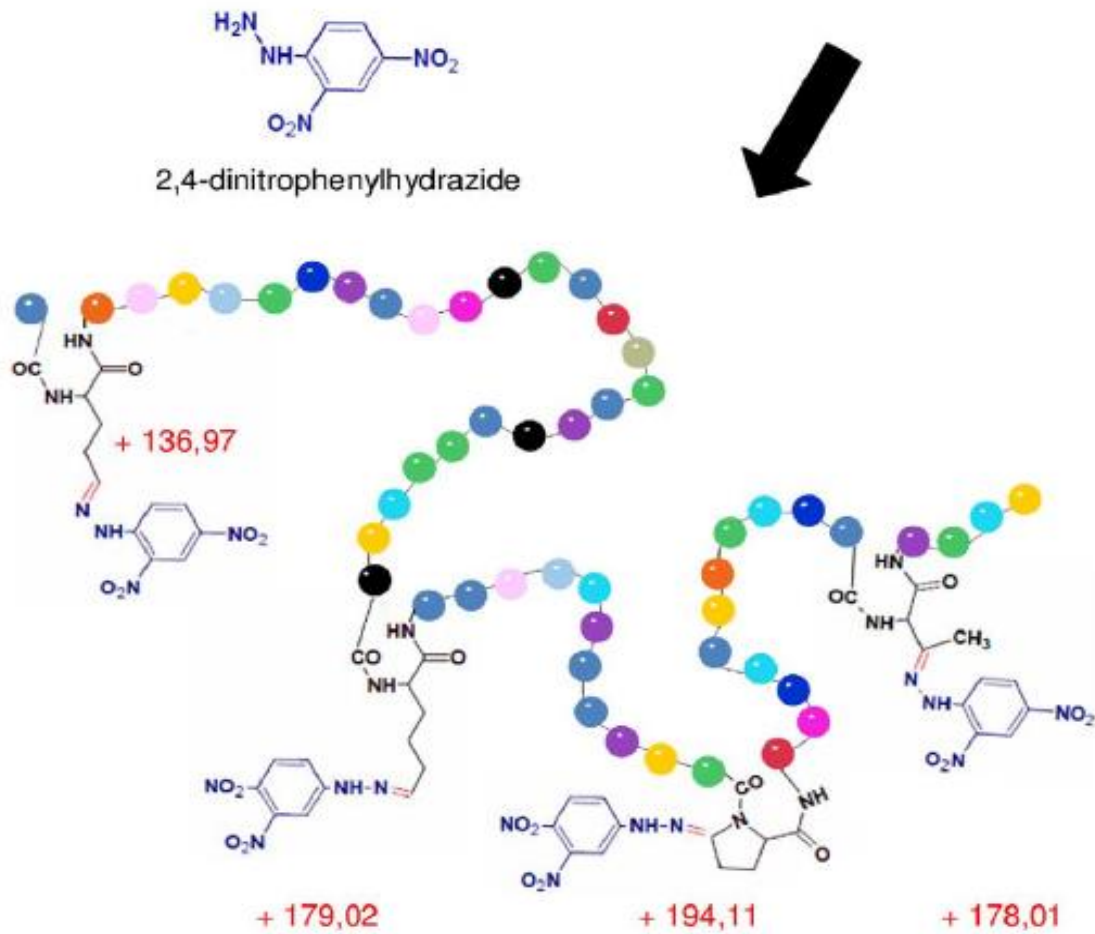


Figura 17. Proteínas carboniladas producidas por oxidación directa de aminoácidos después de la reacción con especies reactivas de oxígeno. Grupos carbonilo derivatizados con DNPH y el aumento asociado en el peso molecular causado por las modificaciones se muestra en azul.(Castroa *et al.*, 2013).

3.8. Antioxidantes

Para evitar que se desborde el aumento oxidativo, las células y los organismos aeróbicos requieren generar y mantener defensas antioxidantes, constituidas por un grupo de sustancias que al estar presente en bajas concentraciones con respecto al sustrato oxidable. Los antioxidantes son sustancias químicas que se caracterizan por impedir o retrasar la oxidación principalmente de los ácidos grasos cuyas reacciones se producen tanto en los alimentos como en el organismo humano, en el cual pueden provocar alteraciones fisiológicas desencadenantes de diversas enfermedades. Los mecanismos homeostáticos antioxidantes con los que el organismo enfrenta el daño oxidativo son específicos, afines, numerosos y diversos; reflejan la necesidad de hacer frente a la multiplicidad de formas de radicales libres y de especies reactivas. También son numerosos los compartimientos donde actúan en el organismo y células (Thomas, 1994; Sindhi *et al.*, 2013; Zamora, 2007; Méndez, 2010).

Existen diferentes tipos de antioxidantes endógenos y exógenos. Los endógenos son de tipo enzimático, siendo tres las principales enzimas antioxidantes necesarias para la vida en células que usan oxígeno en su metabolismo: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GHS-Px) (Figura 18) (Sindhi *et al.*, 2013).

TRIADA ENZIMÁTICA

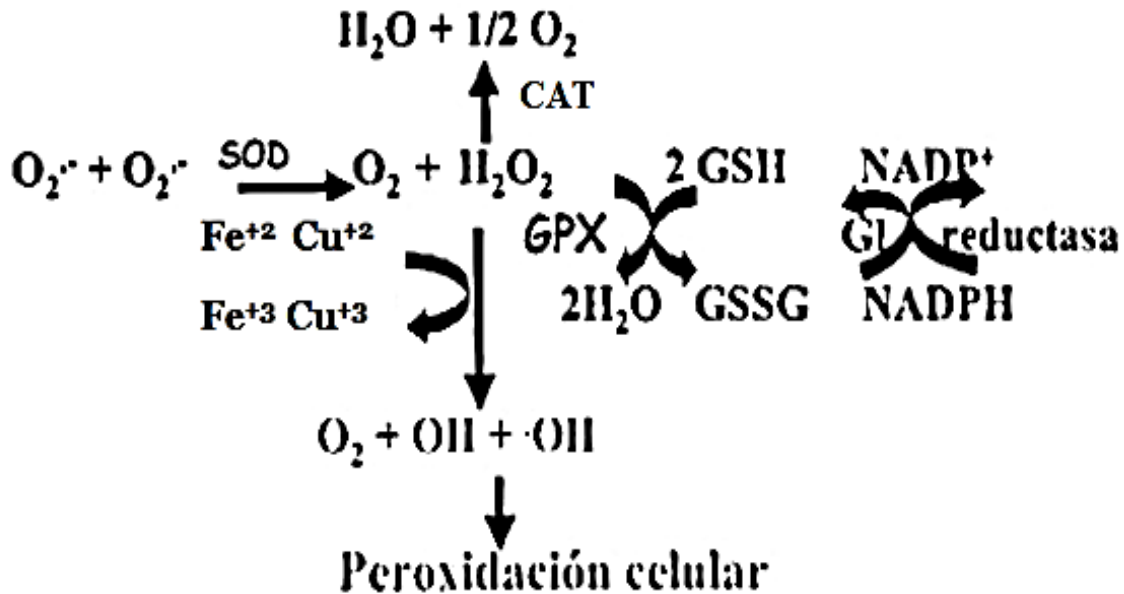


Figura 18. Antioxidantes endógenos (Sindhi et al., 2013).

Los antioxidantes exógenos de origen natural provienen de la dieta, entre ellos están la vitamina E (α -tocoferol), C (ácido ascórbico) y β -caroteno (provitamina A), los iones de cobre, selenio, zinc y manganeso, los compuestos fenólicos como flavonoides (antocianinas, quercetina, hesperidina, taninos), ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cinámico) y polifenoles no flavonoides (resveratrol, cumarinas, quinonas, lignanos y ligninas), los terpenos como el licopeno entre otros (Figura 19). Entre los flavonoides se pueden señalar sólo como ejemplo las antocianinas (rojo-azulado de las fresas), las catequinas (té verde y negro), los citroflavonoides (naranja, que da sabor amargo a la naranja, limón, toronja), los isoflavonoides (genisteína y daidzeína presentes en soya y sus derivados) y protoantocianidinas en semillas de uva y vino tinto (Figura 20). Las dosis normales de ingesta de flavonoides pueden ser de 20 a 26 mg/día contenidos en frutas y verduras (manzanas, naranjas, guayabas y uvas). Sin embargo, hay que alertar sobre el

consumo excesivo que pueden representar fórmulas comerciales de antioxidantes y mezclas herbales que se producen en gramos y no miligramos (como lo recomendado) que conducirían a problemas de toxicidad. Otro tipo de antioxidantes son los taninos presentes en el vino, con su característica de astringencia. No sólo son útiles a la industria alimentaria sino también en la cosmetológica. Respecto a los fitoestrógenos (isoflavonas, lignanos y flavonoides) se encuentran particularmente en las proteínas de la soya o sus derivados. Su uso más importante se asocia con la terapia de reemplazo hormonal para mujeres con síntomas de menopausia y osteoporosis durante el climaterio (Escamilla *et al.*, 2009; Reyes *et al.*, 2011; Drago *et al.*, 2006).

