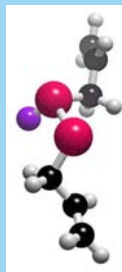
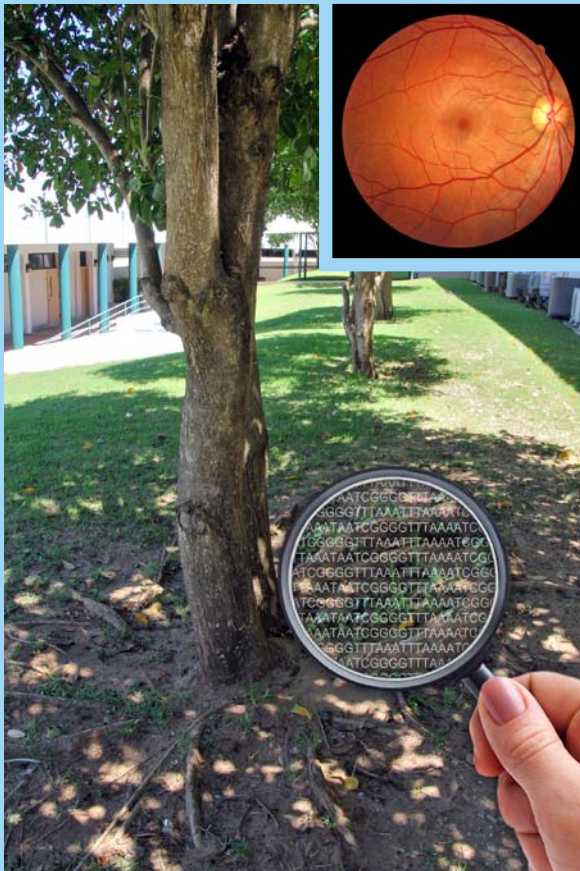


INTER SCIENTIFIC

INQUIRY • NATURE • TECHNOLOGY • EVOLUTION • RESEARCH





DEPARTAMENTO DE
**CIENCIAS Y
TECNOLOGÍA**



BACHILLERATOS:
BIOLOGÍA · BIOTECNOLOGÍA
COMPUTADORAS · QUÍMICA

ASOCIADO:
COMPUTADORAS

COMITÉ EDITORIAL

EDITORIAL COMMITTEE

Lizbeth Romero Pérez, Ph.D.

Coordinadora/Coordinator

Directora Departamento de Ciencias y Tecnología
Director of Science and Technology Department

Annette Vega Rodríguez, Ed.D.

Decana de Asuntos Académicos
Dean of Academic Affairs

Alberto Puente Rolón, Ph.D.

Catedrático Auxiliar de Biología

Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez
Assistant Professor, Biology

José Rodríguez Santiago, MS

Catedrático Auxiliar de Biología
Assistant Professor, Biology

Arlyn Pérez Zamot, MS

Catedrática Auxiliar de Biotecnología
Assistant Professor, Biotechnology

Colaboradores:

Collaborators

Arnaldo Bravo Núñez, Ph.D.

Catedrático Asociado de Química
Associate Professor, Chemistry

Ricardo Infante Castillo, Ph.D.

Catedrático de Química
Universidad de Puerto Rico, Recinto de Arecibo
Professor, Chemistry

Roberto Robles Miranda

Artista Gráfico/Graphic Artist

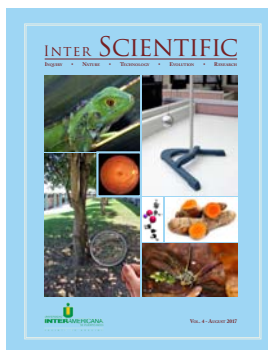
Rafael Colón González

Fotógrafo/Photographer

La revista académica Inter Scientific es una publicación anual de la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo, institución de educación superior fundada en 1912 y 1957 respectivamente. Se concede autorización para reproducir gratuitamente contenido de la revista sólo para fines académicos no comerciales y se requiere que se especifique que dicha reproducción se realiza con el consentimiento del Comité Editor. El contenido y estilo de los artículos publicados son responsabilidad de los autores.

The academic journal Inter Scientific is an annual publication of the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus, institution of higher education founded in 1912 and 1957 respectively. Permission is granted to freely reproduce the content of the journal only for noncommercial academic purposes and must specify that such reproduction has the consent of the Editorial Board. The content and style of the published articles are those of the authors.

PORTADA/ COVER



Nuestra portada combina imágenes de los temas abordados en los artículos de este ejemplar.

Diseño:

Roberto Robles Miranda

Fotos de péndulo y árboles:

Rafael Colón González

Foto de opilión:

Dr. Alberto Puente-Rolón

Otras fotos tomadas de recursos electrónicos e Internet

Illustration of the diversity of topics covered in this issue.

Design:

Roberto Robles Miranda

Pictures of pendulum and trees:

Rafael Colón González

Picture of the harvestmen:

Dr. Alberto Puente-Rolón

Other photos from electronic resources and Internet

CONTENIDO CONTENTS

MENSAJE DEL RECTOR/ MESSAGE FROM THE CHANCELLOR	1
MENSAJE DE LA DECANA DE ASUNTOS ACADÉMICOS/ MESSAGE FROM THE DEAN OF ACADEMIC AFFAIRS	1
DESDE EL ESCRITORIO DE LA EDITORA/ FROM THE EDITOR'S DESK	2
INVESTIGACIÓN/ RESEARCH ARTICLES	3-50
<ul style="list-style-type: none"> <li style="margin-bottom: 10px;"> • Determinación de naftoquinonas y antraquinonas en las glándulas olfativas de Opiliones (<i>Heterolacurbs perezassoi</i> y <i>Neocynortoides obscura</i>) por Cromatografía de Gas.....3 <p style="margin-left: 20px;">Determination of naphthoquinones and anthraquinones in the scent glands of Opiliones (<i>Heterolacurbs perezassoi</i> and <i>Neocynortoides obscura</i>) by Gas Chromatography</p> <p style="margin-left: 20px;">Bravo, Arnaldo, Morales, Tatiana y Puente, Alberto</p> <li style="margin-bottom: 10px;"> • Uso de Excel para análisis de regresión y correlación en experimentos a nivel sub-graduado10 <p style="margin-left: 20px;">Use of Excel for regression and correlation analysis in undergraduate experiments</p> <p style="margin-left: 20px;">Vásquez Moll, Víctor D.</p> <li style="margin-bottom: 10px;"> • Characterization of the anti-proliferative properties and apoptotic profile of curcuminoids on the multiple myeloma cell line RPMI-822620 <p style="margin-left: 20px;">Carecterización de las propiedades anti-proliferativas y el perfil apoptótico de curcuminoides en la línea celular de mieloma múltiple RPMI-8226</p> <p style="margin-left: 20px;">Fuentes-Cabrera, Delinés, Gelpí Acevedo, Lee, Ongay Montero, Kevin, Torres Díaz, Carola and Woolcock Rodríguez, Karen</p> <li style="margin-bottom: 10px;"> • Detection, isolation, and identification of <i>Salmonella spp.</i> in commercial chicken (<i>Gallus gallus domesticus</i>) and green iguana's (<i>Iguana iguana</i>) meat31 <p style="margin-left: 20px;">Detección, aislamiento e identificación de <i>Salmonella spp.</i> en pollo comercial (<i>Gallus gallus domesticus</i>) y en carne de iguana verde (<i>Iguana iguana</i>)</p> <p style="margin-left: 20px;">Ramos, Ashley M., Serrano Víctor J., Viruet, Isamarie, González López, Vanessa and Puente Rolón, Alberto</p> <li style="margin-bottom: 10px;"> • Extracción y cuantificación de alicina en ajo (<i>Allium sativum</i>) y otros productos comerciales utilizando Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).....36 <p style="margin-left: 20px;"></p> 	

Extraction and quantification of allicin in garlic (*Allium sativum*) and other commercial products using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Soto Balseiro, Romina, López González, Vanessa, Herrera, Armando y Ortiz Maldonado, José

• **Soil Metagenomic library construction by pCC1FOS cloning vector**.....41

Construcción de una librería genómica de suelo utilizando el vector de clonación pCC1FOS

Huertas-Meléndez, Stephanie, Méndez-Soto, Krystel, Amador-Vázquez, Natalie, Rivera-Vélez, Kimberly, Rivera-Maldonado, José, Pérez-Samot, Arlyn. and Pagán-Jiménez, María

• **Effect of UVC on the proteasome activity of human retina cells, ARPE-19, and protection provided by natural antioxidant, resveratrol**.....48

Efecto de radiación UVC en la actividad del proteosoma de células de retina humana, ARPE-19, y protección provista por el antioxidante natural resveratrol

Domena, José, Camacho, Christian, Román, Samaris and Romero-Pérez, Lizbeth

LA INVESTIGACIÓN EN EL CAMPUS/ RESEARCH ON CAMPUS51

Resumen de otras investigaciones realizadas por nuestros estudiantes en el Recinto durante el año académico 2016-2017 en los campos de bioquímica, genética y ecología.

Summary of other research conducted on campus by our students during the academic year of 2016-2017 in the fields of biochemistry, genetics and ecology.

BIOQUÍMICA/ BIOCHEMISTRY

1-A Determination of the antiproliferative activity profile of 2-methylbenzimidazole derivatives in Multiple Myeloma cell line RPMI-8226

1-B Potential anti-cancer effect of 2-methylbenzimidazole and *Annona muricata* extract evaluated in PANC-1 cell line

GENÉTICA/ GENETICS

2-A Extraction and detection of *28S*, *EF* and *ND1* genes of *Neocynortoides spp.*, *Neocynortoides dorsalis* and *Yunqueus portoricanus*: a molecular approach to classify harvestmen in Puerto Rico

ECOLOGÍA/ ECOLOGY

3-A Detection of heavy metals in muscle and liver of fish collected at Caño Tiburones using atomic absorption and RAPD-PCR analysis to detect genotoxicity

POLÍTICAS EDITORIALES/ EDITORIAL POLICIES.....53

**MENSAJE DEL RECTOR
DR. RAFAEL RAMÍREZ RIVERA**



Esta cuarta publicación de Inter Scientific continúa reafirmando la investigación científica como base fundamental de la universidad. La variedad de temas presentados que incluyen trabajos en el campo de la química, física, genética, farmacología, bioquímica, ecología y microbiología demuestra el compromiso de nuestra facultad y estudiantes. Es por eso que ofrecemos apoyo constante a esta gestión la cual permite la divulgación de nuevos conocimientos.

**MESSAGE FROM THE CHANCELLOR
DR. RAFAEL RAMÍREZ RIVERA**

This fourth publication of Inter Scientific continues reaffirming scientific research as a fundamental base of the university. The variety of topics presented includes works in the fields of chemistry, physics, genetics, pharmacology, biochemistry, ecology and microbiology showing the commitment of our faculty and students. For that reason our support to this gesture is constant as it is a media for the communication of new knowledge.

**MENSAJE DE LA
DECANA DE ASUNTOS ACADÉMICOS
DRA. ANNETTE VEGA**



La continuidad de Inter Scientific como una revista de investigación es un proyecto que apoya la meta de nuestro Recinto de promover la investigación entre nuestra facultad y estudiantes. Deseamos agradecer el esfuerzo de todos/as los/as colaboradores, facultad, estudiantes y personal administrativo que trabaja en la preparación de este medio de comunicación para dar a conocer los trabajos que realizamos.

**MESSAGE FROM THE DEAN OF ACADEMIC AFFAIRS
DR. ANNETTE VEGA**

The continuity of Inter Scientific as a research journal is a project that supports the goal of our Campus in promoting research among our faculty and students. We want to thank all the collaborators, faculty, students and administrative personnel that work in the preparation of this media of communication as a way of making known the research we do.

**DESDE EL ESCRITORIO DE LA EDITORA
DRA. LIZBETH ROMERO-PÉREZ**



Investigación es la herramienta más vital para la generación de nuevos conocimientos, pero además se convierte en eje fundamental del aprendizaje. Este cuarto volumen de Inter Scientific refleja como la investigación en nuestro Recinto se va robusteciendo y diversificando, promoviendo así proyectos multidisciplinarios.

En la sección de Artículos de Investigación encontrará trabajos que van desde química y física hasta el nuevo campo de la metagenómica. El primer artículo investiga compuestos presentes en las glándulas olfativas de opiliones que pudieran servir como mecanismos de defensa y/o comunicación entre estos organismos. Luego, se presenta el programa Excel como una herramienta para analizar por regresión y correlación resultados de experimentos en el campo de la química y la física. La evaluación de alternativas naturales como tratamientos o co-tratamientos contra el cáncer es presentada en el artículo *Caracterización de las propiedades anti proliferativas y el perfil apoptótico de curcuminoides en la línea celular de mieloma múltiple RPMI-8226*. En el área de la microbiología se presentan dos artículos de investigación. En uno se explora la presencia de bacterias del género *Salmonella* en carne de pollo y carne de iguana verde, y en el otro se evalúa la concentración del compuesto alicina en ajo, al cual se le atribuyen propiedades antimicrobianas. El artículo *Construcción de una librería metagenómica de suelo utilizando el vector pCC1FOS*, presenta métodos para la creación de una librería que lleve al establecimiento del perfil de los organismos que se encuentran en el suelo. El último artículo de esta sección es una comunicación corta que presenta como la luz ultravioleta tipo C puede afectar las células de retina humana.

**FROM THE EDITOR'S DESK
DR. LIZBETH ROMERO-PÉREZ**

Research is the most vital tool for the generation of knowledge, but also it is a fundamental axis of learning. This fourth volume of Inter Scientific shows how the research in our campus is becoming stronger and diverse, promoting multidisciplinary projects.

In the Research Articles section you will find research ranging from chemistry and physics to the new field of metagenomics. The first article investigates compounds present in the olfactory glands of harvestmen that could serve as defense and/or communication mechanisms among these organisms. Then, the program Excel is presented as a tool for regression and correlation analysis of experimental results in the field of chemistry and physics. The evaluation of natural alternatives for treatment or co-treatment against cancer is presented in the article *Characterization of the anti-proliferative properties and apoptotic profile of curcuminoids on the multiple myeloma cell line RPMI-8226*. In the field of microbiology, two articles are presented. One explores the presence of *Salmonella spp* in chicken and in green iguana's meat; the other evaluates the concentration of allicin, a compound present in garlic, to which has been attributed antimicrobial capacity. The article *Soil Metagenomic library construction by pCC1FOS cloning vector*, shows methods for the creation of a library that can lead to the establishment of the profile of organisms present in soil. The last article is a short communication that deals with how ultraviolet radiation type C can affect the cells of human retina.

Determinación de naftoquinonas y antraquinonas en las glándulas olfativas de Opiliones (*Heterolacurbs perezassoi* y *Neocynortoides obscura*) por Cromatografía de Gas

Determination of naphthoquinones and anthraquinones in the scent glands of Opiliones (*Heterolacurbs perezassoi* and *Neocynortoides obscura*) by Gas Chromatography

Bravo, A., Morales, T., y Puente Rolón, A.

Departamento de Ciencias y Tecnología, Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo

ABSTRACT

Opiliones, commonly known as harvestmen, are considered one of the most primitive forms of arachnids that are possibly related to scorpions, pseudoscorpions and solifugae. It is known that olfactory secretions serve as defense mechanisms, have antimicrobial activity and act as pheromones. Methoxyquinones and naphthoquinones have been identified as secretions from the olfactory glands of Opiliones. Previous studies have reported the presence of naphthoquinones for *Phalangiidae* and *Cyphophthalmi*, but none have been quantified. The objective of this research is to explore if two endemic species of Opiliones from Puerto Rico, *Heterolacurbs perezassoi* and *Neocynortoides obscura*, have olfactory glands secretions and to quantify them using Gas Chromatography (GC). Samples were collected at Tallonal Reserve in Arecibo. A protocol was design to prepare extracts of the samples using hexane and ethyl acetate. Four components from the olfactory glands of *Heterolacurbs perezassoi* were isolated and identified. 1,4-naphthoquinone and 1,4-dihydroxynaphthalene were detected at 0.38-0.59% and 7.62% respectively, from the total mass of the sample. 2-methoxy-1,4-naphthoquinone and 2-methylanthraquinone were detected at 0.53% and 0.17% respectively. No compounds were detected for *Neocynortoides obscura*. Further studies will be focused on the development of a protocol for the identification and quantification of compounds using HPLC and the evaluation of other species of Opiliones.

RESUMEN

Los Opiliones comúnmente conocidos como murgaños o segadores son considerados como una de las formas más primitivas de arácnidos que están posiblemente relacionados a los escorpiones, pseudoescorpiones y solífugos. Se conoce que las secreciones de las glándulas olfativas las utilizan como mecanismo de defensa, protección antimicrobial o comunicación feromonal, entre ellas algunas metoxiquinonas y naftoquinonas. Estudios previos han informado la presencia de naftoquinonas en *Phalangiidae* y *Cyphophthalmi* pero no han sido cuantificadas. El objetivo de esta investigación es conocer si dos especies endémicas de Puerto Rico: *Heterolacurbs perezassoi* y *Neocynortoides obscura* contienen secreciones de las glándulas olfativas y cuantificar las mismas por Cromatografía de Gases (GC). Las muestras fueron obtenidas en la Reserva Tallonal en Arecibo. Se desarrolló un protocolo para preparar extractos de las muestras usando hexano y acetato de etilo como solvente. Se aislaron e identificaron cuatro componentes de las glándulas olfativas de *Heterolacurbs perezassoi*: 1,4-naftoquinona y 1,4-dihidroxinaftaleno con 0.38-0.59% y 7.62% respectivamente del total de la masa de cada muestra y 2-metoxi-1,4-naftoquinona y 2-metilntraquinona con 0.53% y 0.17%, respectivamente. Ninguno de estos componentes se detectó para la especie *Neocynortoides obscura*. Futuras investigaciones se enfocarán en el desarrollo de protocolos para la identificación y cuantificación de compuestos usando HPLC y en la evaluación de otras especies de Opiliones.

KEYWORDS Opiliones, gland secretions, naphthoquinones, Gas Chromatography (GC), quantification

PALABRAS CLAVE Opiliones, secreciones glandulares, naftoquinonas, Cromatografía de Gas (GC), cuantificación

INTRODUCCIÓN

Uno de los órdenes de arácnidos más antiguos son los Opiliones comúnmente conocidos como segadores (Watcher et al., 2015) y son considerados como una de las formas más primitivas de

arácnidos que están posiblemente relacionados a los escorpiones, pseudoescorpiones, y solífugos. La mayoría de estos viven en zonas húmedas y sombreadas, son de color oscuro y activos

principalmente durante la noche (Pinto da Rocha, Machado y Giribet, 2007). También, se pueden encontrar en hábitats perturbados, como también en bosques, bajo piedras, en cuevas, en los troncos de los árboles, en el suelo, en la basura forestal, en grietas en el suelo, y a veces bastante profundos en el suelo (Giribet et al., 1999). En términos de morfología general, los opiliones son típicos arácnidos. Tienen dos regiones básicas del cuerpo, un prosoma, que carga todos los apéndices, y un opistosoma sin extremidades, que contiene los estigmas (apertura para respirar) y la apertura genital, comúnmente cubierta por un opérculo (estructura rígida parecida a una tapa o pequeña puerta que controla el contacto entre el mundo afuera y la parte interior del animal). La unión entre las dos regiones del cuerpo no está contraída, dando la apariencia de una araña “sin cintura”. Una característica única de los Opiliones es la apertura de “glándulas olfativas”. Estas especies no son peligrosas porque no contienen glándulas venenosas como algunas arañas. Otra característica es que los Opiliones no tienen glándulas de seda; por lo tanto, no construyen telarañas (Lucio y Chame, 2005).

El comportamiento de defensa mejor estudiado de los Opiliones es el uso de secreciones químicas. Estos secretan compuestos de un par de glándulas exocrinas, las cuales pueden llamarse “glándulas olfativas”. En los Opiliones la apertura de las glándulas (ozoporo) está localizada en los ángulos latero frontal del prosoma y el exudado puede estar compuesto de varias secreciones volátiles. Este mecanismo de defensa se puede dividir en dos tipos básicos. En el primer tipo, la secreción liberada forma un escudo químico alrededor del cuerpo del opilión, sea en forma de vapor o líquida. La última puede ser liberada y luego transportada a otras partes del cuerpo, agrandando el escudo químico. En el segundo tipo la secreción es activamente transferida al agente ofensivo.

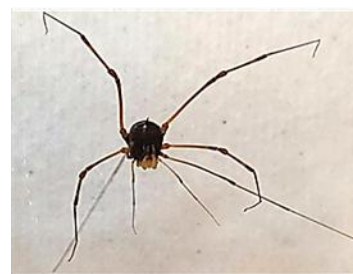
La naturaleza química de las secreciones varía cuando grupos grandes son comparados y parece ser útil en reconocimiento taxonómico. Conjuntos específicos de benzoquinonas y fenoles ocurren en goniléptidos del suborden Laniatores (Grassatores) (Hara, Cavalheiro, Gnaspini y Santos, 2005) mientras que terpenos, ésteres, y compuestos con nitrógeno se han encontrado en Laniatores travunióides (Insidiatores) (Ekpa, Wheeler, Cokendolpher y Duffield, 1984). En los Palpatores, el conocimiento químico en las “glándulas olfativas” es parcial: en Eupnoi, componentes acíclicos como etil cetonas y sus alcoholes correspondientes son comunes (Ekpa, Wheeler, Cokendolpher y Duffield, 1985), mientras que naftoquinonas fueron reportadas de Phalangiidae (Wiemer, Hicks, Meinwald y Eisner, 1978). Ambos, cetonas acíclicas y naftoquinonas fueron también detectadas en Cyphophthalmi (Raspotnig, Fauler, Leis y Leis, 2005) y naftoquinonas y antraquinonas en esencias glandulares de *Paranemastoma quadripunctatum* (Raspotnig, Leutgeb, Schaidler y Komposch, 2010), del suborden Dyspnoi. En este caso los compuestos se detectaron usando Cromatografía de Gas pero no fueron cuantificados.

En esta investigación se estudiaron dos especies endémicas de Puerto Rico: *Heterolacurbs perezassoi* y *Neocynortoides obscura*. Para estas dos especies no hay disponible mucha información. No se conoce con certeza su alimentación, sus depredadores, ni su composición química, entre otras. La especie *Heterolacurbs perezassoi* apenas fue descrita en Puerto Rico en el año 2012 por dos cubanos llamados Aylin Alegre Barroso y Luis F. de Armas (Barroso y Armas, 2012). Algunas de estas investigaciones han sido para establecer la filogenia entre especies de Opiliones y para conocer el hábitat de estas.

Los motivos de esta investigación son detectar si los compuestos: 2-metilntraquinona, 2-metoxi-1,4-naftoquinona; 1,4 dihidroxinaftaleno y 1,4-naftoquinona están presentes en las secreciones de las glándulas olfativas de estas dos especies y cuantificar las mismas usando Cromatografía de Gas (GC). Se pretende determinar la composición porcentual de estos compuestos en relación al peso de la muestra usada. Con este propósito, se desarrolló un protocolo para la extracción de las secreciones utilizando dos solventes (hexano y acetato de etilo) y el manejo de las muestras para evitar degradación. Con los datos obtenidos puede profundizarse en una adecuada clasificación de estas especies y hasta encontrar una asociación entre su hábitat y estos químicos y a su vez establecer una comparación entre especies de otros órdenes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los especímenes de *Heterolacurbs perezassoi* (Figura 1) y *Neocynortoides obscura* (Figura 2) fueron recolectados a mano en la Reserva Privada el Tallonal del Barrio Dominguito en el municipio de Arecibo, Puerto Rico (Figura 3). Se encuentra localizada en la región cársica, compuesta de aproximadamente 114 ha (18°24'27" N, 66 ° 43'53" W), y es manejada por la organización sin fines de lucro *Ciudadanos del Karso*.



- Average weight: 11.7mg
- Order: Opiliones
- Family: Biantidae
- Subfamily: Stenostygninae

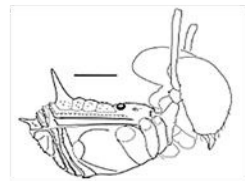


Figura 1. *Heterolacurbs perezassoi*.

Las muestras fueron capturadas en la zona superior e inferior del lado derecho del mapa (Figura 3). En la zona superior se encontró mayor abundancia de *Neocynortoides obscura*, mientras que en la zona inferior se encontró más *Heterolacurbs perezassoi*. Estas dos especies comparten el mismo hábitat, pero hasta el momento no se conoce mucha información sobre su ali-

mentación ni sus depredadores.



- Average weight: 25.65mg
- Order: Opiliones
- Family: Cosmetidae
- Subfamily: Cosmetinae

Figura 2. *Neocynortoides obscura*.

Las muestras fueron capturadas en la zona superior e inferior del lado derecho del mapa (Figura 3). En la zona superior se encontró mayor abundancia de *Neocynortoides obscura*, mientras que en la zona inferior se encontró más *Heterolacurbs perezassoi*. Estas dos especies comparten el mismo hábitat, pero hasta el momento no se conoce mucha información sobre su alimentación ni sus depredadores.

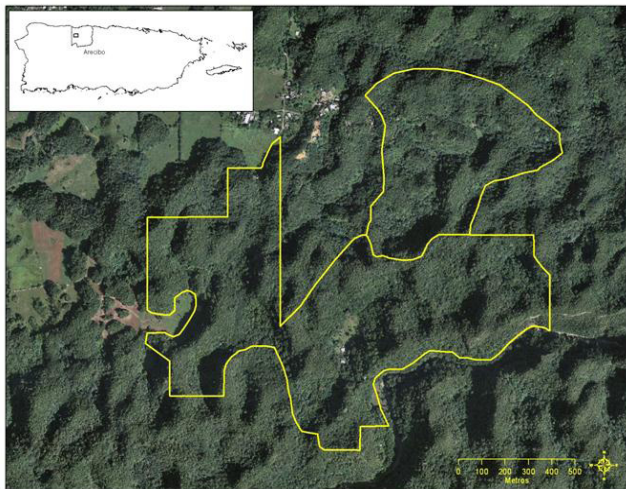


Figura 3. Reserva Privada el Tallonal del Barrio Dominguito en el municipio de Arcibo, Puerto Rico.

Equipos, compuestos y condiciones de operación

Los componentes a detectar y cuantificar con algunas de sus propiedades se muestran en tabla 1. Estos compuestos son tóxicos y han de manejarse en extractores y con respiradores de partículas. Los compuestos C y E son sensibles a la luz y el componente C es también sensible al aire.

Se utilizó un cromatógrafo de gases (GC) Shimadzu Modelo GC-2014 con Columna capilar RTx®-5Ms, 30.0 m de longitud, 0.25mmID de diámetro interno y un espesor de la película (film

thickness) de 0.5 µm con un máximo de temperatura de 350 °C. Se utilizó Helio como fase móvil (carrier gas) a una presión constante de 114.3 kPa para un flujo total de 50.0 mL/min, un flujo de la columna de 1.50 mL/min, velocidad lineal de 34.1 cm/sec. El detector es de ionización de flama (SFID) a 370 °C. Las condiciones de operación para la programación de la temperatura de la columna se muestran en la tabla 2.

Tabla 1. Posibles compuestos en las secreciones glandulares de Opiliones analizados por Cromatografía Gaseosa.

