

**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**



**CAMPUS GUANAJUATO**

**DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**

**POSGRADO EN QUÍMICA**

**“ESTUDIO ANALITICO DE POTENCIALES FACTORES DE RIESGO EN DIABETES APLICADO AL ESTADO DE GUANAJUATO”.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN QUIMICA**

PRESENTA:

**Armando Gómez Ojeda**

GUANAJUATO, GUANAJUATO, 4 DE JULIO DE 2014.



**Universidad de Guanajuato**

**Campus Guanajuato**

**Division de Ciencias Naturales y Exactas**

**Departamento de Química**

**Guanajuato, Guanajuato., 4 de Julio de 2014.**

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título: **“ESTUDIO ANALITICO DE POTENCIALES FACTORES DE RIESGO EN DIABETES APLICADO AL ESTADO DE GUANAJUATO”**. realizado por el Q. Armando Gómez Ojeda en los laboratorios del Departamento de Química, de la unidad Pueblito de Rocha, de la Universidad de Guanajuato, para obtener el grado de Doctor en Química bajo la dirección del Dr. Kazimierz Wrobel , la Dra. Katarzyna Wrobel y la Dra. Ma Eugenia Garay-Sevilla.

**” La verdad os hará libres ”**

---

**Dr. Kazimierz Wrobel**

---

**Dra. Katarzyna Wrobel**

---

**Dra. Ma Eugenia Garay-Sevilla**

**“ESTUDIO ANALITICO DE POTENCIALES FACTORES DE  
RIESGO EN DIABETES APLICADO AL ESTADO DE  
GUANAJUATO”.**

**TESIS**

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de DOCTOR EN QUÍMICA**

**PRESENTA**

**Q. Armando Gómez Ojeda.**

**MIEMBROS DEL JURADO**

---

**Dra. Ericka Bustos Bustos.**

---

**Dr. Gustavo Cruz Jimenez.**

---

**Dra. Ana Lilia Gonzalez**

---

**Dra. Alma Hortencia Serafin Muñoz.**

---

**Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa**

---

**Dra. Elva Perez Luque.**

**A Dios...**  
**si hay Dios.**  
**¿Hay Dios?**

**¡Ay Dios!**

**Agradezco profundamente a los Doctores Wrobel,  
quienes haciendo acopio de la poca paciencia que les queda,  
lograron enseñarme como avanzar a traves de los sinuosos caminos de la ciencia.**

## Resumen

Los tintes pandémicos que en la actualidad ha alcanzado la diabetes tipo 2 distan mucho de los números que tenía hace apenas 30 años; en México, especialmente en Guanajuato (es el estado que lidera el número de muertes relacionadas con diabetes a nivel nacional [1, 2]) ha sido un cambio tan súbito que en algunos casos ha desbancado en enfermedades tradicionalmente relacionadas con la dieta, como la hipertensión (ahora tan a menudo asociada con diabetes) o la desnutrición. Este vertiginoso cambio apunta sin duda a la existencia de un ambiente diabetogénico más acorde con una distopia orwelliana[3] (“1984”, George Orwell) que con una azarosa epidemia natural. Me explico: al contrario de lo que sucede con muchas enfermedades de corte epidémico (cólera, malaria, peste bubónica, etc.) la génesis de la diabetes es multifactorial. En efecto, hasta ahora se considera a la diabetes como una enfermedad compleja en la que inciden factores genéticos y ambientales para llevar al deterioro en la secreción de la insulina de las células  $\beta$  del páncreas[4]. Con relación a los factores ambientales mucho se ha dicho que han contribuido a su desarrollo los, desde mi humilde perspectiva, mal llamados hábitos sedentarios (considero mucho más adecuado el término hábitos abúlicos) y por supuesto, la evolución de la dieta hacia productos alimenticios industrializados y cada vez más procesados.

Este último es uno de los principales enfoques de este trabajo. Creo necesario recalcar que todavía hace algunos años (quizá aún en el presente) se consideraba a la diabetes como una enfermedad de ricos, pero ahora, hago una pregunta retórica ¿cuál es el grupo socioeconómico más afectado? Se achaca en gran parte a un factor genético la prevalencia de diabetes especialmente en afroamericanos y latinos, el cual sin duda lo hay, pero no creo que sea suficiente para explicar por sí solo los avasallantes números de esta pandemia entre estos dos grupos poblacionales. Supongo que en parte por no ser políticamente correcto, no se señalan las obvias diferencias socioeconómicas entre diferentes estratos raciales, pero es claro que el factor socioeconómico juega un papel primordial en esta pandemia del nuevo siglo. Para seguir con esta puntualización del contexto socioeconómico de mi trabajo, baste decir que México es el principal consumidor de bebidas edulcoradas a nivel mundial (seguido muy de cerca por Estados Unidos)[5-7] y, como coincidencia, en la mayor parte de los municipios del país es mucho más fácil (y barato) tener acceso a bebidas edulcoradas que a agua potable, lo cual es al mismo tiempo increíble e indignante. ¿Cómo se ha llegado a esto? Entre otras cosas por la falta de un sistema de potabilización adecuado y el embate perenne de los cabilderos de las industrias refresqueras y alimenticias (Pepsico y Coca Cola son el mejor ejemplo de ambas, sin olvidar por supuesto al grupo Bimbo). En ese mismo tenor, la industria alimenticia cada vez procesa más los alimentos y en su afán de lucro confunde al consumidor, haciendo que este último olvide la diferencia entre mucho y bueno, de forma tal que los alimentos son cada vez más salados, más dulces, más grasosos y, en una relación claramente inversa, menos saludables.

Habiendo dejado en claro la preponderancia del factor socioeconómico al contribuir de manera decisiva en la creación de un ambiente diabetogénico, me abocó ahora a hablar de los aspectos analíticos que intenté abarcar en este trabajo. El enfoque específico de mi tesis ha sido realizar un

estudio analítico de algunos potenciales factores de riesgo en diabetes en el estado de Guanajuato. La idea original fue la de caracterizar cuantitativamente los contaminantes de agua potable y de alimentos en dicha entidad para evaluar su posible relación con la incidencia de la diabetes mellitus tipo 2, habiéndose tomado en cuenta también, los compuestos naturalmente presentes en alimentos, mismos que se conocen como factores de riesgo potenciales (como los productos de glicación avanzada, AGEs por sus siglas en inglés). Para complementar la información, se llevaron a cabo análisis de fluidos biológicos de pacientes diabéticos demostrando así la utilidad de los procedimientos desarrollados/adoptados en el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de la diabetes mellitus tipo 2.

En el capítulo **IV.1** se propuso analizar estadísticamente la incidencia geográfica de la diabetes en el estado de Guanajuato, para ello se analizaron los resultados de un análisis previo[8], sobre las concentraciones de algunos metales y metaloides en pozos de agua potable de los municipios del estado. El enfoque estadístico de dicho análisis consideró los datos de la incidencia de diabetes en esos municipios durante dos años. Y si bien dos años es poco tiempo para tener resultados contundentes, los resultados que arroja nuestro análisis concuerdan con estudios similares reportados en diversas partes del mundo. Específicamente, parece haber una relación entre la exposición a arsénico y la incidencia de diabetes en varios municipios[9-11].

Diversos estudios señalan que la homeostasis corporal es alterada durante la diabetes[12-15]. Asimismo se conoce que en condiciones fisiológicas ocurren ciertas interacciones entre especies de molibdeno y cobre. En particular, un estudio reciente llevado a cabo en pacientes diabéticos encontró concentraciones elevadas de molibdeno y cobre en pacientes con diabetes avanzada y la eliminación de cobre en orina se correlacionó directamente con los biomarcadores de las complicaciones típicas de esta enfermedad.[16] Aunado a ello, hubo un aumento estadísticamente significativo de la relación Cu/Mo en orina con el progreso de la nefropatía, lo cual sugiere que el antagonismo entre molibdeno y cobre pudiera estar relacionado con el desarrollo de las principales complicaciones diabéticas. Todo esto nos llevó a preguntarnos, ¿hay alguna fuente dietética de molibdeno que pudiera ser de importancia particular para los mexicanos y guanajuatenses? En búsqueda de posibles respuestas, nos enfocamos en las leguminosas como componentes importantes en la dieta de muchas culturas y especialmente, en el frijol que es una piedra angular de la pirámide nutricional de los mexicanos. Los pacientes diabéticos muchas veces deben ajustarse a una estricta dieta que restringe alimentos con alto índice glucémico así como platillos muy grasosos (tan típicos de la comida rápida y de varios guisos mexicanos), dejando el campo abierto para vegetales sanos, pero poco calóricos, lo que dificulta la adhesión dietaria de los pacientes. Los pacientes en muchos casos recurren a la ingesta de frijol por las semejanzas en el contenido proteico con los alimentos de origen animal y, dado que su ingesta deja una mayor sensación de saciedad. Las leguminosas son los alimentos con mayores concentraciones de molibdeno, por todo ello, en el capítulo **IV.2** nos pareció interesante evaluar diferentes tipos de frijol como una fuente dietaria tanto de este elemento como de cobre, ya que ambos elementos suelen tener una relación antagónica[17-19].

En el capítulo **IV.3** se aborda la necesidad de crear métodos analíticos fiables para evaluar los niveles fisiológicos de biomarcadores que sean de utilidad para diagnosticar y evaluar el pronóstico de la diabetes, en este caso se realiza la determinación de un AGE que ha sido relacionado en diversos estudios con el progreso y severidad de las complicaciones diabéticas: la pentosidina[20]. En este caso en particular, se evalúa la concentración de pentosidina en orina de pacientes diabéticos con nefropatía, con y sin tratamiento con Telmisartan. El diseño del estudio clínico y las muestras de orina provenían de un estudio realizado en el Departamento de Ciencias Médicas, DCS, Campus León (Dra. Ma. Eugenia Garay Sevilla, Dr. Carlos Kornhauser Araujo) pero el análisis de pentosidina en estas muestras fue importante en el contexto del presente trabajo; en concreto, los resultados obtenidos demostraron que la sensibilidad del procedimiento analítico propuesto permite detectar diferencias entre niveles de pentosidina entre diferentes grupos de pacientes en un estudio clínico.