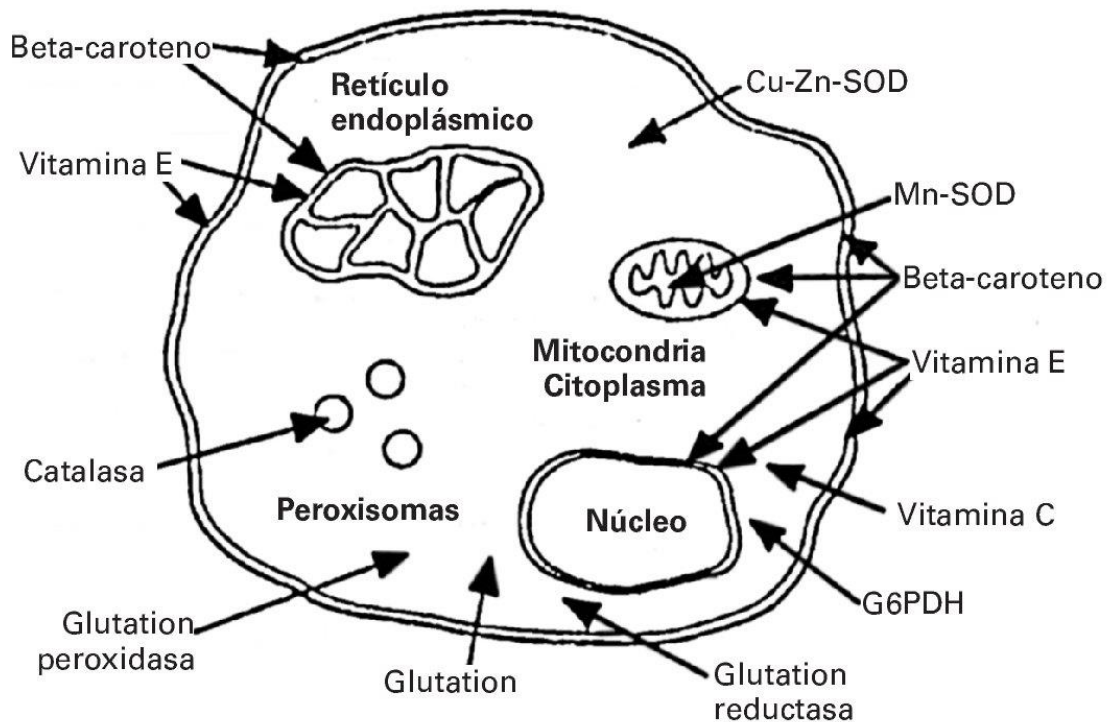


Figura 19. Antioxidantes exógenos, sitio de acción, localización y producción en una célula eucariote (Drago *et al.*, 2006).

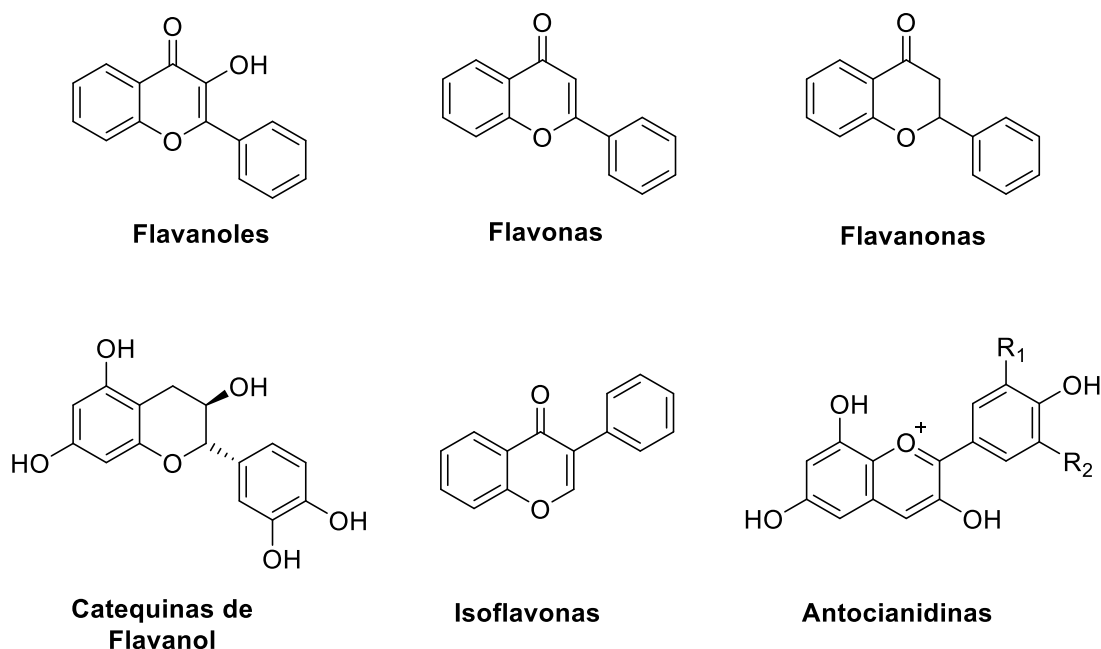


Figura 20. Tipos de flavonoides. (Drago *et al.*, 2006).

Recientemente, ha aumentado el interés sobre moléculas con propiedades antioxidantes que puedan prevenir el daño oxidativo ocasionado por EROS, por lo que hay un incremento en la búsqueda de alimentos funcionales o nutraceuticos por parte de la población (Sindhi *et al.*, 2013). Un nutraceutico es un suplemento dietético concentrado, hecho a partir de una sustancia natural bioactiva presente en los alimentos que proporciona un efecto favorable sobre la salud, superior al que tendría el alimento normal (Cruzado y Cedrón, 2012), contienen moléculas bioactivas tales como, compuestos fenólicos y flavonoides, que son asociados por presentar propiedades antioxidantes. Por lo tanto, los nutraceuticos son de gran interés debido a sus efectos fisiológicos, capaces de mantener la buena salud, de prevenir y aliviar algunas enfermedades (Sindhi *et al.*, 2013). Siendo los metabolitos secundarios (fenoles, flavonoides y carotenoides) los compuestos responsables de las propiedades nutraceuticas; se encuentran principalmente en especies vegetales y frutales (Nieto *et al.*, 2010).

3.9. El género (*Crataegus mexicana*)

Uno de estos nutraceuticos es el fruto del tejocote (Figura 21) cuya planta pertenece a la familia Rosácea, este género agrupa alrededor de 150 especies en todo el mundo, 95 de las cuales se encuentran en el continente americano y 13 son originarias de México, entre ellas *C. mexicana* (García *et al.*, 2013.) La producción total a nivel nacional es de 4,274 toneladas proveniente de los estados de Puebla, Estado de México, Tlaxcala, Chiapas, Michoacán, Hidalgo y Morelos. El tejocote es un frutal silvestre que se encuentra adaptado a una gran diversidad de suelos y climas, aunque su hábitat natural está en el altiplano mexicano y en especial en la región de los volcanes Iztaccíhuatl y Popocatepetl y en la llamada Sierra Nevada (SAGARPA, 2017).

El tejocote es una fuente natural de compuestos polifenólicos, nutricionalmente tiene una gran importancia por su contenido de azúcares principalmente glucosa, ácidos cítricos, quínico y málico (Liu *et al.*, 2009), fibra como la pectina, antioxidantes como bioflavonoides y proantocianidinas (Tassell *et al.*, 2010), carotenoides, vitamina C, y vitaminas del complejo B (Higareda *et al.*, 1995), además de sus propiedades terapéuticas en enfermedades cardiovasculares (Tassell *et al.*, 2010) y pulmonares (Özcan *et al.*, 2005).



Figura 21. *Crataegus mexicana* (Liu *et al.*, 2009).

4. ANTECEDENTES

Rueda *et al.* (2012) realizaron un estudio para evaluar el efecto de la inducción con CuCl_2 y paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) sobre protoplastos y plántulas de dos especies de tomate (*Lycopersicon hirsutum* Dunal y *Lycopersicon esculentum* Mill) mediante la producción de especies reactivas de oxígeno, al contenido de polifenoles totales y de la capacidad atrapadora de radicales libres, observando que la inducción con paraquat durante eventos tempranos presentó un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno en 17.4 veces en protoplastos de *L. hirsutum* y de 12.4 veces en *L. esculentum* con respecto a los controles no tratados. *L. esculentum* produjo significativamente el contenido de polifenoles totales y la capacidad atrapadora de radicales libres con valores de 1.81 Eq/h de ácido gálico y 5,3 % de decoloración del DPPH h^{-1} , respectivamente. Durante la inducción con paraquat se observó una correlación entre el contenido de polifenoles totales y la capacidad atrapadora de radicales libres cercana a 1 indicando que es altamente significativa, en respuesta a los 2 tipos de inducción durante los eventos tempranos. Ellos concluyeron que los resultados sugieren que la biosíntesis de compuestos fenólicos y la correlación con la capacidad atrapadora de radicales libres, no necesariamente se encuentra relacionada con una actividad antioxidante como un mecanismo de defensa a nivel celular y es que ese fenómeno quizá se deba a la activación de la ruta fenilpropanoide para otros fines; como por ejemplo la producción de metabolitos secundarios de estrés o el reforzamiento de pared celular. Lo anterior se sustenta en el hecho de que también se observó correlación entre CPFT y CARL, durante la inducción con cobre en la cual no se observaron procesos de producción de ERO.