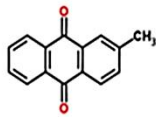
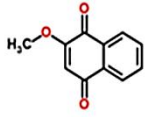
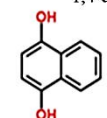
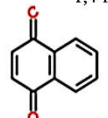
<p>Estructura-A 2-metilntraquinona C₁₅H₁₀O₂ t_r: 170-173°C t_s: 236-238°C</p> 	<p>Estructura-B 2-metoxi-1,4-naftoquinona C₁₁H₈O₃ t_r: 184-187°C</p> 
<p>Estructura : C 1,4-dihidroxinaftaleno C₁₂H₁₀O₂ t_r: 191-192°C</p> 	<p>Estructura: E 1,4-naftoquinona C₁₀H₆O₂ t_r: 119-122°C Sub:100°C</p> 

Tabla 2. Programación de temperatura de la columna del GC.

Velocidad de Calentamiento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo usado (min)
0	50	1.00
10	200	15.00
15	300	6.67

Se usaron dos solventes para extraer las secreciones glandulares: hexano y acetato de etilo ya previamente informados como adecuados (Raspotnig et al., 2010) y en todos los protocolos se inyectaron 2.0 µL como volumen de muestra con alta velocidad de inyección y previos lavados de la jeringa con solvente y muestra. Un equipo ultrasónico (Branson 5800 ultrasonic cleaner) y centrifugadora (Eppendorf Centrifuge 5804 R) se utilizaron para el procesamiento de las muestras y lograr una extracción máxima de cada componente.

Parámetros de identificación y cuantificación

En cromatografía, a iguales condiciones de operación del equipo (solvente, columna, flujos, temperatura, etc.) el tiempo que permanece retenida la sustancia en la columna (tiempo de retención) será idéntico al tiempo de la misma sustancia en una calibración previa, por tanto, dicho tiempo permite identificar compuestos por esta técnica. Para cuantificarlos se utilizó el método de estándar externo de un punto obteniendo el cromatograma de una cantidad conocida de analito o analitos y se registra el área del pico. Luego, se calcula el factor de respuesta

utilizando la ecuación (1):

$$\text{Factor de respuesta} = \frac{\text{Área del pico}}{\text{Cantidad de muestra}} \quad (1)$$

Posteriormente, se inyectan muestras de las soluciones de secreciones glandulares cuyos componentes y cantidades son desconocidos y se registra el tiempo de retención y el área del pico. Luego, se determina la cantidad de cada componente identificado utilizando la ecuación (2):

$$\text{Cantidad del compuesto} = \frac{\text{Área del pico}}{\text{Factor de respuesta}} \quad (2)$$

Protocolo de procesamiento de los estándares

Solvente: Hexano

Se pesó aproximadamente 10 mg de cada componente, se le agregó 4 mL de hexano con el propósito de disolver el sólido antes de ser transferido al matraz volumétrico de 10 mL y se completó a volumen con el solvente. Las soluciones **A**, **B** y **C** fueron sometidas a tratamiento ultrasónico por 15-20 minutos con el propósito de disolver los sólidos. Esto no se necesitó con la solución **D**. Se guardaron en nevera y previo a la inyección en el GC se volvían a someter a ultrasonido por 15-20 minutos.

Solvente: Acetato de Etilo

Se pesó aproximadamente 20 mg de cada sólido, se disolvieron en el solvente y se completó a volumen en matraces volumétricos de 10 mL. Sólo la solución A-2 se sometió a ultrasonido por 5 minutos. En ambos casos alícuotas de 2 µL fueron extraídas de cada solución y del solvente puro para el análisis de cromatografía de gases. Las concentraciones de los estándares se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Soluciones estándares en hexano y acetato de etilo.

Analito	Concentración (mg/mL)	
	Hexano	Ac. de Etilo
A: 2-metilantraquinona	1.07	2.12
B: 2-metoxi-1,4-naftoquinona	1.05	2.12
C: 1,4-dihidroinaftaleno	1.06	2.15
E: 1,4-naftoquinona	1.03	2.12

Se obtuvieron los cromatogramas de los estándares con sus tiempos de retención y áreas de los componentes utilizados. Para hexano (H) los tiempos de retención (t_r) en minutos son (A:20.339; B:19.860; C:---; E:16.250) y para acetato de etilo (AE) (A:18.129; B:18.092; C:20.386; E: 16.259).

Debido a que algunos componentes no se detectaban con cierto

solvente o los tiempos de retención resultaban muy cercanos en uno de los solventes, pero distinguible en el otro, se procedió a seleccionar los solventes y tiempos de retención que no presentaran problemas al momento de identificar y cuantificar estos compuestos en las muestras. Se calculó además los factores de respuesta para cada componente que permitió cuantificarlos en cada muestra. Esto se presenta en la Tabla 4.

Preparación de las muestras- protocolo

Se pesó cada especie viva, se colocó en un mortero de cristal y se le añadió 150 µL del solvente, se trituro al máximo cuidando agregar más solvente en la medida que se evaporaba. La solución fue transferida a un "vial" y se completó a volumen de 150 µL previamente marcado dejándolo reposar por 30 min. Luego se sometió a tratamiento ultrasónico por 10 min. Se calentaron las muestras hasta ebullición y a un nuevo tratamiento ultrasónico por 5 min. Las muestras fueron colocadas en una centrifugadora a 8800 rpm/rcf por 5 min y con una pipeta de Pasteur se separó la solución líquida de los restos de la especie y se completó a 150 µL con el solvente en un "vial" de GC tapado y a resguardo de la luz y aire. Se guardaron en nevera y alícuotas de 2 µL fueron extraídas de cada solución para el análisis de cromatografía de gases.

Tabla 4. Datos seleccionados de los estándares (2 µL).

#	T_R (min)	Área del pico (µV*s)	Solvente	Cantidad inyectada (µmol)	Factor de Respuesta (µV*s/µmol)
A	20.339	855774	H	0.00963	88.87 x 10 ⁶
B	19.860	12190	H	0.01116	1.092 x 10 ⁶
C	20.386	219441	AE	0.02685	8.174 x 10 ⁶
E	16.250	571412	H	0.01303	43.87 x 10 ⁶

RESULTADOS

Sólo se muestra un ejemplo de cromatograma (Figura 4) para la muestra 1 en hexano como solvente la especie *Heterolacurbs perezassoi*. Cromatogramas para otras muestras siguen patrones similares.

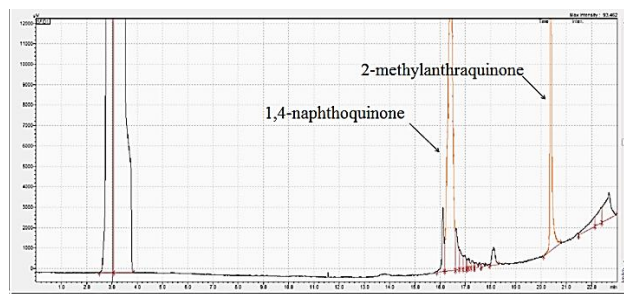


Figura 4. Cromatograma de muestra 1 (*Heterolacurbs perezassoi*) en hexano.

En la Tabla 5 se presentan los datos cromatográficos obtenidos para las cuatro muestras de la especie *Heterolacurbs perezassoi* analizadas en este trabajo con los solventes ya seleccionados.

Tabla 5. Datos para identificación de componentes en la especie *Heterolacurbs perezassoi*.

#	Masa (mg)	Solvente	TR (min)	Componente
1	14.7	Hexano	16.412	(E): 1,4-naftoquinona
		Hexano	20.380	(A): 2-metilantraquinona
2	10.3	Ac. de Et.	20.368	(C): 1,4-dihidroxi-naftaleno
3	11.8	Hexano	16.283	(E): 1,4-naftoquinona
4	10.0	Hexano	19.849	(B): 2-metoxi-1,4-naftoquinona

Una vez identificados estos componentes se cuantificaron los mismos usando los factores de respuesta ya informados en Tabla 4. Estos resultados se muestran a continuación en Tabla 6.

Tabla 6. Áreas, cantidades y masas de los compuestos en las muestras de la especie *Heterolacurbs perezassoi*.

#	Masa Muestra (mg)	Comp	Área del pico (µV*s)	Cant. inyectada (µmol)	Masa en especie (µg)
1	14.7	E	206927	0.00472	55.95
		A	133994	0.00151	25.13
2	10.3	C	533728	0.06530	784.4
3	11.8	E	256333	0.00584	69.30
4	10.0	B	4106	0.00376	53.07

Para este protocolo el cálculo de la cantidad de cada especie (en µg) se realiza por medio de la ecuación (3) considerando el volumen de inyección al cromatógrafo (2 µL) y el volumen de solución utilizado para disolver la muestra (150 µL).

$$\text{Masa } (\mu\text{g}) = \frac{\text{Área del pico}}{\text{Factor de respuesta}} \times \frac{150 \mu\text{L}}{2 \mu\text{L}} \times (\text{Masa Molar}) \quad (3)$$

Finalmente se determinó una proporción porcentual entre la cantidad del componente y la masa total de la muestra del opilión, Estos valores se presentan en Tabla 7.

Para la especie *Neocynortoides obscura* se utilizaron seis (6) muestras y se aplicó el mismo protocolo de tratamiento de las muestras, pero los cromatogramas no presentan ninguno de los componentes analizados por esta técnica.

DISCUSIÓN

En el proceso de establecer el protocolo para determinar los tiempos de retención y los factores de respuesta para cada

compuesto analizado, se puede observar que varían dependiendo del solvente usado y que en algunos casos no son detectados (especie C: 1,4-dihidroxi-naftaleno) en hexano a pesar de ser el mejor solvente para los otros compuestos. Este mismo componente si pudo detectarse en acetato de etilo lo que sugiere que ha de considerarse la extracción en al menos dos solventes distintos para lograr la total detección de los compuestos (Raspotnig et al., 2010).

El proceso de programación de temperatura (Tabla 2) y otros parámetros experimentales del manejo del GC también deben ser mantenidos para reproducibilidad de los datos. En Tabla 4 se presentan los factores de respuesta a cada componente utilizado y puede observarse que, al inyectarse cantidades similares de estos compuestos, el área del pico varía fuertemente en casi 100 veces. Esto es de suma importancia pues este factor indica cuán sensible es el detector a la cantidad de componente analizado. Así, un área mayor de un pico específico no necesariamente indica una mayor cantidad de ese componente en una muestra.

Tabla 7. Composición porcentual de cada componente en la especie *Heterolacurbs perezassoi*.

	Componente	Masa Comp. (mg)	Masa muestra (mg)	%
A	2-metilantraquinona	0.02513	14.7	0.17
B	2-metoxi-1,4-naftoquinona	0.05307	10.0	0.53
C	1,4-dihidroxi-naftaleno	0.7844	10.3	7.62
E	1,4-naftoquinona	0.05595	14.7	0.38
E	1,4-naftoquinona	0.06930	11.8	0.59

Algunas precauciones han de tenerse en cuenta al momento de la preparación de estándares y muestras: los componentes son tóxicos y pueden ser afectados por la luz o aire, alta volatilidad de los solventes (usar envases o “vials” bien cerrados) y la trituración de las muestras.

En los datos obtenidos para la especie *Heterolacurbs perezassoi* se detectó la presencia de todos los componentes investigados. Sin embargo, solamente en la muestra 1 se observó la presencia de dos componentes mientras que en las demás solo se observó uno en cada muestra y por ello se escogió la combinación de solventes. El componente de mayor concentración en la especie resultó ser el 1,4-dihidroxi-naftaleno con un 7.62% de la masa total de la especie y le siguen los compuestos naftoquinonas (1,4-naftoquinona con 0.38% - 0.59% y 2-metoxi-1,4-naftoquinona con un 0.53%) y finalmente la antraquinona (2-metilantraquinona) con un 0.17%. Naftoquinonas y antraquinonas en esencias glandulares de la especie, *Paranemastoma quadripunctatum* (Raspotnig et al., 2010) fueron detectadas usando cromatógrafo de gas-espectrómetro de masas (GC-MS) pero, aunque el compuesto 1,4-naftoquinona genera una señal de mayor área no necesariamente se traduce en

mayor cantidad del componente pues no fueron cuantificados ni los factores de respuesta ni las cantidades de cada componente.

Para la especie *Neocynortoides obscura* no se encontró ninguno de los componentes analizados a pesar de compartir el mismo hábitat. Esta carencia puede ser debido a que no contiene glándulas de secreción utilizando su duro caparazón como mecanismo de defensa como propone Souza y Willemart (2011), no utiliza protección antimicrobiana ni se comunica con feromonas, o simplemente contiene otros componentes que no fueron analizados en esta investigación.

Sin embargo, los componentes derivados de las “glándulas olfativas” de Opiliones se pueden agrupar aproximadamente en varias clases de sustancias entre ellas: naftoquinonas, antraquinonas, fenoles, benzoquinonas, piranos, terpenos, etil y metil cetonas. Esto da lugar a posibles estudios de identificación y cuantificación de otros componentes en ambas especies ya sea por GC o HPLC.

CONCLUSIÓN

Se desarrolló un protocolo para extraer las secreciones de las glándulas olfativas de Opiliones de dos especies endémicas de Puerto Rico a saber: *Heterolacurbs perezassoi* y *Neocynortoides obscura*, usando hexano y acetato de etilo como solvente.

Se generó un procedimiento por cromatografía gaseosa (GC) para la identificación y cuantificación de cuatro componentes que pueden estar contenidos en las secreciones de estas especies. Específicamente no se conoce de estudios que hayan informado de este tipo de análisis simultáneo.

Se detectó la presencia de los cuatro compuestos analizados en la especie *Heterolacurbs perezassoi* con una proporción porcentual respecto de su masa corporal de un 7.62% para 1,4-dihidroxinaftaleno y le siguen 1,4-naftoquinona con 0.38% - 0.59% y 2-metoxi-1,4-naftoquinona con un 0.53%; finalmente 2-metilnftoquinona con un 0.17%. Aquellos de mayor valor porcentual son bastante tóxicos y podrían ser utilizados como mecanismos de defensa en esta especie.

Para la especie *Neocynortoides obscura* no se encontró ninguno de los componentes analizados a pesar de compartir el mismo hábitat. Esta carencia puede ser debido a que no contiene glándulas de secreción utilizando su duro caparazón como mecanismo de defensa o posee otras sustancias aún no determinadas. Pueden analizarse otros compuestos por GC o HPLC para estas especies, así como para otros tipos de opiliones que provean información de similitud o diferencias en sus mecanismos de defensa, si el hábitat condiciona el tipo de secreción que poseen o si son otros los componentes que los relacionan.

AGRADECIMIENTOS

Se reconoce el apoyo de la Directora del Departamento de Ciencias y Tecnologías del Recinto de Arecibo de la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Dra. Lizbeth Romero y la asistencia técnica del Sr. Armando Herrera, técnico de los laboratorios químicos del mismo Departamento.

REFERENCIAS

- Barroso, A. and de Armas, L. (2012). *A new species of Heterolacurbs (Opiliones: Biantidae: Stenostygninae) from Puerto Rico. American Arachnology*. Recuperado de http://www.americanarachnology.org/JoA_free/JoA_v40_n3/ara-c-40-3-291.pdf
- Ekpa, O., Wheeler, J. W., Cokendolpher, J. C., and Duffield, R.M. (1984). N,N-dimethyl- β -phenylethylamine and bornyl esters from the harvestman *Sclerobunus robustus* (Arachnida: Opiliones). *Tetrahedron Letters*, 25, 1315-1318.
- Ekpa, O., Wheeler, J. W., Cokendolpher, J. C., and Duffield, R.M. (1985). Ketones and alcohols in the defensive secretion of *Leiobunum townsendi* Weed and a review of the known exocrine secretions of Palpatores (Arachnida: Opiliones). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81B, 555-557.
- Giribet, G., Rambla, M., Carranza, S., Baguña, J., Riutort, M., and Ribera, C. (1999). Phylogeny of the arachnid order Opiliones (arthropoda) inferred from a combined approach of complete 18s and partial 28s ribosomal DNA sequences and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(2), 296-307.
- Hara, M. R., Cavalheiro, A. J., Gnaspini, P., and Santos, D. Y. A. C., (2005). A comparative analysis of the chemical nature of defensive secretions of Gonyleptidae (Arachnida: Opiliones: Laniatores). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 1210-1225.
- Lucio, C., and Chamé, D. (2005). *Opiliones: Las arañas que no son arañas*. Capítulo 9. Diversidad de especies.
- Pinto-da-Rocha, R., Machado, G., and Giribet, G. (2007). *Harvestmen: The biology of Opiliones*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Raspotnig, G., Fauler, G., Leis, M., and Leis H. J. (2005). Chemical profile of scent gland secretions in the cyphophthalmid opilionid harvestmen, *Siro duricorius* and *S. exilis*. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 1353-1368.
- Raspotnig, G., Leutgeb, V., Schaidler, M., & Komposch, C. (20

10). Naftoquinonas and Antraquinonas from Scent Glands of a Dyspnoic Harvestman, *Paranemastoma quadripunctatum*. *Journal of Chemical Ecology*, 36(2), 158-162. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-010-9745-y>

Souza, E. and Willemart, R. (2011). Harvest-ironman: heavy armature, and not its defensive secretions, protects a harvestman against a spider. *Animal Behaviour*, 81 (1), 127-133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.09.023>

Wachter, G. A., Muster, C., Arthofer, W., Raspotnig, G., Föttinger, P., Komposch, C., Schlick-Steiner, B. C. (2015). Taking the discovery approach in integrative taxonomy: Decrypting a complex of narrow-endemic Alpine harvestmen (Opiliones:Phalangidae:Megabunus). *Molecular Ecology*, 24(4), 863-889. doi:10.1111/mec.13077

Wiemer, D.F., Hicks, K., Meinwald, J., and Eisner, T. (1978). Naftoquinonas in the defensive secretion of an opilionid. *Experientia*, 34, 969-970.

AUTORES/AUTHORS

Tatiana Morales Ortiz. Estudiante del B.S. en Química de la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo. Desarrolló esta investigación durante su último año de estudios como parte del Seminario Integrador en Química.

Is a student of the B.S. in Chemistry from the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus. She developed this research project during her senior year as part of the Senior Seminar in Chemistry.

Alberto Puente Rolón. Investigador y profesor del Recin-

to de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico. Obtuvo un grado doctoral (Ph.D) en Ecología Tropical y una maestría (M.S.) en Biología/ Ecología de la Universidad de Puerto Rico, Recintos de Río Piedras y Mayagüez, respectivamente. Ha publicado varios artículos en reconocidas revistas profesionales. Su correo electrónico: apuente@arecibo.inter.edu.

Researcher and professor at the University of Puerto Rico, Mayaguez Campus. Earned a doctoral degree (Ph.D) in Tropical Ecology and an M.S. in Biology / Ecology at the University of Puerto Rico, Río Piedras and Mayaguez Campus, respectively. He has published several articles in peer reviewed journals. May be contacted via email: apuente@arecibo.inter.edu.

Arnaldo Bravo Núñez. Posee el rango de Catedrático Asociado en el Departamento de Ciencias y Tecnología de la Universidad Interamericana, Recinto de Arecibo. Obtuvo una Licenciatura en Química (M.S.) y su grado doctoral (Ph.D) en la Universidad de Concepción-Chile en el área de Química-Física Teórica y Aplicada. Ha publicado varios artículos en reconocidas revistas profesionales. Puede ser contactado a través del correo electrónico: abravo@arecibo.inter.edu.

Associate Professor in the Department of Science and Technology at the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus. Earned an M.S. in Chemistry and a doctoral degree (Ph.D) in Theoretical and Applied Physical-Chemistry from the University of Concepción in Chile. He has published several articles in peer reviewed journals. May be contacted via email: abravo@arecibo.inter.edu.

Uso de Excel para análisis de regresión y correlación en experimentos a nivel sub-graduado

Use of Excel for regression and correlation analysis in undergraduate experiments

Vásquez Moll, V.D.

Departamento de Ciencias y Tecnología, Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo

ABSTRACT

Learning to establish regression and correlation analysis for experimental and simulated data is important for students at all levels including undergraduate, graduate and research. This study is focused on showing how to do regression and correlation analysis in the fields of chemistry and physics. The results obtained by the students in laboratory experiences will be used for lineal and non lineal regression analysis making use of the tools provided by Excel. Calculations for a simple pendulum, vaporization heat, boiling temperature and potential energy will be shown.

RESUMEN

La importancia del análisis de regresión y correlación de datos experimentales o simulados conlleva unos beneficios fundamentales a nivel de estudios sub-graduados, de posgrado y de investigación en el área de las ciencias químicas y físicas. Haciendo uso de observaciones en experimentos a nivel sub-graduado, se aprovechan las distintas opciones de regresión lineal y no lineal proporcionadas por Excel, de acuerdo con la fácil disposición de las nuevas herramientas tecnológicas. Se mostrarán cálculos para el comportamiento de un péndulo simple, presión de vapor, temperatura de ebullición y energía potencial.

KEYWORDS Solver Excel, regression, correlation, simple pendulum, potential energy, vapor pressure, boiling temperature

PALABRAS CLAVE Solver Excel, regresión, correlación, péndulo simple, energía potencial, presión de vapor, temperatura de ebullición

INTRODUCCIÓN

En cualquier investigación científica, la obtención de datos experimentales o simulados, obedece a una relación entre propiedades del sistema estudiado. Una modificación de las variables independientes y los resultados alcanzados para la variable dependiente permiten obtener una tabla de datos. El análisis de esta información experimental es un paso muy importante en el quehacer de cualquier trabajo relacionado con las ciencias físicas o químicas. Una técnica o procedimiento útil para encontrar una relación entre variables independientes y la variable dependiente está basada en los conceptos de regresión y correlación, nociones de estadística fundamentales (Freund y Simon, 1994; Miller, 2000; Velasco y Wisniewski, 2002; Devore, 2005).

Al aplicar el concepto de regresión más simple, el que considera dos variables, una que se denomina x y es la variable independiente y otra que se le llama y , siendo la variable dependiente la dependencia de y en términos de x , puede alcanzar distintas formas entre las que se encuentran: (1) lineal: $y = ax + b$; (2) polinomial: $y = a + bx + cx^2 + \dots$; (3) potencia: $y =$

ax^b ; (4) exponencial: $y = ae^{bx}$; (5) logarítmica: $\log [y] = \log[a] + b \log [x]$; donde a , b y c son parámetros a determinar.

Muchas veces, cuando los datos exigen el uso de funciones no lineales, se procede a la realización de transformaciones lineales, siempre que sea posible, de la ecuación no lineal.

El presente trabajo aprovecha las distintas opciones de regresión lineal y no lineal que dispone el paquete de Microsoft Excel para llevar a cabo distintos ajustes a datos experimentales que se obtienen mediante la realización de experimentos en un laboratorio de Ciencias. Además, este paquete contiene los complementos de aplicación activa de herramientas para Análisis y Solver (Microsoft).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los datos que se presentan en este trabajo se obtuvieron a partir de 4 experimentos desarrollados con equipos, materiales y aplicaciones computacionales de química disponibles en el

laboratorio de física y química computacional (Pasco, Fujitsu, HiperChem, Talete, Gaussian). El tratamiento de estos datos experimentales permitió aplicar regresiones lineales simples y múltiples, regresiones lineales de transformaciones lineales de relaciones no lineales y regresiones no lineales.

Ejemplo 1.

Un péndulo simple puede ser usado como un instrumento para medir la aceleración de gravedad en un lugar particular (Figura 1). Si el péndulo está sujeto a la restricción de un ángulo pequeño de oscilación, se puede proponer la ecuación siguiente (Giancoli, 2014):

$$T = 2\pi\sqrt{L/g} \quad [1]$$

donde T es el periodo, L es la longitud del péndulo y g es la aceleración de gravedad. Realizado un experimento en el Laboratorio de Física se obtuvieron los datos siguientes que se muestran en la Tabla 1.



Figura1. Péndulo Físico.

Tabla 1. Tiempos de 10 oscilaciones en función de L.

L (cm)	t ₁ (s)	t ₂ (s)	t ₃ (s)
10	7.98	7.72	7.4
20	10.03	9.82	9.9
30	11.78	11.62	11.45
40	13.44	13.66	13.98
50	14.9	15	14.68
60	16.58	16.13	16.35

donde t_i es el tiempo necesario para que ocurran 10 oscilaciones. Para cada longitud del péndulo se realizaron 3 ensayos. Estos datos se usarán, aprovechando Excel, en el empleo de procedimientos como regresión lineal, de potencia, logarítmica, estimación lineal y Solver.

Ejemplo 2.

Una de las variables importantes en la presión de vapor de una sustancia líquida pura es la temperatura de ebullición. Una relación entre la temperatura de ebullición y la presión de vapor viene expresada por la ecuación siguiente [2] (Atkins, 1998):

$$P = I e^{-\frac{\Delta H_v}{R} \left[\frac{1}{T} \right]} \quad [2]$$

donde P es la presión de vapor, ΔH_v es el calor de vaporización, R es la constante universal de un gas, T es la temperatura de ebullición e I es una constante de integración.

Se realizó un experimento para determinar el calor de vaporización de acetona utilizando la aplicación de sensores de temperatura y presión de Pasco y la aplicación computacional Data Studio obteniéndose los datos siguientes presentados en la Tabla 2. En este caso se utilizará Excel para aplicar las opciones de regresión exponencial, regresión lineal modificada, la función estimación lineal y Solver.

Tabla 2. Presiones de vapor de Acetona.

T (°C)	P (kPa)
53.3	89.4
52.7	85.9
52	82.5
51.2	80.1
50.3	76.7
49.3	74.2
48.5	72.3
47.7	70.3
46.8	68.4
46	66.4
45.2	64.5
44.4	63.5
43.7	61.5
43	60.5
42.2	58.6
41.6	57.6
41	56.6

Ejemplo 3.

Este experimento se desarrolla utilizando un sensor de temperatura de Pasco, para determinar las temperaturas de ebullición (T_e) de varias sustancias alcohólicas con la aplicación computacional de Data Studio y cuyos datos se observan en la

Figura 2. Por otra parte, se usan aplicaciones computacionales como Proyect Leader de Scigress y Dragon de Talete para encontrar algunos descriptores tales como la Masa Molar (M), el momento dipolar (p) y el índice de conectividad (I_{c2}) y que se presentan en la tabla 3.

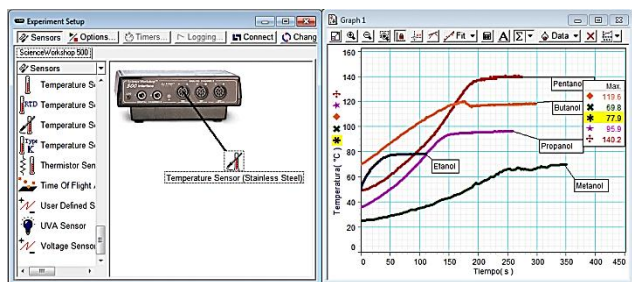


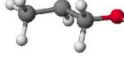




Figura 2: Obtención de Temperaturas de Ebullición de alcoholes mediante un sensor de temperatura incluido en Pasco Scientific.

Tabla 3. Datos de Temperatura de Ebullición de alcoholes.

Molécula	M [g/mol]	p [Db]	I _{c2}	Te [C]	Modelo Molecular
Metanol	32.042	1.489	0	69.8	
Etanol	46.069	1.449	0.707	77.9	
Propanol	60.096	1.423	1	95.9	
Butanol	74.122	1.443	1.354	119.6	
Pentanol	88.149	1.414	1.707	140.2	

Para estos datos se proponen estudios de regresión lineal, regresión polinomial, regresión de potencia y regresiones lineales múltiples.

Ejemplo 4.

En el estudio de moléculas, las curvas de energía potencial en función de la longitud de enlace, en el caso de dos átomos vecinos, se puede seguir a través de la función potencial de Morse teniendo la forma siguiente (Engel y Reid, 2013):

$$E_p = D_e [1.0 - e^{-\beta(L-L_e)}]^2 \tag{4}$$

donde E_p es la energía potencial, D_e es la energía de disociación de enlace, β es un parámetro, L es la longitud de enlace y L_e es la

longitud de enlace en el equilibrio o en la posición de mínima energía.