En el capítulo **IV.4** y siguiendo con esta búsqueda de métodos analíticos simples y confiables que nos permitan la evaluación y discriminación de pacientes sanos y diabéticos, o pacientes diabéticos que por sus complicaciones se encuentren en diferentes estados clínicos, se propone un nuevo método para la determinación de diversos  $\alpha$ -cetoaldehidos en orina, una muestra no invasiva y de fácil recolección. Esta determinación se propone como una nueva herramienta que coadyuve en el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de la diabetes. Además, este método parece ser lo suficientemente sensible para evaluar el progreso de la diabetes y la adhesión dietaria de los pacientes y/o su exposición a fuentes exógenas de los analitos en cuestión.

Dado que tanto los AGEs exógenos como endógenos parecen jugar un papel importante en el desarrollo y progreso de la enfermedad, en el capítulo **IV.5** se evalúa la concentración de  $\alpha$ -cetoaldehidos en jarabes de agave, un producto que se comercializa como un edulcorante alternativo para diabéticos. Pero, ¿es una alternativa segura como edulcorante alternativo? Con relación a lo que parece un campo promisorio para futuras investigaciones, este estudio sugiere que el jarabe de agave podría ser utilizado como un ungüento bactericida, lo cual abre la perspectiva para el trabajo futuro enfocado en su posible uso como alternativa a los antibióticos[21-23].

Finalmente, en el análisis estadístico realizado en el capítulo IV.I se encontraron concentraciones relativamente altas de plomo en aguas de pozo de varias localidades, este elemento además de presentar una alta toxicidad, ha sido asociado con diabetes. En este contexto, se decidió incluir en el **anexo 1** un estudio de remoción de plomo en agua, mediante la fabricación y modificación de películas de un biopolímero natural que se extrae de las algas, llamado alginato. Este trabajo se realizó durante una estancia de tres meses en la universidad de Nagaoka, Japón.

Sin más, deseo que este trabajo sea al menos tan útil como para mí lo fueron varios trabajos previos citados en este documento y, espero haber podido avanzar en el desarrollo de procedimientos analíticos y en su aplicación para un mejor entendimiento de los mecanismos que llevan al desarrollo y progreso de la diabetes.

## INDICE GENERAL.

<b>Resumen</b>	5
<b>Índice general</b>	8
<b>Índice de tablas</b>	12
<b>Índice de figuras</b>	13
<b>CAPITULO I. Introducción.</b>	15
I.2 Diabetes mellitus – marco socioeconómico y retos para la química analítica	18
I.3 Relevancia de micronutrientes minerales en diabetes.	19
I.3.1 Elementos benéficos en diabetes	20
I.3.2 Xenobióticos no esenciales	25
I.4 Enfoque metalómico del estudio	28
I.5 Enfoque regional del estudio	29
I.6 Precursores y productos de glicación avanzada <i>in vivo</i> y en alimentos	29
I.6.1 Productos finales de glicación avanzada (AGEs)	29
I.6.1.1 Pentosidina	32
I.6.1.2 Glioxal y metilglioxal como precursores de los AGEs y marcadores de daño oxidativo	33
I.6.2 Enfoque del estudio en el análisis de los AGEs y de sus precursores	34
I.7 Antecedentes del proyecto	35
<b>CAPITULO II. Objetivos</b>	36
Objetivo general	36
Objetivo particular	36

<b>CAPITULO III. Parte Experimental</b>	37
Materiales y reactivos	37
<b>CAPITULO IV. Resultados y discusión</b>	40
<b>Capítulo IV.1.</b>	40
IV.1.1. Evaluación estadística de una posible asociación entre los niveles de metales/metaloideos en aguas y la incidencia de diabetes mellitus 2 en el Estado de Guanajuato.	40
IV.1.2. Conclusiones	44
<b>Capítulo IV.2.</b>	45
IV.2.1. <i>Frijol como fuente dietética de molibdeno y cobre – estudio analítico</i>	45
IV.2.2. Introducción – relevancia de Mo y Cu en diabetes.	45
IV.2.2.1. Materiales y métodos	46
IV.2.2.1. Muestras	46
IV.2.2.2. Tratamiento de muestras para el análisis de metales totales	46
IV.2.2.3. Modelo gastrointestinal	47
IV.2.2.4. Determinación de elementos por ICP-MS	47
IV.2.3. Resultados y discusión.	48
IV.2.4. Conclusiones.	53
<b>Capítulo IV.3.</b>	54
IV.3.1. Avances en el desarrollo de los procedimientos analíticos para la determinación de los AGEs y de sus precursores	54
IV.3.1. Síntesis, purificación y determinación de pentosidina en matrices biológicas.	54

IV.3.2. Materiales y métodos.	56
IV.3.3. Resultados y discusión.	57
IV.3.4. Conclusiones.	66
<b>Capítulo IV.4.</b>	<b>67</b>
IV.4.4. Avances en el desarrollo de los procedimientos analíticos para la determinación de los AGEs y de sus precursores	67
IV.4.4. Determinación cromatografica de glioxal, metilglioxal y diacetil usando 4- metoxi-o-fenilendiamina como agente derivatizante.	67
IV.4.1. Introducción	67
IV.4.2. Materiales y métodos	70
IV.4.2. 1. Protocolo para el procedimiento analítico desarrollado	70
IV.4.2. 2. Análisis estadístico	71
IV.4.3. Resultados y discusión	71
IV.4.4. Conclusiones	85
<b>Capítulo IV. 5.</b>	<b>86</b>
IV.5. Avances en el desarrollo de los procedimientos analíticos para la determinación de los AGEs y de sus precursores	86
IV.5. Metilglioxal es responsable de la actividad antibacteriana que presentan los jarabes de agave de alta fructuosa.	86
IV.5.1. Introducción	86
IV.5.2. Materiales y Métodos	88
IV.5.2.1. Determinación cromatográfica de glioxal, metilglioxal y diacetil en mieles, usando 4-metoxi-o-fenilendiamina como agente derivatizante.	88
IV.5.2.2. Ensayo para peróxido de hidrógeno	89
IV.5.2.3. Ensayo para actividad antibacteriana	89
IV.5.2.4. Análisis estadístico	90
IV.5.3. Resultados y discusión.	90

IV.5.3.1. Determinación de compuestos dicarbonílicos	90
IV.5.3.2. Evaluación de la actividad antibacteriana	95
IV.5.3.3. Evaluación para peróxido de hidrógeno	97
IV.5.3.4. Análisis de componentes principales	100
IV.5.4. Conclusiones	102
<b>CAPITULO V. Conclusiones finales.</b>	<b>103</b>
<b>Anexo 1. Reporte de estancia.</b>	<b>106</b>
A.1 Introducción – plomo como elemento tóxico en diabetes y posible estrategia de remoción en aguas naturales.	106
A.2. Materiales y métodos	108
A.2.1. Preparación de los diferentes tipos de alginatos para remoción.	108
A.2.2. Procedimiento experimental para la remoción de Pb (II).	108
A.3. Resultados y Discusión	109
A.4. Conclusiones	111
<b>Referencias</b>	<b>112</b>
<b>Anexo 2. Productos académicos obtenidos.</b>	<b>128</b>
Lead Ion Uptake By Sodium Alginate And Calcium Alginate Film: A Comparison Study	128
High-performance liquid chromatography determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine using 4-methoxy-o-phenylenediamine as derivatizing reagent	132
Effect of Cd(II) and Se(IV) exposure on cellular distribution of both elements and concentration levels of glyoxal and methylglyoxal in <i>Lepidium sativum</i>	139
Methylglyoxal is associated with bacteriostatic activity of high fructose agave syrups	147

## INDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Mortalidad por diabetes en México, 1940-2008.*Tasa por 100 000 habitantes.	18
<b>Tabla I.1.</b> Porcentajes de incidencia de diabetes con respecto al censo nacional de población 2005, en los municipios con mayor incidencia en el estado.	41
<b>Tabla I.2.</b> Resultados de la determinación de elementos traza en pozos municipales de agua potable, se muestran los pozos con concentraciones que superan el máximo nivel permisible acorde con la norma: NOM PROY-NOM.SSA1-250-2007.	43
<b>Tabla II.1.</b> Concentración de Mo en legumbres crudas y en agua de remojo.	48
<b>Tabla II.2.</b> Concentraciones de molibdeno en $\mu\text{g/g} \pm \text{DE}$ (n = 3) en agua de remojo, caldo, frijol cocido, suma de resultados, en frijol crudo y % de recuperación en el procedimiento de fraccionamiento.	48
<b>Tabla II.3.</b> Las concentraciones de Mo y Cu en frijol cocido liofilizado (F) y en el sobrenadante de enzimólisis (S), ambos valores como $\mu\text{g}$ del elemento por 1 gramo de frijol cocido liofilizado y con sus respectivos DE (n = 3). Se presenta también el porcentaje de biodisponibilidad ( $B = S/F \cdot 100 \%$ ).	51
<b>Tabla III.1</b> Algunos ejemplos de procedimientos cromatográficos con detección fluorimétrica, reportados en la literatura para la determinación de pentosidina en muestras biológicas.	56
<b>Tabla III.2.</b> Condiciones para el análisis cromatográfico de pentosidina en muestras de orina.	61
<b>Tabla III.3.</b> Parámetros analíticos evaluados para el procedimiento cromatográfico propuesto.	62
<b>Tabla III.4.</b> Concentración de pentosidina en orina de pacientes antes y después del tratamiento.	65
<b>Tabla IV.1.</b> Algunos ejemplos de procedimientos analíticos propuestos para la determinación de glioxal, metilglioxal ó diacetil en orina.	69
<b>Tabla IV.2.</b> Figuras analíticas de los parámetros evaluados para el procedimiento propuesto.	80
<b>Tabla IV.3.</b> Resultados de los experimentos de recuperación.	81
<b>Tabla IV.4.</b> Concentraciones encontradas de Go, MGo y DMGo en soluciones estándar de glucosa analizadas antes y después del pretratamiento SPE.	82
<b>Tabla IV.5.</b> Resultados obtenidos para Go, MGo y DMGo en orina después de diferentes tiempos de almacenamiento (- 20 ° C protegidas de la luz, n=3).	83
<b>Tabla IV. 6.</b> Resultados obtenidos para glioxal, metilglioxal y diacetil en diferentes muestras de orina obtenidos en análisis por triplicado.	84
<b>Tabla V.1.</b> Resultados de los experimentos de recuperación.	93