Recientemente Mesquita *et al.* (2014), determinaron grupos carbonilos en proteínas oxidadas mediante un modelo con un método tradicional de Levine y un al que denominaron método alcalino DNPH, encontrando que ambos métodos son equivalentes. Las correlaciones entre las mediciones de absorbancia obtenidas

usando los dos métodos son buenas (sistema Fe^{2+} : $A_N^{\text{alcalino}} = (0.01 \pm 0.02) + (1.00 \pm 0.04)A_N^{\text{tradicional}}$; $r = 0.998$; $N = 17$; $P = 95\%$; Sistema Cu^{2+} : $A_N^{\text{alcalino}} = (0.01 \pm 0.02) + (0.98 \pm 0.03)A_N^{\text{tradicional}}$; $r = 0.998$; $N = 16$; $P = 95\%$). Por lo tanto, la equivalencia de los métodos puede aceptarse teniendo en cuenta que las ecuaciones de regresión lineal definidas para cada sistema de oxidación muestran valores de intercepción que no son significativamente diferentes de cero y que los valores de pendiente son cercanos a 1. Este último método es viable para emplearse en la determinación de carbonilación de proteínas ocasionada por EROS mediante el uso de plaguicidas como paraquat.

Por otra parte, García *et al.* (2012) evaluaron los compuestos fenólicos, flavonoides y la actividad antioxidante en extractos de flores de *Crataegus*, la caracterización química se llevó a cabo con base en las colecciones del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma Chapingo. La actividad antioxidante se midió con el método DPPH y los flavonoides se identificaron con HPLC-MS. Usando la prueba de DPPH con capacidad de barrido de radicales, las recolectas 52 y 77 mostraron la mayor actividad antioxidante ($\text{IC}_{50} = 431.1 \pm 27.2$ y 555.4 ± 8.0 mg mL^{-1}).

Méndez *et al.* (2013) y Banderas *et al.* (2015) realizaron estudios *in vitro* en seis extractos diferentes de la epidermis del fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*) para determinar la capacidad antioxidante de acuerdo con su polaridad utilizando *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol. Las muestras fueron evaluadas por el contenido total de fenol y contenido de carotenoide por medio de la prueba de DPPH, la inhibición de la formación de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la neutralización del radical catiónico 2,2'-azino-bis (3-sal de diamonio del ácido (etil benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS). El extracto más activo en la eliminación de radicales DPPH e inhibición de la formación de TBARS fue el extracto de acetona, con actividades de 21.9 ± 0.15 y $13.27 \pm 0.70\%$, respectivamente, a 10 mg/L. Los extractos polares tuvieron un mejor rendimiento en la inhibición de la peroxidación lipídica, el extracto con la

mayor actividad fue el extracto de acetona ($13.27 \pm 0.70\%$) a 10 mg/L y el menos activo es el extracto de n-hexano ($2.35 \pm 0.27\%$) a 10 mg/L.

La determinación de la actividad de barrido radical ABTS en los extractos de tejocote indicaron una menor actividad en los extractos no polares de 11 y 12 μM de Trolox/g de piel seca muestra. En los extractos más polares, los resultados fueron entre 16 y 17 μM de Trolox/g de muestra de piel seca. También reportaron la actividad antioxidante de la epidermis liofilizada del fruto de tejocote (*C. mexicana*) mediante los métodos químicos DPPH y TBARS, y como controles positivos el ácido ascórbico, el ácido cafeico, el α -tocoferol y la quercetina. Encontraron que el extracto de acetona mostró mejor efecto antioxidante con una CI_{50} de 15.26 ± 0.20 mg/L y 16.78 ± 0.33 mg/L mediante los métodos DPPH y TBARS, respectivamente.

5. JUSTIFICACIÓN

Los productos químicos que se emplean para el cuidado de hortalizas tienen la función de eliminar plagas y vectores que las dañan, estos productos no dejan de ser tóxicos y peligrosos para los seres vivos provocándoles diversas enfermedades y alteraciones como la oxidación proteica que da origen a grupos carbonilo. Esto se debe a que diversos pesticidas generan radicales libres y los sistemas antioxidantes del cuerpo no son suficientes para contrarrestar este tipo de oxidación. Por ello, el consumo de alimentos con compuestos antioxidantes es benéfico para el consumidor, sin embargo, se desconoce si éstos son capaces de prevenir el proceso de carbonilación proteica ocasionado por la formación de radicales libres por la exposición a pesticidas. Por lo que en el presente trabajo se plantea evaluar en plasma humano la actividad antioxidante del extracto de acetona de la cascara del fruto de tejocote (*Crataegus mexicana*) sobre la carbonilación proteica causada por el herbicida paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo).

6. HIPÓTESIS

El extracto de acetona de la epidermis de tejocote contiene alto poder antioxidante, el cual tendrá protección en la carbonilación de proteínas plasmáticas causado por un potencial prooxidante, el herbicida paraquat.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Evaluar la inhibición de la carbonilación de proteínas plasmáticas producida por el extracto de la epidermis tejocote empleando como prooxidante al paraquat, para conocer la capacidad antioxidante de *Crataegus mexicana*.

7.2. Objetivos específicos

- Conocer la dosis efectiva media (DE_{50}) de carbonilación producida por el paraquat mediante la reacción de 2,4-Dinitrofenilhidrazina para utilizarlo como prooxidante en cultivos de proteínas plasmáticas.
- Construir una curva dosis-respuesta con cultivos de proteínas plasmáticas expuestas a diferentes concentraciones de *C. mexicana*, utilizando la DE_{50} del paraquat como prooxidante.
- Calcular la concentración de inhibición media (CI_{50}) de la curva dosis-respuesta para analizar la capacidad antioxidante.

8. METODOLOGÍA

8.1. Obtención de los frutos de tejocote

Se recolectó el fruto de un solo árbol, en el municipio de San Pablo del Monte, Tlaxcala, entre noviembre y diciembre de 2018 y principios de enero de 2019, de acuerdo a sus propiedades físicas (color, tamaño, textura, firmeza y sin algún tipo de picadura) obteniendo un total de 15 kg, se lavó manualmente solo con agua de grifo para eliminar restos de residuos. Se retiró la epidermis de manera manual y se puso a deshidratar durante siete días al aire libre adquiriendo un total de 410 g, se maceró en un mortero y posteriormente se almacenó en bolsas de plástico retirando el aire por completo con una bomba de vacío, para evitar su oxidación.

8.2. Obtención de extractos

Se obtuvieron seis extractos de la epidermis de *C. mexicana*, de acuerdo con su polaridad (de menor a mayor), a partir de 30 g de epidermis deshidratada, extraída con 300 mL de cada disolvente de manera secuencial (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol), se colocó en un frasco ámbar y se dejó incubar a 37 °C durante 48 h por cada disolvente, luego de transcurrir dicho tiempo se filtró para separar el solvente de la muestra biológica utilizando un embudo y algodón. Después el solvente se evaporó en un rotavapor Büchi R-200 a diferentes temperaturas para finalmente obtener cada uno de los extractos. De los seis extractos, se trabajó con el extracto de acetona, ya que en pruebas y estudios realizados con anterioridad en el laboratorio de Química de la Nutrición han presentado una actividad antioxidante elevada, son reproducibles y altamente estables (Méndez *et al.*, 2013; Banderas *et al.*, 2015).

8.3. Toma de muestra sanguínea

En ayuno (10 a 12 h) se les tomaron muestras sanguíneas a cinco estudiantes varones de 22 años de edad de la Licenciatura de Nutrición de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx), clínicamente sanos con base en un estudio de biometría hemática de 7 elementos. Las muestras sanguíneas fueron tomadas en tubos esterilizados heparinizados obteniendo 4 mL de cada muestra y colocándolas sobre hielo de inmediato, seguidamente se separó aproximadamente 2 mL de plasma por medio de centrifugación a 3000 rpm, durante 10 minutos, posteriormente se almacenaron a -40 °C.

8.4. Curva dosis respuesta

Se preparó una solución muestra del herbicida Gramoxone® diluido con agua destilada, se realizó un espectro cada 25 nm para determinar la absorbancia del herbicida, en un intervalo de longitud de onda entre los 500 nm y 700 nm.

Consecutivamente se preparan seis disoluciones a diferentes concentraciones (1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%) de Gramoxone®, a partir de la solución patrón cada uno fue aforado a 10 mL con agua destilada, posteriormente con estas disoluciones se realizó la primera curva de calibración para la cual se utilizó un espectrofotómetro de UV visible con una longitud de onda de 630 nm y a partir de estas lecturas se obtuvo el intervalo lineal del Gramoxone®.

Posteriormente se realizó una segunda curva de calibración donde la solución patrón contenía diluciones a diferentes concentraciones de paraquat puro (0.002%, 0.013%, 0.027%, 0.041%, 0.055%), estas fueron leídas a una longitud de onda de 370 nm, se determinó la concentración efectiva media (CE_{50}) del herbicida, mediante la concentración de grupos carbonilo en proteínas plasmáticas utilizando la DNPH, se aplicó la ecuación de la recta para obtener el valor correspondiente.

Finalmente se construyó la curva de calibración para determinar la concentración máxima inhibitoria media del extracto de la epidermis tejocote (IC_{50}), donde la solución patrón contenía extracto de ésta en diluciones a diferentes

concentraciones de 10 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm y 1000 ppm, además del paraquat puro a una concentración al 0.06%.

8.5. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Se tomaron 5 µL de plasma sanguíneo (por triplicado) colocándolos en una placa de ELISA, se les agregaron 20 µL de agua destilada y 150 µL de mezcla de Lowry, se incubó a 25 °C durante 10 min con agitación orbital. Posteriormente, se adicionaron 25 µL de reactivo de Folin y se incubó a 25 °C por 30 min. Finalmente, se agregó en otro apartado 200 µL de PBS (Buffer de fosfatos) que se utilizó como blanco, realizando una lectura a 540 nm con el lector de ELISA (Porras *et al.*, 2014; Lowry *et al.*, 1951).