Utilizando la aplicación computacional GaussView de Gaussian se obtuvieron los datos presentados en Figura 3 y Tabla 4 y que pertenecen al estudio de un enlace OH de la molécula de H₂O [g].

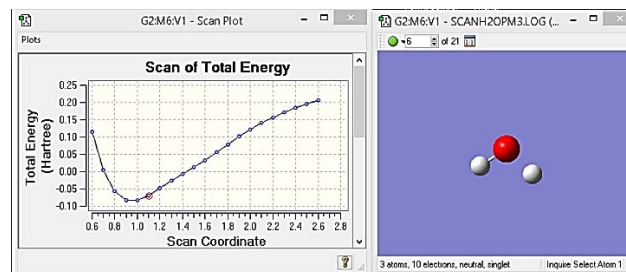


Figura 3: Energía Potencial de un enlace OH en molécula de agua.

Tabla 4. Datos de Energía Potencial del Agua.

L [Å]	E _p [Ha]
0.6	0.11557
0.7	0.004629
0.8	-0.05692
0.9	-0.08228
1	-0.08288
1.1	-0.06869
1.2	-0.0479
1.3	-0.02614
1.4	-0.00578
1.5	0.013604
1.6	0.033676
1.7	0.055494
1.8	0.078582
1.9	0.101406
2	0.122503
2.1	0.141163
2.2	0.15743
2.3	0.17172
2.4	0.184448
2.5	0.195874
2.6	0.206133

Solamente, estos datos pueden ser tratados en Excel, mediante una regresión no lineal aplicando la opción de Solver.

RESULTADOS

En este análisis, se intenta aprovechar la mayor parte de todas las

opciones de las que dispone Excel con el propósito de realizar regresiones lineales, regresiones lineales modificadas, regresiones lineales múltiples y regresiones no lineales a los datos presentados anteriormente.

Ejemplo 1.

La ecuación 1 puede ser tratada de distintas maneras en cuanto a regresiones lineales se refiere. Cálculos necesarios para alcanzar un análisis de los distintos modelos se presentan en la Tabla 5 y sus resultados correspondientes se muestran en Tabla 6 y Figura 4.

Tabla 5. Cálculos necesarios para aplicar regresiones a datos de ejemplo 1.

L [m]	L ^{1/2} [m ^{1/2}]	T [s]	T ² [s ²]	Ln [L]	Ln [T]
0.100	0.316	0.770	0.593	-2.303	-0.261
0.200	0.447	0.992	0.983	-1.609	-0.008
0.300	0.548	1.162	1.349	-1.204	0.150
0.400	0.632	1.369	1.875	-0.916	0.314
0.500	0.707	1.486	2.208	-0.693	0.396
0.600	0.775	1.635	2.674	-0.511	0.492

Tabla 6. Obtención de resultados para distintos métodos de ajuste conseguidos con Excel (ejemplo 1).

Modelo	Ecuación	Ecuación de regresión en Excel	R ²	g[m/s ²]	% error en g
Potencia	$T = aL^b$	$T = 1.9924L^{0.422}$	0.9943	9.949	1.42
Transformación lineal 1	$T = aL^{1/2} + b$	$T = 1.8974L^{1/2} + 0.1525$	0.9965	10.9658	11.78
Transformación lineal 2	$T^2 = aL + b$	$T^2 = 4.1734L + 0.1532$	0.9975	9.4595	3.57
Logarítmico	$Ln[T] = b + aLn[L]$	$Ln[T] = 0.6893 + 0.422Ln[T]$	0.9943	9.9458	1.38

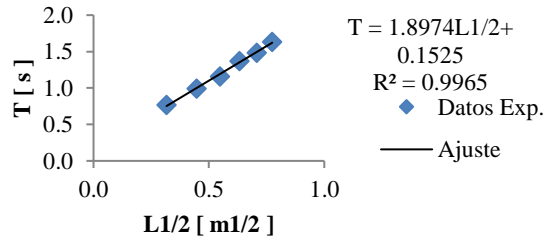
El valor final alcanzado para g se obtiene mediante la ecuación siguiente:

$$g = \frac{4\pi^2}{a^2} \tag{5}$$

donde a varía de acuerdo con el modelo propuesto en la Tabla 6. Además, el valor experimental de g considerado fue de 9.81 m/s² (Giancoli, 2014). En el caso del método logarítmico, g se obtuvo mediante la ecuación:

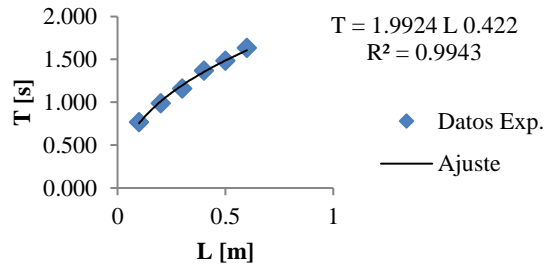
$$g = \frac{4\pi^2}{[e^b]^2} \tag{6}$$

Variación del Periodo con la longitud de un Péndulo [Método Transformación Lineal 1]



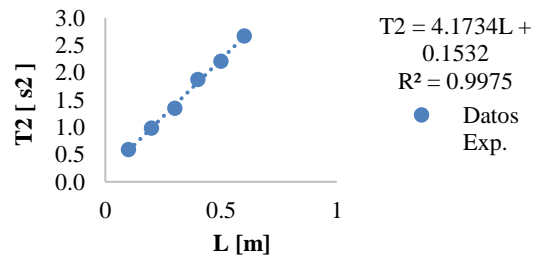
A

Variación del Periodo de un Péndulo [Método de Potencia]



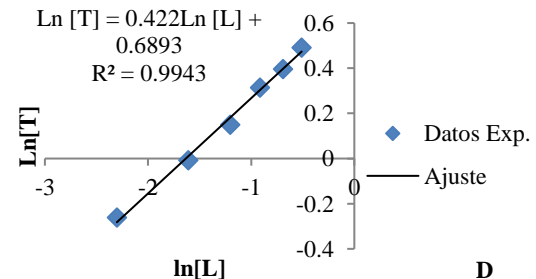
B

Variación de Periodo con la longitud de un Péndulo [Método Transformación Lineal 2]



C

Variación del Periodo de un Péndulo [Método Logarítmico]



D

Figura 4. Representación gráfica de distintos métodos de regresión propuestos para los datos experimentales en la Tabla 1.

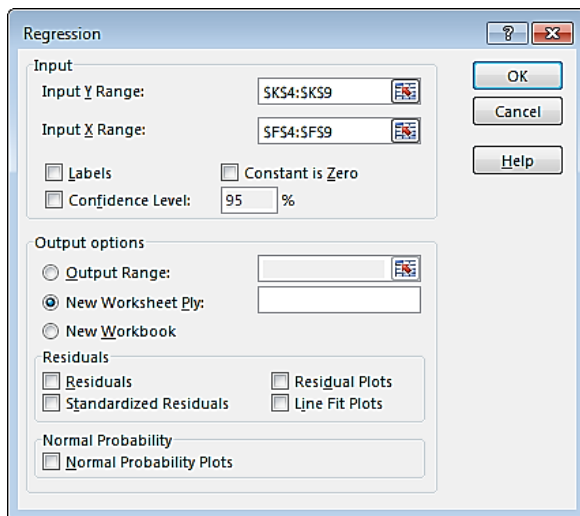
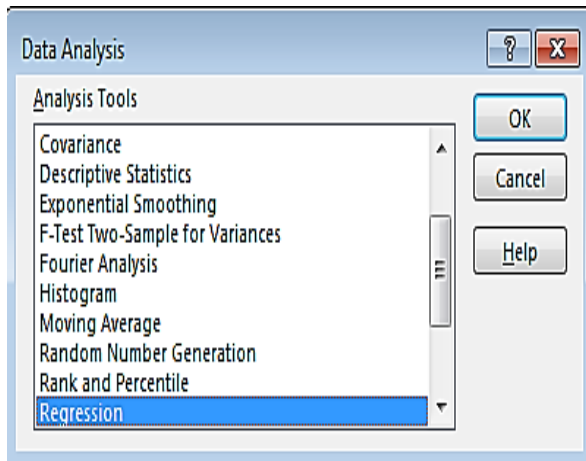


Figura 5: Aplicación de Regresión desde paquete Análisis de Datos de Ejemplo 1.

Por otra parte, se aplicó el paquete estadístico Data Analysis disponible en Excel al modelo de transformación lineal 2 y cuyas ventanas para introducir la información se presentan en la Figura 5 y los resultados se muestran en la Figura 6.

Por último, en este ejemplo se hace uso de un paquete estadístico denominado Solver y disponible en Excel que se utiliza en el análisis de regresiones no lineales. En el formulario de la figura 9 se introducen los datos y se presentan los resultados. De la tabla 6 se puede indicar que el modelo de transformación lineal 2 es el más aceptable, ya que el modelo de potencia y el modelo logarítmico modifica sustancialmente la ecuación determinística original. El uso de Solver con la restricción de b igual a 0.5 al igual que el modelo de transformación 1 permitieron lograr buenos ajustes con coeficiente de correlación próximos a 1 pero valores de la aceleración de gravedad g poco confiables.

Ejemplo 2.

Los datos experimentales que se presentan en la tabla 2 permiten realizar un análisis de regresión lineal y no lineal y cuyo propósito es determinar el calor de vaporización de la acetona.

Figura 6. Hoja de Cálculo entregada por Análisis de Datos de Excel.

SUMMARY OUTPUT								
Regression Statistics								
Multiple R	0.998742155							
R Square	0.997483892							
Adjusted R Square	0.996887365							
Standard Error	0.043825047							
Observations	6							
ANOVA								
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>			
Regression	1	3.048088412	3.04808841	1587.0214	2.37227E-06			
Residual	4	0.007682539	0.00192063					
Total	5	3.055770951						
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	0.153186896	0.040798899	3.75468215	0.0198662	0.039910994	0.266462799	0.039910994	0.266462799
X Variable 1	4.173445387	0.1047619	39.8374568	2.372E-06	3.382579922	4.464311253	3.382579922	4.464311253

Utilizando la ecuación [2] se propusieron dos métodos para realizar regresiones:

1. Una regresión exponencial que considera la variable independiente como el inverso de la Temperatura.
2. Una transformación lineal con una variable independiente x igual que en el caso anterior.

Los cálculos necesarios que permiten aplicar los métodos anteriores se presentan en Tabla 7 y los resultados alcanzados se encuentran en Tabla 8 y Figura 8. Además, se usaron el paquete estadístico de Data Analysis y la aplicación de Solver para el tratamiento de los datos del ejemplo 2, cuyos resultados están presentes en Figura 9 y Figura 10. El mejor resultado de regresión que se obtuvo fue alcanzado con Solver, que considera los datos originales, sin modificaciones.

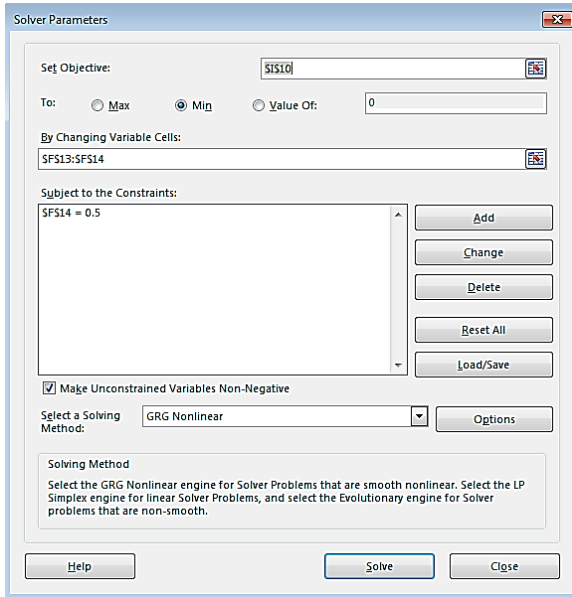
Ejemplo 3.

En este ejemplo no se hicieron modificaciones a los datos experimentales obtenidos. Además de las opciones tradicionales de ajuste que se encuentran en Excel, se propuso una relación empírica para las distintas variables involucradas cuya forma es:

$$y = m_1x_1 + m_2x_2 + \dots \quad [7]$$

donde y es una variable, m₁, m₂ son parámetros constantes, x₁, x₂ son variables independientes. Esta ecuación se conoce normalmente como una ecuación lineal múltiple. En la tabla 3 están presentes cuatro variables, tres de ellas son variables

independientes [M, p, I_{c2}], mientras que la temperatura de ebullición es la variable dependiente [T_e].



L [m]	T [s]	T _{caic} [s]	(T-T _{caic}) ²
0.1	0.770	0.67865191	0.00834447
0.2	0.992	0.95975873	0.00101812
0.3	1.162	1.17545958	0.00019024
0.4	1.369	1.35730381	0.00014471
0.5	1.486	1.5175118	0.00099299
0.6	1.635	1.66235088	0.00072995
			0.01142049
		$\Sigma(T - T_{caic})^2$	
2.1461		$T_{caic} = aL^b$	
0.5000			
	g	8.5717	m/s ²
	% Error	12.623	%

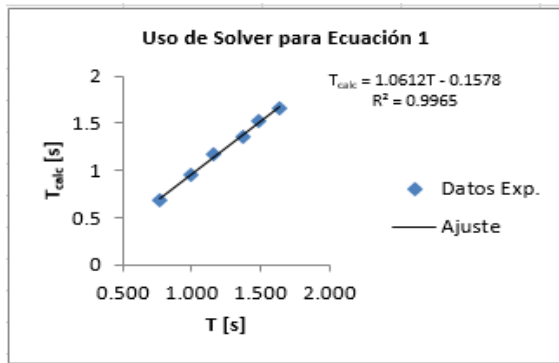


Figura 7. Formulario para introducir los datos y restricciones

necesarios para la utilización de Solver y resultado del parámetro g.

Se realizaron regresiones en Excel correspondientes a opciones de potencia, lineal y polinomial, cuyos resultados se presentan en Tabla 9 y Figura 11. Además, se aplicaron la función estadística Linest (y,x,1,1) y el paquete Data Analysis para estudiar regresiones lineales múltiples. Los resultados logrados se presentan en la Tabla 9, Figura 12 y Figura 13.

Un análisis de la tabla 10 muestra que las mejores regresiones alcanzadas fueron la regresión polinomial, las regresiones lineales múltiples 1 y 2.

Ejemplo 4.

Los datos de la tabla 4 fueron ajustados con la ecuación 4. Esta ecuación no lineal, no permite modificaciones. De modo que la única opción posible en Excel fue la aplicación de Solver. Antes de realizar la regresión, la energía potencial medida en Hartree [Ha] se convirtió en kcal/mol. La hoja de cálculo que se utilizó en Excel para trabajar con Solver presenta los datos calculados y los resultados alcanzados y se muestran en figura 14 y figura 15. El ajuste de los datos permite encontrar la ecuación:

$$E_p = 218.74[1.0 - e^{1.4538(L-0.983)}]^2 \quad [8]$$

El ajuste es bueno y el valor logrado para la energía de disociación del enlace O-H fue de 218.74 kcal/mol

Tabla 7. Cálculos en ejemplo 2 para aplicar las distintas opciones de regresión en Excel.

T [C]	P [kPa]	1/T [K ⁻¹]	P [mmHg]	ln P
53.3	89.4	3.063	0.6727	-0.396
52.7	85.9	3.069	0.6464	-0.436
52	82.5	3.076	0.6208	-0.477
51.2	80.1	3.083	0.6027	-0.506
50.3	76.7	3.092	0.5771	-0.550
49.3	74.2	3.101	0.5583	-0.583
48.5	72.3	3.109	0.5440	-0.609
47.7	70.3	3.117	0.5290	-0.637
46.8	68.4	3.125	0.5147	-0.664
46	66.4	3.133	0.4996	-0.694
45.2	64.5	3.141	0.4853	-0.723
44.4	63.5	3.149	0.4778	-0.739
43.7	61.5	3.156	0.4628	-0.771
43	60.5	3.163	0.4552	-0.787
42.2	58.6	3.171	0.4410	-0.819
41.6	57.6	3.177	0.4334	-0.836
41	56.6	3.183	0.4259	-0.854

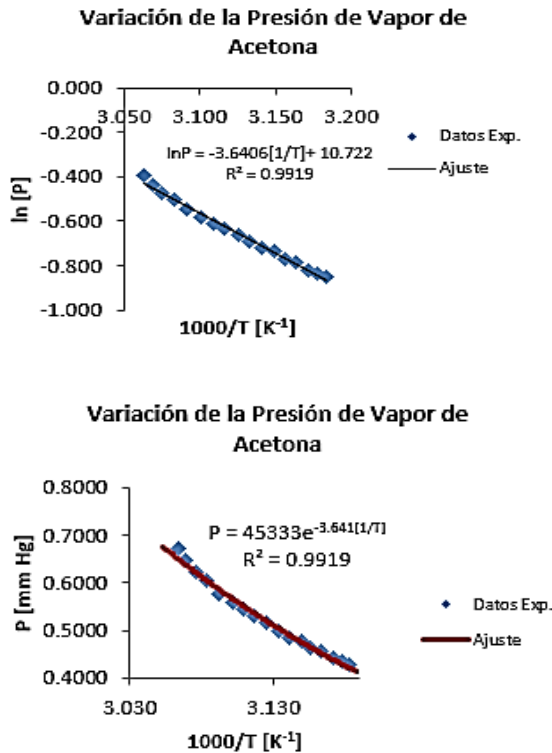


Figura 8. Visualización de los distintos ajustes logrados en análisis de ejemplo 2.

Tabla 8. Resultados alcanzados en regresiones aplicadas a ejemplo 2.

Modelo	Ecuación	Ecuación de regresión en Excel	R ²	$\Delta H_{vap} \left[\frac{J}{mol} \right]$	% Error en ΔH_{vap}
Método de Transformación Lineal 1	$LnP = -a \left[\frac{1}{T} \right] + b$	$LnP = -3640 \left[\frac{1}{T} \right] + 10.722$	0.9919	30269.8	0.21
Método Exponencial	$P = be^{-\frac{a}{T}}$	$P = 45333 e^{-3641 \left[\frac{1}{T} \right]}$	0.9919	30273.1	0.20
		$\Delta H_{vap,calc} = a \cdot R$			
		$\Delta H_{vap,exp} = 30334 \left[\frac{J}{mol} \right]$			

Resumen								
Estadísticas de la regresión								
Coefficiente de correlación múltiple	0.99595841							
Coefficiente de determinación R ²	0.991947956							
R ² ajustado	0.991411153							
Error típico	0.013311549							
Observaciones	17							
ANÁLISIS DE VARIANZA								
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Valor crítico de F				
Regresión	1	0.327439609	0.327439609	1847.880976	4.00411E-17			
Residuos	15	0.00265796	0.000177197					
Total	16	0.330097569						
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	10.72178166	0.264599637	40.52077242	9.64496E-17	10.15780088	11.28576243	10.15780088	11.28576243
Variable X1	-3.64061467	0.084691089	-42.98696512	4.00411E-17	-3.821129454	-3.460099887	-3.821129454	-3.460099887

Figura 9. Hoja de Cálculo que se obtiene por la aplicación de

Análisis de Datos a ejemplo 2 y método de transformación lineal 1.

T [K]	P [mm Hg]	P _{calc} [mm Hg]	(P _{calc} -P) ²
326.45	0.672712871	0.650518949	0.00049257
325.85	0.646376238	0.637260158	8.31029E-05
325.15	0.620792079	0.622072978	1.6407E-06
324.35	0.602732673	0.605081744	5.51813E-06
323.45	0.577148515	0.586424677	8.60472E-05
322.45	0.558336634	0.566252406	6.26595E-05
321.65	0.544039604	0.550529074	4.21132E-05
320.85	0.528990099	0.53516718	3.81563E-05
319.95	0.514693069	0.51830914	1.3076E-05
319.15	0.499643564	0.50369421	1.64077E-05
318.35	0.485346535	0.48942102	1.66014E-05
317.55	0.477821782	0.475483415	5.46796E-06
316.85	0.462772277	0.463558512	6.18165E-07
316.15	0.455247525	0.451881851	1.13278E-05
315.35	0.440950495	0.43883595	4.4713E-06
314.75	0.433425743	0.429257341	1.73756E-05
314.15	0.42590099	0.419852411	3.65853E-05
			0.000933739
			$\Sigma(P_{calc} - P)^2$

$P = a e^{-\frac{b}{T}}$		
a =	46790.13625	
b =	3650.825026	
$\Delta H_{vap,calc}$	30347.925 J/mol	
$\Delta H_{vap,exp}$	30334 J/mol	
% Error	0.04591 %	

Aplicación de Solver a Datos de Presión de Vapor de Acetona

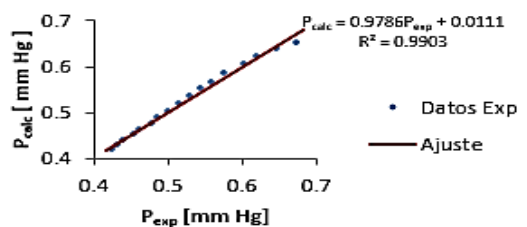


Figura 10: Hoja de Cálculo aplicando Solver a ejemplo 2 y Resultado logrado para el Calor de Vaporización de Acetona.

DISCUSIÓN

En este artículo se utilizan las distintas opciones disponibles en

Excel y cuyo objetivo fue realizar ajustes lineales y no lineales a los datos experimentales que están contenidos en los distintos ejemplos que se presentan en este trabajo.

Estas técnicas de regresión, tanto lineal como no lineal, son poderosos procedimientos para el análisis de datos y que no es necesario un conocimiento profundo en matemáticas o uso de este paquete computacional que es Excel

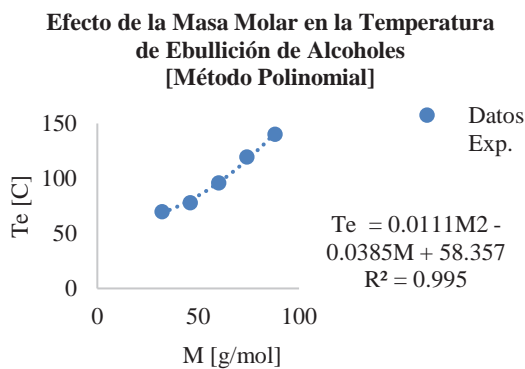
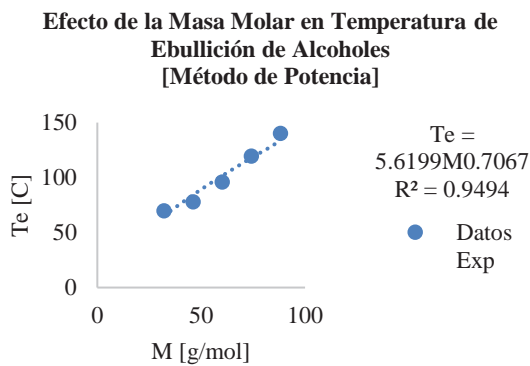
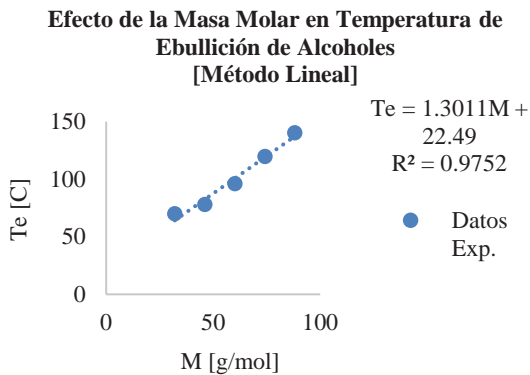


Figura 11. Representación Gráfica de distintos ajustes aplicados a datos de ejemplo 3.

	M [g/mol]	p [Db]	lc ₂	T _e [C]
10				
11	32.042	1.489	0	69.8
12	46.069	1.449	0.707	77.9
13	60.096	1.423	1	95.9
14	74.122	1.443	1.354	119.6
15	88.149	1.414	1.707	140.2

249.9861	1.579116	-355.098
113.5469	0.149072	171.5787
0.99277	3.513655	#N/A
137.3124	2	#N/A

{=LINEST(F11:F15,C11:D15,1,1)}

Figura 12. Hoja de Cálculo correspondiente a la aplicación de datos de ejemplo 3 mediante la función LINEST.

Tabla 9: Resultados logrados en ejemplo 3 mediante distintas regresiones propuestas disponibles en Excel.

Modelo	Ecuación	Ecuación de regresión en Excel	R ²
Método de Potencia	$T = aM^b$	$T_e = 5.6199M^{0.7067}$	0.9494
Método Lineal	$T = aM + b$	$T_e = 1.3011M + 22.49$	0.9752
Método Polinomial	$T = aM^2 + bM + c$	$T_e = 0.0111M^2 - 0.0385M + 58.357$	0.995
Método lineal múltiple 1	$T = aM + bp + c$	$T_e = 1.579M + 249.99p - 355.1$	0.9928
Método lineal múltiple 2	$T = aM + bl_{c2} + c$	$T_e = 2.3896M - 37.6l_{c2} - 7.074$	0.9964
Método lineal múltiple 3	$T = ap + bl_{c2} + c$	$T_e = 430.35p + 59.702l_{c2} - 577.498$	0.9335

SUMMARY OUTPUT								
<i>Regression Statistics</i>								
Multiple R	0.9963784							
R Square	0.99277							
Adjusted R Square	0.98554							
Standard Error	3.5136553							
Observations	5							
<i>ANOVA</i>								
	df	SS	MS	F	Significancia F			
Regression	2	3390.4565	1695.2282	137.31243	0.00723			
Residual	2	24.691548	12.345774					
Total	4	3415.148						
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	-355.09791	171.57873	-2.0695917	0.174354	-1093.3416	383.14577	-1093.3416	383.14577
X Variable 1	1.579116	0.1490722	10.592961	0.0087944	0.9377101	2.2205219	0.9377101	2.2205219
X Variable 2	249.98614	113.54695	2.2016104	0.1586291	-238.56695	738.53922	-238.56695	738.53922

Figura 13: Hoja de Cálculo para uso de Análisis de Datos y resultados alcanzados en Método Lineal Múltiple 1 de ejemplo 3.

En cuanto al ejemplo 1, de todos los ajustes que se realizaron, el método de transformación lineal 2 fue el más aceptable de acuerdo con el % de error en la aceleración de gravedad g, alcanzando un valor de 3.57 %. Tanto el método de potencia como como el método logarítmico, a pesar que tienen excelentes % de error, ellos incurren en una modificación de la ecuación

determinística propuesta, alcanzando un valor de 0.422 en el parámetro b en vez de 0.50. En los casos en que se restringe el valor de b a 0.5, como lo son el método de transformación lineal 1 y la técnica de Solver, el % de error alcanza el 12% en el valor de g.

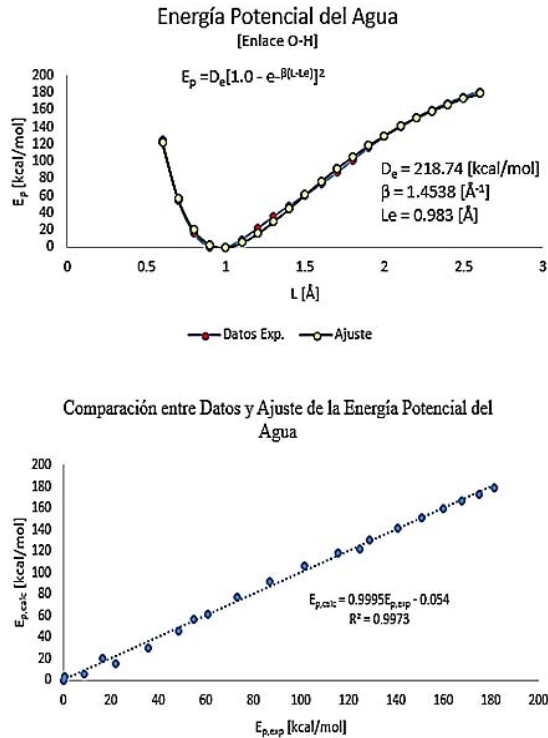


Figura 14. Representación Gráfica mediante el uso de Solver en ejemplo 4.