**Tabla V. 2.** Resultados obtenidos para glioxal, metilglioxal y diacetil en jarabes de agave, mieles de abeja y jarabes de maíz. 94

**Tabla V. 3.** Resultados del ensayo para peróxido de hidrógeno en jarabes de agave y mieles de abeja. en 98

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Efectos de metales/metaloideos en la diabetes.	19
<b>Figura 2.</b>	Esquema global de la formación de AGEs.	30
<b>Figura 3.</b>	Estructura de la pentosidina.	32
<b>Figura 4.</b>	Estructuras de los AGEs derivados de metilglioxal.	33
<b>Figura I.1.</b>	Mapa político del estado de Guanajuato, con los municipios con incidencia relativamente elevada de diabetes en los años 2008 y 2009.	42
<b>Figura I.2.</b>	Modelo PCA obtenido en la evaluación de posibles relaciones entre elementos en aguas de pozo y la incidencia de diabetes en el estado de Gto.	44
<b>Figura II.1.</b>	Fraciones de Cu y Mo encontrados en frijol cocido respecto al contenido total de cada uno de los elementos en el frijol crudo, en cuatro diferentes tipos de frijol.	50
<b>Figura II.2.</b>	Modelo PCA obtenido en la evaluación de posibles relaciones entre ingesta dietaria y pacientes diabéticos en el estado de Guanajuato	52
<b>Figura III.1.</b>	Esquema de la formación de los AGEs, mediante la reacción de Maillard.	55
<b>Figura III.2.</b>	Sustratos de la síntesis de la pentosidina.	58
<b>Figura III.3.</b>	Cromatograma de la purificación de pentosidina sintetizada y desprotegida.	59
<b>Figura III.4.</b>	Espectro de absorción de la solución de pentosidina.	60
<b>Figura III.5.</b>	Evaluación de pureza de pico en orina de un voluntario sano.	62
<b>Figura III.6.</b>	Cromatogramas de una muestra de orina de un paciente diabético con complicaciones leves.	63
<b>Figura III.7.</b>	Cromatogramas de una muestra de orina de un paciente diabético con complicaciones severas.	63
<b>Figura III.8.</b>	Cromatogramas de una muestra de orina de un voluntario sano, y la misma orina con tres puntos de adición de estándar.	64

<b>Figura IV.1.</b>	Esquema de la reacción de derivatización.	72
<b>Figura IV.2.</b>	Espectro de fluorescencia de quinoxalina.	73
<b>Figura IV.3.</b>	Muestras de orina después de la reacción de derivatización con 4MPD sin protección antioxidante.	74
<b>Figura IV.4.</b>	Señales de fluorescencia para glioxal, metilglioxal, diacetil y dietilglioxal después de su derivatización obtenidas en diferentes tiempos de reacción a 40°C.	75
<b>Figura IV.5.</b>	Efecto del pH usado durante la reacción de derivatización sobre las señales de las quinoxalinas de glioxal, metilglioxal, diacetil y dietilglioxal.	76
<b>Figura IV.6.</b>	Efecto de la concentración de acetonitrilo en la mezcla de reacción sobre las señales fluorescentes obtenidas para las quinoxalinas de los analitos.	77
<b>Figura IV.7.</b>	Cromatogramas de HPLC-FLD para muestras de orina sin pretratamiento y después del pretratamiento propuesto en este trabajo.	78
<b>Figura IV.8.</b>	Cromatogramas típicos obtenidos mediante el procedimiento de HPLC-FLD.	79
<b>Figura IV.9.</b>	Cromatograma de HPLC-FLD para una muestra de orina, se muestra la región de elución del DEGo: (---) orina sin EI; (—) orina con EI.	81
<b>Figura V.1.</b>	Cromatogramas típicos de cromatografía de líquidos en fase reversa con detección fluorimétrica. (500 µg/L DEGo como estándar interno).	92
<b>Figura V.2.</b>	Resultados obtenidos en un ensayo espectrofotométrico en caldo diluido para medir la actividad antimicrobiana.	96
<b>Figura V.3.</b>	Resultados del ensayo para peróxido de hidrógeno.	99
<b>Figura V.4.</b>	Cromatogramas típicos de GC-FID mostrando el perfil de azúcares en la miel de abeja H1 (...) y en el jarabe de agave A1(---) ; mezcla de estándares 1 mg/mL (___).	100
<b>Figura V.5.</b>	Análisis de componentes principales de los datos obtenidos en el análisis de los jarabes de agave (A1-A5) y de las mieles de abeja (H1-H3).	101
<b>Figura A.1.</b>	Porcentaje de remoción de Pb (II) contra tiempo (en minutos).	109
<b>Figura A.2.</b>	Diagrama esquemático de la estructura del Ca-Alg.	109
<b>Figura A.3.</b>	Porcentaje de remoción de plomo contra tiempo para películas de Ca- Alg en soluciones de Pb (II) con diferentes concentraciones.	110
<b>Figura A.4.</b>	Porcentaje de remoción de plomo para películas y perlas de Ca-alg después de 360 minutos.	111

## Capítulo I.

### I.1. Introducción

La diabetes mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa. Se presenta cuando el organismo no produce suficiente insulina o esta no actúa debidamente, provocando deficiencias en el proceso de asimilación de la glucosa, aumentando su concentración en el torrente sanguíneo lo que conduce con el tiempo al desarrollo paulatino de complicaciones en todo el organismo. Existen numerosas clasificaciones de la diabetes, siendo la más aceptada la formulada por el Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Diabetes Mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por una hiperglucemia resultante de una defectuosa secreción o acción de la insulina, o ambas, que la divide en dos tipos principales sin considerar la edad de inicio: diabetes mellitus tipo 1 (DM 1) y diabetes mellitus tipo 2 (DM 2)[24]. La diabetes DM 1 es caracterizada por una destrucción auto inmune de células pancreáticas tipo beta que típicamente llevan a un déficit absoluto de insulina. Ocurre principalmente en niños o adultos jóvenes, pero puede presentarse a cualquier edad. Este tipo representa entre el 5 y 10% de personas enfermas. La DM 2 se caracteriza por una resistencia insulínica, acompañada por un déficit relativo de insulina y representa el 90-95% de los casos de diabetes mellitus. En México, la diabetes afecta al 8 % de la población y ha sido reportada como la cuarta más importante causa de mortalidad en nuestro país, así como la primera causa de los estados terminales de insuficiencia renal, ceguera adquirida y de las amputaciones no relacionadas con accidentes. Se estima que la diabetes afecta más de 150 millones de personas en el mundo y se espera que en el año 2025 este número será duplicado. En el periodo 2005 – 2007, la prevalencia a diabetes se incrementó 13.5 % además hay datos que sugieren que el 24 % de todos pacientes diabéticos no han sido aún diagnosticados [25, 26].

Durante el desarrollo de la enfermedad, el exceso de glucosa en el organismo provoca una serie de cambios patológicos los cuales son responsables de las principales complicaciones en diabetes:

- Enfermedades cardiovasculares <sup>[27-30]</sup>;
- Nefropatía <sup>[31-36]</sup>;
- Retinopatía [35, 37, 38];
- Neuropatía [39, 40];

Los mecanismos responsables por las complicaciones en diabetes no se conocen con exactitud; sin embargo, existe un consenso acerca de la importante contribución de las siguientes vías [35, 41-44]:

- Acelerada glicosilación no enzimática (glicación) con depósitos de productos finales de estos procesos (AGEs);
- Aumento de estrés oxidativo;
- Activación de isoformas de proteína cinasa C;
- Activación de la vía de la aldosa reductasa.

Se han definido los siguientes factores de riesgo en diabetes: edad mayor de 45 años, obesidad, antecedentes familiares de la enfermedad, bajos niveles séricos de HDL, altos niveles de triglicéridos, alta presión sanguínea, intolerancia a glucosa, síndrome metabólico y falta de actividad física. Además, ciertos grupos étnicos, incluyendo a los hispano-americanos presentan un mayor riesgo de tener diabetes [26].

Es de conocimiento común que hábitos de vida saludable, como una dieta sana, el control de peso y el ejercicio diario pueden ayudar en prevención o, en su caso, en el mejor control de la diabetes [45-47]. En cuanto a la dieta indicada, además de ser baja en grasas saturadas y con alto contenido de fibra dietética, es imprescindible asegurar la ingesta de cantidades adecuadas de ciertos micronutrientes [46]. En este sentido, existe un creciente número de evidencias sobre el importante papel de vitaminas [48], antioxidantes [49], ácido fólico y minerales [48, 50, 51]. En el caso de los minerales, los más estudiados han sido el zinc, selenio, vanadio, manganeso y cromo, entre otros [52-56]. Hay que notar sin embargo que, tanto un déficit como niveles excesivos de micronutrientes han sido reportados como factores potenciales en la patogénesis de diabetes y sus complicaciones [57-60]. De ahí, uno de los temas importantes en los estudios sobre diabetes es evaluar los efectos de los micronutrientes y de los potenciales contaminantes de los alimentos y de agua potable. En este tipo de estudios se busca asegurar una adecuada ingesta de los micronutrientes antes mencionados, mediante evaluación de sus niveles en diferentes tipos de alimentos [61], plantas medicinales [62] así como en la elaboración de diversas formulaciones de suplementos dietéticos [63]. Cabe mencionar que los principales componentes considerados en la elaboración de los suplementos para el tratamiento de diabetes han sido: ácido  $\alpha$ -lipóico, cromo trivalente (típicamente en forma de picolinato), selenio, manganeso, vanadio, zinc, vitamina E, C y D, ácido fólico, isoflavonoides y polifenoles [64]. Por otro lado, existe interés en estudiar un posible efecto de contaminantes medio ambientales como factores de riesgo en diabetes [65-71]. En el contexto de los elementos metálicos y metaloides, se han estudiado los efectos de arsénico [72, 73], cadmio [70, 74], plomo [75], cobre, fierro [12, 76], vanadio [77, 78], mercurio [79], entre otros [80].