Posteriormente se aplicó la siguiente fórmula para la determinación de proteínas:

$$Proteína \frac{\mu g}{mL} = \frac{\text{Promedio de las absorbancias} - \text{constante 1}}{\text{constante 2}} * \text{constante 3}$$

Dónde:

Promedio de las absorbancias = promedio de las lecturas realizadas por triplicado.

Constante 1 = 0.01508

Constante 2 = 0.00267

Constante 3 = 40

Las constantes fueron establecidas mediante curvas de calibración previamente hechas ya en el lugar de estudio.

El resultado se dividirá entre 1000 para obtener los mg de proteína las cuales se ajustaran a 10 mg/mL para las soluciones patrón.

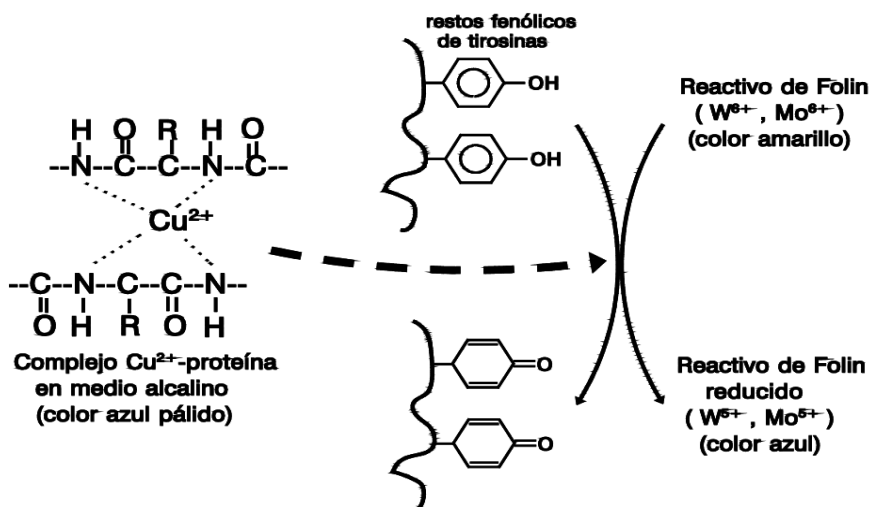


Figura 22. Mecanismo de acción del método Lowry.

8.6. Determinación de grupos carbonilo por el método alcalino DNPH

Cada muestra se procesó por triplicado, una independientemente de la otra; en la primera muestra la proteína obtenida del plasma sanguíneo se ajustó a 10 mg y se incubó durante 18 h a 37 °C con tampón de fosfato (pH 7.2, 50 mM), el volumen final fue de 10 mL (Mesquita *et al.*, 2014). La segunda muestra se ajustó a 10 mg y se le adiciona el herbicida Gramoxone® como inductor de la carbonilación de las proteínas y se incubó durante también por 18 h a 37 °C con tampón de fosfato (pH 7.2, 50 mM), el volumen final fue de 10 mL y en la tercera muestra se ajustó a 10 mg, adicionando el extracto de tejocote en acetona seguido del herbicida Gramoxone® y se incubó durante 18 h a 37 °C con tampón de fosfato (pH 7.2, 50 mM), el volumen final fue de 10 mL.

Posteriormente, se tomaron 500 µL de cada solución muestra y por separado se añadieron 500 µL de DNPH 10 mM en 0.5 M de H₃PO₄, incubándose durante 15 min en oscuridad a 25°C y con agitación orbital. A continuación, se adicionaron 250 µL de TCA (ácido tricloroacético) al 50% y se incubó a 20 °C durante 15 min con agitación orbital. Seguidamente se centrifuga a 12,000 rpm por 20 min, se

desecha el sobrenadante sin remover el sedimento; se lava tres veces cada muestra con 1 mL de etanol/acetato de etilo (v/v, 1:1) dejando en reposo 10 min y centrifugando a 12,000 rpm durante 20 min, eliminando nuevamente el sobrenadante sin remover el sedimento. Finalmente, se resuspende en 1 mL de clorhidrato de guanidina 6 M, y se mide la absorbancia a 370 nm. Se empleó clorhidrato de guanidina 6 M en forma de blanco.

El resultado final se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Carbonilos en } \frac{\mu\text{mol}}{\text{mg}} = \frac{\text{Absorbancia 370 nm}}{\text{Coeficiente de absorcion molar}}$$

Dónde:

Absorbancia 370 nm = son las lecturas obtenidas para cada muestra.

Coeficiente de absorción molar = $0.022 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

La capacidad de absorción molar se utiliza para los derivados de hidrazona de los grupos carbonilo en las condiciones experimentales.

9. RESULTADOS

A partir de los 15 kg del fruto de tejocote se consiguió la epidermis y posterior a la deshidratación (7 días) se obtuvo un total de 410 g de epidermis de *C. mexicana* extraída con 300 mL de cada solvente, todos fueron colocados en viales forrados con papel carbón y aluminio para evitar el contacto con la luz y evitar su posible descomposición como se observa en la figura 23; los pesos variaron para cada extracto seco obteniendo consistencias y colores diferentes debido a la polaridad de cada solvente como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Peso de extractos secos.

Solvente	Temperatura	Peso (mg)	Color	Consistencia
n- Hexano	40 °C	686.5	Amarillo	Viscosa
Diclorometano	30 °C	2.0	Café claro	Viscosa
Acetato de etilo	40 °C	552.6	Amarillo	Solida
Acetona	30 °C	729.1	Amarillo	Solida



Figura 23. Obtención de extractos

9.1. Cuantificación de proteína

A partir de la toma de muestra sanguínea (4 mL) para cada participante se obtuvo el plasma (2 mL) de cada uno de ellos. Seguidamente se realizó la cuantificación de proteínas (figura 24) obteniendo diferentes concentraciones para cada uno de los participantes los cuales variaron de 6.08 mg/mL como se observa en la tabla 9.

Tabla 6. Proteína mg/mL

Estudiantes	Proteína mg/mL
1	7.29
2	8.22
3	7.23
4	6.08
5	10.68



Figura 24. Obtención de plasma sanguíneo y cuenta de proteína.

9.2. CURVAS DOSIS RESPUESTA DE PARAQUAT

9.2.1. Espectro de paraquat

A partir de los barridos realizados en el espectro de absorción UV se puede observar que comienza a aumentar la absorbancia a partir de los 550 nm hasta lograr su máxima longitud de onda a los 630 nm, a partir de este valor comienza a decrecer, observando que a los 680 nm se encuentra muy cercano al punto de origen como se muestra en la figura 25.

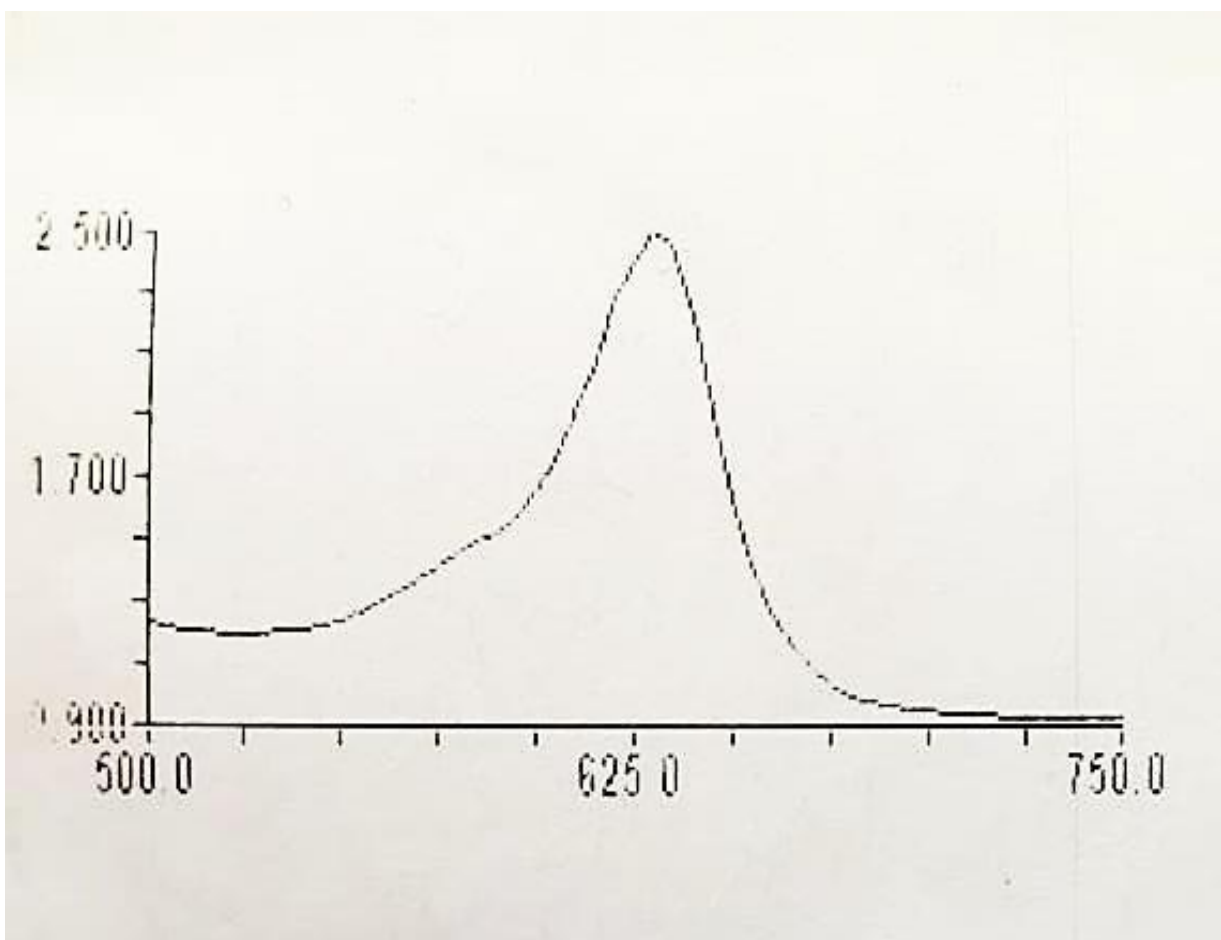


Figura 25. Espectro de absorción del paraquat generado a través de las lecturas de absorción UV visible.