L [Å]	Ep [Ha]	Ep,cor [Ha]	Ep,cor [kcal/mol]	Ep,calc [kcal/mol]	(Ep,cor - Ep,calc) ²
0.6	0.11557	0.19857	124.6028953	121.4929178	9.67195953
0.7	0.004629	0.087629	54.98721061	56.6956288	2.91869268
0.8	-0.05692	0.02608	16.364949	20.33583999	15.76797526
0.9	-0.08228	0.000719	0.451233117	3.602653195	9.931448513
1	-0.08288	0.000118	0.074132474	0.129623752	0.003079282
1.1	-0.06869	0.014313	8.981106677	5.3480387	13.19918292
1.2	-0.0479	0.035099	22.02486164	16.00742523	36.20954092
1.3	-0.02614	0.056864	35.68242255	29.82054635	34.36159252
1.4	-0.00578	0.077222	48.45711091	45.20099953	10.60226129
1.5	0.013604	0.096604	60.61895064	61.06964322	0.203123804
1.6	0.033676	0.116676	73.21405032	76.71213036	12.23656398
1.7	0.055494	0.138494	86.90474097	91.67434727	22.74914433
1.8	0.078582	0.161582	101.3928499	105.6859288	18.43052615
1.9	0.101406	0.184406	115.7149758	118.6045361	8.349558647
2	0.122503	0.205503	128.953098	130.3754612	2.023117154
2.1	0.141163	0.224163	140.6621388	141.002518	0.115857984
2.2	0.15743	0.24043	150.8698495	150.5272255	0.117391188
2.3	0.17172	0.25472	159.836869	159.0140622	0.67701107
2.4	0.184448	0.267448	167.8235196	166.5401487	1.647040967
2.5	0.195874	0.278874	174.9936101	173.1881458	3.259701382
2.6	0.206133	0.289133	181.4309177	179.0414741	5.709440782
			$\Sigma(E_{p,cor} - E_{p,calc})^2$		208.1842104

$$y = p_1 [1 - e^{-p_2(x-p_3)}]^2$$

218.743	p ₁
1.453871	p ₂
0.983049	p ₃

Figura 15. Hoja de Cálculo que presenta Datos y Resultados logrados mediante el uso de Solver en ejemplo 4.

En el ejemplo 2, Solver resultó ser la mejor aplicación de regresión donde se logró un 0.04 % de error en el calor de vaporización de la acetona. De cualquier manera, el método de transformación lineal 1 y el método exponencial son igualmente aceptables.

Para el ejemplo 3, respecto de regresiones que consideran una variable independiente, es decir la masa molar M, el mejor método de ajuste fue el polinomial con un coeficiente de correlación igual a 0.995. En el caso de regresiones múltiples, los mejores ajustes fueron el método de ajuste lineal múltiple 1 y el método de ajuste lineal múltiple 2 con coeficientes de correlación 0.9928 y 0.9964 respectivamente.

En lo que respecta al ejemplo 4, se puede decir que Solver es una buena aplicación para llevar a cabo un ajuste de los datos experimentales a una ecuación no lineal como lo es la función potencial de Morse.

Por último, la automatización de los procesos físicos y químicos exige que se adquieran habilidades y destrezas tanto para académicos como estudiantes de las ciencias químicas y físicas desde el nivel subgraduado hasta los posgrados y los trabajos de investigación. Ya no basta sólo la adquisición de datos y su almacenamiento y divulgación. Es necesario dar un paso más y así lo ha venido haciendo la aplicación del conocimiento científico.

Una herramienta básica en el análisis e interpretación de datos experimentales es el uso computadoras, hojas de cálculo y disponibilidad de software estadísticos que permiten aplicar distintas opciones de regresión con el propósito de proponer funciones matemáticas, tanto empíricas como determinísticas, logrando así la optimización matemática de los fenómenos estudiados y que sirve de experiencia para el futuro laboral de los profesionales de las ciencias, tanto físicas como químicas.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece el apoyo de la Universidad Interamericana de Puerto Rico y especialmente al departamento de Ciencias y Tecnología del Recinto de Arecibo por incluir en sus presupuestos la adquisición de computadoras, interfaces,

sensores y el software necesario para la realización de este trabajo investigativo.

REFERENCIAS

Atkins, P. (1998). *Physical Chemistry*. Freeman, Sixth Edition, pp 152.

Devore, J. L. (2005). *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias*. (6a ed.). México: Thomson Learning.

Engel, T., & Reid, P. (2013). *Physical Chemistry*. Third Edition, Pearson.

Foresman, J.B., & Frish, A.E. (1993). *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*. Second Edition, Gaussian, Inc.

Freund, J. & Simon, G. (1994). *Estadística elemental*. (8a ed.). México: Prentice Hall.

Fujitsu Technical Computing Solution SCGRESS.

Gaussian, Inc. Gaussian.com. Wallingford, Connecticut.

Giancoli, D. (2104). *Physics*. Prentice Hall, Seventh Edition, pp 301.

HyperChem, Re 8.0.2 for Windows. (2007). *Hypercube, Inc.*

Microsoft. www.microsoftstore.com. Microsoft Office. Excel.

Pasco Scientific. www.pasco.com. Data Studio. Interface and Sensor.

Miller, I. (2000). *Estadística matemática con aplicaciones*. (6a ed.). México: Pearson Educación.

Talete srl DRAGON Professional version 5.4-2006, <http://www.talete.mi.it>

Velasco Sotomayor, G, y Wisniewski, P. (2002). *Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias*. Editorial Thomson.

AUTOR/AUTHOR

Víctor D. Vásquez Moll. Posee el rango de Catedrático en el Departamento de Ciencias y Tecnología de la Universidad Interamericana, Recinto de Arecibo. Es Doctor en Ciencias Químicas con especialidad en Química Física y Electroquímica e Ingeniero Civil Metalúrgico graduado de la Universidad Nacional del Plata, Argentina y autor del libro de texto “Matemática y Visual Basic para Químicos y Físicos”. Puede ser contactado a través del correo electrónico: dvasquez@arecibo.inter.edu

Professor in the Science and Technology Department of the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus. Graduated from the National University of La Plata in Argentina with a doctorate in Chemical Sciences with a specialization in Physical Chemistry and Electrochemistry, and as a Metallurgical Engineer. Author of *Matemática y Visual Basic para Químicos y Físicos*. May be contacted via email: dvasquez@arecibo.inter.edu

Characterization of the anti-proliferative properties and apoptotic profile of curcuminoids on the multiple myeloma cell line RPMI-8226

Caracterización de las propiedades anti-proliferativas y el perfil apoptótico de curcuminoides en la línea celular de mieloma múltiple RPMI-8226

Fuentes Cabrera, D.M., Gelpí Acevedo, L.M., Ongay Montero, K.D., Torres Díaz, C.I., and Woolcock Rodríguez, K.

Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus, Science and Technology Department

ABSTRACT

In many “in vitro” models for cancer, such as Multiple Myeloma (MM) RPMI-8226 cell line, curcumin has been shown to have anti-tumor effects. Curcumin (CUR) has a limited bioavailability rendering low concentration in circulation and at target organs, which can limit establishing a formal health claim for this natural product. Therefore, it is important to characterize the pleiotropic action of curcumin (CUR) and other curcuminoids such as demethoxycurcumin (DMC) and bis-demethoxycurcumin (BDMC) and describe the mathematical model that explains its interaction. In the present study, RPMI8226 cell line was treated with various concentrations of CUR, DMC, and BDMC for 24, 48, and 72h prior to perform a cell proliferation assay. The IC_{50} for CUR, DMC and BDM was $1.119 (\mu M) \pm 0.95$, $9.93 (\mu M) \pm 0.2877$ and $21.25 (\mu M) \pm 1.204$, respectively, where DMC seems to have the highest potency. The Hill slope for DMC was 4.13 ± 1.60 and BDM was 2.48 ± 0.2891 , suggesting that both molecules may have an allosteric interaction with its biological target. Also, to determine if the three curcuminoids can induce apoptosis in RPMI-8226 cells, flow cytometry methods were used. The Annexin V assay showed that DMC induced apoptosis of 53% of the cells when exposed 48 hours. CUR and DMC produced Caspase-3/7 activation (33.8%) after 72 hours exposure with the highest concentrations tested. This suggests that the cell death, confirmed through the Annexin V assay, may occur through an alternate pathway beside activation of Caspase-3/7. The mitochondrial potential assay demonstrated that all curcuminoids reduced the depolarization induced by DMSO.

RESUMEN

Estudios previos han mostrado que los curcuminoides exhiben efectos anti-tumorales en muchos modelos de cáncer *in vitro*, como la línea celular RPMI-8226 de mieloma múltiple. La baja concentración de curcumina que se observa en la circulación y en órganos importantes, demuestra que la curcumina es de biodisponibilidad limitada, lo que puede limitar el beneficio a la salud que este producto natural ofrece. Por lo tanto, es vital caracterizar la acción pleiotrópica de los curcuminoides como curcumina (CUR), demetoxicurcumina (DMC) y bis-demetoxicurcumina (BDMC) y describir los modelos matemáticos que explican su interacción. En este estudio, la línea celular RPMI-8226 fue tratada con varias concentraciones de CUR, DMC, y BDMC por 24, 48, y 72 hrs antes de realizar un ensayo de proliferación. El IC_{50} de CUR, DMC y BDMC fue $1.119 (\mu M) \pm 0.95$, $9.93 (\mu M) \pm 0.2877$ y $21.25 (\mu M) \pm 1.204$, respectivamente, donde DMC parece tener la mayor potencia. La pendiente de Hill para DMC fue 4.13 ± 1.60 y para BDM fue 2.48 ± 0.2891 ; esto sugiere que ambas moléculas pueden tener interacciones alostéricas con sus blancos biológicos. Para determinar si estos tres curcuminoides pueden inducir apoptosis en las células RPMI-8226 se utilizaron métodos de citometría de flujo. El ensayo de Anexina V mostró que DMC indujo apoptosis en el 53% de las células a las 48 hrs. CUR y DMC en sus concentraciones mas altas, activaron en un 33.8% a las Caspasas-3/7 luego de 72 hrs. Estos resultados sugieren que la muerte celular observada con el ensayo de Anexina V pudiera ocurrir por una ruta alterna a las caspasas 3/7. El ensayo de potencial mitocondrial demostró que todos los curcuminoides evaluados redujeron la depolarización inducida por DMSO.

KEYWORDS curcuminoids, RPMI-8226, annexin V, caspase-3/7, mitopotential

PALABRAS CLAVE curcuminoides, RPMI-8226, anexina V, caspasa-3/7, mitopotencial

INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a cancer formed by malignant

plasma cells. Normal plasma cells are found in the bone marrow

and are an important part of the immune system. MM accounts for ~10% of all hematological malignancies, being the second most common type in this category (Kyle, 2010). The most common symptoms presented by patients suffering of MM are fatigue, bone pain and recurrent infections. In addition, anemia is present in 70% of patients at diagnosis. There are several therapeutic strategies for MM, such as the use of steroids (dexamethasone), chemotherapy (thalidomide, bortezomib), radiotherapy and stem cell transplants (Zheng, Fan, Wu, Cay and Shi, 2016). Patients with MM diagnosis relapse after a period of recovery due to chemo resistance development and have a life expectancy of almost seven years. Evaluating alternative therapies is essential to improve patient prognosis and life expectancy.

Different studies have demonstrated that the use of curcuminoids potentiate the effects of the therapeutic strategies used for MM. Turmeric (*Curcuma longa*) is a rhizome of a natural plant that has generic structures of the turmeric-derived curcuminoids. The order of the relative abundance of the principal components are: curcumin (CUR) (71.5%), demethoxycurcumin (DMC) (19.4%) and bis-demethoxycurcumin (BDMC) (9.1%) (Li et al., 2011). Curcuminoids belong to the group of diarylheptanoids, were the most define structural characteristic of them is the presence of the methoxy group, which is linked to the benzene ring.

One of the possible mechanisms that explain the effects of curcuminoids is NF- κ B pathway. NF- κ B is a transcription factor that when activated induces the production of proteins that allows cancerous cells to increase proliferation and inhibits apoptotic pathway (Madonna, Ullman, Gentilcore, Palmieri and Ascierio, 2012). This process facilitates cell survival and metastasis. Therefore, the inhibition of its activation can be a promising option for anti-cancer therapies. Curcumin has shown anti-proliferative and pro-apoptotic effect against a variety of tumors cells due to its ability of downregulating the levels of this transcription factor (He et al., 2015). The evasion from apoptosis is a hallmark of cancer cells that leads to uncontrolled proliferation of damaged cells.

Apoptosis is a major form of programmed cell death that is composed of a series of signaling cascades (extrinsic and intrinsic pathways) that crosses among them. The extrinsic pathway is initiated by cell surface death receptor stimulation and activation of caspases, while the intrinsic pathway involves cytochrome c release from mitochondria and subsequent caspase activation. This leads the activation of cytoplasmic endonucleases and proteases that degrade nuclear materials and cytoskeletal proteins resulting in the elimination of abnormal cells (Al Dhaheri, et al., 2014). Effector caspase-3 and caspase-7 are essential in downstream of the apoptotic pathway, since they produce cellular breakdown through cleavage of structural proteins (Adamová, Liskova, Matalová and Kleparník, 2014) due to its protease activity once they become activated.

Changes in the mitochondrial membrane potential have been implicated in apoptosis and are reliable indicators of mitochondrial dysfunction and cellular health (Al Dhaheri, et al., 2014). Mitochondria contain key regulators of cell death process that may lead apoptosis in response to intracellular stress.

Although curcuminoids has been shown to produce cancer cell death though activation of apoptosis in *in-vitro* cancer cell models, the clinical use of this this natural product is limited because of its low bioavailability that renders very low concentration levels (at the nanomolar range) in circulation and at target organs (Heger, Golen, Broekgaarden, and Michel, 2013). Therefore, it is important to characterize the pharmacological profile of each individual component of the curcuminoids at low concentration ranges and describe the mathematical models that may explain their interaction with intracellular targets.

In the present study, the effects of specific curcuminoids present in *Curcuma longa* (curcumin, demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin) on the viability of RPMI-8226 cells, and its capacity to induce apoptosis was characterized. For this, RPMI-8226 cells were treated with various concentrations of CUR, DMC, and BDMC for 24, 48, and 72 hours, before determining the cell viability and the apoptotic activity by flow cytometry.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Curcumin, demethoxycurcumin, bis-demethoxycurcumin and DMSO (HybriMax) were purchased from Sigma. A 100 mmol/L stock solution was prepared for each curcuminoid in DMSO, stored as small aliquots at -20°C , and diluted as needed in RPMI 1640 cell culture medium (ATCC) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma) with penicillin (100 U)/ streptomycin (0.1 mg) (Sigma) for all experiments. The MTT kit was purchased from (Roche) Sigma. Cell Imaging Dishes were obtained from Eppendorf. The Muse Mito Potential Assay Kit, the Muse Annexin V & Dead cell kit, and the Muse Caspase 3/7 assay kit were obtained from Millipore. The Graph Pad software (version 7.03) was obtained from the Graph Pad Prism website.

Cell line and maintenance

The Human Multiple Myeloma cell line, RPMI-8226 of the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) was obtained from Sigma. The cells were cultured in RPMI 1640 cell media (ATCC) supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin at 37°C with 5% CO_2 using a humidified CO_2 incubator (Sanyo). Cell concentration was determined using a hemocytometer and trypan blue exclusion dye or the Countess (Invitrogen) instrument. Cells were fed twice each week.

Cell Proliferation Assay

The effect of the curcuminoids on RPMI-8226 cell proliferation was determined using the MTT assay, following the instructions provided by the manufacturer. When cultured cells reached a concentration of $2.5\text{-}3.0 \times 10^5$ cells/mL and a viability of at least 85%, an aliquot of the suspension was centrifuged, during 5 minutes at 1000 rpm at 25°C. The cell pellets were resuspended in 3 ml of pre-warmed cell culture media to achieve a final cell concentration of 4×10^5 cells/mL. Afterwards, 50 µL of cell suspension were transferred to each well of a 96-well microplate. After stabilizing cells during approximately 2 hours in the incubator, 50 µL of each curcuminoid were added to achieve a final curcuminoid concentration of 100, 10, 1, 0.1, 0.01 and 0.001 µM or 100, 75, 50, 25, 10 and 1 µM and a final number of cells of 1×10^4 cells/well. Exposure to each tested curcuminoid was done in quadruplicate during 24, 48 and 72 hours at 37°C. After each incubation period, 10 µL of the MTT reagent was added to each well and incubated for an additional 4 hours followed by the addition of the solubilizing agent. The microplate was incubated overnight in a humidified incubator at 37°C with a supply of 5% CO₂. The absorbance of the formazan produced by metabolically active cells, was determined at a 570 nm wavelength using a microplate reader (BioRad). Each proliferation experiment was repeated three times, and with a control of untreated cells and cells treated with the corresponding percentage of DMSO (0.00001 - 0.1%).

Apoptosis Assay

To determine apoptotic activity on multiple myeloma cells, the Annexin V & Dead Cell Detection kit (Millipore) was used. This assay uses Annexin V and 7-aminoactinomycin D (7-ADD). A total of 100 µl of cell suspension was exposed to curcuminoids on a 48-well microplate in duplicates using curcuminoids concentrations of 100, 10, 1 and 0.1 µM. Briefly, 1×10^4 cells/well were exposed to each treatment followed by an incubation period of 24, 48 or 72 hours. Untreated cells and DMSO were used as control for this experiment. After the treatment period concluded, 100 µl of treated cells for each tested concentration were transferred to microtubes, and 100 µL of the Muse Annexin V & Dead cell reagent (Millipore) was added, followed by a 20 minutes incubation period at room temperature in a dark place. Flow cytometry analysis was performed with the Muse Cell Analyzer (Millipore).

Caspase-3/7 activity Assay

The detection of caspase-3/7 activation was done using the Muse Caspase-3/7 assay kit purchased from Millipore. A total of 100 µl of cell suspension (2×10^4 cells) was exposed to curcuminoids on a 48-well microplate in duplicates using curcuminoids concentrations of 100, 10, 1 and 0.1µM. Briefly, 1×10^4 cells/well were exposed to each treatment followed by an

incubation period of 24, 48 and 72 hours. Untreated cells and DMSO were used as control for this experiment. An aliquot (50 µl) of treated cells were transferred to microtubes for each tested concentration. Cells were centrifuged at 1200 rpm and 25°C for 7 minutes, followed by the resuspension of cell pellets in Assay Buffer 1X. The Muse Caspase 3/7 and 7-ADD working solutions were prepared as described by the user's guide. After adding 5 µl of the Muse Caspase 3/7 working solution to each tube, treated and untreated cells were incubated for 30 minutes in a CO₂ incubator at 37°C. One hundred and fifty microliters (150 µL) of the Muse Caspase 7-ADD working solution was added to each tube, and incubated for another 5 minutes in a dark place at room temperature. Flow cytometry analysis was performed with the Muse Cell Analyzer.

MitoPotential Assay

The detection of mitochondrial depolarization was done using the Muse MitoPotential kit purchased from Millipore. The MitoPotential assay was done by transferring 100µl of treated cells to micro tubes. The Muse MitoPotential working solution and the 7-ADD working solution were prepared according to the user's guide. After transferring the treated and untreated cells to a tube, 95 µL of the Muse MitoPotential working solution was added to each tube and incubated for 20 minutes in a humidified CO₂ incubator at 37°C. Subsequently 5 µL of the Muse 7-ADD working solution was added and incubated at room temperature for 5 minutes in a dark place. Flow cytometry analysis was performed with the Muse Cell Analyzer.

Cell Dish Imaging Assay

Cell dish imaging was done by exposing 400 µl of cell suspension to curcuminoids (CUR, BDMC and DMC) at 100, 10 and 1 µM during 24, 48 and 72 h, incubated at 37°C. The effect on the RPMI 8226 cells morphology was observed through an Olympus CKX-41 Inverted Microscope at a total magnification of 400X. Untreated cells and DMSO were used as controls.

Data analysis

The relative cell proliferation rates were determined by calculating the average absorbance from cells exposed to curcuminoids, the solvent DMSO and control cells (without solvent or curcuminoids), and dividing the average absorbance of treated cells by the average absorbance of untreated cells. The percentage of inhibition was determined subtracting the viability from 100 (control cells was assumed to have 100% of viability). All graphs were constructed using Graph Pad Prism 7.03 software. The no-linear regression analysis was done considering either a normalized response, normalized response with a variable slope, a three parameter response and variable slope with four parameters. The analysis selected was the one that best fitted the data points. The two-way ANOVA Dunnett's multiple

comparisons test was used to determine viability in the dose-dependency analysis. The two-way ANOVA Tukey's multiple comparisons test was used in the time-dependency analysis.

RESULTS

Curcumin inhibits proliferation in multiple myeloma RPMI 8226 cells in vitro

Dose-dependency analysis. The effect of curcuminoids on the proliferation of RPMI-8226 cells, after incubation with a wide (100µM, 10µM, 1µM, 0.1µM, 0.01µM, 0.001µM) concentration range during 24, 48, and 72 hours, was analyzed. Figure 1 shows that the three tested compounds (CUR, DMC, and BDMC) produced a statistically significant reduction of RPMI-8226 cell proliferation at 100 µM. When the curcuminoids concentration was lowered to 10 µM only DMC and BDMC produced a significant reduction, and at 1 µM (data not shown) none of the tested compounds exerted a significant change in the cell population.

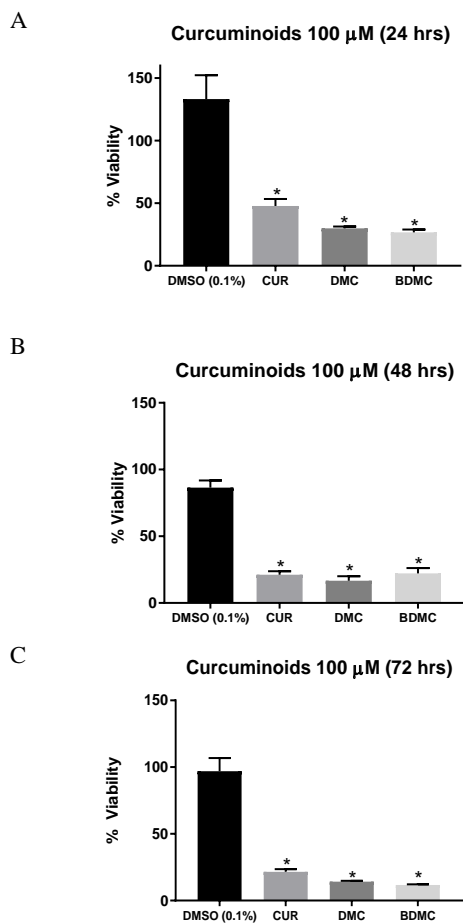


Figure 1. Curcuminoids effect on the viability of multiple myeloma RPMI-8226 cell line. Cells were treated with 0.0001 to 100 µM CUR, DMC or BDMC during 24 (A), 48 (B), or 72

hours (C), and the viability was determined with the MTT assay. The difference in viability as compared with the control (cells treated with DMSO) was statistically significant.

Time-dependency analysis. Figure 2 shows the time-dependency analysis of curcuminoids. In summary, curcumin reduced the cell viability to 47.8%±5.7 after 24 hours and a further reduction to 21.1%±3.0 and 21.6%±2.0 was observed when the incubation period was increased to 48 and 72 hours respectively. A similar pattern was observed with DMC, but in the case of BDMC the maximal reduction of cell viability was observed when the incubation period was increased to 72 hours.

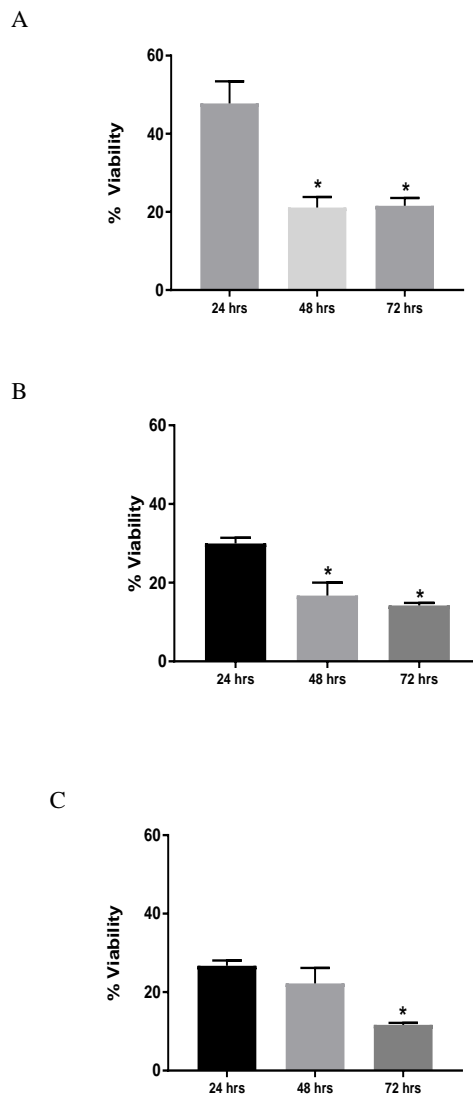
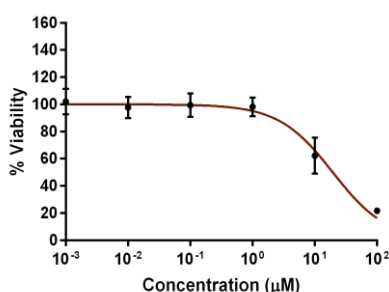


Figure 2. Time dependency of curcuminoids effect on the viability of multiple myeloma RPMI-8226 cell line. Cells were treated with 0.0001 to 100 µM CUR (A), DMC (B) or BDMC (C), during 24, 48, or 72 hours (C), and the viability was determined with the MTT assay. Values are average of three

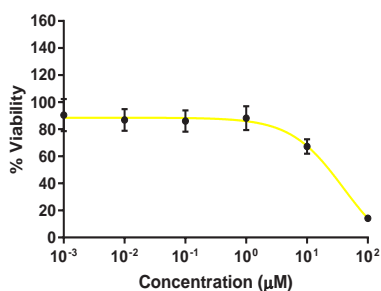
experiments performed in quadruplicates and are expressed as mean \pm SEM. The asterisk indicates that the difference in viability is statistically significant as compared with the reduction of the viability achieved after treating cells for 24 hours.

Pharmacological profile of curcuminoids. To further analyze the curcuminoids pharmacological profile, the IC_{50} was determined by performing a non-linear regression analysis of the points obtained after exposing the cells for 72 hours. The prolonged exposure allowed for all curcuminoids to reach its maximum efficacy. Figure 3 shows the curves obtained for each tested compound.