Existen diversas evidencias sobre elevados niveles de algunos metales y metaloides en diferentes lugares del estado de Guanajuato. Entre los elementos de interés en la región se han considerado los siguientes: As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Sb, Se, Pb, Tl, V y Zn. En cuanto al plomo, su presencia en el medio ambiente se debe a las emisiones de las industrias petrolera, metalúrgica, de pinturas y de fundición; la contaminación con vanadio y níquel proviene de la

combustión de petróleo, carbón y aceites pesados; la problemática de cromo se ubica principalmente en León – sede de la industria de curtido, aunque la contaminación también se ha detectado en otras regiones del Estado. El mercurio es un contaminante típico de zonas mineras, en las que se obtenían plata y oro mediante los procedimientos antiguos. Además de actividades antropogénicas, la presencia de niveles elevados de metales en el Estado de Guanajuato se debe a la composición particular de la corteza terrestre. Así, existen varios reportes, en los que se observa la presencia de As, Pb, Hg, Sb, entre otros, en diferentes compartimientos del medio ambiente [81-86]. Es importante hacer notar que los niveles de los elementos antes mencionados han sido determinados en jales de minas, en suelos, lodos, aguas superficiales y subterráneas de la región. Aunque la movilidad de contaminantes potenciales ha sido estudiada por varios autores [81, 82, 87], la información sobre los niveles de elementos en productos alimenticios producidos en el estado de Guanajuato y, en particular en las zonas con elevados niveles de metales/metaloides es escasa. El proyecto de tesis ha sido dirigido al desarrollo y aplicación de procedimientos analíticos que permitan evaluar la posible relación de los contaminantes de agua potable y de algunos componentes de los alimentos con incidencia/progreso de las complicaciones en diabetes en el estado de Guanajuato. Un enfoque adicional ha sido en el análisis de los compuestos naturalmente presentes en alimentos, mismos que se conocen como factores de riesgo potenciales, incluyendo específicamente productos de glicación avanzada y sus precursores.

## **I.2. Diabetes mellitus – marco socioeconómico y retos para la química analítica**

La diabetes es una enfermedad crónica que ocurre cuando el páncreas no produce suficiente insulina, o el cuerpo no puede hacer uso efectivo de la insulina que produce [88]. Afecta a diferentes órganos y tejidos y dura toda la vida. Hay dos tipos principales de diabetes, en la diabetes tipo 1 o insulino dependiente, el paciente simplemente es incapaz de producir insulina, a diferencia de la diabetes tipo 2, donde el paciente es capaz de producir insulina, pero en cantidad insuficiente o el cuerpo no puede hacer uso efectivo de la insulina que produce.

En la actualidad la diabetes se ha convertido en una enfermedad de proporciones epidémicas, a nivel mundial hay 285 millones de enfermos, más del 4% de la población la padece, y se estima que en los próximos 20 años el número de afectados llegue a 438 millones [89]. En México el problema es aún más grave, la diabetes ocupa el primer lugar dentro de las principales causas de mortalidad y presenta un incremento ascendente con alrededor de 60 000 muertes y 400 000 casos nuevos al año [90], la prevalencia de diabetes mellitus en hombres y mujeres adultos de más de 20 años se ha incrementado de manera paulatina, pasando de 7.5% en el año 2008, a 9.2% en el año 2012 [91, 92]. En 2008, la principal causa de muerte fueron decesos por diabetes, muy por encima de enfermedades isquémicas del corazón (15 993 defunciones más), que es la segunda causa [91]. En Guanajuato la prevalencia de diabetes en adultos mayores de 20 años es del 5.6% siendo mayor en mujeres (6.3%), que en hombres (4.7%) [93]. Se le puede considerar una enfermedad incapacitante ya que su prevalencia entre la población económicamente activa es

bastante alta, en algunos casos su porcentaje es incluso mayor que su porcentaje de incidencia total, lo cual la convierte en la enfermedad que hace mella entre el grupo de población más importante para cualquier sociedad [94, 95]. En cuanto a morbilidad, el 97% de los nuevos casos de diabetes en México, corresponden al tipo 2 [96]. Asimismo la diabetes tipo 2 afecta principalmente a personas en edad económicamente activa [94, 95]. La Secretaría de Salud Pública establece el Programa de Acción Diabetes Mellitus, el cual se enfoca principalmente en la prevención de esta enfermedad y, en su caso en el mejor control de los pacientes con el fin de retardar el desarrollo de las complicaciones y desacelerar la mortalidad[97]. El segundo objetivo específico de este programa es brindar una atención multidisciplinaria para el control adecuado de la diabetes mellitus y enfermedades crónicas no transmisibles asociadas, y prevenir sus complicaciones. Asimismo, entre las acciones estratégicas del programa se incluyen la orientación alimentaria y la evaluación clínica periódica de los pacientes. En este contexto, la aportación importante de la química analítica comprende el desarrollo de nuevos procedimientos para el análisis de los marcadores de enfermedad y de sus complicaciones, la evaluación del posible impacto de factores medioambientales y de la dieta, entre otros. Por todo lo anterior, el objetivo principal de este estudio será enfocado en la diabetes mellitus tipo 2.

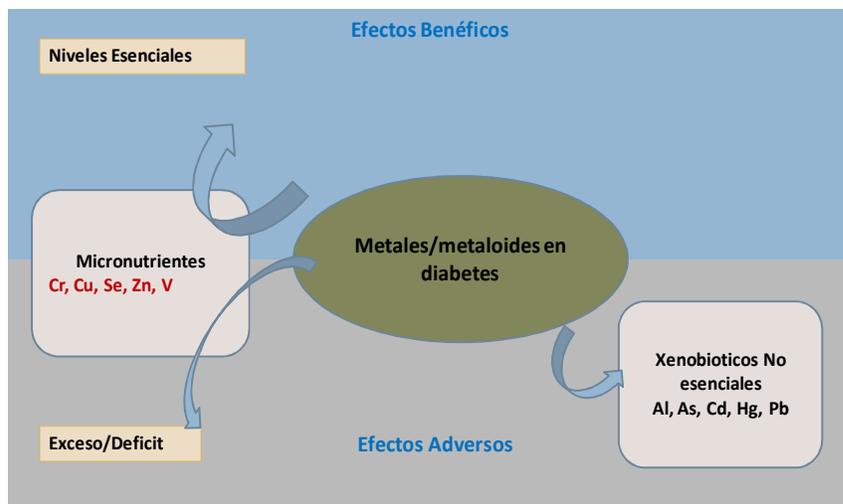
**Tabla 1.** Mortalidad por diabetes en México, 1940-2008 [90, 91].

Año	Tasa*	Lugar dentro de las principales 20 causas
1940	4.2	-
1960	7.9	19
1970	16.9	15
1980	21.8	9
1990	31.7	4
2000	46.8	3
2005	63	<b>1</b>
2006	65.2	2
2007	62	2
2008	70.8	<b>1</b>

\*Tasa por 100 000 habitantes

### I.3. Relevancia de micronutrientes minerales en diabetes.

Existen importantes evidencias experimentales que demuestran alteraciones del metabolismo de micronutrientes minerales en la diabetes, además ha sido ampliamente aceptado que algunos elementos traza pueden jugar un papel específico en la patogénesis y en el progreso de la enfermedad [12, 45, 98-102]. En este sentido, los efectos adversos han sido relacionados no solamente con la presencia de los llamados elementos tóxicos, pero también con un desbalance de los elementos esenciales. En este último caso, tanto el exceso como la deficiencia de un



micronutriente pueden perjudicar el estado del paciente diabético. [103] En la Figura 1, se presentan de una manera muy general los posibles efectos de metales o metaloides en la diabetes.

**Figura 1.** Efectos benéficos y adversos de metales/metaloides involucrados en diabetes.

En cuanto a efectos específicos, el exceso de metales y de algunos metaloides ha sido relacionado con un aumento de estrés oxidativo, uno de los factores principales en el desarrollo de la diabetes debido a su efecto en la resistencia a la insulina [104]. En particular, metales tales como cobre, cromo, hierro participan directamente en procesos redox en ambiente celular, mientras que otros como cadmio, plomo y mercurio causan el decremento de los niveles de antioxidantes celulares, principalmente por su afinidad con el grupo tiol, presente en varias biomoléculas (aminoácidos, péptidos, enzimas, etc.). Independiente del modo de acción, la presencia de los llamados elementos tóxicos, así como un desbalance de elementos esenciales causan la producción de las especies reactivas de oxígeno, incluyendo ( $\text{HO}^\cdot$ ), ( $\text{O}_2^\cdot^-$ ), ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [98, 105]. Por otro lado, se conoce que la deficiencia de los micronutrientes cobre, selenio, manganeso, cromo y zinc afecta el control glucémico [45, 106, 107]. Cabe mencionar que en algunos casos, el control glicémico puede mejorarse mediante una suplementación adecuada de ciertos micronutrientes [108, 109]. Finalmente, hay que resaltar que ciertas especies de vanadio, zinc, molibdeno y selenio han sido descritos como agentes miméticos de la insulina y utilizados en el tratamiento de diabetes [110-115].