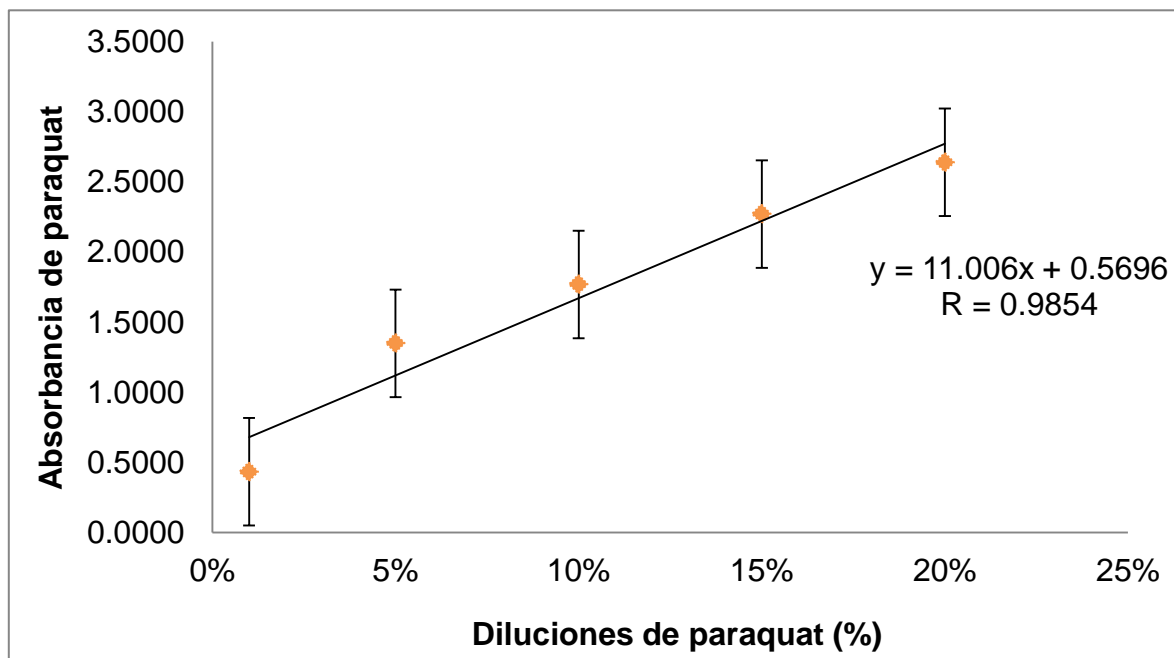
9.2.2 Intervalo lineal de paraquat

A partir de la longitud de onda máxima que se obtuvo en el espectro de UV visible se registraron por triplicado y en días diferentes las absorbancias de las diferentes concentraciones así como la desviación estándar para cada una de ellas como se observa en la tabla 7.

Tabla 7. Absorbancias de paraquat.

Concentración %	Absorbancia 1ra. Corrida	Absorbancia 2da. Corrida	Absorbancia 3ra. Corrida	Promedio	Desviación estándar
1	0.453	0.407	0.443	0.434	0.02
5	1.358	1.374	1.315	1.349	0.03
10	1.856	1.746	1.705	1.769	0.08
15	2.347	2.346	2.118	2.270	0.13
20	2.704	2.622	2.593	2.639	0.06

Los datos obtenidos anteriormente (tabla 7) se graficaron y se obtuvo el intervalo lineal donde se puede observar que a partir de la concentración del 25% el espectro ya no pudo determinar la lectura como se observa a continuación en la gráfica1.



Gráfica 1. Intervalo lineal de paraquat.

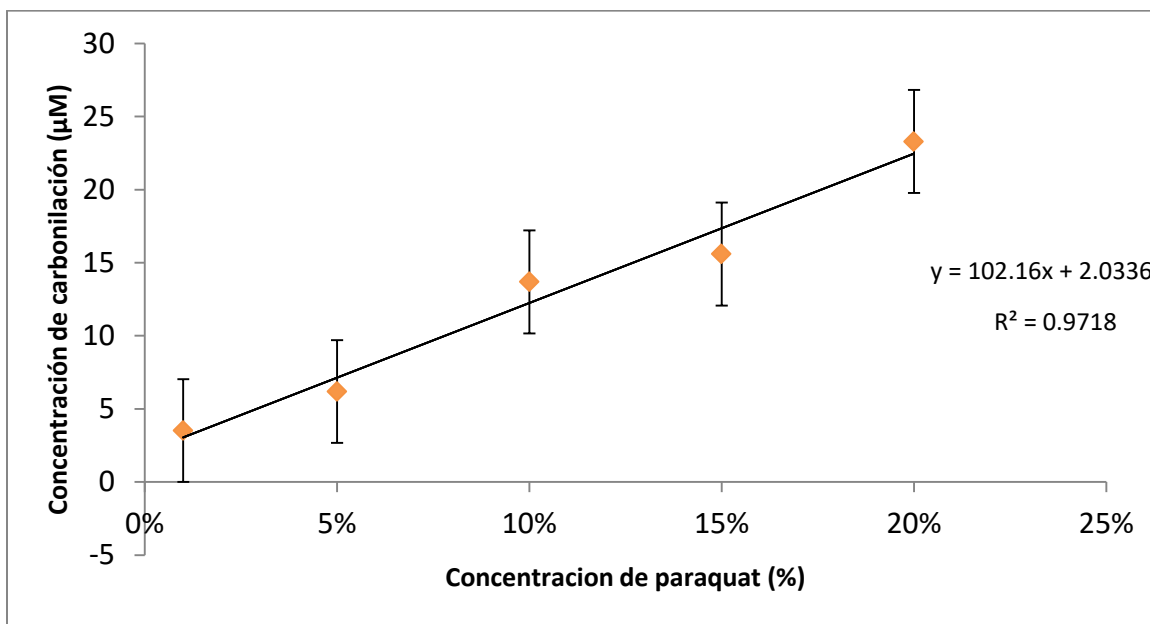
9.2.3 Concentración efectiva media de paraquat

Se determinó el nivel de carbonilación por triplicado y en días diferentes para obtener las diferentes concentraciones con sus respectivas desviaciones tal y como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Concentración de carbonilación

Concentración %	Carbonilación 1ra. Corrida	Carbonilación 2da. Corrida	Carbonilación 3ra. Corrida	Promedio de carbonilación	Desviación estándar
1	3.20	3.88	3.45	3.51	0.34
5	6.38	5.79	6.38	6.18	0.34
10	13.52	14.36	13.18	13.68	0.60
15	15.34	16.54	14.88	15.59	0.85
20	23.31	23.02	23.52	23.28	0.25

Con las diferentes concentraciones se construyó la siguiente curva de calibración del herbicida (gráfica 2), encontrándose en el eje X las concentraciones de paraquat y en el eje Y la concentración de carbonilación, se aplicó la ecuación de la recta y se obtuvo una CE_{50} del 22% de Gramoxone, lo que equivale al 0.06% de paraquat puro.



Gráfica 2. Concentración efectiva 50 de paraquat a 370 nm.

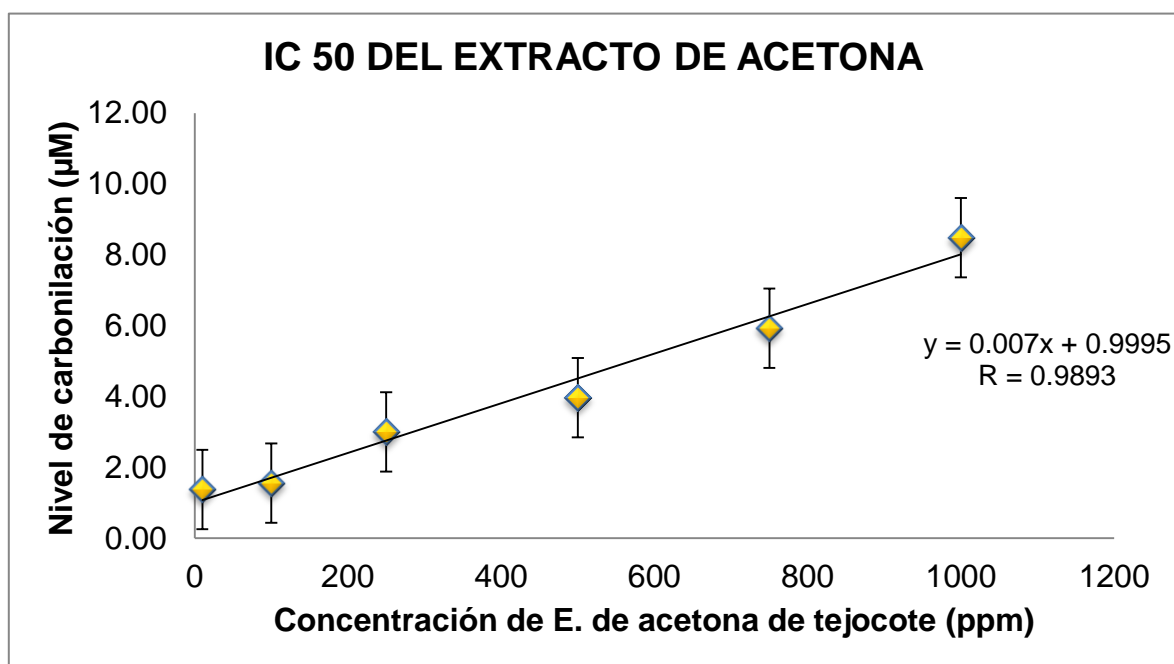
9.2.3 Concentración máxima inhibitoria media del extracto de acetona de tejocote

Se determinó la inhibición de la carbonilación mediante el extracto de la cascara de tejocote por triplicado y con sus respectivas desviaciones (tabla 9).