A



B



C

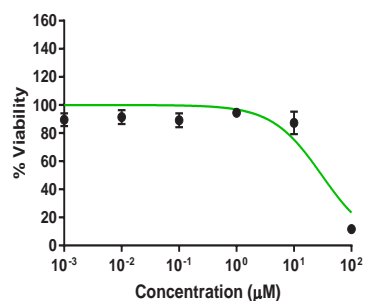


Figure 3. Pharmacological profile of curcuminoids. RPMI-8226 cells were treated with 0.0001 -100 μ M CUR (A), DMC (B) or BDMC for 72 hours (C), and the viability was determined with the MTT assay. Values are average of three experiments performed in quadruplicates and are expressed as mean \pm SEM.

The non-linear regression analysis was done assuming a normalized response using Graph Pad Software (v 7.03).

Table 1 shows the evaluation of four parameters: the minimal viability, the maximal viability, IC_{50} and the 95% confidence. The minimal viability is observed with the highest concentration of the tested compound. The maximal viability is observed with the lowest concentration of the tested compound. The IC_{50} is determined after 72 hours of exposure and it is defined as the concentration at which the cell viability is 50%. The 95% confidence is defined as the range at which it is probable to find the IC_{50} .

Table 1. Summary of evaluated parameter for the tested curcuminoids.

Evaluated parameter	CUR	DMC	BDMC
Lowest cell viability (%) (100 μ M)	21.6 \pm 2.0	14.23 \pm 0.63	11.7 \pm 0.52
Highest cell viability (%) (10 nM)	97.7 \pm 7.9	86.9 \pm 8.0	91.5 \pm 5.0
IC_{50} (μ M)	19.5 \pm 5.5	18.4 \pm 5.9	30.6 \pm 8.4
95% confidence	10.6 to 37	9.4 to 36.7	18.4 to 51

To further evaluate the model that may explain the pharmacological effects of curcuminoids, similar proliferation experiments were done using a concentration range from 1 μ M to 100 μ M. Figure 4 shows the curve obtained for each curcuminoid after analyzing the data with Graph Pad software. As shown, the shape of the curves that describe each curcuminoid were different. For DMC and BDMC a fit with a variable slope was considered, but for curcumin not. The Hill coefficient obtained for DMC and BDMC were 2.48 μ M \pm 0.2891 and 4.13 μ M \pm 1.60 respectively.

Induction of apoptosis by curcuminoids – Morphological changes and Annexin V assay. The detection of apoptosis was done after exposing RPMI-8226 cells for 24, 48 and 72 hours with each curcuminoid at 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M and 0.1 μ M. Figure 5 shows the changes in morphology observed using phase contrast light microscopy. Figure 6 shows the dot plots obtained after analyzing the cells by flow cytometry and shows the sorting and classification of cells as: dead, late apoptosis, early apoptosis and live.

Table 2, 3 and 4 summarizes the net apoptosis induced by CUR, DMC and BDMC respectively. The net apoptotic profile was determined by subtracting the apoptosis induced by DMSO. It

was observed that a higher percentage of cells were in a stage of late apoptosis after 48 hours, when compared to the results obtained after 24 and 72 hours of exposure.

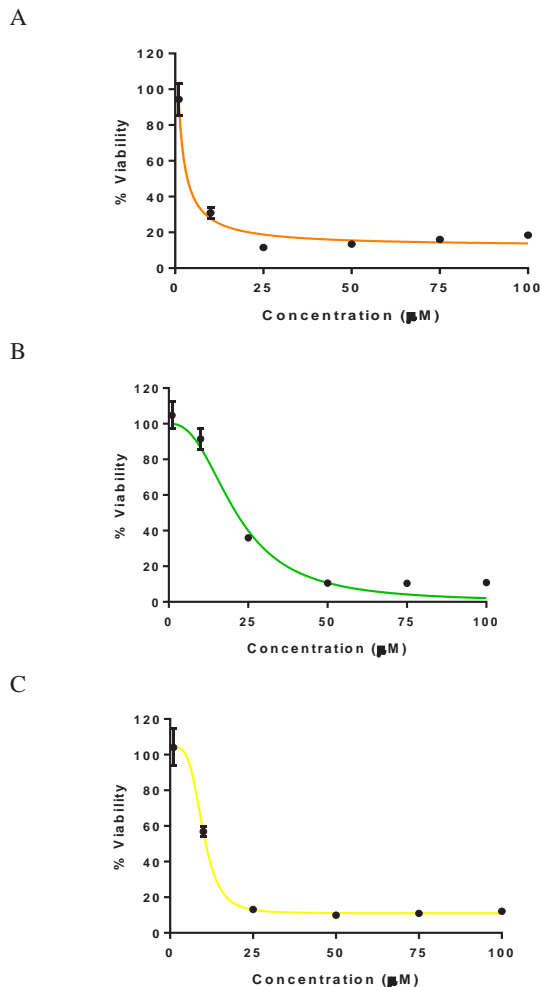


Figure 4. Characterization of the effect of curcuminoids. Cells were treated with 1 -100 µM CUR (A), DMC (B) or BDMC (C) for 72 hours, and the viability was determined with the MTT assay. Values are the average of three experiments performed in quadruplicates and are expressed as mean ±SEM. The non-linear regression analysis was done assuming a variable slope (B and C) and a normalized response using Graph Pad Software (v 7.03).

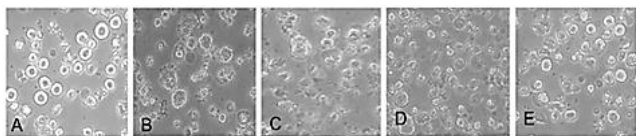


Figure 5. Effects of curcuminoids on the morphology of RPMI-8226 cells after 24 hours of exposure. Cells treated with Curcumin (B), Bisdemethoxycurcumin (C), Demethoxycurcumin

(D) and DMSO (E) exhibited some features of apoptosis such as nuclear condensation, membrane blebbing, cell shrinkage and formation of apoptotic bodies in comparison to untreated control (A). Cells were observed at a 400x total magnification using an inverted light microscope (Olympus, CKX41).

Table 2. Net apoptotic profile induced by CUR.

Period of exposure (hours)	Cell population (%)			
	Curcumin (µM)			
	100	10	1	0.1
24	31.1	7.7	-2	1.05
48	34.95	7.95	3.4	1.8
72	28.1	7.65	-1.2	0.5

Table 3. Net apoptotic profile induced by DMC.

Period of exposure (hours)	Cell population (%)			
	Demethoxycurcumin (µM)			
	100	10	1	0.1
24	36.4	1.8	-3.65	-0.45
48	53.05	12.25	-1.45	-2.95
72	31.6	6.5	0.8	0.65

Table 4. Net apoptotic profile induced by BDMC.

Period of exposure (hours)	Cell population (%)			
	Bisdemethoxycurcumin (µM)			
	100	10	1	0.1
24	41.2	2.1	-1.65	0
48	32.15	6.85	1.55	1.1
72	27.8	0.4	0.25	0.75

Induction of apoptosis by Curcuminoids-Caspase3/7. The activity of caspase-3/7 was determined after treating the cells with curcuminoids for 24 and 72 hours at 100 µM, 10 µM, 1 µM, and 0.1 µM. The activation of caspase was analyzed by flow cytometry and the obtained dot plots are shown in Figure 7. The net apoptotic profile was determined by subtracting the apoptosis induced by DMSO. Tables 5, 6 and 7 summarize the net apoptotic profile for CUR, DMC and BDMC, respectively.

Curcuminoids effect on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in cell line RPMI-8226. Mitochondrial membrane potential changes have been implicated in apoptosis and the changes in the RPMI-8226 cells were determined after a

treatment with curcuminoids at 100 μM , 10 μM , 1 μM , and 0.1 μM for 24 and 72 hours. The dot plots show the distribution of sorted cells among the following stages: live, depolarized/live, depolarized/dead, and dead cells (Figure 8). The percentage of depolarized/ live cells treated with DMSO in concentrations of 0.1%, 0.01%, 0.001% and 0.0001% after 48 hrs was 42.20%, 30.35%, 31.80%, and 28.60%, respectively. Although DMSO (alone) produced depolarization of the mitochondria, cells continue alive. The percentage of depolarized/dead cells exposed to curcuminoids at the tested concentrations were very low ranging from 0.30% (for curcumin) to 1.75% (for demethoxycurcumin).

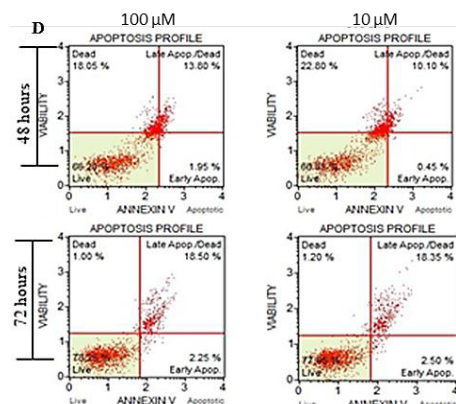
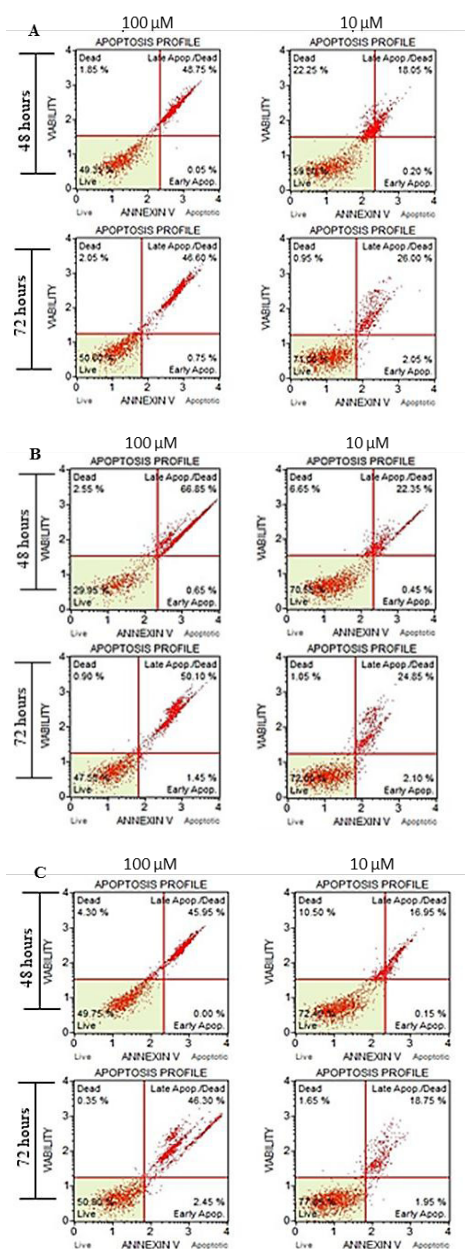


Figure 6. Induction of apoptosis by curcuminoids. Cell death by apoptosis was evaluated by flow cytometry with annexin/propidium iodide staining after treatment with CUR (A), DMC (B) or BDMC (C) at 100, 10, 1 and 0.1 mM for 24, 48 and 72 hours, using DMSO (D) as a control. The obtained dot plots show the distribution of the evaluated cells at different stages: live, early apoptotic, late apoptotic and dead. Among the tested curcuminoids, DMC induced dead by apoptosis to the higher percentage of cells.

Table 5. Net apoptotic profile induced by CUR.

3A Period of exposure (hours)	Cell population (%)			
	Curcumin (μM)			
	100	10	1	0.1
24	23.3	2.7	-0.2	-0.15
72	33.8	3.95	0.2	4.05

Table 6. Net apoptotic profile induced by DMC.

3B Period of exposure (hours)	Cell population (%)			
	Demethoxycurcumin (μM)			
	100	10	1	0.1
24	13.75	4.4	-0.35	-0.75
72	32.65	-1.45	-4.05	0.3

Table 7. Net apoptotic profile induced by BDMC.

3C Period of exposure (hours)	Cell population (%)			
	Bisdemethoxycurcumin (μM)			
	100	10	1	0.1
24	18.9	0.45	-0.65	1.55
72	2.35	0.4	-3.3	2

DISCUSSION

One of the principal limitations for clinical application of curcumin is the low bioavailability and the high intrinsic metabolism, rendering low concentrations in circulation and in the target organs (Anand, Kunnumakkara, Newman and Aggarwal, 2007). Yet, it has also been established, that populations that uses turmeric in a daily basis as part of their dietary intake have a lower incidence of cancer.

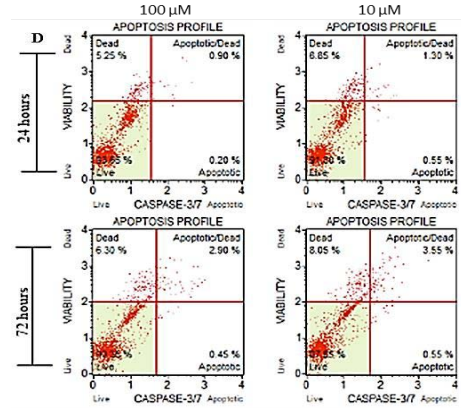
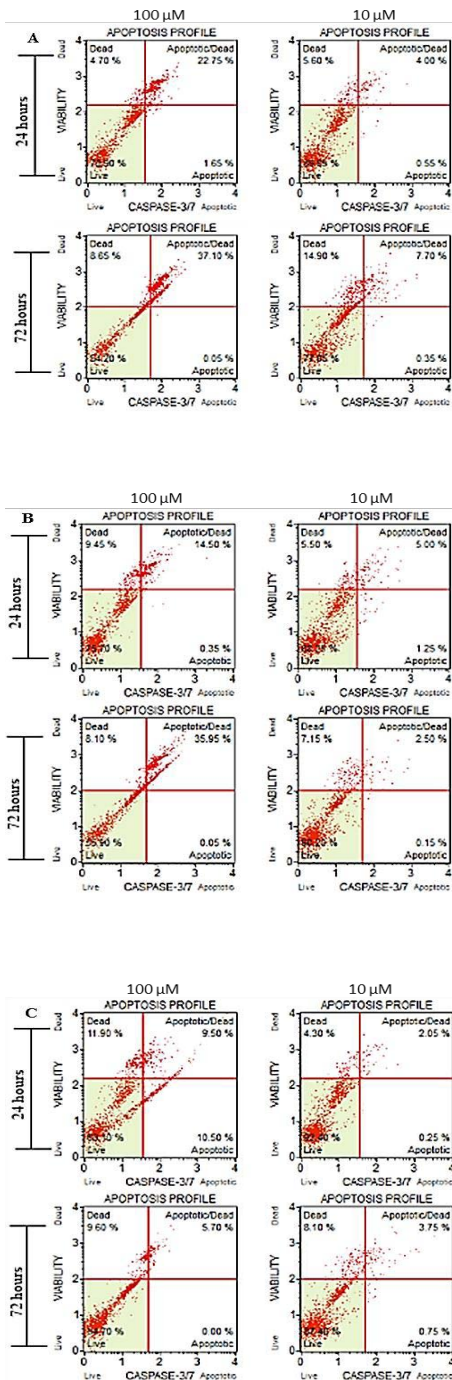
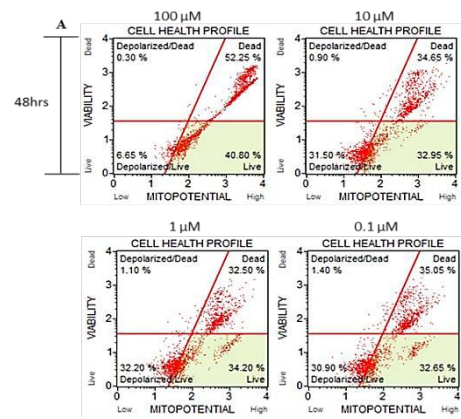


Figure 7. Induction of apoptosis by curcuminoids. Cell death by apoptosis mediated by caspase 3/7 was evaluated by flow cytometry using DNA binding dye linked to a DEVD peptide substrate/propidium iodide staining, after treatment with CUR (A), DMC (B) or BDMC (C) at 100, 10, 1 and 0.1 μM for 24 and 72 hours, using DMSO (D) as a control. The obtained dot plot shows the distribution of the evaluated cells at different stages: live, apoptotic/dead, and dead. Figure includes the plots obtained for the highest tested concentrations.

Therefore, to understand what may explain the beneficial effects of consuming turmeric, the objective of this study was to analyze the pharmacological properties of three of the principal curcuminoids CUR, DMC and BDMC. Our data shows that curcumin reduced cell viability, consistent with what has been previously described for the RPMI 8226 cell line (Sung et al., 2009, Park et al., 2008). The proliferation analysis demonstrated that principal curcuminoids have biological activity with differences in their pharmacological profile. For example, it was observed that curcumin has an earlier onset of action, (after 24 hours cell viability was reduced almost to half), and after 48 hours the maximal inhibitory capacity was reached. The same is true for DMC, but for BDMC, the maximal inhibitory capacity was reached when cells were exposed for 72 hours to the treatment.



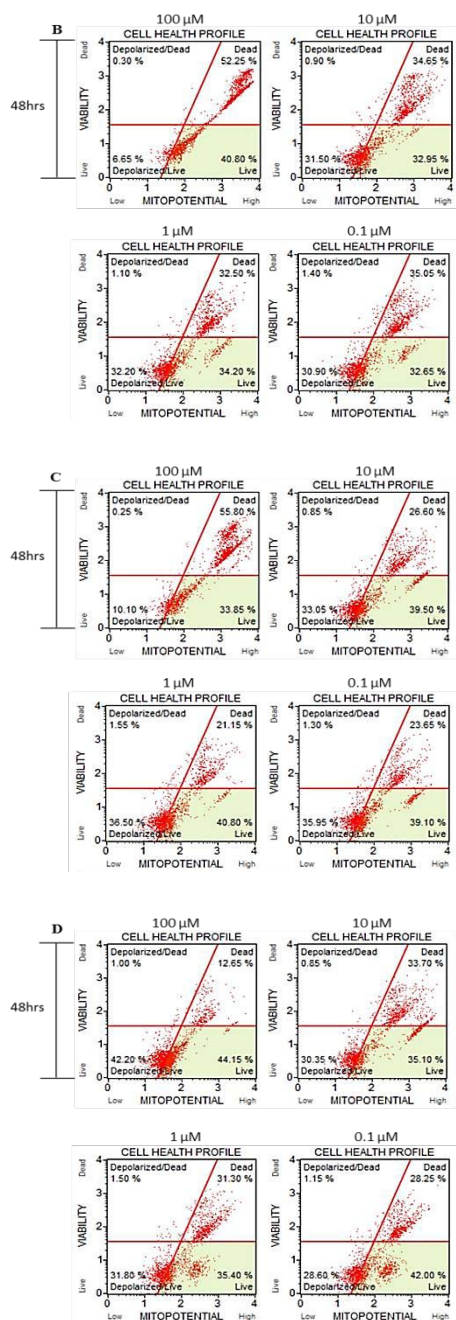


Figure 8. Induction of apoptosis by curcuminoids. Cell death by apoptosis through the activation of the intrinsic pathway was assessed by detecting depolarization of the inner membrane of the mitochondria using flow cytometry after staining cells with a cationic lipophilic dye and 7-ADD as a dead cell indicator. Prior to staining the cell were treated with CUR (A), DMC (B) or BDMC (C) at 100, 10, 1 and 0.1 μM for 48 hours, using DMSO (D) as a control. The obtained dot plots show the distribution of the evaluated cells at different stages: live, depolarized/live, depolarized/dead and dead.

It is interesting that at low physiological doses ($< 1 \mu\text{M}$), DMC and BDMC exhibited a slight inhibitory effect, however this was not observed for curcumin. One important pharmacological parameter is the IC_{50} , that is, the concentration at which the cell viability is 50%. This is an indicator of the relative potency of a pharmacological compound. The lowest the IC_{50} value is, the higher the potency of the curcuminoid tested. Also, the 95% confidence indicates the range at which is 95% probable to find the IC_{50} value. The lower the range, the more accurate is the determination of the IC_{50} performed. The determined IC_{50} for CUR was $19.5 \pm 5.5 \mu\text{M}$, similar to the one obtained by Gomez-Bougie *et al.* (2015), who reported a value of $17.2 \pm 3 \mu\text{M}$ using the same cell line. DMC exhibit a slightly lower value ($18.4 \pm 5.0 \mu\text{M}$) and 95% confidence value from 9.4 to 36.7, which suggest that DMC shows a higher potency. The relative potency of curcuminoids characterized for the MM cell line RPMI-8226 is as follows: Demethoxycurcumin \geq Curcumin $>$ Bis-demethoxycurcumin. The efficacy among the compounds can be compared by determining which can reach the maximum response. After 24 hours of exposure, DMC and BDMC appear to be slightly more effective than curcumin at high concentration (100 μM), as shown in Figure 1. At low concentrations (1 μM), it was observed that DMC reduced cell viability to approximately 10% (results not shown).

The curve fitting analysis demonstrates that each curcuminoid has a unique mathematical model that describes its interaction with a biological system. The non-linear regression analysis determined that there is a Hill slope or Hill coefficient for bis-demethoxycurcumin and demethoxycurcumin. According to Prinz (2010), when there is Hill slope suggests that there is a “complex pattern of interactions between the compounds” and the biological effector. Therefore, we are proposing that BDMC and DMC may act through an allosteric mechanism, whereas curcumin does not. However, viability experiments do not provide information as to which protein explains this type of interaction, and further experimentation is required to identify with which protein (s) this type of mechanism is observed.

An important group of proteins to evaluate is the regulators and effectors of apoptosis, since previous studies have revealed that curcumin induces apoptosis of myeloma cells RPMI 8226 lines (Mistiades *et al.*, 2002). The morphological features of apoptosis were analyzed after treating RPMI-8226 cells with curcuminoids for 48 hours. Some indicators of apoptosis such as, nuclear condensation, membrane blebbing, cell shrinkage and formation of apoptotic bodies were observed (Figure 5). As shown in Table 3, DMC seems to induce apoptosis (up to 53.05%) more effectively when cells were treated during 48-hours. We found that at low concentrations (0.1 μM) curcuminoids did not induced apoptosis in myeloma cells. The results obtained in the preliminary Annexin V experiments, agreed with previously published data since the curcuminoids induced apoptosis in

RPMI-8226 cells.

The activation of caspase-3/7 was evaluated since different pathways leading to apoptosis depend on this process. The preliminary data suggest that among the tested curcuminoids, once again DMC was observed the highest caspase 3/7 activation (Table 6). To determine whether curcuminoid-induced apoptosis involves the mitochondria-mediated intrinsic apoptotic pathway, treated cells were stained with a cationic lipophilic dye. As shown in Figure 8, treatment in the μM range resulted in a low cell percentage depolarized/dead, indicating that the intrinsic pathway of apoptosis may not be initial activator of the cell dead mediated by apoptosis.

In summary, it was observed that curcuminoids can induce apoptosis in the RPMI-8226 cell line of multiple myeloma, mainly by the extrinsic pathway, being demethoxycurcumin the compound capable of inducing the highest apoptosis. Further evaluations of intracellular pathways should be done for each of the curcuminoids. The difference in the pharmacological profile, particularly of DMC, could represent an opportunity to design a combination of this natural product with classical therapies that may enhance the prognosis of MM patients. These findings also provide useful information for understanding the anticancer properties attributed to curcuminoids.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Science and Technology Department, of the Inter American University of Puerto Rico Arcibo Campus and the Xerox foundation. The MUSE Cell Analyzer used to study the apoptotic profile of MM cells was acquired with funds from the US Department of Education, MSEIP Project, (Award number P120 A150082).

REFERENCES

Adamová, E., Lišková, M., Matalová, E., & Klepárník, K. (2014). A miniaturized device for bioluminescence analysis of caspase-3/7 activity in a single apoptotic cell. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(22), 5389-5394.

Al Dhaheri, Y., Attoub, S., Ramadan, G., Arafat, K., Bajbouj, K., Karuvantevida, N. & Iratni, R. (2014). Carnosol induces ROS-mediated beclin1-independent autophagy and apoptosis in triple negative breast cancer. *PLoS one*, 9(10), e109630.

Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., & Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Molecular Pharmaceutics*, 4(6), 807-818. doi: 10.1021/mp700113r

He, Y., Yue, Y., Zheng, X., Zhang, K., Chen, S., & Du, Z. (2015). Curcumin, Inflammation, and Chronic Diseases: How

Are They Linked?. *Molecules*, 20(5), 9183-9213. doi: 10.3390/molecules20059183

Heger, M., Golen, R.F., Broekgaarden, M., & Michel, M.C. (2013). The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacological Reviews*, 66, 222-307.

Kyle, R. (2010). Diagnosis and treatment of multiple myeloma in 2010. *Revista de Hematología*, 11(1), 30-39.

Li, S., Yuan, W., Deng, G Wang, P., Yang, P., & Aggarwal, B. (2011). Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa L.*). *Pharmaceutical Crops*, 2, 28-54.

Madonna, G., Ullman, C., Gentilcore, G., Palmieri, G., & Ascierto, P. (2012). NF-KB as potential target in the treatment of melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 10(53), 1-8.

Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Poulaki, V., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., ... Anderson, K.C. (2002). Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99(22), 14374-14379.

Park, J., Ayyappan, V., Bae, E., Lee, C., Kim, B., Kim, B. K., Yoon, S. (2008). Curcumin in combination with bortezomib synergistically induced apoptosis in human multiple myeloma U266 cells. *Molecular Oncology*, 2(4), 317-326. doi: 10.1016/j.molonc.2008.09.006

Prinz, H. (2010). Hill coefficients, dose-response curves and allosteric mechanisms. *Journal of Chemical Biology*, 23(1), 37-44. doi:10.1007/s12154-009-0029-3.

Sung, B., Kunnumakkara, A. B., Sethi, G., Anand, P., Guha, S., & Aggarwal, B. B. (2009). Curcumin circumvents chemoresistance in vitro and potentiates the effect of thalidomide and bortezomib against human multiple myeloma in nude mice model. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(4), 959-970. doi:10.1158/1535-7163.mct-08-0905.

Zheng, C., Fan, Y., Wu, S., Cai, X., & Shi, Y. (2016) Synergistic effects of curcumin and bortezomib. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 9(11), 21787-21793

AUTHORS/AUTORES

Delinés Fuentes Cabrera and Lee Gelpí Acevedo. Are students of the B.S. in Biotechnology from the Inter American University of Puerto Rico, Arcibo Campus. They developed this research project during their senior year.

Estudiantes del B.S. en Biotecnología de la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo. Desarrollaron esta investigación en su último año de estudios.

Kevin Ongay Montero. Is a student of the B.S. in Biotechnology from the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus. He developed this research project during his junior year of study.

Es estudiante del B.S. en Biotecnología de la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo. Desarrolló esta investigación en su penúltimo año de estudios.

Carola Torres Díaz. Is a student of the B.S. in Biology from the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus. She developed this research project during her senior year.

Es estudiante del B.S. en Biología de la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo. Desarrolló esta investigación en su último año de estudios.

Karen Woolcock Rodríguez. Professor in the Department of Science and Technology at the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus. Earned a doctoral degree (Ph.D) in Pharmacology and an M.S. in Pharmacology / Toxicology from the University of Puerto Rico, Medical Sciences Campus. She has published many articles in peer-reviewed journals. May be contacted via email at: kwoolcock@arecibo.inter.edu

Posee el rango de Catedrática de Departamento de Ciencias y Tecnología de la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo. Obtuvo un grado doctoral (Ph.D) en Farmacología y una maestría M.S. en Farmacología y Toxicología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Ciencias Médicas. Ha publicado varios artículos en reconocidas revistas profesionales. Puede ser contactada a través del correo electrónico: kwoolcock@arecibo.inter.edu

Detection, isolation, and identification of *Salmonella* spp. in commercial chicken (*Gallus gallus domesticus*) and green iguana's (*Iguana iguana*) meat

Detección, aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en pollo comercial (*Gallus gallus domesticus*) y carne de iguana verde (*Iguana iguana*)

Ramos, A. M., Serrano, V. J., Viruet, I., González, V., and Puente Rolón, A.

Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus, Science and Technology Department

ABSTRACT

Salmonella is a gram-negative rod shaped pathogen, able to cause a vast range of diseases in living organisms associated by food ingestion. Food poisoning, also known as salmonellosis could last 4 to 7 days with symptoms like diarrhea, nausea, vomiting, and so on. Samples of commercial chicken and iguana's meat were processed for the isolation of *Salmonella* spp. through selective grow mediums, so the samples could be examined with the biochemical tests including RapID ONE, with the purpose of identifying *Salmonella* spp. The test results, showed the presence of *Salmonella* spp. in the commercial chicken and in the iguana's meat, also it was identified at least one species of *Salmonella* spp. which was *S. choleraesuis*, without discarding the possibility of the existence of other species of this microorganism in both meats. Other enteric were found like *Escherichia coli* and *Serratia marcescens*.

RESUMEN

Salmonella es un patógeno Gram negativo capaz de causar enfermedades asociadas con alimentos en los seres vivos. La intoxicación por alimentación, también conocida como salmonelosis posee una duración de 4 a 7 días, con síntomas como la diarrea, náuseas, vómitos, entre otros. Se obtuvieron muestras de pollo comercial y de carne de iguana, las cuales fueron procesadas para el aislamiento de *Salmonella* spp. a través de medios de crecimiento selectivos, para que de esta forma fueran examinadas por medio de las pruebas bioquímicas incluyendo RapID ONE, con el propósito de identificar *Salmonella* spp. Los resultados obtenidos, mostraron que había presencia de al menos una especie de *Salmonella* spp. en el pollo comercial y en la carne de iguana, la cual fue identificada como *S. choleraesuis*, esto sin descartar la posibilidad de la existencia de otras especies de este microorganismo. Otros entéricos fueron identificados tales como *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*.

KEYWORDS salmonellosis, chicken, iguana, RapID

PALABRAS CLAVE salmonelosis, pollo, iguana, RapID

INTRODUCTION

Salmonella is a Gram-negative, rod shaped, non-spore forming bacteria, which is considered one of the major food-borne pathogens. This microorganism can be spread mainly through the stool. People become infected by the ingestion of contaminated food. This food could be contaminated during its handling, and processing, without proper hygiene; or by the contact with feces (excrement). This type of food poisoning, could last four to seven days with symptoms like diarrhea, fever, abdominal pain, headache, nausea, and vomiting. Symptoms appear 12 to 72 hours after infection. Most of the people recover without need of treatment. However, in some cases the infection could spread to the blood stream (Nesa, Khan, and Alam, 2011).

According to the Centers for Disease Control and Prevention (2016), in the United States annually occur due to non-typhoidal *Salmonella* 1.2 million of infections of which 450 end on fatalities. Also, the group that shows more vulnerability to this type of infection are children who are 5 years old or younger, adults older than 65 years old, as well as people with weakened immune systems are at greater risk of severe infection.

The aim of this research is to determine if there are *Salmonella* spp in commercial chicken (*Gallus gallus domesticus*) and in Green iguana's (*Iguana* and compare the ones present *iguana*) meat, and compare them.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and processing

Two commercial packages of chickens parts were obtain from a local super market. Seven samples of 25 grams were taken from each chicken package. In addition, five samples of green iguana’s tail meat, each one of 25 grams, were obtained from capture wild iguanas in the west part of Puerto Rico (Figure 1). These samples (commercial chicken and the green iguana’s meat) were transferred to Buffered Peptone Water, for the pre-enrichment prior to the selective enrichment for the isolation of *Salmonella. Spp.* All samples were incubated in a shaker for 37°C. Then, 1 mL of each sample from the commercial chicken and the green iguana’s meat were transferred to the selective médiums, Rappaport- Vassiliadis broth and Tetrathionate broth, for the selective enrichment and growth of *Salmonella spp.* Samples were incubated for 24 hours at 37 °C.



Figure 1. Samples of commercial chicken and green iguana’s meat.

From the samples in the Rappaport- Vassiliadis broth and Tetrathionate broth, an aliquot of each simple was inoculated in selective mediums, which are used to allow the specific growth of a group of microorganisms (López and Torres, 2006). These selective mediums were Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD), Brilliant Green Agar (BGA) and Bismuth Sulfite Agar (BSA). After inoculation and incubation for 24 hours at 37°C, a simple was passed to Tryptic Soy Agar (TSA), to obtain pure sample and to compare the morphology of the isolated colonies to the characteristics of *Salmonella spp.* (Figure 2.)

A Serial Dilution was performed using the standardize method to obtain and compare the Colony Forming Units between the commercial chicken and the green iguana’s meat. (Figure3).

Identification tests

The Gram Stain was done to compare the morphology of the bacterial cells. From the results obtained it was confirmed the characteristics of *Salmonella spp.* because the bacterial cells were presented as Gram-negative bacillus with straight rods, single, grouped or in chains. From the confirmation of the Gram

Stain method, a series of biochemical tests were performed, for the identification of *Salmonella spp.* and these tests were Triple Sugar Iron (TSI), Indol, Lysine Decarboxilase Broth and the Urea test.

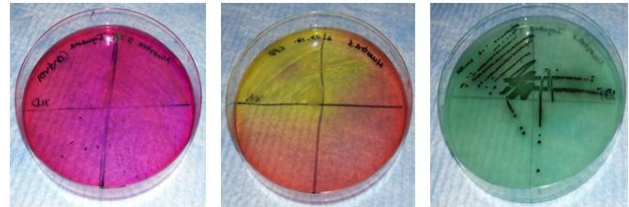


Figure 2. Selective mediums (Xylose Lysine Deoxycholate, Brilliant Green and Bismuth Sulfite Agar) with the commercial chicken and green iguana’s meat samples.

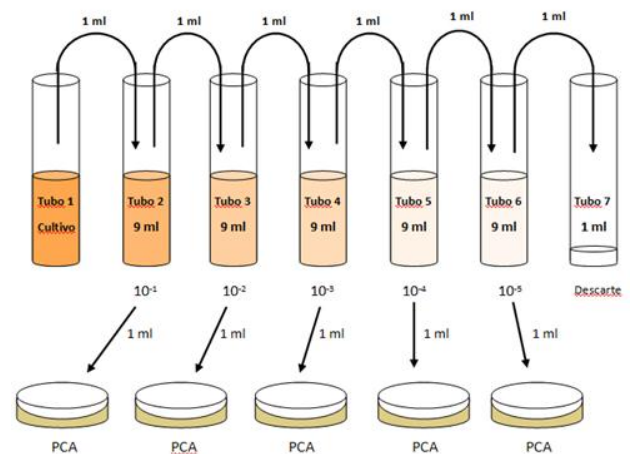


Figure 3. Serial Dilution performed from commercial chicken and green iguana’s samples inoculated in Tetrathionate médium.

RapID ONE

The RapID ONE test executed has a qualitative micro method for the identification of the *Enterobacteriaceae* or other Gram negative bacilli. According to THERMO FISHER SCIENTIFIC (2016), for this procedure is important to prepare the inoculums for 18, 24 or 48 hours. In this case it was prepared a subculture of the samples of the commercial chicken and the iguana’s meat to a Tryptic Soy Agar medium. Then, a suspension with the growth from the agar was made in a RapID Inoculation Fluid (2mL) to achieve turbidity equal to a #2 McFarland turbidity standard or equivalent. The suspensions was mixed thoroughly and vortexed. After this step, it was peeled back the panel over the inoculation port by pulling the tab marked “Peel to Inoculate” up and to the left. Using a pipette gently, it was transferred the entire contents of the Inoculation Fluid tube into the upper right-hand corner of the panel (Figure 4). The inoculation port of the panel was resealed by pressing the peel-

back tab back in place. After adding the test suspension, and while keeping the panel on a level surface, it was tilted the panel back away from the reaction cavities at approximately a 45-degree angle. While tilted back, it was gently rocked the panel from side to side to evenly distribute the inoculum along the rear baffles. The panel was slowly tilt forward toward the reaction cavities until the inoculum flows along the baffles into the reaction cavities, evacuating all the inoculums from the rear portion of the panel. Then the panel was returned to a level position and was incubated at 35-37°C in non-CO₂ incubator for 4 hours.

After this period of time, firmly holding the RapID ONE panel on the bench top, it was peeled off the label lid over the reaction cavities by pulling the lower right hand tab up and to the left. Then, 2 drops of RapID ONE Reagent from cavities 15 (PRO) through 17 (PYR) were added. From cavities 1 (URE) through 18 (ADON) from left to right using the interpretation guide, the results were read and scored. In addition, 2 drops of RapID Spot Indole Reagent were added to cavity 18 (ADON/IND). Then the test cavity 18 (IND) was read and scored. Finally the scores were record on the report form, to obtain the microcode for the identification in ERIC, which is a system used to identify the microorganism in this type of test.

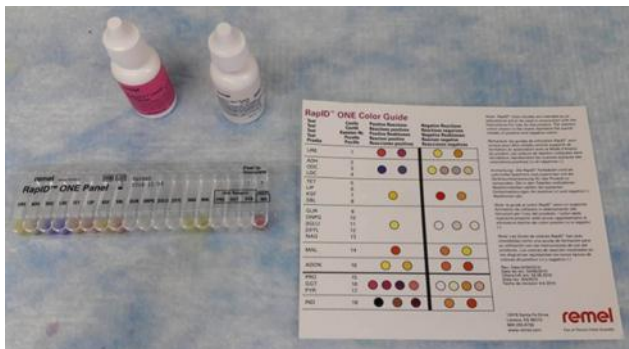


Figure 4. RapID ONE performed for the identification of the commercial chicken and the green iguana's meat.

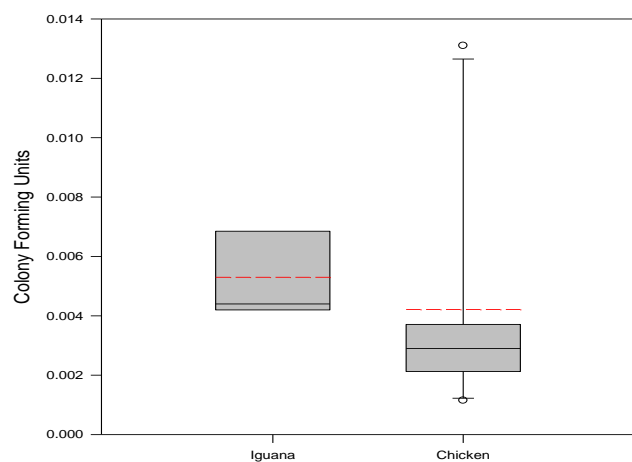
RESULTS AND DISCUSSION

Once it was obtained the results from the Serial Dilution, the Mann-Whitney Rank Sum, a non parametric test (which means the distribution would not show a normal distribution) was made, and it was founded that the green iguana's meat had more Colony Forming Units in comparison with the commercial chicken (Figure 5). This is because the green iguana's meat was fresher than the commercial chicken, and the chicken was exported from North America and had passed through series of processes including the washing which could have helped the chicken to be less exposed from contamination.

The results obtained from the biochemical tests confirmed the presence of *Salmonella spp.* since it was obtained a 50.3% from

the commercial chicken and 52.5 % from the green iguana's meat, which it means that the possibilities of both meats to be contaminated with *Salmonella spp.* were pretty much the same because the difference was just 2%. With the Rapid ID ONE test it was identified at least one species of *Salmonella spp.* which was *S. choleraesuis*, without discarding the possibility of the existence of other species of this microorganism in both meats. This microorganism causes Acute Gastroenteritis with symptoms like headache, abdominal pain, vomiting, diarrhea and others, and it can be acquired through ingestion of food, from infected animals (Universidad Nacional Autónoma de Mexico, 2011).

Figure 5. Mann-Whitney Rank Sum, performed with the Colony Forming Units of the commercial chicken and the green iguana's meat samples. $T = 65.000$, $P = 0.040$.



During research, we observed the fermentation of the medium XLD and we documented the presence of *Escherichia coli* in both samples of meat (Figure 6). This find was confirmed through the use of Eosin Methylene Blue, which is a selective medium that acquire a metallic green color when *Escherichia coli* is present.

This microorganism (*E. coli*) has great clinical importance, because out of the intestinal tract it can cause bleeding diarrhea, urinary tract infections, and other illnesses (CDC, 2015). Since some of the Eosin Methylene Blue turns purple instead of metallic green, we examined the samples using RapiD One test (Figure 7).

Based on the results, we identified the opportunistic human pathogen *Serratia marcescens*, wich is associated with nosocomial infections. This microorganism has been associated with respiratory tract infection, meningitis, endocarditis, and so on (Fedrigo, Campoy, Venanzio, Colombo, & Garcia, 2011).

Based on all the observed results we can conclude that both chicken and iguana's meat can be consumed by carrying out the proper cooking process. Future directions may be focus on increasing sample size. Also, the use of molecular techniques

can be applied to for the identification of all *Salmonella* species to be able to perform better comparisons.



Figure 6. Presence of metallic green in the selective medium Eosin Methylene Blue after 24 hours of incubation.



Figure 7. Purple color in Eosin Methylene Blue after 24 hours of incubation due by the presence of *Serratia marcescens*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Lizbeth Romero and the Inter American University Arecibo Campus for providing the materials and assistance.

REFERENCES

Centers for Disease Control and Prevention. (2015). *Escherichia coli*.

Centers for Disease Control and Prevention. (2016). *Salmonella* Technical Information.

Fedrigo, G.V., Campoy, E. M., Venanzio, G. D., Colombo, M. I. & Garcia, E. (2011). *Serratia marcescens* Is Able to Survive and Proliferate in Autophagic-Like Vacuoles inside Non-Phagocytic

Cells. *PLoS ONE*, 6(8). e24054. doi: 10.1371/journal.pone.0024054

López Tévez, L., & Torres, C. (2006). *Universidad del Nordeste*. Retrieved from <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>

Ministerio de la Salud. (2011, december 1). Retrieved from http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_i.pdf

Nesa, M. K., Khan, M. S., and Alam, M. (2011). Isolation, identification and characterization of salmonella serovars from diarrhoeic stool samples of human. *Medicine*, 9(1), 85-93.

Puerta, A., & Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426-31.

Swearingen, M. C., Porwollik, S., Desai, P. T., McClelland, M., & Ahmer, B. M. (2012). Virulence of 32 Salmonella strains in mice. *PLOS One*, 7(4). e36043. doi:10.1371/journal.pone.0036043.

AUTHORS/AUTORES

Ashley M. Ramos, Víctor J. Serrano, and Isamarie Viruet. Students of B.S. in Biology from the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus. They developed this research during their senior year.

Son estudiantes del B.S. en Biología de la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo. Desarrollaron esta investigación durante su último año de estudios.

Vanessa González. Microbiology Laboratory Technician and Professor at the Science and Technology Department at the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus.

Técnico de Laboratorio de Microbiología y Profesor del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Campus de Arecibo.

Alberto Puente Rolón. Researcher and professor at the University of Puerto Rico, Mayaguez Campus. Earned a doctoral degree (Ph.D) in Tropical Ecology and an M.S. in Biology / Ecology at the University of Puerto Rico, Río Piedras and Mayaguez Campus, respectively. He has published several articles in peer reviewed journals. May be contacted via email: apuente@arecibo.inter.edu.

Researcher and professor at the University of Puerto Rico,

Mayaguez Campus. Earned a doctoral degree (Ph.D) in Tropical Ecology and an M.S. in Biology / Ecology at the University of Puerto Rico, Río Piedras and Mayaguez Campus, respectively.

He has published several articles in peer reviewed journals. May be contacted via email: apuente@arcibo.inter.edu.

Extracción y cuantificación de alicina en ajo (*Allium sativum*) y otros productos comerciales por medio de HPLC

Extraction and quantification of allicin in garlic (*Allium sativum*) and other commercial products by HPLC

Soto Balseiro, R., González López, V., Herrera, A., and Ortiz Maldonado, J.

Departamento de Ciencias y Tecnología, Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo

ABSTRACT

Due to the development of antibiotic-resistant microorganisms, evaluating new antibiotic alternatives, particularly natural options is vital. Garlic has proven to exhibit antibiotic properties against microorganisms of pathological importance. Mostly, that quality has been attributed to allicin. The objective of this work is to determine the concentration of allicin in natural garlic bulbs and compare it with the concentration found in commercially available products (garlic powder capsules and garlic cooking salt) using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Our results show that garlic bulbs contain 36.54 µg/ml, garlic powder capsules 18.35 µg/ml, and garlic powder 34.05 µg/ml of allicin. Those concentrations are high enough to serve as inhibitors of bacteria like *Staphylococcus epidermidis*, as described in previous investigations. Further studies are required to evaluate other garlic products and do microbial inhibition assays.

RESUMEN

Debido al desarrollo de cepas de microorganismos resistentes a los antibióticos, evaluar nuevas opciones de antibióticos, particularmente alternativas naturales es vital. El ajo exhibe propiedades antibióticas en contra de microorganismos de importancia patológica. Principalmente, esta capacidad se le atribuye a la alicina que se encuentra en el ajo. El objetivo de este estudio es determinar la concentración de alicina en ajo fresco y compararla con la concentración en productos comerciales (cápsulas de polvo de ajo y sal de ajo) utilizando Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC). Nuestros resultados muestran que el ajo fresco contiene 36.54 µg/ml, las cápsulas de ajo en polvo 18.35 µg/ml y el polvo de ajo 34.05 µg/ml de alicina. Estudios previos han demostrado que estas concentraciones son suficientemente altas para inhibir bacterias como *Staphylococcus epidermidis*. Estudios futuros se requieren para evaluar otros productos de ajo y realizar ensayos de inhibición microbiana.

KEYWORDS garlic, allicin, antibiotic, HPLC, extraction

PALABRAS CLAVE ajo, alicina, antibiótico, HPLC, extracción

INTRODUCCIÓN

Aunque las propiedades del ajo (*Allium sativum*) han sido explotadas a través de siglos, no fue hasta 1944 que se investigó por primera vez su capacidad antimicrobiana (Cavallito y Bailey, 1944). Estas propiedades se le atribuyen a la alicina (Cavallito y Bailey, 1944) (S-Alil-2-propentiosulfonato), que se sintetiza cuando la enzima alinasa actúa sobre la molécula de aliina que se encuentra en el ajo (Figura 1). La enzima alinasa se encuentra encapsulada en celdas en el citoplasma, de manera que el sustrato (aliina) sólo tiene acceso a la enzima cuando se rompe el tejido de las celdas (al ser machacado, triturado o cortado) en las cuales se encuentra la alinasa, provocando la formación de alicina. Este compuesto representa ~70% de los compuestos sulfurados que se encuentran en el ajo (Díaz Jiménez y Jiménez López, 2008). Varios investigadores han determinado y cuanti-

ficado alicina en ajo fresco, seco o productos basados en ajo (Lawson, Wood y Hughes, 1991; Lawson, 1998; Lawson y Wang, 2001; Prati, Henrique, Souza, Silva y Pacheco, 2014; Ribak, Calvey y Harnly, 2004; Silva, Moretti y Matos, 2010) obteniendo distintos valores de concentración en las muestras analizadas.

En un estudio previo (Iberl, Winkler, Muller y Knoblock, 1990) se utilizó Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (High Performance Liquid Chromatography- HPLC) para evaluar el contenido de alicina en muestras de ajo obtenidas de distintos lugares. Sus resultados mostraron que el ajo contenía un 0.4% de alicina. En otro estudio reciente, realizado por Bose y colegas (Bose, Laha y Banerjee, 2014) también utilizaron HPLC para

determinar la concentración de alicina en extractos de ajo fresco preparados de cuatro maneras distintas. Utilizaron 30 g de ajo y lo mezclaron con 300 ml de agua utilizando una licuadora. Ese extracto luego fue macerado en frío, tratado con ultra sonido o con microondas y obtuvieron concentraciones de alicina de 3.33 a 9.53 µg/ml. En el 2016, se realizó un estudio evaluando 20 cultivares de ajo de una reserva de germoplasma en China (Hayat, et al., 2016). Se utilizó HPLC para cuantificar la concentración de alicina y la misma varió desde 0.66 mg/g (mínima) hasta una máxima de 3.98 mg/g. Estos estudios muestran que la técnica de HPLC es efectiva para cuantificar la concentración de alicina en ajo.

El objetivo de esta investigación fue determinar y cuantificar alicina en ajo fresco utilizando HPLC y comparar su concentración con productos comerciales (cápsulas de polvo de ajo y polvo de ajo para cocinar).

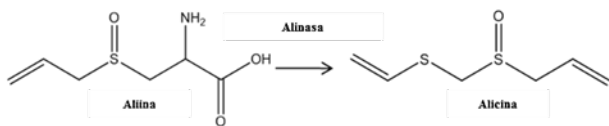


Figura 1. Reacción de formación de alicina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó una solución de alicina (NC0771584 Fisher Scientific) para la curva de calibración. Las muestras fueron filtradas utilizando una membrana de 0.47 µm (Nuclepore coporation, Stock No. 410400). Se utilizaron cápsulas de ajo en polvo (Aged Garlic Extract Odorless Organic Garlic Supplement) y ajo en polvo (Garlic powder). Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC Hewlett Packard 1100 series, C18 column). Los parámetros se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros utilizados para el análisis por HPLC.

Columna	Sistemas Agilent Series 1100 C18
Fase móvil	Methanol: Water (45:55)
Rango del Flujo	0.800 mL/min
Detector	VWD Signal 230 nm
Volumen de Inyector	20.0 µL
Temperatura de la Columna	25.0 °C
Tiempo de Corrida	15 min

Cuantificación de alicina en ajo puro

Se utilizaron cuatro dientes de ajo a los cuales se le removió la piel exterior y se trituraron en una licuadora. Se pesaron 0.500-

0.600 g del ajo triturado y se mezclaron con agua (4 °C). Se agitaron las muestras por 30 segundos. Una vez homogeneizadas las muestras, se filtraron utilizando una membrana de 0.47 µm. Cada muestra se realizó en duplicado.

Cuantificación de alicina en Pastilla de Ajo en polvo

Para este análisis se utilizó un producto comercial que se utiliza como un suplemento alimenticio en forma de cápsulas, las cuales según la etiqueta contienen 600 mg de extracto de ajo envejecido en polvo equivalente a un bulbo de ajo (t). Las cápsulas de ajo se abrieron y del contenido se pesaron alrededor de 0.100 a 0.200 g y se procesaron de igual forma que el ajo triturado.

Cuantificación de alicina en polvo de ajo de cocinar

La última muestra que se utilizó para la determinación de su contenido de alicina fue el producto comercial mercadeado como ajo en polvo para cocinar. La etiqueta señala que 1/8 cda de ajo en polvo equivale a 1 diente de ajo fresco. Del recipiente se extrajo y pesaron muestras de 0.100 a 0.200 g del ajo en polvo y se procesaron como se menciona antes.

RESULTADOS

Se construyó una curva de calibración con los datos obtenidos de las áreas determinadas por HPLC del estándar de alicina al 98%, para determinar la constante de calibración, k=5002.66, (ecuación 1 y Tabla 2) y la concentración de alicina en las muestras (ecuación 1 y 2).

$$k = \frac{Area}{mg} \tag{1}$$

$$mg = \frac{Area}{k} \tag{2}$$

La ecuación (2) se utilizó para la determinación de la masa de los analitos con las áreas obtenidas por medio del análisis de HPLC.

Se determinó que los dientes de ajo tenían una concentración promedio de 2.252 mg de alicina por cada gramo de la muestra (Tabla 3). De acuerdo con la literatura, los valores de las concentraciones de alicina en dientes de ajo fluctúan entre 3.37 a 7.74 mg/g (wet basis) (Bose, Laha y Banerjee, 2014; Prati et al., 2014; Ribak, Calvey y Harnley, 2004). Nuestros resultados se asemejan a los de Ribak et al., (2004).

Por otro lado, se determinó que la concentración promedio de alicina en las cápsulas de ajo contenían 8.641mg/g (Tabla 4), mientras que el polvo de ajo para cocinar según nuestros cálculos contenía 19.375 mg/g de alicina (Tabla 5) en promedio. Prati et al., (2014) reportó en su investigación que la concentración de

alicina en ajo puro determinado por “dry basis” en algunas variedades de *Allium sativum* fluctuaba entre 20.73 mg/g a 24.31 mg/g, por lo que al menos el polvo de ajo para cocinar demostró estar cerca de esos.

Tabla 2. Resultados de las áreas (mAU) determinadas por HPLC de estándar de alicina y la contante de distribución k.

Masa muestra (g)	Area (mAU)	Masa alicina (mg)	Concentración alicina en muestra (mg/g)
0.5115	616.85852	1.227	2.399
0.5959	770.56165	1.533	2.573
0.5112	426.97583	0.849	1.662
0.5924	706.90179	1.406	2.374
		media	2.252±0.403

Tabla 3. Áreas, masa y concentración “dry basis” obtenidas de los las cápsulas de ajo en polvo ($p \leq 0.05$).

Masa muestra (g)	Area (mAU)	Masa alicina (mg)	Concentración alicina en muestra (mg/g)
0.1020	321.26428	0.639	6.266
0.2021	931.43219	1.853	9.169
0.1039	422.7728	0.841	8.095
0.2039	1131.11829	2.250	11.036
		media	8.641±1.996

Tabla 4. Áreas, masa y concentración “dry basis” obtenidas del ajo en polvo para cocinar ($p \leq 0.05$).

Masa muestra (g)	Area (mAU)	Masa alicina (mg)	Concentración alicina en muestra (mg/g)
0.1021	957.77069	1.905	18.662
0.2011	2127.95288	4.233	21.051
0.1051	946.51678	1.883	17.916
0.2039	2036.35925	4.051	19.868
		media	19.375±1.377

Por otro lado, aunque el polvo de ajo en cápsula no mostró valores cercanos a los anteriormente citados, se demostró que este suplemento posee alicina, pero no en concentraciones cercanas a las encontradas en ajo fresco. Hay que senalar que al cuantificar la concentracion de alicina en el diente de ajo se

utiliza el “wet basis” debido a que parte de la masa del diente de ajo es agua, mientras que la masa de ambas muestras de ajo en polvo carecían de agua por lo que se utilizó el “dry basis”. De igual forma se pudo demostrar que se logró extraer alicina de todos los productos analizados.

DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente de acuerdo a nuestros datos se determinó que los dientes de ajo contenían en promedio de 2.252 mg/g de alicina y que estos resultados se acercan al valor de 3.37 a 4.60 mg/g determinado por Ribak, et al., (2014). A pesar de esto otros autores aseguran que las concentraciones de alicina en el ajo son mayores (Lawson, Woody y Huges, 1991; Prati et al., 2014; Silva, Moretti y Mattos, 2010). Estas discrepancias pueden atribuirse principalmente al origen de las muestras de ajo. Un estudio publicado por Hayat et al., 2014, se podrían deber a varios factores externos, como la temperatura, tiempo en cada paso del proceso de extracción y cuantificación, la agitación de la solución, descomposición de la alicina, madurez del ajo y la cantidad de alicina característica para cada variedad de *Allium sativum* (Prati et al., 2014).