El estatus de los elementos metálicos y metaloides en pacientes diabéticos ha sido evaluado en un considerable número de reportes. Las muestras clínicas más frecuentemente analizadas fueron

sangre total, plasma, suero, orina, pelo y uñas. Algunos estudios fueron enfocados en un solo elemento con el fin de conocer su efecto específico [70, 72, 106, 107, 116, 117], mientras que en otros se realizó el análisis de varios elementos en la búsqueda de posibles cambios más generalizados [99, 101, 118-122]. Con base en los resultados reportados, se puede resumir que los pacientes diabéticos presentan niveles séricos más altos de Cu, Pb, As, Cd, Ni, Al y más bajos niveles de Se, Cr, Zn y Mn respecto a los controles. Es importante sin embargo que, en la mayoría de los estudios multi-elementales se llevó a cabo exclusivamente la comparación de los niveles de concentración de elementos entre pacientes diabéticos y personas sanas, sin tomar en cuenta parámetros comúnmente utilizados para evaluar el estado de paciente y el progreso de las complicaciones de la enfermedad. También es relevante indicar que los cambios en los niveles de concentración observados, aparentemente fueron afectados por la característica particular del grupo seleccionado para el estudio, es decir la edad de los pacientes, complicaciones de la enfermedad, posible obesidad, embarazo, hábito de fumar, etc. [105]

### **I.3.1. Elementos benéficos en diabetes**

La lista de micro-elementos esenciales para la salud del hombre incluye hierro, zinc, cobre, selenio, manganeso, molibdeno, cromo, yodo y cobalto (en forma de vitamina B12). Los resultados de varios estudios en animales sugieren que otros elementos tales como, boro, silicio e incluso cadmio, níquel, arsénico y estaño podrían también tener cierto papel benéfico, aunque en concentraciones muy bajas[115, 123]. El requerimiento de los elementos esenciales es bajo (< 100 mg/día), pero es necesario mantener un estatus adecuado debido a que estos elementos tienen diversas funciones tales como la función catalítica en procesos metabólicos, el control de la asimilación de otros nutrientes, y el uso de energía. Cabe mencionar aquí, que aproximadamente 25% de las proteínas en el organismo humano contienen en su estructura uno o más iones metálicos; entre estas metaloproteínas se encuentran metaloenzimas, proteínas de transporte y almacenamiento, y proteínas que participan en la transducción de las señales intra- y extracelulares[115]. Por otra parte, se ha demostrado que las especies metálicas de baja masa molecular también pueden ejercer efectos benéficos *in vivo*.

Ya fue mencionado que el incremento del estrés oxidativo y la inhabilitación de los mecanismos de defensa antioxidante son considerados importantes factores que contribuyen a la patogénesis y progreso de la diabetes mellitus[124-126]. En este sentido, los elementos como cobre, selenio, manganeso y zinc están presentes en varias enzimas relacionadas con el combate al estrés oxidativo, y es de esperar que una alteración en el metabolismo de estos elementos incida directamente sobre la defensa antioxidante en el cuerpo. Como ejemplo, las enzimas del grupo súper óxido dismutasas (SOD) son metaloenzimas que contienen iones de Cu, Zn, Fe, Mn o Ni como cofactor y catalizan la dismutación de súper óxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno[127, 128] formando una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno. Existen varios tipos de súper óxido dismutasa (SOD), en la SOD1, el cobre y

el zinc son parte de la enzima, la cual se encuentra en el citoplasma de prácticamente todas las células eucariotas [115, 128]; la enzima SOD2 ó SOD-Mn mitocondrial, como su nombre lo indica, se encuentra en humanos en las mitocondrias y contiene en su centro activo manganeso[115, 124, 128]. Es relevante mencionar que ciertas poliaminas cíclicas de manganeso, así como derivados de sales de manganeso mimetizan la acción de la enzima súper oxido dismutasa (SOD)[129-132]. Por otro lado, la familia de las glutatión peroxidasas (GSH-Px) agrupa a 4 tipos distintos de selenoproteínas en mamíferos. De acuerdo a estudios en animales, cultivos celulares y estudios genéticos diversos, su función principal es responder a los ataques oxidativos mediante la eliminación (reducción) de peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos orgánicos, como son los productos tóxicos de la peroxidación lipídica[133-135]. En el centro activo de estas enzimas está presente el aminoácido proteinogénico Se-cisteína; la inactivación de estas enzimas es una de las causas de la sobreproducción de radicales hidroxilo y anión súper óxido durante el proceso de estrés oxidativo. La GSH-Px es esencial para la remoción de productos tóxicos formados durante la peroxidación lipídica[134, 135], pero la actividad de estas enzimas se vio disminuida en pacientes diabéticos, el efecto es asociado con el decremento de selenio en estos pacientes respecto a las personas sanas[52, 136-138].

### **Cromo**

La suplementación de cromo (picolinato de cromo) parece mejorar el control glucémico en pacientes con diabetes tipo 2, esto parece deberse a un incremento en la acción de la insulina [64, 109, 139-141]. En un estudio realizado en pacientes diabéticos tipo 2 (no fumadores) se obtuvieron niveles de Ni, Pb, Al, Cu, Cr, Cd y Hg en plasma, significativamente más altos que en controles, además se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de hemoglobina glucosilada en plasma y los niveles de los metales antes mencionados[101]. Las deficiencias de elementos traza esenciales en muestras biológicas de mujeres diabéticas, entre ellos cromo, pudieran tener un papel en la patogénesis de la enfermedad[99]. El ion Cr (III) ha mostrado ser una forma esencial del elemento en ratas, ya que es requerido para la función normal de la insulina controlando el metabolismo de la glucosa. El cromo (Cr (III)) se transporta en el cuerpo ligado a la transferrina, ocupando los mismos sitios de enlace que el ion hierro. Se cree que entre otros factores la diabetes pudiera deberse a la exclusión de cromo por hierro en sitios de unión metabólicos[142, 143].

### **Cobre**

En el caso del cobre, un micronutriente esencial, se ve afectado su metabolismo durante la diabetes; en un estudio llevado a cabo en pacientes diabéticos tipo 2, las complicaciones metabólicas estuvieron asociadas con alteraciones de algunos elementos, especialmente cobre[122]. La producción de especies reactivas de oxígeno (las cuales como se mencionó anteriormente están asociadas al desarrollo de diversas patologías, entre ellas diabetes I[125, 126, 144, 145]) es facilitada por la presencia del ion cobre. Hay que resaltar que las alteraciones de la homeostasis de cobre que resultan en el aumento de Cu(II) libre, han sido asociadas con la

producción del radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton[146]. En un estudio realizado en ratones diabéticos al administrarles un agente quelante de cobre se redujo la resistencia a la insulina, se aminoró la intolerancia a glucosa y adicionalmente decrecieron los niveles de triglicéridos en suero. Esto sugiere que el ion cobre está involucrado en el desarrollo de diabetes tipo 2[144]. Las perturbaciones en el metabolismo del cobre son una característica en la diabetes, por ejemplo, niveles elevados de cobre en plasma y la defensa oxidante comprometida relacionada con los efectos inducidos por la diabetes sobre las enzimas que contienen cobre. La enzima Cu - superóxido dismutasa es alterada durante diabetes[131, 147, 148]. El daño oxidativo inducido por cobre está asociado con cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas y también, relacionadas con la edad avanzada[125, 148-150]. Tales alteraciones metabólicas pueden tomarse como medidas del incremento en el estrés oxidativo y la inflamación, las cuales pueden estar implicadas en el progreso de las patologías relacionadas con la diabetes[125, 126, 145, 150]. En un estudio en ratas se encontró que el picolinato de cobre(II) tiene una mayor actividad hipoglucémica que el respectivo complejo de vanadio, y se ha propuesto que este complejo puede ser un potente agente antidiabético alternativo [114].

### **Hierro**

Numerosas líneas de investigación sugieren que el hierro puede jugar un papel en la patogénesis de la diabetes tipo II.[13, 151-153]. Hierro es un fuerte pro-oxidante y altos niveles de hierro en la sangre están asociados con niveles más altos de estrés oxidativo que pueden incrementar el riesgo de diabetes tipo 2[142, 143, 151, 152, 154, 155]. Numerosos estudios epidemiológicos han reportado una asociación positiva entre altos niveles de hierro en el cuerpo, medido por el nivel de ferritina circulante y el riesgo de diabetes tipo 2 y de otros estados de resistencia a la insulina tales como diabetes gestacional, síndrome metabólico y síndrome ovariano policístico[154, 156-158]. Aunado a ello, el incremento de la ingesta dietaria de hierro, especialmente de hemo hierro, está asociada con diabetes tipo 2 en poblaciones aparentemente sanas[159]. Además varios estudios clínicos sugieren que la flebotomía que induce la reducción de los niveles de hierro en el cuerpo puede mejorar la sensibilidad a la insulina en humanos. Así mismo, se cree que la diabetes pudiera deberse a la exclusión de cromo por hierro en sitios de unión metabólicos [142, 143]. La toxicidad de hierro libre en el ambiente celular se debe a su participación en la reacción Fenton, en la que se genera el radical hidroxilo, altamente reactivo y tóxico.

### **Magnesio**

Magnesio es uno de los iones más abundantes presentes en células vivas y su concentración en plasma es remarcablemente constante en personas saludables. El plasma y la concentración de magnesio intracelular están estrechamente regulados por muchos factores. Entre ellos la insulina parece ser uno de los más importantes[34, 64]. La deficiencia de magnesio es el disturbio del metabolismo de metales más evidente en la diabetes mellitus insulino dependiente [100, 160]. Hipomagnesemia ha sido asociada tanto a complicaciones metabólicas graves como a

complicaciones crónicas tardías en diabetes. Particularmente preocupante, es la asociación entre hipomagnesemia y la enfermedad de corazón isquémico y retinopatía severa en humanos con diabetes mellitus. Una suplementación apropiada de magnesio podría proveer beneficios en la normalización de bajos niveles de magnesio en plasma y tejido y prevenir o retardar el desarrollo de complicaciones vasculares en pacientes diabéticos[34, 100, 160, 161].