Tabla 9. Inhibición de carbonilación

Concentración %	Carbonilación 1ra. Corrida	Carbonilación 2da. Corrida	Carbonilación 3ra. Corrida	Promedio de la carbonilación	Desviación
10	0.91	1.36	1.84	1.37	0.46
100	0.89	2.13	1.63	1.55	0.62
250	3.07	3.06	2.86	3.00	0.11
500	3.81	4.34	3.74	3.97	0.32
750	5.47	6.61	5.68	5.92	0.60
1000	8.25	8.79	8.38	8.48	0.28

Con las diferentes concentraciones se construyó la siguiente curva de calibración, encontrándose en el eje "X" las concentraciones del extracto de tejocote y en el eje "Y" la concentración de carbonilación, se aplicó la ecuación de la recta y se obtuvo una IC₅₀ de 462 ppm (gráfica 3).



Gráfica 3. Determinación de la IC₅₀ del extracto de acetona de tejocote a 370 mn.

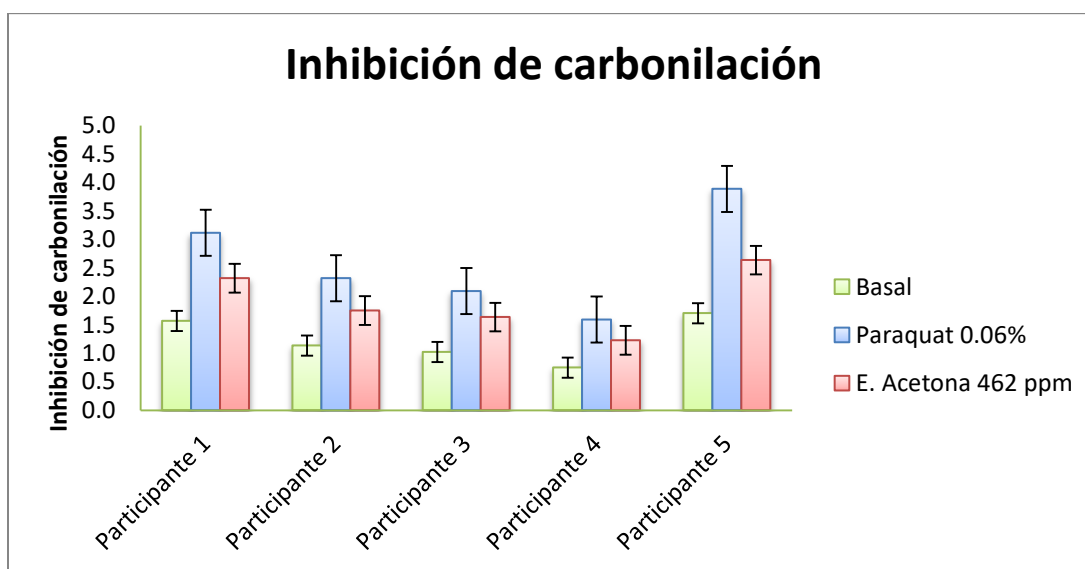
9.2.4 Inhibición la de carbonilación

En la tabla 10 se muestra la concentración de carbonilación de cada estudiante en forma basal, con la inducción del 0.06% de paraquat y con el extracto de tejocote a 462 ppm, con sus respectivas desviaciones.

Tabla 10. Carbonilación

Estudiante	Basal	Desviación estándar	Paraquat 22 %	Desviación estándar	E. Acetona 462 ppm	Desviación estándar
1	1.56	0.16	3.11	0.86	2.31	0.25
2	1.13	0.32	2.31	0.45	1.75	0.54
3	1.02	0.03	2.09	0.00	1.63	0.25
4	0.76	0.10	1.59	0.32	1.22	0.19
5	1.70	0.16	3.88	0.03	2.63	0.06

Con los valores obtenidos anteriormente se graficaron los datos en donde se puede observar que cada estudiante tiene un nivel de carbonilación de manera basal, al inducir la concentración del 0.06% de paraquat se puede observar que se produjo un aumento del 50 % aproximadamente, sin embargo al adicionar el extracto de acetona a una concentración de 462 ppm protegió efectivamente a las proteínas plasmáticas disminuyendo hasta en un 50 % el efecto de paraquat sin embargo no se logró llegar al valor basal (gráfica 4).



Gráfica 4. Carbonilación a 370 mn.

10. DISCUSIÓN

En el espectro de Gramoxone® (figura 25) se observó que el mayor punto de absorbancia se presentó a los 630 nm, la literatura reporta que la longitud de onda del paraquat se encuentra a los 604 nm, esta variabilidad pudiera deberse a la fórmula de gramoxone así como la sensibilidad del equipo, sin embargo el valor obtenido se encuentra cerca de lo reportado, por lo tanto se pudo comprobar que el herbicida comercial (Gramoxone) efectivamente contiene paraquat, esto por la técnica de espectroscopia de UV como lo reporta Uzcátegui *et al.* (2017), en su estudio donde lograron implementar un método para determinar niveles de concentración del herbicida Gramoxone en saliva humana mediante una escala colorimétrica por la técnica de UV, donde permite monitorear con mayor frecuencia a los trabajadores del campo expuestos al herbicida que es muy utilizado en los cultivos mexicanos, ellos concluyen que es un método efectivo puesto que todos los participantes mostraron cantidades de 0.25 – 2 mg/L.

En la gráfica 1 observamos el intervalo lineal de nuestras diluciones con distintas concentraciones leídas a una misma longitud de onda de 630 nm, es decir se muestra el intervalo de concentración del herbicida en la fase móvil, dentro del cual la sensibilidad del detector es constante, con una variación determinada y podemos observar que a medida que aumenta la concentración también aumenta la absorbancia hasta la concentración del 25% por lo que el espectrofotómetro a esta concentración solo estaría detectando turbiedad del herbicida, con base en los resultados de la curva se observó que se cumple con la Ley de Lambert y Beer ya que al ir aumentando la concentración aumenta la absorción es decir, es directamente proporcional.

Se determinó proteínas totales en plasma a los cinco participantes, los valores variaron en cada uno de ellos como se muestra en los resultados (tabla 6), debido a que existen factores extrínsecos que afectan tanto a la calidad proteica como al aporte adecuado de proteína, entre ellos podemos citar el estado fisiológico y de salud del individuo y factores económicos, higiénicos y sanitarios, etc., (Meade *et*

al. 2005). Una vez determinado el intervalo lineal se obtuvo la gráfica 2 en donde se midió el nivel de carbonilación de las proteínas plasmáticas a través de la DNPH y con la ecuación de la recta se obtuvo la pendiente la cual permitió sustituir los valores y el despeje de "x" para poder calcular la DE₅₀ y obtener la concentración de 0.06%, la cual carbonila en un 50% a las proteínas plasmáticas totales, también se obtuvo una r de 0.9816 cuyo valor indica una relación positiva fuerte y una r² de 0.9636 que representa la proporción de la variación de las absorbancias explicadas por la concentración. Aunque no existen estudios que determinen la carbonilación con Gramoxone (paraquat), Malpica *et al.* (2001) realizaron un estudio de 97 casos intoxicados por Gramoxone en el Hospital Manuel Ascunce Domenech de Camagüey entre mayo de 1997 y junio de 1998. Analizaron la edad, sexo, color de piel, procedencia, finalidad de la ingestión, complicaciones y sus resultados mostraron que el 37.11% y el 29.89% correspondieron a grupos de 15-24 años y 25-34 años respectivamente; 58.76% eran mujeres y el 4.23% hombres; el 74.94% tenían color de la piel blanca. Los síntomas digestivos, respiratorios y renales fueron los más frecuentes. El 47.44% presentó insuficiencia renal aguda y el síndrome de distrés respiratorio del adulto en el 14.44%, que como principales complicaciones se presentaron en las primeras 24 y 48 horas. El 71.13% de los pacientes fallecieron. Por lo tanto, se observa que a bajas concentraciones causa un efecto negativo importante y que a concentraciones elevadas puede llegar a ser mortal, este estudio puede corroborar los resultados obtenidos en este trabajo. Existen dos tipos de reacción de proteínas carboniladas la primaria que es detectable por la DNPH (Kadiiska, 2002; Aoki *et al.*, 2002), y la secundaria que se genera a partir de la lipoperoxidación, su descomposición forma varias especies de carbonilos (de tres a nueve carbonos de longitud), los más reactivo y citotóxico son; aldehídos β -insaturados (4-hidroxi-*trans*-2-nonenal y acroleína), di-aldehídos (malondialdehído y glioxal) y cetoaldehídos (4-oxo-*trans*-2-nonenal) (Yuichiro *et al.*, 2010). Debido a las proteínas obtenidas en el plasma sanguíneo (albumina, globulinas, fibrinógeno) se estima que la reacción, la reacción que se lleva a cabo en este estudio es de tipo primario, mientras que la formación de grupos carbonilos se da principalmente en

las cadenas laterales de prolina, arginina y lisina con más del cincuenta por ciento debido a las características que presenta su estructura química para intervenir en este proceso; sin embargo, se requieren más estudios que confirmen esta teoría y que expliquen el porqué.