Tabla 5. Concentaciones de alicina en las muestras expresadas en $\mu\text{g/ml}$.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Muestra
36.54	Diente de ajo
18.35	Capsula de ajo en polvo
34.05	Polvo de ajo para cocinar

De acuerdo con una investigación realizada por Wu, Santos y Fink-Gremmels, 2015, la concentración inhibitoria mínima (MIC) y la concentración inhibidora mínima del biofilme (MBIC) de *Staphylococcus epidermidis* para la alicina pura fue de 12.5 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras procesadas (Tabla 5) tenían una concentración de 36.54 $\mu\text{g/ml}$, 18.35 μl y 34.05 μl del diente de ajo, cápsula de ajo en polvo y ajo en polvo para cocinar respectivamente, por lo tanto, esto significa que el método de extracción utilizado permite generar una solución con concentraciones que pueden inhibir tanto a *S. epidermidis*, como el biofilme producido por esta bacteria.

Dada la amplia aceptación de la medicina natural, el ajo se visualiza como una alternativa a los antibióticos comerciales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que la búsqueda de nuevos antibióticos es un asunto de alta prioridad ya que doce familias de las bacterias más peligrosas para la salud se han vuelto multirresistentes (Efe, 2017). De igual forma, se ha registrado un aumento en las infecciones de transmisión sexual y el riesgo de la resistencia a los antibióticos (Castro, 2017).

Como plan futuro sería recomendable purificar la alicina y evaluar su efecto antimicrobiano al igual que si presenta alguna toxicidad en células mamíferas. También estudiar los mecanismos moleculares a través de los cuales la alicina ejerce su efecto antibiótico.

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. José R. Ortiz Maldonado mentor de la investigación, a la Dra. Lizbeth Romero Pérez directora del Departamento de Ciencias y Tecnología, a la profesora Arlyn Pérez, a los técnicos de laboratorio Vanessa González López, Armando F. Herrera y José Arce y al Dr. Arnaldo Bravo por asesoramiento en las técnicas de cromatografía.

REFERENCIAS

- Bose, S., Laha, B., & Banerjee, S. (2014). Quantification of allicin by high performance liquid chromatography-ultraviolet analysis with effect of post-ultrasonic sound and microwave radiation on fresh garlic cloves. *Pharmacognosy Magazine*, 10. doi: 10.4103/0973-1296.133279.
- Castro, I. D. (2017, marzo 17). Un tema del que hay que hablar. *El Nuevo Día*, pp. 06- 07.
- Cavallito, C. J., & Bailey, J. H. (1944). Allicin, the Antibacterial Principle of *Allium sativum*. I. Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action. *Journal of the American Chemical Society*, 66(11), 1950-1951. doi:10.1021/ja01239a048
- Díaz Jiménez, L., & Jiménez López, K.. (2008). Validación de un Método de Extracción de Alicina en Ajo y su Cuantificación por HPLC. *Centro Nacional de Metrología*.
- Efe, A. (2017, marzo 1). En busca de nuevos antibióticos . *El Nuevo Día* , p. 49.
- Iberl, B., Winkler, G., Muller, B., & Knoblock, K. (1990). Quantitative determination of allicin and alliin from garlic by HPLC. *Planta Medica*, 56 (3), 320-326.
- Hayat, S., Cheng, Z., Ahmad, H., Ali, M., Chen, X., & Wang, M. (2016). Garlic, from Remedy to Stimulant: Evaluation of Antifungal Potential Reveals Diversity in Phytoalexin Allicin Content among Garlic Cultivars; Allicin Containing Aqueous Garlic Extracts Trigger Antioxidants in Cucumber. *Frontiers in Plant Science*, 7. doi: 10.3389/fpls.2016.01235.
- Lawson, L.D., Wood, S.G., and Hughes, B. (1991) HPLC Analysis of Allicin and Other Thiosulfonates in Garlic Clove Homogenates. *Planta Medica*, 57, 263-270.
- Lawson, L. D. (1998). Garlic: A Review of Its Medicinal Effects and Indicated Active Compounds. *ACS Symposium Series Phytomedicines of Europe*, 176-209. doi:10.1021/bk-1998-0691.ch014
- Lawson L.D., & Wang Z.J. (2001) Low allicin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of alliinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2592-2599.
- Prati, P., Henrique, C. M., Souza, A. S., Silva, V. S., & Pacheco, M. T. (2014). Evaluation of allicin stability in processed garlic of different cultivars. *Food Science and Technology*, 34(3), 623-628. doi:10.1590/1678-457x.6397
- Ribak, M. E., Calvey, E. M., & Harnly, J. M. (2004). Quantitative determination of allicin in garlic: supercritical fluid extraction and standard addition of alliin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4), 682-687. PMID:14969516. http://dx.doi.org/10.1021/jf034853x
- Silva, E. Y. Y., Moretti, C. L., & Mattos, L. M. (2010). Compostos funcionais presentes em bulbilhos de alhos armazenados sob refrigeração, provenientes de cultivos no Brasil e na China. *Ciência Rural*, 40 (12), 2580-2587. http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010001200023.
- Solo Balseiro, R., López González, V., & Ortiz Maldonado, J. (2015). Evaluation of the antibacterial properties of garlic, (*Allium sativum*). *Inter Scientific*, 2, 32-36.
- Wu, X., Santos, R. R., & Fink-Gremmels, J. (2015). Analyzing the antibacterial effects of food ingredients: model experiments with allicin and garlic extracts on biofilm formation and viability of *Staphylococcus epidermidis*. *Food Science & Nutrition*, 3(2), 158-168. doi:10.1002/fsn3.199

AUTORES/AUTHORS

Romina Soto Balseiro. Es estudiante del B.S. en Biología de la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo. Desarrolló esta investigación en su último año de estudios.

Is a student of the B.S. in Biology from the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus. She developed this research project during her senior year

Vanessa González. Técnica de laboratorio de Microbiología y profesora de Departamento de Ciencias y Tecnología de la Universidad Interamericana de Puerto

Rico, Campus de Arecibo.

Microbiology Laboratory Technician and part-time professor at the Science and Technology Department of the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus.

Armando Herrera. Técnico de laboratorio de Química y profesor del Departamento de Ciencias y Tecnología de la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo.

Chemistry Laboratory Technician and part-time profesor at the Science and Technology Department of the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus.

José Ortiz Maldonado. Facultad a jornada parcial del Departamento de Ciencias y Tecnología y del Programa de Certificados Técnicos. Posee una maestría (M.S.) en

Biología Molecular de la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Bayamón. Puede ser contactad a través del correo electrónico: jortiz@arecibo.inter.edu.

Part-time professor from the Science and Technology Department and the Technical Certificate Program at the Inter American University of Puerto Rico. Holds an M.S. in Molecular Biotechnology from the Inter American University of Puerto Rico Bayamón Campus. May be contacted via email at: jortiz@arecibo.inter.edu

Soil Metagenomic Library Construction by pCC1FOS Cloning Vector

Construcción de Biblioteca Metagenómica de Suelo por el Vector de Clonación pCC1FOS

Huertas-Meléndez, S., Méndez-Soto, K., Amador-Vázquez, N., Rivera-Vélez, K.,
Rivera-Maldonado, J., Pérez-Samot, A. and Pagán-Jiménez, M.

Science and Technology Department, Inter American University, Arecibo Campus

ABSTRACT

Studies have estimated that only 1% of whole microbial population is cultivable. Different culture- independent techniques have been developed to explore the other 99%. Metagenomics is a novel technique that study the combined genomes of all community members in an environment. Metagenomic libraries are used to investigate the full extent of microbial diversity, including identification and function of microorganisms. The focus of our research was to construct a metagenomic library from environmental DNA that was isolated directly from topsoil. The eDNA (≈ 40 Kb) was end-repaired, ligated into the fosmid cloning vector pCC1FOS and packed in a Lambda phage. *Escherichia coli* EPI300-T1R were infected with the phages, cultivated in LB with chloramphenicol (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and positive clones were selected. Our library consists of approximately ~ 300 clones. The $\sim 10\%$ of clones were digested with NotI and different inserts of eDNA were obtained (40,000 bp - < 500 bp). The 75% of the digested clones show metagenomic DNA. This is the first step to develop future applications such as sequencing and functional screening to discover microorganisms with novel metabolic activities.

RESUMEN

Estudios han estimado que sólo el 1% de la población microbiana entera es cultivable. Se han desarrollado diferentes técnicas independientes de cultivo para explorar el otro 99%. La metagenómica es una técnica novedosa que estudia la combinación de genomas de todos los miembros de la comunidad en un ambiente. Las bibliotecas metagenómicas se utilizan para investigar la diversidad microbiana, incluyendo la identificación y función de los microorganismos. El objetivo de nuestra investigación fue construir una biblioteca metagenómica de ADN ambiental (ADNa) que fue aislado directamente de la capa superficial del suelo. Al ADN (≈ 40 Kb) se le repararon los extremos y fue ligado en el vector de clonación fósido pCC1FOS el cual se empacó en un fago Lambda. *Escherichia coli* EPI300-T1R fue infectada por los fagos, y cultivada en LB con cloranfenicol (12.5 $\mu\text{g} / \text{mL}$) donde se seleccionaron los clones positivos. Nuestra biblioteca consiste en aproximadamente ~ 300 clones. El 10% de los clones se digirieron con NotI y se obtuvieron diferentes insertos de ADNa (40,000 pb - < 500 pb). El 75% de los clones digeridos muestran ADNa metagenómico. Este es el primer paso para desarrollar futuras aplicaciones como secuenciación y detección funcional para descubrir microorganismos con nuevas actividades metabólicas.

KEYWORDS environmental DNA, *Escherichia coli*, fosmid, clones, NotI

PALABRAS CLAVE ADN ambiental, *Escherichia coli*, fósido, clones, NotI

INTRODUCTION

Soil is considered an excellent environment for the study of microbial populations. It is a complex system that houses a large quantity and diversity of microorganisms (Robe, Nalin, Capellano, Vogel & Simonet, 2003; Rajendhran & Gunasekaran, 2008). Unfortunately, using conventional techniques in laboratories, only 0.1 to 10% of environmental microorganisms can be cultivated (Rondon, Goodman & Handelsman, 1999; Hernández-León, Velázquez-Sepúlveda, Orozco-Mosqueda, & Santoyo, 2010). Therefore, many aspects of the physical and chemical parameters that have endowed the microorganisms for

their adaptation are not accessible for research (Schloss & Handelsman, 2003; Rajendran & Gunasekara, 2008). This led scientists to make an effort to develop uncultured methods such as to isolate nucleic acids from environmental samples to access the unknown microorganisms. Metagenomics is the science that makes possible the study of metagenome, that refers to the combined genomes of all community members in an environmental sample (Handelsman, 2004; Hernández-León et al., 2010). Metagenomics are diversified in the search of new antibiotics, enzymes, and studies of the dynamics of

uncharacterized populations of biotechnological importance (Handelsman, 2004; Riesenfeld, et al., 2004; Hernández-León, et al., 2010). One variant on metagenomics approaches are cloning the DNA from an environmental sample (Healy, et al., 1995; Stein, Marsh, Wu, Shizuya & DeLong, 1996; Kikirde, Parsley & Liles, 2010). A metagenomic library is a collection of clones that contain DNA extracted from an environmental sample and inserted into a vector. Vectors with an inserted high molecular weight eDNA fragment are incorporated in a bacterial host to form clones (Handelsman, 2004; Torres-Zapata, González-Montalvo, Castro-Ruiz & Ríos-Velázquez, 2010). To do this, it is necessary to select an appropriate large-insert cloning vector such as a fosmid. Fosmid vectors can accommodate cloned inserts between 40 and 50 Kb, (Kikirde, et al., 2010), and have a higher cloning efficiency in comparison with BAC vectors (Kikirde, et al., 2010), allowing to obtain an efficient metagenomic library. The last step from the construction of a metagenomic library is search for clones synthesizing metabolites of interest (Craig, Chang, Kim, Obiajulu & Brady, 2010; Hernández-León, et al., 2010), new antibiotics (Wang, et al., 2000; King, Bauer, & Brady 2009), enzymes (Healy, et al., 1995; Palackal, et al., 2007; Richardson, et al., 2002; Solbak, et al., 2005; Voget, et al., 2003; Rondon, et al., 2000; Lee, et al., 2004; Ferrer, et al., 2005), and genes that encode and express unknown biosynthetic pathways (Schloss & Handelsman, 2003; Cowan, et al., 2005; Kikirde, et al., 2010).

Although constructing a clone library may be an established technique in many laboratories, the soil metagenomic library can be a challenge. Some soils may contain many humic acids, which may inhibit the activity of DNA and polymerases (Tsai & Olson, 1992; Hernández-León, et al., 2010), and may interfere the quantification of soil DNA (Jackson, et al., 1997; Rajendhran & Gunasekaran, 2008). Humic acids are generated due to decomposition of plants, animals and microbial biomass (Senesi & Loffredo, 2001). They can bind other compounds and absorb water, ions and organics compounds (Stevenson, 1976; Rajendhran & Gunasekaran, 2008). In addition, humic acids have similar physical and chemical properties to that of nucleic acids. Therefore, humic substances are generally co-extracted with DNA (Tebbe & Vahjen, 1993), representing a challenge in most of soil metagenomics projects.

To estimate the humic acids isolated in a sample, researchers have used A_{230} values. Therefore, absorbance ratio at 260/230 nm (DNA/humic acids) are used to evaluate the purity of the soil metagenome DNA (Roose-Amsaleg et al. 2001; Rajendhran & Gunasekaran, 2008), in order to obtain a quality soil sample to construct a metagenomic library.

The main objective of this study consisted on creating a metagenomics library of a soil sample using the fosmid vector pCC1FOS, suitable for future projects that enrich our

understanding of soil microbial ecology and provide enzymes and metabolites useful for human beings.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Soil sample was collected from the Inter American University, Arecibo campus (18°28'30.2" N 66°45'29.7" W). Temperature was 22.8°C and a 6.8 pH. Sample was transported to the laboratory to realize an immediate extraction.



Figure 1. Sample collection from topsoil at the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus

Bacterial strains and vectors

The library was generated using the fosmid vector pCC1FOS available in the CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI). The bacterial host of the foreign eDNA was the EPI300™ T1^R Phage T1-Resistant *Escherichia coli* (Epicentre).

DNA extraction from soils

High molecular weight DNA from soil was extracted using the E.Z.N.A. soil DNA Kit (OMEGA, Norcross, GA, USA)

according to manufacturer’s protocol. Briefly, roots and small rocks were removed from soil. Direct cell lysis of 0.5 grams of soil was carried out by vortex (VWR Analog Vortex Mixer) (Figure 2). After several incubations and centrifugations, the pellet containing the eDNA was eluted with 100µL of Elution Buffer and stored at -20°C.

Figure 2. Sample homogenized by vortex.



Gel electrophoresis and spectrophotometer analysis

Extracted DNA was analyzed on a 1% agarose gel containing 0.75µL of ethidium bromide. The concentration of DNA was determined with spectrophotometer at 260 nm. The eDNA quality was also measured by ratio of A₂₆₀ to A₂₈₀, and A₂₆₀ to A₂₃₀.

Library generation

The DNA was ligated with the fosmid vector pCC1FOS™. Ligation reaction was realized using Fast-Link DNA Ligation kit (Epicenter, Biotechnologies, Madison, WI). MaxPlax Lambda packaging extracts were used to package the recombinant DNA into lambda phages following the manufacturer’s protocol. In order to determine the concentration of phage particles and the number of plates and dilutions required to construct the metagenomic library, a titration of the fosmid packaging is necessary. Phages were diluted at 1:10, 1:100, 1:1000 and no dilution. The recombinant packaged DNA was transduced into EPI300™-T1R, plated in Luria Bertani (LB) agar plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) supplemented with chloramphenicol (CM) (12.5 µg/mL), and incubated at 37 °C for 24 hours, according to the manufacturer’s protocol.

To identify the percentage of clones containing DNA inserts, random clones were picked and grown in LB broth containing CM for fosmid extractions. Fosmid extraction/purification was carried out using a modified protocol from QIAprep spin MiniPrep Kit (QIAGEN, Valencia, Ca, #27106) by Lynn Williams and Heather Allen in (2004). The insert DNA was then analyzed by gel electrophoresis (1%) after a NotI (New England Bio Labs, Ipswich, MA) digest. The libraries were divided in sub-pools and stored in 1.5mL microtubes, containing LB with CM and 20% glycerol at -80°C.

Fosmid DNA digestion with NotI

After fosmid isolation, they were digested by NotI (*Nocardia otitidis-caviarum*) restriction enzyme to verify eDNA insert. Reaction was performed by an incubation of 2 hours at 37°C. Digestion was verified by an electrophoresis agarose gel (1%) in 1X TBE buffer (50 mL) and visualized under UV light.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, we constructed a metagenomic library using a fosmid vector (pCC1FOS). A sample from topsoil, at Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus was collected (Figure 1). This soil layer has nutrients, minerals and humic compounds (Figure 2). DNA was extracted from this sample and was evaluated for purity and for the presence of humic acids (Table 1). A sample with ratio 260/230 (DNA/humic acids) below 2.0, indicates contamination with humic acids in the DNA (Fatima et al., 2014). The spectrophotometric analysis of our metagenomic DNA indicated the ratio 260/230 of 1.2, showing that our DNA sample had lower concentrations of humic acids (Yeates et. al., 1998). These results were verified with a gel electrophoresis of eDNA as shown in Figure 3, where humic acids, generally visible with low molecular weight (Tebbe and Vahjen, 1993), are not present.

Table 1. Concentration and ratios of DNA extracted from soil analyzed by spectrophotometry.

Sample	Conc. (ng/µL)	Ratio 260nm/280nm	Ratio 260nm/230nm
A	53.0	1.8	1.2

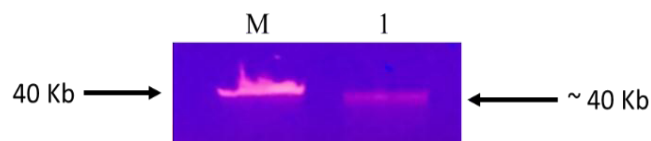


Figure 3. Electrophoresis 1% agarose gel to verify the eDNA size. Copy Control Fosmid DNA (lane M); eDNA extract from soil (lane 1). In lane 1 the band of the eDNA is observed, which has a size of approximately 40 Kb.

The concentration of DNA (53.0 ng/µL) and the purity of DNA 260/280 (1.8), show a good quality metagenomic DNA (Table 1). The DNA (insert) size was determined by agarose gel electrophoresis. An integral fragment of ≈ 40 Kb was observed, the same size of the Copy Control Fosmid DNA (Figure 3). It was important to determined and selected the appropriate size of the DNA, since the maximum insertion capacity of the vector (pCC1FOS) is 42 Kb.

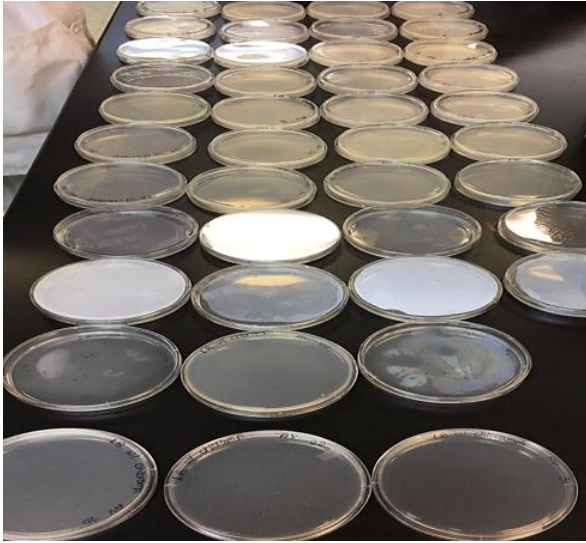


Figure 4. Metagenomic Library cultured in plates of LB with chloramphenicol. Two hundred ninety-four (294) clones were obtained.

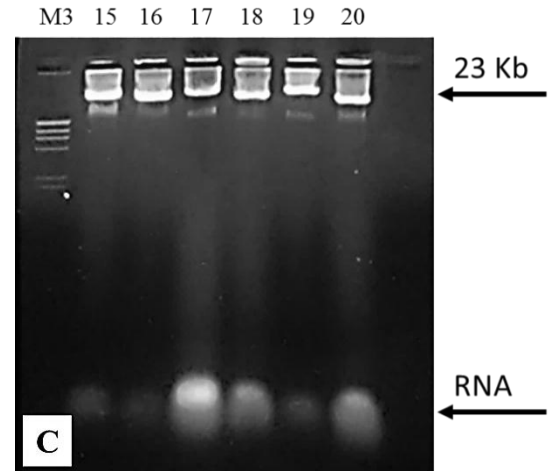


Figure 5. Electrophoresis 1% agarose gel to verify fosmid DNA. Lambda/HindIII marker (lane M1, M2 & M3); DNA isolated from clones (lanes 1-7 (A), 8-14 (B) and 15-20 (C)). Isolated DNA was observed in all the clones. Low molecular weight RNA was also observed.

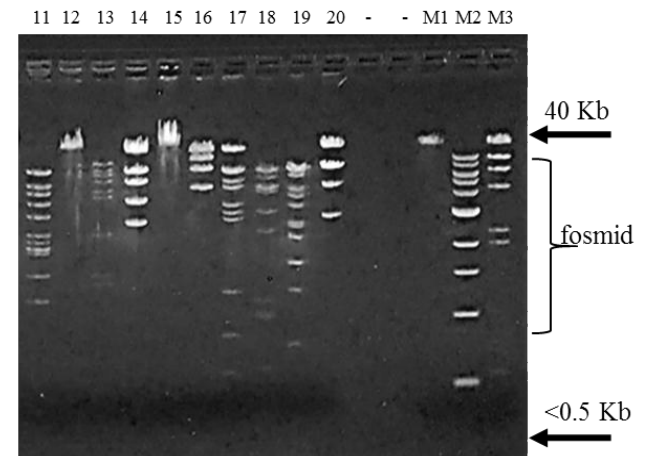
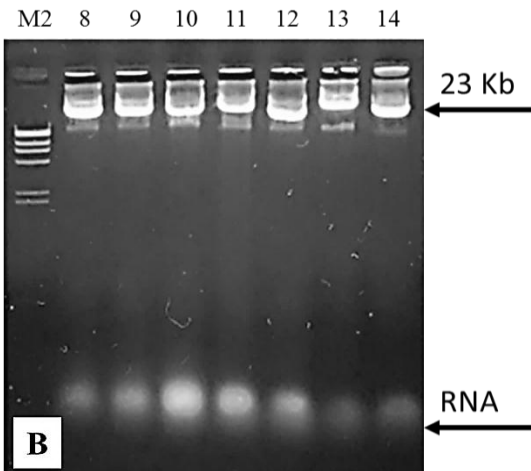
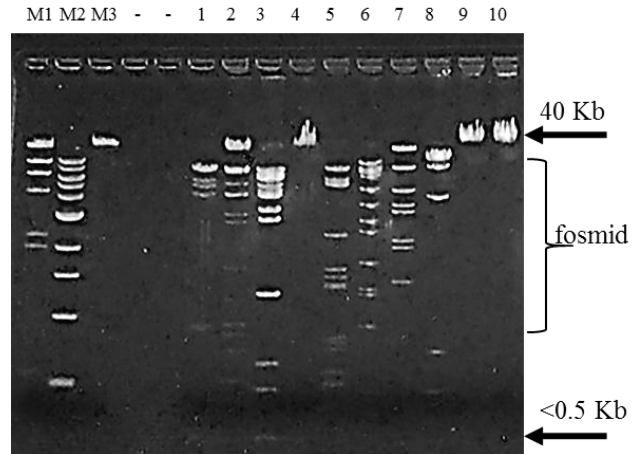
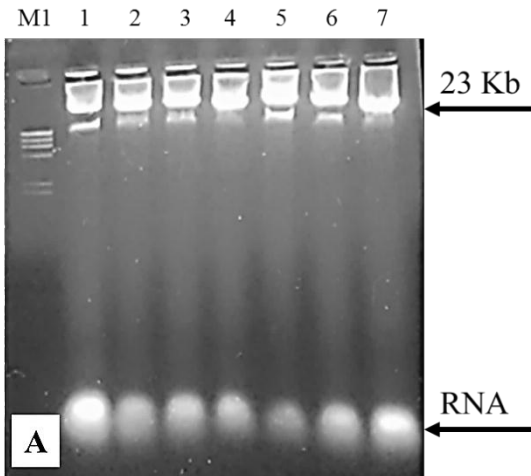


Figure 6. Electrophoresis 1% agarose gel of fosmids (pCC1FOS) digested with NotI. Lambda/HindIII Marker (lane M1); 1Kb Marker (lane M2); Copy Control Fosmid DNA (lane M3); Fosmids digested with NotI (lane 1-20). Fifteen fosmids showed the expected 7,498 bp band and inserts with sizes ranging from 40,000 - < 500 bp.

On the other hand, the vector pCC1FOS has blunt-ends, and for ligation purposes, it was necessary to repair the DNA to generate the same blunt and phosphorylated ends. Once the ends were repaired, the insert was ligated to the fosmid, and then was packed into the Lambda phage. The packed mixture was diluted and cultivated in plates (stock, 1:10, 1:100, 1:1000) to determine the concentration of phage particles and the number of plates and dilutions required to construct the metagenomic library. Titering comparison of the phage dilution shows that thirty-four (34) clones were obtained from a plate with no dilution (stock). Accordingly, 50 plates with packed phages without dilution were used to generate the whole metagenomic library (Figure 4).

Recombinant cells (*E. coli*, EPI300-T1R) were cultivated in LB w/ CM. This media allowed to select the transformed cells (clones), because the vector has a CM^R selection gene that confers CM resistance to the bacteria. A total of two hundred ninety-four (294) positive clones were obtained (Figure 4). Twenty positive clones were randomly selected to verify the fosmid DNA. The isolated fosmid DNA was observed in all the selected clones (Figure 5).

To verify the size of eDNA obtained in our library, a fosmid DNA digestion with the NotI restriction enzyme was performed. Fosmid vector (pCC1FOS) has a total size of 8,139bp, generating two fragments of 7,498bp and 641bp when it was digested by NotI. Since the insertion site of this fosmid is by 382bp, the 641bp fragment ligates the insert of eDNA while the 7,498 bp fragment remain intact. Others visualized bands in the digested clones corresponds to eDNA inserts. Based on our restriction digest analysis with NotI (5'-GCGGCCGC-3) on the 6.8% of the clone library (n=20), 15 clones showed the expected 7,498 bp band and inserts with sizes ranging from 40,000 - < 500 bp (Figure 6). These digested clones prove to have DNA inserts, showing that the eDNA was ligated, packed, and transformed in the bacterial host (*E. coli*, EPI300T1R) to construct the metagenomic library.

CONCLUSION

This study generated the first metagenomic library developed in Inter American University Puerto Rico, Arecibo Campus. The metagenomic library consisted of approximately 300 clones, and it was demonstrated that 75% of the library had the DNA insert. This is the first step to obtain a large amount of genetic information of microorganisms that cannot grow by culture-methods. After construction, several functional analyses can be

made, such as, enzymatic activities, selection for antibiotics resistance and sequencing.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thank to Dr. Carlos Ríos and Robert Rabelo for orientations and advices during the research. We thank José Arce and Jesús Ramos, Biotechnology Laboratory Technicians, and Vanessa Gonzalez, Microbiology Technician, for kindly supplied materials and technical assistance. This research was supported by Inter American University of Puerto Rico in Arecibo Campus and Xerox.