### **Manganeso**

Las deficiencias de manganeso, pudieran tener un papel en la patogénesis de la enfermedad [99]. Asimismo, se ha visto que poliaminas cíclicas de manganeso, así como derivados de sales de manganeso mimetizan la acción de la enzima súper oxido dismutasa (SOD)[129-131]. El ion Mn (II) produce hipoglucemia en ratas, independientemente de la dosis, se ha visto que Mn(II) puede tener un efecto periférico en la entrada de glucosa a las células[162]. El polimorfismo de la enzima Mn-SOD(súper óxido dismutasa) parece estar asociado con nefropatía y retinopatía en pacientes diabéticos tipo II[163]. Datos substanciales indican que el estrés oxidativo está involucrado en el desarrollo de retinopatía diabética [124, 164, 165]. De la misma manera, metaloporfirinas de Mn (III) son capaces de entrar a la mitocondria en niveles suficientes para asegurar una acción antioxidante, lo cual lo hace un elemento efectivo para tratar el estrés oxidativo inducido como en el caso de cáncer, daño por radiación y diabetes[132]. En un estudio realizado en ratas se encontró que el picolinato de manganeso tiene una mayor actividad hipoglucémica que su complejo de vanadio[114].

### **Selenio**

Los datos disponibles sobre el rol de selenio en diabetes son inconsistentes y parece existir un enigma por su relación con la diabetes, por un lado la ingesta de antioxidantes está asociada a efectos benéficos en la enfermedad, pero estudios recientes demuestran una correlación directa entre niveles altos de selenio y la incidencia de diabetes en humanos[166, 167]. El selenio además de poseer propiedades antioxidantes bien conocidas, tiene propiedades miméticas en la insulina, en estudios realizados en animales no sólo restaura el control glucémico, además previene o alivia efectos diabéticos adversos en plaquetas y en funciones cardiacas y renales[27, 112, 168]. En poblaciones con alto nivel de selenio con excepción de mujeres embarazadas, sus suplementos no son recomendables para la prevención de diabetes. Los efectos antidiabéticos parecen estar restringidos a dosis altas y cercanas a la toxicidad, las cuales no pueden usarse en humanos; y las futuras investigaciones deberán considerar el estado de la enfermedad[167]. Se ha visto que la ingesta de selenio puede prevenir alteraciones inducidas por diabetes[64, 107, 111, 135, 167, 169, 170]. Bajos niveles de selenio y/o glutatión peroxidasa parecen estar implicados en nefropatía diabética[107]. Ebselen, un compuesto a base de selenio mimetiza la acción de la enzima glutatión peroxidasa(GSH-Px)[171]. Es sabido que compuestos de selenio pueden restaurar algunos parámetros metabólicos en diabetes. Los efectos benéficos de selenito de sodio parecen ser resultado de la restauración de las actividades alteradas de las enzimas antioxidantes en tejido cardíaco diabético[172]. La ingesta de selenito de sodio en ratas, normaliza alteraciones en tejido

óseo inducidas por diabetes[173]. Se ha encontrado que selenio tiene propiedades insulinomiméticas, en ratones diabéticos un tratamiento con selenito mejoró los niveles de glutatión en cerebro, riñones, hígado y testículos. Los ratones diabéticos tratados con selenito bajaron sus niveles de glucosa en sangre[27].

### **Litio**

Los efectos de la suplementación de litio en condiciones diabéticas fueron estudiados en ratas, al suministrar carbonato de litio el contenido de litio en hígado y músculo regresó a su rango normal, disminuyó la destrucción de células beta en el páncreas, decreció el nivel de glucosa en sangre, entre los indicadores de estrés oxidativo decrecieron los niveles de peroxidación lipídica en sangre, mientras que regresaron a niveles normales los niveles de súper óxido dismutasa en eritrocitos, y glutatión y los niveles de glutatión peroxidasa aumentaron. Estos resultados sugirieron que la restauración de litio a sus niveles normales en hígado y músculo de animales diabéticos está asociado no sólo con un decremento de glucosa en sangre, si no con una reducción del estrés oxidativo, y consecuentemente con la protección de las células pancreáticas secretoras de insulina[174].

### **Zinc**

El zinc es un elemento traza esencial crucial para la función de más de 300 enzimas y es importante para procesos celulares como la división celular y la apoptosis. El contenido de zinc en las células beta del páncreas está entre las más altas en el cuerpo, sin embargo, muy poco se sabe acerca de la ingesta y almacenamiento de zinc dentro de estas células. Por lo tanto, la concentración de zinc en el cuerpo está estrechamente regulada y disturbios en la homeóstasis del zinc han sido asociados con muchas enfermedades, incluyendo diabetes[99, 131, 147, 169, 175-182]. La suplementación de zinc en animales y humanos ha mostrado mejorar el control glucémico en diabetes tipo I y II, sin embargo el mecanismo molecular subyacente no se conoce con exactitud[179, 182, 183]. El zinc parece ejercer efectos parecidos a la insulina apoyando la señal de transducción de la insulina y reduciendo la producción de citosinas, las cuales llevan a la muerte a las células beta durante los procesos inflamatorios en el páncreas durante el desarrollo de la enfermedad. Ha sido demostrado que el zinc es necesario en la biosíntesis de la insulina, ayudando a formar hexámeros de pro-insulina en las células beta del páncreas[45]. Por otro lado, el zinc podría jugar un papel en el desarrollo de diabetes, desde polimorfismos genéticos en el gen del transportador de zinc 8 (ZnT8) y los genes que codifican metalotioneinas están asociados con la diabetes mellitus tipo 2[175, 179, 182]. El zinc forma un complejo con metalotioneina en células betas que da protección contra radicales libres, los cuales se vuelven activos activan durante las respuestas inmunes desencadenadas por bacterias y virus, por ejemplo. En el páncreas de los mamíferos, altas concentraciones de zinc son co-secretadas con la insulina, la cual puede entonces permear las células beta a través de los abundantes canales de calcio[184].

Tomando como ejemplo los efectos comentados anteriormente, de zinc y de selenio, estos parecen indicar claramente que, evitando las deficiencias y las sobredosis de elementos traza esenciales, quizá seremos capaces de reducir la incidencia de diabetes [183].

### **Vanadio**

Elementos traza como el vanadio previenen hiperinsulinemia, parcialmente por su propia actividad insulínica, la cual es también una propiedad de la interleucina-1 (IL-1) particularmente durante los periodos de enfermedad y estrés. Como la IL-1, el vanadio puede remplazar a la insulina por muchas horas y regular el metabolismo de la glucosa. Vanadio, e IL-1 aseguran que las células beta productoras de insulina en el páncreas no pierdan mucho zinc [183]. El compuesto más utilizado como insulinomimético es el picolinato de oxovanadio (IV) [114, 185]. Sin embargo, recientes estudios experimentales muestran que hay un vínculo entre vanadio y estrés oxidativo en la etiología de la diabetes [98].

### **Molibdeno**

Molibdeno es un elemento traza esencial para plantas y animales. La vía natural de entrada del molibdeno al organismo es más que nada a través de la ingesta de vegetales, principalmente leguminosas [186]. El molibdeno permite la fijación del nitrógeno en las plantas, esto debido a que el molibdeno es el cofactor de la enzima nitrogenasa, la cual cataliza la conversión de nitrógeno atmosférico a amoníaco, así mismo la nitrato reductasa necesita molibdeno para su actividad [187]. Actualmente los complejos de Mo(VI) como agentes antidiabéticos son de un interés considerable [185, 188]. Se ha visto que complejos con Mo(VI) tienen propiedades hipoglucémicas [185], no hay reportes en la literatura que ligen a este elemento con complicaciones en diabetes en humanos, sin embargo en un experimento realizado en fluidos biológicos de pacientes diabéticos con distinto grado de progreso de diabetes se encontró que puede estar correlacionado con el progreso de la enfermedad [189]. Este elemento está relacionado con un caso de molibdenosis en alces con una deficiencia secundaria de cobre, lo cual junto a elevados niveles de insulina en los alces afectados sugiere una diabetes tipo II inducida ambientalmente [190]. El molibdeno es utilizado para aliviar intoxicaciones con cobre, como la enfermedad de Wilson, lo cual ilustra su relación antagónica con cobre [17-19]. Además, la administración intravenosa de sales de tiomolibdenato disminuyeron significativamente los niveles de cobre en sangre de ovejas intoxicadas con este metal [18]. A la vista de estos antecedentes es importante recalcar que la transferencia de molibdeno en humanos sigue las mismas reglas que las que se han encontrado para mamíferos [191], por todo esto es importante estudiar los posibles efectos adversos de molibdeno en pacientes diabéticos.

### **1.3.2. Xenobióticos no esenciales.**

Los llamados metales pesados son conocidos por ocasionar efectos adversos a la salud, por largos periodos de tiempo. La industrialización descontrolada ha desencadenado la contaminación

con grandes cantidades de metales pesados en todo el mundo. Las formas fisicoquímicas de estos elementos pueden perjudicar el funcionamiento de los sistemas de defensa del organismo contra estrés oxidativo. Los metales como hierro, cobre, cromo y vanadio experimentan ciclos redox en condiciones fisiológicas y de esta manera pueden incidir en una mayor producción de radicales libres o especies oxígeno reactivas[155, 192]. En este sentido, ya fue mencionado que el sistema Cu(II)/Cu(I) y Fe(III)/Fe(II) pueden activar la producción del radical hidroxilo en la reacción de Fenton. Por otro lado, metales pesados como cadmio, mercurio, plomo y níquel presentan alta afinidad al grupo tiol, por lo que se unen a glutatona inhabilitando este antioxidante celular mayoritario. Como consecuencia, aumentan la peroxidación lipídica, el daño al ADN y se altera la homeóstasis de calcio y sulfhidrilo, todos estos procesos importantes en la patogénesis y el progreso de la diabetes[98, 192, 193]. Aunado a ello, en un estudio realizado en pacientes diabéticos tipo 2 (no fumadores) se obtienen niveles de Ni, Pb, Al, Cu, Cr, Cd y Hg en plasma significativamente más altos que en controles, además se encontró una correlación estadísticamente significativa en plasma entre los niveles de hemoglobina glucosilada y los niveles de los metales antes mencionados[101]. A continuación se presenta un resumen de las evidencias que sugieren que algunos metales pesados pueden jugar un papel importante en diabetes como factores de riesgo ambientales.