La condición que provoca esto, son las elevadas concentraciones de radicales libres donde estos superan en actividad a los antioxidantes. A pesar del avance que se ha tenido en poco tiempo acerca de la oxidación proteica, aún existen preguntas abiertas. Químicamente la causa de la oxidación de proteínas es todavía ambigua, pues, aunque los mecanismos de oxidación de ciertos grupos pueden ser precedidos, existen limitantes experimentales para determinarlos. Incluso el probar un mecanismo preferencial de oxidación para una proteína no proporcionaría reglas generales, pues el ambiente químico de cada sustrato es diferente dependiendo de las estructuras primaria, secundaria y terciaria de cada proteína, y aún más si existen cofactores metálicos coordinados. Todos estos factores que hacen a una proteína única para su función tienen como consecuencia que un mismo grupo químico presente un potencial Redox diferente y, por lo tanto, pueda o no participar de la oxidación por EROS.

Posterior a la aparición de radicales libres y a la detección de grupos carbonilo en proteínas, se obtiene como consecuencia el daño irreversible que sufren las macromoléculas para desempeñar su función, coadyuvando a el desarrollo de enfermedades crónico degenerativo y aumentando aún más los grupos carbonilo como lo menciona Gutiérrez *et al.* (2016) en su estudio, donde analizaron las muestras de 123 mujeres con un promedio de 52 años de edad que presentaron el diagnóstico confirmado de cáncer de mama con un promedio de 3.34 ± 3.49 años de evolución. El 60.97% del total de pacientes presentaron cáncer de mama del lado derecho y el 47.96%, metástasis. Además, el 28.45% de las pacientes presentaron receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano positivo (HER2+) y el 85.36%, un grado nuclear III. En comparación con el grupo control, las mujeres con cáncer de mama presentaron un incremento de 3.76 veces la cantidad de proteínas carboniladas en su plasma (5.00 ± 3.27 vs. 1.33 ± 2.31 nmol

carbonilos/mg proteína; $p < 0.05$). Además, las pacientes con cáncer presentaron un incremento del 60% en la concentración de la enzima carbonil reductasa en comparación con el grupo control (3.27 ± 0.12 vs. 2.04 ± 0.11 ng/mg proteína). Ellos concluyen que la correlación positiva entre la concentración plasmática de proteínas carboniladas y la actividad de la enzima carbonil reductasa en los leucocitos indica que ambos parámetros se encuentran asociados entre sí, por lo que pueden ser utilizados como indicadores del daño a los tejidos en este tipo de pacientes, sobre todo si presentan metástasis; por ello, serían apropiados para llevar a cabo el monitoreo de la progresión de esta enfermedad. Por lo tanto, hay que prevenir o retardar diversas enfermedades que tengan relación con la generación de radicales libres mediante el consumo de alimentos ricos en antioxidantes como el fruto de tejocote, ya que es rico en antioxidante, el cual evita la producción de estas especies reactivas de oxígeno.

Existe gran variedad de especies del género *Crataegus* sin embargo hay pocos estudios relacionados con la especie *C. mexicana*. Uno de ellos fue realizado por García *et al.* (2012) en su estudio, evaluaron la actividad antioxidante de las flores de esta especie mediante la prueba de DPPH teniendo una protección de hasta 92.62%, dicho valor fue comparado con la quercetina el cual tiene una protección de 97.20% por lo tanto muestra que esta especie tiene buena protección antioxidante en las flores, sin embargo Méndez *et al.* (2013) demostraron en su estudio que tiene mayor actividad antioxidante la epidermis del fruto ya que lo evaluaron mediante diferentes extractos de *C. mexicana* y demostraron que el extracto en acetona presenta una mayor actividad antioxidante con respecto a los demás extractos ya que fueron comparados con antioxidantes puros como la quercetina pero únicamente el extracto de acetona es el que se asemeja a estos valores. En la gráfica 3 se determinó la IC_{50} del extracto de tejocote *C. mexicana* y mediante la ecuación de la recta se pudo obtener una concentración de 462 ppm la cual inhibe en un 50% de la carbonilación de las proteínas plasmáticas totales, también se obtuvo una r de 0.9893 indicando una relación positiva fuerte y una r^2 de 0.9787 que representa la proporción de la variación de las absorbancias explicadas por la concentración. La IC_{50} obtenida es una cantidad relativamente

pequeña, sin embargo protege efectivamente a las proteínas contra la oxidación y esto podría tener un efecto importante para la salud. En la gráfica 4 se aplicaron las concentraciones obtenidas anteriormente, con tres tratamientos para cada estudiante, en el primero se observó el nivel de carbonilación de manera basal el cual indica va a variar en cada uno de ellos de acuerdo al estilo de vida que presenten, en el segundo tratamiento se induce la oxidación por medio del plaguicida y aumenta en un 50% la carbonilación, mientras que en el tercer tratamiento se inhibe en un 50%, en este sentido, se puede resaltar que el comportamiento del extracto en acetona fue semejante a los resultados de este estudio, ya que al adicionar la concentración del extracto la formación de grupos carbonilo se vio inhibido en todos los casos debido a que el fruto de tejocote contiene metabolitos antioxidantes, no obstante para saber que metabolito es el principal responsable de esta inhibición es necesario realizar técnicas más sensibles como lo es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) y/o Electroforesis.

11. CONCLUSIÓN

Se comprobó que el herbicida paraquat es productor de radicales libres con un alto grado de carbonilación a una concentración de 0.06%, produciendo aumento de carbonilación hasta en un 50% en las proteínas plasmáticas.

Se determinó que el extracto en acetona de tejocote (*Crataegus mexicana*) es una fuente natural con propiedades antioxidantes, con una concentración de 462 ppm presenta una capacidad antioxidante elevada frente a la carbonilación de proteínas, protegió efectivamente a las proteínas en el plasma sanguíneo, contra el efecto de la carbonilación hasta en un 50% *in vitro*. Sin embargo, se requiere de más estudios que indiquen cual es el metabolito responsable de esta protección.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aoki, Otaka, Igarashi: Soy protein reduces paraquat induced oxidative stress in rats. PubMed 132 (8): 58 – 62, 2002

Banderas J., Cervantes M., Grada M., Espíndola M., Cuevas E., Navarro A., Méndez D. (2015). Antioxidant-mediated protective effect of hawthorn (*Crataegus mexicana*) peel extract in erythrocytes against oxidative damage. Afr. J. Food Sci. 9, (4): 208-222.

Basaga HS. (1989). Biomedical aspects of free radicals. Bioquímica y Biología Celular, 68, 989-98.

Bedmar F. (2011). ¿Qué son los plaguicidas? CH, Vol. 21 no. 122, 10-16.

Benezer M., Castro E., y García E. (2008). Production of reactive oxygen species during the resistance expression of plants to diseases. Rev. Mex. Fitopatol , vol.26 no.1, 56-60

Blanco A., Andérica A., & Pedraza J. (2014). New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. Free Radical Research, 48 (6), 626-638.

Camacho R. Gerardo J., Guillén K., Sánchez J. (2017). Producción de enzimas ligninolíticas durante la degradación del herbicida paraquat por hongos de la pudrición blanca. Revista Argentina de Microbiología, 49(2), 189-196.

Castroa J. Jungc T., Grunec T., Almeida H. (2013). Actin carbonylation: From cell dysfunction to organism disorder. Journal of Proteomics, 92, 171 – 180.

Cheesman KH, Slater TF. (1998). Free Radicals in Medicine. Br Med Bull, 49, 118-21.

Cofepris (2016). Catálogo de Plaguicidas, 22-23.

Colombo G., Clerici M., Garavaglia M., Giustarini D., Rossi R., Milzani A., & DalleDonne I. 2016. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *Journal Of Chromatography B*. 1019:178-190.

Cortinas, C., (2000). Proyecto para habilitar a México a formular el Plan Nacional de Implementación (PNI) para dar cumplimiento al Convenio de Estocolmo. Cortinas, Retrieved from.

Cruzado M. y Cedrón J. (2012). Nutracéuticos, alimentos funcionales y su producción. *Revista de Química PUCP*, 26 (1-2), 33-36.

Cuevas C., Covarrubias., A. (2011). Las proteínas desordenadas y su función: una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 14, no.2, pp. 97-105.

Del Puerto A., Suárez S., Palacio D.(2014). Effects of pesticides on health and the environment. *Rev Cubana Hig Epidemiol*.vol.52no.3, 372-387

Díaz A., E.; Membrillo J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, vol. 9, núm. 1, pp. 34-44.

Dornelles C., and Reischak A. (2004). Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev Bras Med Esporte*, Vol. 10, Nº 4, 314-318.

Drago, M., López, M., Saíenz, T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Rev Mexicana Ciencias Farmacéuticas*. 37 (4): 58-68.

Escamilla, Ch., Cuevas, E., Guevara, J. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med. UNAM.* 52 (2): 73-5.

FAO, Statistical Pocketbook: World Food and Agriculture, 2015 (Accessed April 9 2017) <http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>.