REFERENCES

- Cowan D., Meyer Q., Stafford W., Muyanga S., Cameron R. & Wittwer P. (2005). Metagenomic gene discovery, past, present and future. *Trends in Biotechnology* 23:321-329.
- Craig J.W., Chang F.Y., Kim J.H., Obiajulu S.C. & Brady S.F. (2010). Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse Proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 76:1633-1641.
- Fatima, F., Pathak, N., & Rastogi Verma, S. (2014). An Improved Method for Soil DNA Extraction to Study the Microbial Assortment within Rhizospheric Region. *Molecular Biology International* 2014:1-6
- Ferrer M., Golyshina O.V., Chernikova T.N., Khachane A.N., Dos Santos V.A., Yakimov M.M., Timmis K.N. & Golyshin P.N. (2005). Microbial enzymes mined from the Urania deep-sea hypersaline anoxic basin. *Chemistry and Biology* 12:895-904.
- Healy F.G., Ray R.M., Aldrich H.C., Wilkie A.C., Ingram L.O. & Shanmugam K.T. (1995). Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic, digester maintained on lignocellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43:667-674.
- Handelsman J. (2004). Metagenomics Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68:669-685.
- Hernández-León R., Velázquez-Sepúlveda I., Orozco-Mosqueda M.C. & Santoyo G. (2010). Soil Metagenomics: new challenges and biotechnological opportunities. *International Journal of Experimental Botany* 79:133-139.
- Jackson C.R., Harper J.P., Willoughby D., Roden E.E. & Churchill P.F. (1997). A simple, efficient method for the separation of humic substances and DNA from environmental samples. *Applied Environmental Microbiology* 63:4993-4995.

- Kakirde K.S., Parsley L.C. & Liles M.R. (2010). Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1911-1923.
- King R.W., Bauer J.D. & Brady S.F. (2009). An environmental DNA-derived type II polyketide biosynthetic pathway encodes the biosynthesis of the pentacyclic polyketide erdacin. *Angewandte Chemie (International ed. In English)* 48:6257-6261.
- Lee S.W., Won K., Lim H.K., Kim J.C., Choi G.J. & Cho K.Y. (2004). Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:720-726.
- Palackal N., Lyon C.S., Zaidi S., Luginbuhl P., Dupree P., Goubet F., Macomber J.L., Short J.M., Hazlewood G.P., Robertson D.E. & Steer B.A. (2007). A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74:113-124.
- Rajendhran J. & Gunasekaran P. (2008). Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnology Advances* 26:576-590.
- Richardson T.H., Tan X., Frey G., Callen W., Cabell M., Lam D., Macomber J., Short J.M., Robertson D.E. & Miller C. (2002). A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase. *The Journal of Biological Chemistry* 277:26501-26507.
- Riesenfeld C.S., Goodman M.R., & Handelsman J. (2004). Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology* 6:981-989.
- Robe P., Nalin R., Capellano C., Vogel T.M. & Simonet P. (2003). Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*; 39:183-190.
- Rondon M., Goodman M. & Handelsman J. (1999). The earth's bounty: assessing and accessing the soil microbial diversity. *Trends in Biotechnology* 17:403-409.
- Rondon M.R., August P.R., Betterman A.D., Brady S.F., Grossman T.H., Liles M.R., Loiacono K.A., Lynch B.A., MacNeil I.A., Minor C., Tiong C.L. Gilman M., Osburne M.S., Clardy J., Handelsman J. & Goodman R.M. (2000). Cloning the soil metagenome, a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2541-2547.
- Roose-Amsaleg C.L., Garnier-Silliam E. & Harry M. (2001). Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediments samples. *Applied Soil Ecology* 18:47-60.
- Schloss P.D. & Handelsman J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology* 14:303-310.
- Senesi N., & Loffredo E. (2001). Soil humic substances. In: Hofrichter M., Steinbuchel A., editors. *Biopolymers. Lignin, humic substances and coal* vol. 1. Wiley-VCH; p. 247-249.
- Solbak A.I., Richardson T.H., McCann R.T., Kline K.A., Bartnek F., Thomlinson G., Tan X., Parra-Gessert L., Frey G.J., Podar M., Luginbuhl P., Gray K.A., Mathur E.J., Robertson D.E., Burk M.J., Hazlewood G.P., Short M.J. & Kerovuo J. (2005). Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric. *The Journal of Biological Chemistry* 280:9431-9438.
- Stein S.L., Marsh T.L., Wu K.Y., Shizuya H. & DeLong E.F. (1996). Characterization of uncultivated prokaryotes isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon. *Journal of Bacteriology* 178:591-599.
- Stevenson F.J. (1976). Stability constants of Cu, Pb, and Cd complexes with humic acids. *Journal of Soil Science Society of America* 40:665-672.
- Tebbe C.C. & Vahjen W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 2657-2665.
- Torres-Zapata I., González-Montalvo A., Castro-Ruiz C. & Ríos-Velázquez C. (2010). Generation of large insert metagenomic libraries using indirect DNA extraction methods from benthic and ephemeral tropical hypersaline microbial mats. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 1569-1575.
- Tsai Y.L. & Olson B.H. (1992). Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Applied Environmental Microbiology* 58:2292-2295.
- Voget S., Leggewie C., Uesbeck A., Raasch C., Jaeger K.F. & Streit W.R. (2003). Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6235-6242.
- Wang G.Y., Graziani E., Waters B., Pan W., Li X., McDermott J., Meurer G., Saxena G., Andersen R.J. & Davis J. (2000). Novel natural products from soil DNA libraries in a *Streptomyces* host. *Organic Letters* 2:2401-2404.
- Williamson, L. & Allen H. (2004). "Best Mini Prep Ever Protocol." *Protocols and Resources - Mastering Metagenomics*.

Web. April 25, 2017. [https:// sites. google. com /site / mastering metagenomics/file-cabinet](https://sites.google.com/site/mastering-metagenomics/file-cabinet)>.

Yeates, C., Gillings, M., Davison, A., & Altavilla, N. (1998). Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online*, 1: 40-47.

AUTHORS/AUTORES

Stephanie A. Huertas-Melénde, **Krystal Méndez-Soto**, **Natalie Amador-Vázquez**, **Kimberly Rivera-Vélez** and **José N. Rivera Maldonado**. Students of the B.S. in Biotechnology from the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus. They develop this research project during their senior year.

Son estudiantes del B.S. en Biotecnología en la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo. Desarrollaron esta investigación durante su último año de estudio.

Arlyn Pérez-Samot. Associate professor in the Science and Technology Department in the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus. Her Master's Degree was in Biology specializing in Micology from the University of Puerto Rico, Mayaguez Campus. Can be contacted at aperez.@arecibo.inter.edu

Posee el rango de Catedrática Asociada en el Departamento de Ciencias y Tecnología de la Universidad Interamericana, Recinto de Arecibo. Su grado de maestría fue en Biología con especialidad en Micología de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Puede ser contactada a través del correo electrónico: aperez@arecibo.inter.edu

María Pagán-Jiménez. Professor of Biology and Biotechnology in the Science and Technology Department in the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus. Her Master's Degree was in Biology specializing in Molecular and Cellular Biology from the University of Puerto Rico, Río Piedras Campus. Can be contacted at mpagan@arecibo.inter.edu

Es Profesora de Biología y Biotecnología en el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo. Su grado de maestría fue en Biología con especialidad en Biología Molecular y Celular de la Universidad de Puerto Rico, Recinto de Río Piedras. Puede ser contactada a través del correo electrónico: mpagan@arecibo.inter.edu

SHORT COMMUNICATION/ COMUNICACIÓN CORTA

Effect of UV-C on the proteasome activity of human retina cells, ARPE-19, and evaluation of the protection provided by resveratrol

Efecto de radiación UV-C en la actividad del proteosoma de células de retina humana, ARPE-19, y evaluación del efector protector de resveratrol

Domena, J., Camacho, C., Román, S., and Romero-Pérez, L.

Science and Technology Department, Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus

The human eye is an organ highly susceptible to damage induced by solar and artificial light. UV-C is radiation of short wavelength (from 100-280 nm). Because it is filtered by the human cornea before it can reach the lens, no main damage to the retina has been attributed to this type of radiation. The ubiquitin proteasome pathway is the most important protein quality control system that degrades proteins selectively. Studies show that oxidation caused by radiation can affect this pathway and has been linked to diseases including retinopathy, cataract and Age-related Macular Degeneration (AMD). The objective of this research is to evaluate the effect of UV-C radiation on the proteasome activity of human retina cells, and evaluate if natural antioxidant resveratrol can provide some protection against that effect. Our results show that 30 min exposure to UV-C did not affect cell viability, but caused a 40% reduction in proteasome activity. Resveratrol restored proteasome activity to 80% showing a degree of protection to the effect caused by UV-C.

El ojo humano es un órgano susceptible al daño causado inducido por luz solar y artificial. La radiación UV-C es de bajo largo de onda (100-280 nm). Como esta radiación es filtrada por la córnea antes de llegar al lente, no se le ha atribuido ser causa de daño a la retina humana. El sistema ubiquitina-proteosoma es el sistema principal de control de calidad de proteínas que las degrada de forma selectiva. Estudios muestran que la oxidación causada por radiación puede afectar este sistema siendo así asociado a enfermedades como retinopatía, cataratas y degeneración macular asociada a la edad (AMD). El objetivo de esta investigación es evaluar el efecto de la radiación UV-C en la actividad del proteosoma de células de retina humana y evaluar si el antioxidante natural, resveratrol, provee protección contra ese efecto. Nuestros resultados mostraron que 30 min de exposición a UV-C no afectó la viabilidad de las células, pero redujo un 40% la actividad del proteosoma. Resveratrol restauró la actividad del proteosoma a un 80% mostrando un grado de protección contra el efecto causado por UV-C.

INTRODUCTION

Solar ultraviolet (UV) radiation can damage DNA and promote the generation of reactive oxygen species (ROS). In turn, ROS may cause oxidative damage (Chan et al., 2015; Koskela, Rainisalo, Hyttinen, Kaarnirante & Karjalainen, 2014; Mitter et al., 2014). It is known that solar radiation exposes the eye to UV-B, UV-A and visible light. Artificial light can contribute UV-C radiation, which includes short wavelength radiation from 100 to 280 nm. No main damage has been attributed to this type of radiation, except changing the size of cornea cells *in vitro* (Wang & Lu, 2016). A study by Miquel et al., 2007, shows that UV-B and UV-C can generate oxidative conditions that lead to apoptosis of retina cells in crustaceans.

Retinal pigmented epithelium (RPE) is a monolayer of cells located between the neural retina and choroid in charge of maintaining and promoting the survival of photoreceptor cells. Previous studies show that RPE is highly susceptible to oxidative damage, which is thought to play an important role in the early pathogenesis of Age-related Macular Degeneration (AMD). It is one of the most common causes of impaired vision in the elderly population. Besides aging, other factors that contribute to its onset include genetic background, diet, cigarette smoke and exposure to radiation (Liu et al., 2014).

Understanding the pathways implicated in the oxidative damage of RPE is crucial to understand the disease. The ubiquitin-proteasome pathway (UPP) is the main non-lysosomal proteolytic pathway within eukaryotic cells. Proteins to be degraded must be tagged with an ubiquitin chain in order to be recognized and degraded by a large protease complex called proteasome. Having a fully functional UPP is important for the cell to deal with oxidative stress. A study by Hodge-Jahngen, et al, 1997 showed that extensive oxidative stress can reversibly inhibit ubiquitin conjugation process. Zhang and colleagues (Zhang, et al., 2008) showed that the proteasome is more susceptible to oxidation by H₂O₂ or photo oxidation in ARPE-19

cells, consistent with other studies that have shown accumulation of ubiquitin conjugated proteins in response to stress. Other processes like cell signaling are affected when the proteasome is inactivated by oxidation. Impairment of the UPP has been linked to neurodegenerative disorders including retinopathy, cataracts and inherited retinal degeneration (Ando et al., 2014; Lobanova, Finkelstein, Skiba, & Arshavsky, 2013).

A study by Cha et al., 2015, showed that resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene), a flavonoid found in grapes, berries and other fruits, exhibits antioxidant capacity towards ARPE-19 cells damaged by UV-A. The objective of this investigation is evaluate the effect of UV-C on the proteasome activity of human retina cells and determine if resveratrol offers protection against that effect.

RESULTS AND DISCUSSION

After UV exposure, cell viability was measured using the MTT assay. This assay uses a yellow tetrazolium salt that is cleaved by metabolically active cells and generates formazan; a purple compound. Cells were treated with concentrations of 1 μM , 5 μM and 10 μM of resveratrol and no effect on viability was observed. This is consistent with a study published by Chan et al., 2015, where they tested a range of concentrations and showed that resveratrol to 10 μM concentrations does not affect the viability of ARPE-19 cells. Besides treatment with resveratrol, UV-C exposure for 30 min did not affect cell viability, but did affect proteasome activity (Figure 1).

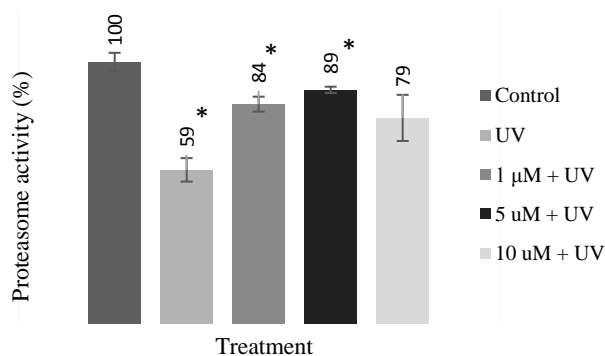


Figure 1. Effect of UV-C on the proteasome activity of ARPE-19 cells with or without resveratrol.

A decrease of 41 % in the activity of the proteasome after UV-C exposure was observed. Not much is known on the effect of UV-C to the proteasome, but a study done by Zhang, X. et al., 2008 showed that proteasome activity is affected by oxidation. Cells with resveratrol at 1 and 5 μM had statistically significant increases in proteasome activity after exposure to UV-C light. Pre-treatment with 1 μM had an increase of 25 %; 5 μM of 30% and 10 μM of 20%. This is consistent with studies that show that

resveratrol and similar compounds can protect against oxidation caused by radiation (Chan et al., 2008, Chan et al., 2015; Koskela et al., 2014).

Further studies are required to determine if UV-C induces oxidation conditions and if the decrease in proteasome activity is caused by oxidation. Also, to evaluate other concentrations of resveratrol and exposure times and the molecular mechanisms involved in the effect that resveratrol had on proteasome activity.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Adult human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) were obtained from ATCC (CRL-2302). Resveratrol (Sigma-Aldrich R5010) and DMSO (Sigma-Aldrich). For MTT assay we used Cell Proliferation kit I (MTT) (Roche Life Sciences). For proteasome activity we used Pierce Colorimetric Protease Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 23263) and Cellytic MT (Sigma-Aldrich, C3228).

Cell culture, resveratrol treatment and UV exposure

Adult human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) supplemented with 10% fetal bovine serum and Penicillin/Streptomycin, at 37 °C with 5% CO₂. 1x10⁵ or 1x10⁶ cells/well were seeded to 6-well plates for resveratrol treatment. Resveratrol was diluted in DMSO and before UV radiation, cells were treated with 1 μM , 5 μM or 10 μM of resveratrol for 24 hr. Control samples were prepared with DMSO only. After incubation with resveratrol for 24 hr, cells were rinsed twice with PBS and media was replaced without resveratrol. Plates were exposed to UV radiation for 30 min and incubated for 24 hr at 37 °C, 5% CO₂.

Cell Viability Assay

Cell viability was determined using the MTT assay. The plates with 1x10⁵ cells/well were used. After resveratrol treatment, UV exposure and the 24 hr incubation, 10 μl of MTT labeling Reagent were added to each well followed by 4 hr incubation. At 4 hr, 100 μl of Solubilization Solution were added. Plates were incubated overnight and read at 570 nm.

Proteasome Activity Assay

For this assay, the 1x10⁶ cells/well plates were used. After resveratrol treatment, UV exposure and the 24 hr incubation, cells were lysed using CelLytic MT with protease inhibitors. Cell extract was incubated with casein solution, in 96 well plates and incubated for 20 min at room temperature. After incubation, 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBSA) was added to each well

and incubated for 20 min at room temperature. Absorbance was measured in a microplate reader at 450 nm. Data was analyzed using Sigma Plot software to perform student's T test.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to José Arce and Jesús Ramos, Biotechnology Laboratory Technicians, Xerox Foundation for supporting this research and the US Department of Education, MSEIP Project, (Award number P120 A150082).

REFERENCES

Ando, R., Noda, K., Tomaru, U., Kamoshita, M., Osawa, Y., Notomi, S., ... Ishida, S. (2014). Decreased Proteasomal Activity Causes Photoreceptor Degeneration in Mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 55 (7).

Chan, C.-M., Huang, J.-H., Lin, H.-H., Chiang, H.-S., Chen, B.-H., Hong, J.-Y., & Hung, C.-F. (2008). Protective effects of (-)-epigallocatechin gallate on UVA-induced damage in ARPE19 cells. *Molecular Vision*, 14, 2528–2534

Chan, C.-M., Huang, C.-H., Li, H.-J., Hsiao, C.-Y., Su, C.-C., Lee, P.-L., & Hung, C.-F. (2015). Protective Effects of Resveratrol against UVA-Induced Damage in ARPE19 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5789–5802. <http://doi.org/10.3390/ijms16035789>

Koskela, A., Reinisalo, M., Hyttinen, J. M. T., Kaarniranta, K., & Karjalainen, R. O. (2014). Pinostylin-mediated protection against oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells. *Molecular Vision*, 20, 760–769.

Liu, Z., Qin, T., Zhou, J., Taylor, A., Sparrow, J.R., and Shang, F. (2014). Impairment of the Ubiquitin-Proteasome Pathway in RPE Alters the Expression of Inflammation Related Genes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 801: 237–250. doi:10.1007/978-1-4614-3209-8_31.

Lobanova, E.S., Finkelstein, S., Skiba, N.P., and Arshavsky, V.Y. (2013). Proteasome overload is a common stress factor in multiple forms of inherited retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (24): 9986–9991.

Mitter, S.k., Song, C., Qi, X., Mao, H., Rao, H., Akin, D., ... Boulton, M. (2014). Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy*, 10 (11), 1989–2005.

Wang, L., & Lu, L. (2016). Ultraviolet Irradiation-Induced Volume Alteration of Corneal Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57 (15). doi: 10.1167/iovs.16-19763.

Zhang, X., Zhou, J., Fernandes, A. F., Sparrow, J. R., Pereira, P., Taylor, A., & Shang, F. (2008). The proteasome is a target of oxidative damage in human retina pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(8), 3622–3630. <http://doi.org/10.1167/iovs.07-1559>

AUTHORS/AUTORES

José Domena, Christian Camacho and Samaris Román. Students of the B.S. in Biotechnology from the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus. They develop this research project during their senior year.

Son estudiantes del B.S. en Biología en la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo. Desarrollaron esta investigación durante su último año de estudio.

Lizbeth Romero Pérez. Assistant Professor and Director of the Science and Technology Department of the Inter American University of Puerto Rico, Arecibo Campus. Holds a B.S. in Microbiology from the University of Puerto Rico and a doctoral degree in Biochemistry and Molecular Biology from the University of Medicine and Dentistry of New Jersey. Author of various articles published in peer reviewed journals. May be contacted via email: romero@arecibo.inter.edu.

Es Catedrática Auxiliar y Directora del Departamento de Ciencias y Tecnología la Universidad Interamericana de Puerto Rico, Recinto de Arecibo. Tiene un B.S. en Microbiología de la Universidad de Puerto Rico y un grado doctoral en Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Medicina y Odontología de Nueva Jersey (UMDNJ). Es autora de varios artículos publicados en revistas profesionales. Puede ser contactada a través del correo electrónico: lromero@arecibo.inter.edu

LA INVESTIGACIÓN EN EL CAMPUS/ RESEARCH ON CAMPUS

Resumen de otras investigaciones realizadas por nuestros estudiantes en el Recinto durante el año académico 2016-2017 en los campos de bioquímica, genética, y ecología.

Summary of other research conducted on campus by our students during the academic year 2016-2017 in the fields of biochemistry, genetics and ecology.

BIOQUÍMICA/ BIOCHEMISTRY

1-A Determination of the anti-proliferative activity profile of 2-methylbenzimidazole derivatives in Multiple Myeloma cell line RPMI-8226

Amarilys Vélez, Sulined García, Ricardo Infante and Karen Woolcock

Multiple myeloma (MM) is a hematological malignancy characterized by neoplastic proliferation of monoclonal plasma cells in the bone marrow. This kind of cancer is more frequently in men with over 50 years old. According to Yang and Li (2014) benzimidazole, which is a heterocyclic aromatic organic compound, have anti-tumoral activity against this cancerous cell. In this project the antiproliferative activity of three benzimidazole derivatives: 1-(6-acetyl-1,4-benzodioxanyl) -2-methylbenzimidazole (ABM), 1-(methylphtalimidyl) -2-methylbenzimidazole (MPM), and 1-(4-acetylmorpholy) -2-methylbenzimidazole (AMM) was evaluated. Also, preliminary studies were done to determine the intracellular mechanism that may explain the pharmacological properties of this new compounds. Our results shown that the tested compounds exhibit unique antiproliferative effects depending on the time of exposure and the dose. In summary, ABM had a net inhibition of 38% when cells were exposed during 96 hours to a low dose (1mM), while AMM had a net inhibition of 33%, with a 100 mM concentration. Noteworthy, MPM seems to have the highest inhibitory effect (27%) at low concentration (1mM) among the tested compounds, being a good candidate for continuing evaluating its properties as a potential alternative therapy to conventional treatments for MM. Further studies revealed that ABM, MPM and AMM compounds exhibited a low apoptotic profile, as verified with Annexin V and Caspase 3/7 assay. In addition, benzimidazole derivatives did not induced the loss of mitochondrial membrane potential by apoptosis intrinsic pathway. Further studies are required to evaluate the intracellular pathway that explains the viability reduction produced by these compounds.

1-B Potential anti-cancer effect of 2-methylbenzimidazole and *Annona muricata* extract evaluated in PANC-1 cell line

Zuleika Rodríguez, Nilka Tejera and Lizbeth Romero-Pérez

Cancer is the uncontrolled growth of abnormal cells in the body. It can begin almost anywhere in the human body and grow invasively. In 2016, it was estimated 1,685,210 new cancer patients in the United States and 595,690 already with the disease. The most common cancers in 2016 were breast cancer, lung and bronchial, prostate, colon and rectum, bladder, skin melanoma, thyroid, kidney, leukemia and pancreatic cancer. The incidence of new cases for the latter is 53,070 and 41,780 deaths in the United States. Pancreatic cancer is the forth leading cause of death from cancer, is highly aggressive and resistant to current therapies. The present study aims to seek new chemical and natural alternatives by assessing the anticancer potential of chemical reagent 2-methylbenzimidazole and derivatives and *Annona muricata* extract. Benzimidazoles have been evaluated *in vitro* for their antiproliferative activity, inducing cell apoptosis. In the quest for new treatments *A. Muricata* (soursop) is a natural alternative that has been traditionally used for inflammatory conditions, rheumatism, neuralgia, diabetes, hypertension,

insomnia, parasitic infections and cancer. We evaluated the viability of pancreatic cancer cells PANC-1 exposed to 2-methylbenzimidazole and derivatives and *A. muricata* extract for 24 hours. 2-methylbenzimidazole and derivatives reduced cell viability by more than 60 % whereas the natural extract exhibited only a 10% reduction at concentrations of 50 and 75%. Further studies are required in order to evaluate other exposure times and concentrations, as well as evaluating which mechanisms are implicated in the observed viability reduction.

GENÉTICA/ GENETICS

2-A Extraction and detection of 28S, EF and ND1 genes of *Neocynortoides spp.*, *Neocynortoides dorsalis* and *Yunquenus portoricanus*: a molecular approach to classify harvestmen in Puerto Rico

Ashley Ortega, Christian Pacheco, Ramón J. Nieves, Andrés A. Vélez, Yelitza Toro, Rayven Ortíz, Kenneth Reina De la Torre, Alberto Puente Rolón and María Pagán-Jiménez

The order Opiliones, commonly known as harvestmen, represents the third mite's diverse group of Arachnids after mites, ticks and spiders. They are often found in forests, under stones, in caves, under the trunks of trees and distributed on every continent, except for Antarctica. Despite a long evolutionary history which comes from Paleozoic Era, the taxonomy classification of many species from this order is still unstable and/or unknown. In Puerto Rico, little is known about the taxonomic classification of the species of Opiliones found in the island, in part due to the lack of molecular data. In this study, we want to optimize the extraction protocol of genomic DNA from appendages of the harvestmen *Neocynortoides spp.*, *Neocynortoides dorsalis* and *Yunquenus portoricanus* and to optimize the detection protocol of the conservative genes *ND-1*, *28S* rDNA and *EF-1* by PCR. Our results shown amplification of the *ND1* gene of *N. dorsalis*, the *28S* rDNA genes of *Y. portoricanus* and *N. spp.*, and the *EF-1* gene of *N. spp.* The optimization of genomic DNA extraction and PCR protocols, were important to successfully amplify genes that can be sequenced in order to generate molecular data to establish phylogenetic relationship of Opiliones in Puerto Rico.

ECOLOGÍA/ ECOLOGY

4-A Detection of heavy metals in muscle and liver of fish collected at Caño Tiburones using atomic absorption and RAPD-PCR analysis to detect genotoxicity

Miguel Quiñones, Kevin Vázquez and Lizbeth Romero-Pérez

Contamination with heavy metals is a mayor concern in health, since many of these contaminants have been deemed responsible for human ailments. The purpose of this study was to determine the amount of heavy metals cadmium, chromium and nickel in muscle and liver, and verify the integrity of the genomic DNA of fish collected at the Caño Tiburones. This natural reserve is placed next to a land fill, which is thought to be a main source of contamination. Samples were collected the same day or day before the dissection. Muscle and liver were dried and subjected to humid digestion for heavy metal detection. For RAPD-PCR, DNA was extracted from muscle and stored at -20°C. Our results were compared with a previous investigation involving blue crabs (*Callinectes spp.*) in the eastern region of Puerto Rico. High levels of heavy metals present in the liver of fish was consistent with high levels of heavy metals in the hepatopancreas of crabs. This can be attributed to the presence of metal-binding proteins. The levels of cadmium and chromium detected exceeded the limits established by FDA for human consumption. The RAPD-PCR showed a difference in the molecular markers of sea bass samples. Further studies are

needed in order to evaluate more samples for heavy metals and the establishment of RAPD profile for genotoxicity.

POLÍTICAS EDITORIALES/EDITORIAL POLICIES

Inter Scientific es una revista académica de publicación anual del Decanato de Asuntos Académicos, Recinto de Arecibo de la Universidad Interamericana de Puerto Rico. Persigue el propósito de fomentar y divulgar investigaciones y artículos especializados del campo científico de las Matemáticas, Ciencias Naturales, la Salud y la Tecnología. Publica artículos inéditos de la facultad, estudiantes y especialista extramuros enmarcados dentro de alguna de las siguientes categorías:

1. **Artículo de investigación científica y tecnológica**
2. **Artículo de revisión**
3. **Artículo corto**
4. **Ensayos**

Puede descargar la guía completa de políticas editoriales al igual que la plantilla para la preparación y presentación de artículos a través del siguiente enlace:

<http://www.arecibo.inter.edu/Portal/intersci.htm>

Inter Scientific is an annual academic publication of the Office of the Dean of Academic Affairs of the Arecibo Campus of Inter American University of Puerto Rico. Its goal is to promote and disseminate research and scholarly articles in the scientific fields of Mathematics, Science, Health and Technology. It publishes original articles of faculty, students, and extramural specialists framed within one of the following categories:

1. **Article on scientific and technological research**
2. **Review article**
3. **Brief article**
4. **Essays**

This complete guide of editorial policies as well as the template for the preparation and submission of articles is available at:

<http://www.arecibo.inter.edu/Portal/intersci.htm>



SUPPORTING RESEARCH

IN OUR CAMPUS

SINCE 2009



INTER AMERICAN UNIVERSITY OF PUERTO RICO
ARECIBO CAMPUS