### **Aluminio**

Los diabéticos tienen mayor riesgo de desarrollar insuficiencia renal [194]. La toxicidad por aluminio se ha encontrado con mayor frecuencia en pacientes con funciones renales disminuidas y se acumula en mayor grado en tejidos de pacientes diabéticos. Estudios en pacientes con enfermedad renal en fase terminal han visto implicaciones de exceso de aluminio como una causa potencial de reducciones en las funciones cardiacas[194].

### **Plomo**

Hay evidencias de que el metabolismo de muchos elementos traza es alterado durante diabetes, y que estos podrían tener roles específicos en la patogénesis y progreso de la enfermedad. Uno de estos estudios muestra que los valores medios de plomo, cadmio y arsénico fueron significativamente más altos en muestras de cabellos de pacientes diabéticos comparado con controles[120], mientras que en otros altos niveles de plomo en los dientes pueden estar relacionados con diabetes[195]. Asimismo hay una asociación directa entre la exposición a plomo, presión arterial alta, enfermedades cardiacas y diabetes[75]. Se puede asumir que en enfermedades diabéticas el plomo puede intensificar cambios patológicos en la actividad enzimática[196].

### **Arsénico**

El efecto de ciertos xenobióticos parece tener un rol específico en la patogénesis y el progreso de diabetes. La exposición crónica a arsénico inorgánico ha sido asociado con un incremento de la incidencia de diabetes tipo 2 [197, 198]; en particular la presencia de altas

concentraciones de arsénico en agua de grifo ha sido asociada con un incremento del riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 en la población expuesta[199]. Aunque los resultados de estudios epidemiológicos en áreas con baja exposición o riesgo ocupacional están inconclusos, la investigación en laboratorio ha demostrado que la exposición a arsénico inorgánico puede producir efectos que son consistentes con los de la diabetes tipo 2 [199]. Muchos factores están involucrados en la forma en la cual arsénico contribuye a la incidencia de la diabetes. Algunos estudios sugieren que arsénico puede incrementar el riesgo de diabetes tipo 2 por múltiples mecanismos, afectando un conjunto de eventos, los cuales desencadenan la enfermedad. El arsénico afecta la sensibilidad a la insulina en tejido periférico modificando la expresión de genes involucrados en la resistencia a la insulina y cambiando células de su ruta de diferenciación a la de proliferación. En el hígado perturba la producción de glucosa, mientras que en las células beta del páncreas disminuye la síntesis y secreción de insulina y reduce la expresión de enzimas antioxidantes. Las consecuencias de estos cambios en la expresión de genes incluyen la reducción de secreción de insulina, la inducción de estrés oxidativo en el páncreas, la alteración de la glucogénesis, la proliferación anormal y el patrón de diferenciación de músculo y adipocitos así como la resistencia periférica a la insulina[197, 198]. Estudios epidemiológicos llevados a cabo en Taiwán, Bangladesh y Suecia han demostrado un efecto diabetogénico de arsénico, si bien los mecanismos permanecen poco claros y se requiere mayor investigación[73]. Se especula que el arsenato puede substituir al fosfato en la formación de adenosintrifosfato y otros fosfatos intermedios involucrados en el metabolismo de la glucosa, lo cual podría teóricamente disminuir el metabolismo normal de la glucosa, interrumpiendo la producción de energía, e interfiriendo con la secreción de ATP-insulinodependiente. Sin embargo esto no es factible cuando el As se presenta en bajos niveles de concentración; por su parte, la inducción de estrés oxidativo e interferencias en la transducción de señal ó expresión de genes por arsénico o sus metabolitos metilados son la causa más probable de diabetes inducida por arsénico a través de mecanismos de inducción de resistencia a la insulina y disfunciones en las células beta. El estrés oxidativo ha sido sugerido como el mayor vínculo patogénico entre la resistencia a la insulina y disfunciones en las células beta mediante mecanismos que involucran la activación del factor nuclear kappa B, el cual también es activado por bajos niveles de arsénico. Estos defectos pueden ser los responsables para la diabetes inducida por arsénico, pero se requieren más investigaciones para probar esta hipótesis[73].

## **Cadmio**

Recientes estudios epidemiológicos sugieren una asociación directa entre la exposición al contaminante ambiental cadmio y la incidencia y severidad de la diabetes[70]. El cadmio en la diabetes está asociado a daño por estrés oxidativo, la ruta primaria de la toxicidad del cadmio es su capacidad para inhabilitar al tripeptido glutatión (GSH) y a enlazarse a los grupos sulfidrilo de las proteínas[98]. Además, estudios en animales y humanos indican que el cadmio puede

potenciar o exacerbar la nefropatía diabética. Dichos estudios también muestran que el cadmio reduce los niveles de insulina y tiene efectos citotóxicos directos en el páncreas. Juntos estos resultados indican que el cadmio podría ser un factor en el desarrollo de algunos tipos de diabetes e incrementan la posibilidad de que el cadmio y la hiperglucemia relacionada con diabetes puedan actuar de manera sinérgica para dañar los riñones[70]. Hay evidencias de que el metabolismo de muchos elementos traza es alterado durante diabetes, y que estos podrían tener roles específicos en la patogénesis y progreso de la enfermedad.

### **Mercurio**

Mercurio al ser un xenobiótico altamente tóxico en condiciones fisiológicas normales, es de suponer que sea especialmente dañino durante diabetes, uno de sus efectos adversos es su contribución al daño oxidativo, uno de los principales factores en diabetes[200]. Por su especial afinidad al grupo tiol, el  $Hg^{2+}$  forma uniones con glutatona, desactivando de esta manera uno de los más importantes antioxidantes celulares[98, 193].

### **Níquel**

El níquel en diabetes ha sido asociado con el daño oxidativo en pacientes diabéticos. La ruta primaria de la toxicidad del níquel es su capacidad para inhabilitar al antioxidante glutatión y para enlazarse a los grupos sulfhidrilo de las proteínas[98]. El níquel puede contribuir al progreso de patologías en órganos específicos en enfermedades inducidas por infecciones, de carácter autoinmune o inflamatorias tales como diabetes[201]. En un estudio llevado a cabo en ratas, tratadas con níquel, este tratamiento provocó una elevación importante y transitoria de los niveles de glucosa en plasma, conduciendo de manera simultánea a una hiperglucagonemia e hipoinsulinemia, lo cual sugiere que ambos, cambios en glucagon e insulina son esenciales en el desarrollo de la hiperglicemia inducida por níquel[202]. En un estudio realizado en pacientes diabéticos tipo II se observa que los niveles de níquel en orina de diabético fueron más altos que en controles[119].

### **I.4. Enfoque metalómico del estudio**

El término metalómica se refiere a un área de investigación interdisciplinaria definida como el estudio de la presencia y la función de metales/metaloides en sistemas biológicos, incluyendo las posibles interacciones entre ellos [203-208]. En las secciones anteriores quedó demostrada la importancia de micronutrientes minerales y de xenobióticos no esenciales en pacientes con diferente grado de avance de diabetes. Se considera entonces que la evaluación de estatus de elementos traza, su distribución en fluidos biológicos, en tejidos u órganos de pacientes, su especiación y también la evaluación de la biodisponibilidad en diferentes productos alimenticios se encuentran dentro del área de la metalómica y los resultados analíticos obtenidos permitan avanzar en el mejor entendimiento del papel que estos elementos tienen en la patogénesis y el progreso de la enfermedad.

### **I.5. Enfoque regional del estudio**

En el territorio del Estado de Guanajuato se han reportado lugares con altas concentraciones de algunos metales/metaloideos tales como arsénico, mercurio, plomo, cromo, níquel, etc [209, 210]. La presencia de estos elementos en diferentes compartimentos del medio ambiente se debe a los yacimientos naturales de minerales [81] y, por otro lado a diversas actividades industriales desde la industria petrolera, metalúrgica, automotriz hasta curtiduría [10, 82, 85, 87, 211-213]. En este contexto parece interesante evaluar posibles asociaciones entre el contenido de metales/metaloideos en aguas y la incidencia de la diabetes mellitus 2 en nuestro estado, lo que podría ser un complemento útil en la evaluación de riesgos de la enfermedad. Por otra parte, ha sido reconocida la necesidad de desarrollar e implementar estrategias de remoción de metales en sitios contaminados. En cuanto a los antecedentes de nuestro grupo de trabajo, se demostró la factibilidad del uso de nanopartículas de fierro para la remoción de especies de arsénico en sistemas acuosos [214] y la reducción de cromo hexavalente por hongos filamentosos, aislados de suelos contaminados [215, 216]. Para avanzar en este tema se propone incluir en el trabajo el estudio de alginato en forma de película para la remoción de plomo.