Garcia J., Aguilera D., Sofia F., Leyva G., Ramirez J., Glenn E. (2016). Removal of organochlorine pesticides (OCs) using constructed wetlands in a northwestern Mexican agricultural valley. *Toxicology Letters*, 73–247.

García M., Aguilar L., Soto M., Nieto R., Kite G. 2012. Total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in the flowers of *Crataegus* spp. From Mexico. *Agrociencia*; 46 (7): 651-662.

García R., Ibarra E., and Nieto R. (2013). Antioxidant compounds in hawthorn fruits (*Crataegus* spp.) of Mexico. *Mexican Journal of Biodiversity*, 84, 1298-1304.

Gil A (ed.): *Tratado de nutrición. Tomo 1. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición.* Acción Médica. Madrid, 2005.

Graziano C., Clerici M., Garavaglia M., Giustarini D., Ranieri R., Milzani A., Dalle, I. (2015). A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 178-190.

Guo YL, Wang BJ, Lee CC, and Wang JD. (1996). Prevalence of dermatoses and skin sensitisation associated with use of pesticides in fruit farmers of southern Taiwan, *Occupational and Environmental Medicine* 53, 427–431.

Guoying W., Shiming J., Xiuli N., Haoqi T., Yanrong L., Xuefu C., Lan L., Yuanhang Z., Gaofeng S. (2017). Total free radical species and oxidation equivalent in polluted air. *Science of the Total Environment*, 609, 103–1113.

Gutiérrez-Salinas¹ J, García-Ortiz L, Mondragón-Terán P, Hernández-Rodríguez S, Ramírez-García S y Núñez-Ramos N. 2016. Determinación de proteínas carboniladas y enzima carbonil reductasa en mujeres mexicanas con cáncer de mama: estudio piloto. *Gaceta Médica de México*. 152:13-8.

Hernández A., y Hansen A. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Rev. int. contam. ambie.*, 2, 115-127.

Hlaváčková A., Stikarová J., Pimková K., Chrastinová L., Májeka P., Kotlína R., Cermák J., Suttara J., Evangelista J. D. (2017). Enhanced plasma protein carbonylation in patients with myelodysplastic syndromes. *Free Radical Biology and Medicine*, 108, 1-7.

Higareda, R. Salazar-Montoya y E. G. Ramos-Ramírez (1995). "Conservación poscosecha del tejocote (*Crataegus mexicana*)", *Revista Chapingo. Serie Horticultura*.

Uzcátegui, J. Márquez, A, Erazo, M. Sulbarán, A. Peña, J. Zambrano, R. Arias, R. Luna, J. Echeverría, F. 2017. Implementación de un método para la determinación del herbicida paraquat (gramoxone) en saliva humana a través de una escala colorimétrica. *Acta-Bioclin*; 7(14):169-185

Kadiiska MB, Mason: In vivo copper mediated free radical production and ESR spintrapping study. (2002). *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 58 (6): 1227–39.

Kähkönen E. (1999). Risk surveys in occupational health and safety, *African Newsletter on Occupational Safety and Health* 1, 101–103.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. 1990. Determinación del contenido de carbonilo en proteínas modificadas oxidativamente. *Métodos Enzimáticos*. 186: 464-78.

Liu, P., Kallio, H., Lu, D., Zhou, C., Ou, S., & Yang, B. Acids, sugars, and sugar alcohols in Chinese hawthorn (*Crataegus* spp.). 2009 fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2), 1012-1019.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

Maldonado O., Jiménez E., Bernabé M., Ceballos G., Méndez E. (2010). Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev. Med. UV*, 32-38.

Malpica Rivero J A, Pila Pérez R, Pila Peláez R, Guerra Rodríguez C, Mejías Rodríguez I. 2001. Intoxication for gramoxone. Our experience *Mapfre Medicina*. 12: 122-126

Marín Cuartas M, Berrouet Mejía M. 2016. Intoxicación por paraquat. *Ces medicina Vol. 30*, 1:1-7

Martínez Augustin O. y Martínez de Victoria Muñoz E. 2006. Proteins and peptides in enteral nutrition. *Nutr. Hosp.* 21,1-14.

Meade SJ., Reid EA., Gerrard JA. 2005. The Impact of Processing on the Nutritional Quality of Food Proteins. *J. AOAC* 88:904-922.

Méndez D., Banderas J., Nieto A., Rojas A., García M. 2013. Antioxidant capacity of extracts from hawthorn (*Crataegus mexicana*) skin. *Afr. J. Food Sci.* 7, 150-158.

Méndez D. (2010). Proteómica redox de membrana de eritrocito humano en malaria y polimorfismos de grupos sanguíneos y g6pd (tesis doctoral).

Mesquita C., Oliveira R., Bento F., Geraldo D., Rodríguez J., Marcos J. (2014). Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry*, 69-71.

Mostafalou S., Abdollah M. (2017). Pesticides: an update of human exposure and toxicity, *Arch. Toxicol.* 91, 549–599.

Nayara Cristina Perez de Albuquerque, Daniel Blascke Carrão, Maísa Daniela Habenschus, Anderson Rodrigo Moraes de Oliveira. (2017). Metabolism studies of chiral pesticides. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 89-109.

Nieto R., Aguirre E., y García M. (2010). *Frutales*, 133-137.

Madeley J. (2002). Paraquat – Syngenta’s controversial herbicide, A report written for Berne Declaration, Swedish Society for Nature Conservation, Pesticide Action Network UK, Pesticide Action Network Asia Pacific, Foro Emaús.

Mataix J. Sánchez F. Proteínas. Cap. 5. Nutrientes. 96-111. URL disponible en: http://www.uco.es/master_nutricion/nb/Mataix/proteinas.pdf. Accedido en fecha 11 de junio de 2018.

Özcan, M.; H. Hacseferoğullari; T. Marakoğlu y D. Arslan. “Hawthorn (*Crataegus* spp.) 2005. Fruit: Some Physical and Chemical Properties”, *Journal of Food Engineerin.* 69

Pérez M., Navarro H., y Miranda E. (2013). Residuos de plaguicidas en hortalizas: problemática y riesgo en México. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 45-64.

Plenge F., Sierra J., y Castillo Y. (2007). Riesgos a la salud humana causados por plaguicidas. *Tecnociencia*, Vol. I, No. 3, 4-6.

Porras J., Cote F., Ávila J. (2014). Concentration of salivary total protein during exercise Summary. *Arch Med (Manizales)*. Vol. 14 No. 2, 1-7.

Reyes, A., Galicia, M., Carrillo, M. 2011. Antioxidantes: la magia de lo natural. *Revista Tlatemoani*. (8): 1-16.

Richard I., y Davis J. (2009). Oxygen Toxicity and Reactive Oxygen Species: The Devil Is in the Details. *The Role of Oxygen in Health and Disease - A Series of Reviews*, Vol. 66, No. 2, 121-127.

Rivero González A, Navarro González JF, Macía Heras ML, Mora Fernández C, Rodríguez Serrano ML, García Pérez J. 2001. Intoxicación por paraquat: presentación de dos casos y revision de la literatura. *Anales de Medicina Interna (Madrid)*. 18: 208-210.

Sarangarajan R., Meera S., Rukkumani S., Sankar P., Anuradha G. (2017). Antioxidants: Friend or foe? Contents lists available at Science Direct *Asian Pacific Revista de medicina tropical*, 1-6.

SAGARPA Puebla. (18 de diciembre de 2017). Puebla alcanza primer lugar nacional en producción de tejocote. *SAGARPA*, 1-4.

Sengupta A., Manna K., Datta S., Das U., Biswas, S., Chakrabarti N., and Dey S. (2017). Herbicide exposure induces apoptosis, inflammation, immune modulation and suppression of cell survival mechanism in murine model. *The Royal Society of Chemistry*, 7, 13957-13958.

Sindhi S., Gupta V., Sharma K., Bhatnagar S., Kumari R., Dhaka N. (2013). Potential applications of antioxidants, *Pharmacy research*, 7(9), 828-835.

Tassell, M. C., Kingston, R., Gilroy, D., Lehane, M., & Furey, A. Hawthorn (*Crataegus* spp.). 2010. in the treatment of cardiovascular disease. *Pharmacognosy reviews*, 4(7). 32.

Thomas JA. (1994). Oxidative stress, oxidant defense and dietary constituents. *Modern nutrition in health and disease*. 8 ed. Willians and Wilkins; Philadelphia, 501-12.

Towbin, H. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(9):4350-4.

United Nations Environment Programme (UNEP). (2004). Making agriculture more sustainable: trends and challenges, *UNEP Industry and Environment* 27(4), Paris.

Velázquez M., Prieto B., y Contreras R. (2004). El envejecimiento y los radicales libres. *CIENCIAS*, 1, 36-43.

Viada Pupo E, Gómez Robles L, Campaña Marrero I. 2017. Oxidative Stress. *CCM*, 1, 171-186.

Wesseling C, van Wendel de Joode B, Ruepert C, Leon C, Monge P, Hermosillo H, and Partanen TJ, (2001). Paraquat in developing countries, *International Journal of Occupational and Environmental Health* 7(4), 275–86.

World Health Organization (WHO), *Equipment for vector control*, 3 edición, Geneva 1990

Yuichiro J. Suzuki, Marina Carini y D. Alan Butterfield. (2010). Carbonilación de proteínas. *Señal antioxidante redox* 12 (3): 323–325.

Zamora J. (2007). Antioxidants: micronutrients fighting for health. *Rev. Chil. Nutr.*, 34 n.1, 1-7.