### **I.6. Precursores y productos de glicación avanzada *in vivo* y en alimentos**

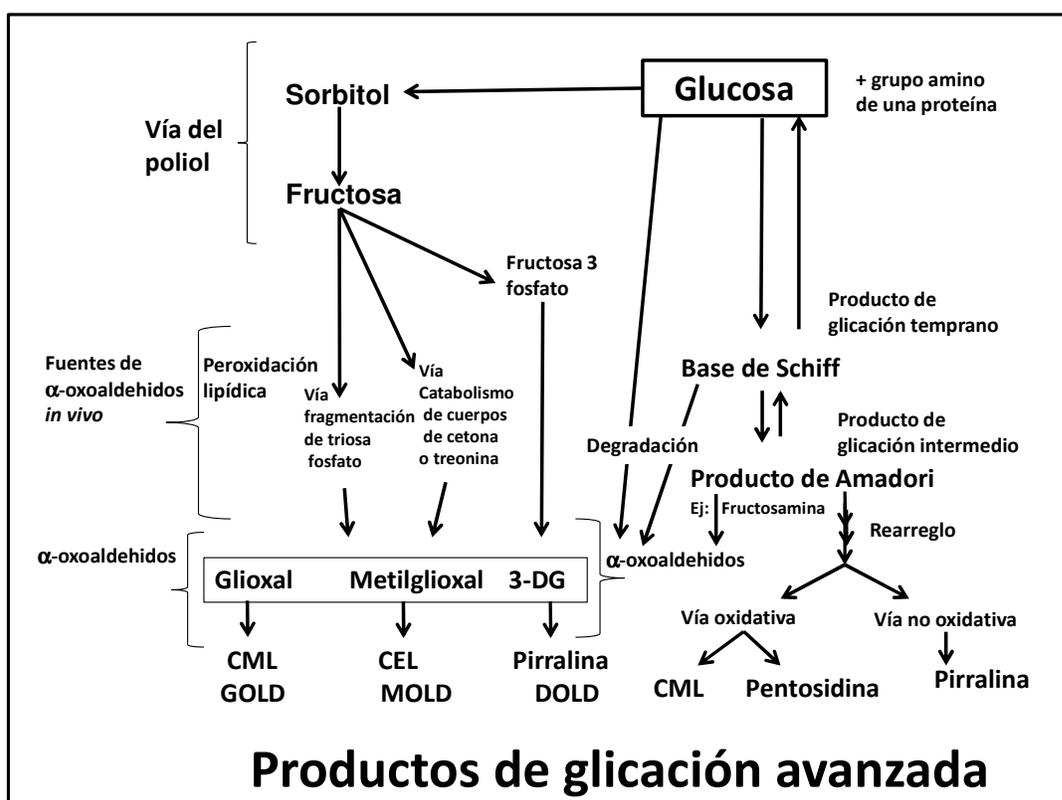
Hoy en día, en el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de la diabetes se tienen definidos una serie de marcadores de la enfermedad tales como el nivel sérico de glucosa, prueba de tolerancia a glucosa, actividad de insulina, nivel de colesterol y triglicéridos, así como el nivel de hemoglobinas glicosiladas[54, 217]. Es importante resaltar, sin embargo, que se siguen buscando ensayos de mayor selectividad, que al mismo tiempo sean fáciles de implementar en laboratorios clínicos de rutina. En este sentido, se reconoce la importancia de la acelerada glicación y del aumento de estrés oxidativo, como procesos que contribuyen en el desarrollo y progreso de las complicaciones[35, 41-44]. En particular, la glicación es la consecuencia directa de la hiperglucemia y consiste en la formación de enlaces químicos entre glucosa y las bio-moléculas, alterando de esta manera sus funciones biológicas con daños irreversibles en diferentes tejidos, órganos y sistemas. Es por ello, que un grupo de los marcadores propuestos son los llamados productos finales de la glicación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés)[218].

#### **I.6.1. Productos finales de glicación avanzada (AGEs)**

Las reacciones entre azúcares reductores y aminoácidos fueron observadas por primera vez por el químico francés Louis-Camille Maillard, a principios del siglo XX, y después estudiadas extensivamente en el contexto de la diabetes y de la ciencia de los alimentos. En particular, la caracterización estructural y la cuantificación de los AGEs es uno de los puntos clave en el entendimiento de los mecanismos moleculares responsables de las complicaciones de esta

enfermedad[38, 219, 220]. Asimismo, los estudios realizados en la última década sugieren que, no solamente los AGEs endógenos sino también los AGEs provenientes de la comida y/o tabaco podrían tener relevancia en diabetes [221, 222]. Consecuentemente, existe una fuerte demanda de los procedimientos analíticos que permitan la cuantificación de este tipo de compuestos en muestras clínicas y en productos alimenticios.

La principal dificultad en la cuantificación de los AGEs es que este término se refiere a un grupo grande y heterogéneo de compuestos que incluye pirralinas, imidazolonas, N- $\epsilon$ -(carboximetil)-lisina (CML), N- $\epsilon$ -(carboxietil)-lisina (CEL), pentosidina, entre otros. Dependiendo de las condiciones de reacción, se han descrito diferentes rutas de su formación, mismas que se presentan de manera global en la Figura 2. La ruta clásica (re-arreglo Amadori) puede involucrar etapa de oxidación, cuyos principales productos son CML y pentosidina. En el caso de la ruta no oxidativa, el AGE mejor caracterizado es la pirralina. Por otra parte, la degradación de glucosa, de las bases Schiff o de los productos Amadori conduce a los intermediarios altamente reactivos (llamados  $\alpha$ -dicarbonilos u oxoaldehídos) tales como 3-desoxiglucosona (3-DG) y metilglioxal (MGO).



**Figura. 2.** Esquema global de la formación de AGEs. (CML-N- $\epsilon$ -(carboximetil)-lisina; CEL - N- $\epsilon$ -(carboxietil)-lisina, GOLD – dímero de glioxal-lisina, MOLD – dímero de metilglioxal-lisina, DOLD – dímero de deoxiglucosona-lisina)[40].

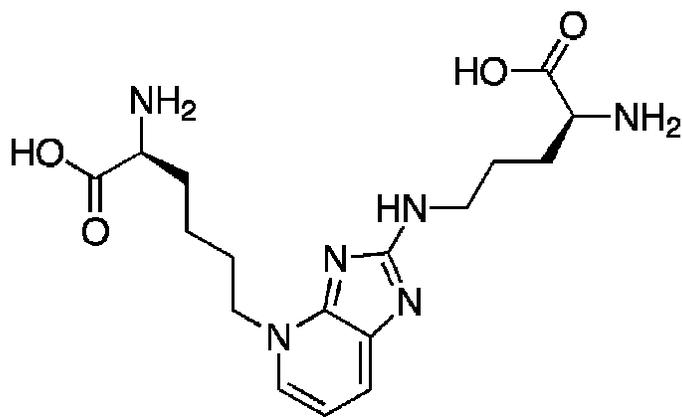
Los principales AGEs derivados de esta ruta son dímeros de los compuestos antes mencionados. Cabe mencionar que las hemoglobinas glicosiladas y específicamente el compuesto mayoritario HbA1c (incluido en la lista de marcadores utilizados actualmente), también es un AGE. La ventaja de utilizar el nivel de HbA1c en el seguimiento de los pacientes es que este parámetro no depende de la ingesta reciente de la glucosa sino representa el promedio de la glucemia en las últimas 6-8 semanas. Existen sin embargo importantes limitaciones de este marcador tales como su dependencia de las condiciones clínicas del paciente no asociadas a diabetes, un tiempo de vida relativamente corto de hemoglobinas y su presencia prácticamente exclusiva en el torrente sanguíneo.

Los ensayos de los AGEs abarcan los procedimientos basados en sus propiedades ópticas, uso de radiomarcadores, técnicas inmunoquímicas y/o técnicas de análisis estructural. Cabe mencionar que algunos AGEs tales como la pentosidina y las imidazolonas son fluorescentes; su rigidez estructural se debe a un entrecruzamiento entre residuos de arginina y lisina en las proteínas. Aunque los ensayos basados en las mediciones directas de fluorescencia carecen de especificidad, estos son útiles en la evaluación del daño acumulativo a las proteínas. En este contexto, en nuestro grupo de trabajo se desarrolló un procedimiento rápido y simple para la evaluación de los AGEs fluorescentes en la fracción de baja masa molecular del suero humano (principalmente pentosidina) [223]. El procedimiento requiere una alícuota relativamente pequeña de suero (20  $\mu$ l), de la que se eliminan las proteínas (ácido tricloroacético), los lípidos (extracción con cloroformo) y, después de una filtración, la muestra se introduce a un sistema de flujo con dos detectores conectados en-línea: uno espectrofotométrico (280 nm) y otro espectrofluorimétrico ( $\lambda_{\text{ex}} = 247$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 440$  nm). Para aumentar la selectividad del procedimiento para los AGEs, la señal analítica se definió como la relación entre fluorescencia relativa (AGEs) y absorbancia en 280 nm (péptidos). En la etapa de calibración se utilizó el estándar AGE-BSA obtenido mediante la incubación de albumina (BSA) con glucosa y su hidrólisis con proteinasa K. En la primera aplicación del procedimiento se analizaron 41 sueros de pacientes diabéticos, obteniéndose una correlación estadísticamente significativa entre los resultados de este procedimiento y los obtenidos por el inmuno-ensayo ( $r = 0.8477$ ,  $p < 0.05$ ). La utilidad del procedimiento ha sido confirmada posteriormente en estudios clínicos; cabe mencionar que los AGEs pueden ser evaluados por este procedimiento no solamente en suero pero también en orina, saliva y piel de los pacientes [107].

Como ya se mencionó la búsqueda de métodos para la determinación de AGEs es uno de los tópicos de interés no sólo local o regional, su búsqueda es relevante a nivel mundial[224]. El siguiente reto en el trabajo sobre los AGEs ha sido contar con procedimientos selectivos, basados en la separación cromatográfica y la cuantificación de los compuestos individuales, enfocándose principalmente en pentosidina, glioxal y metilglioxal. A continuación se presentan los antecedentes para cada uno de ellos.

### I.6.1.1 Pentosidina

La fórmula química de la pentosidina se presenta en la Figura 3, donde se puede observar la presencia de enlaces dobles conjugados que confieren a este compuesto propiedades fluorescentes. La pentosidina fue aislada por primera vez del colágeno humano y posteriormente encontrada en una gran variedad de tejidos[225], además se observó su acumulación con el progreso de la diabetes y sus complicaciones[38, 226, 227]. Se ha demostrado también la presencia del mismo compuesto en alimentos [228-232].



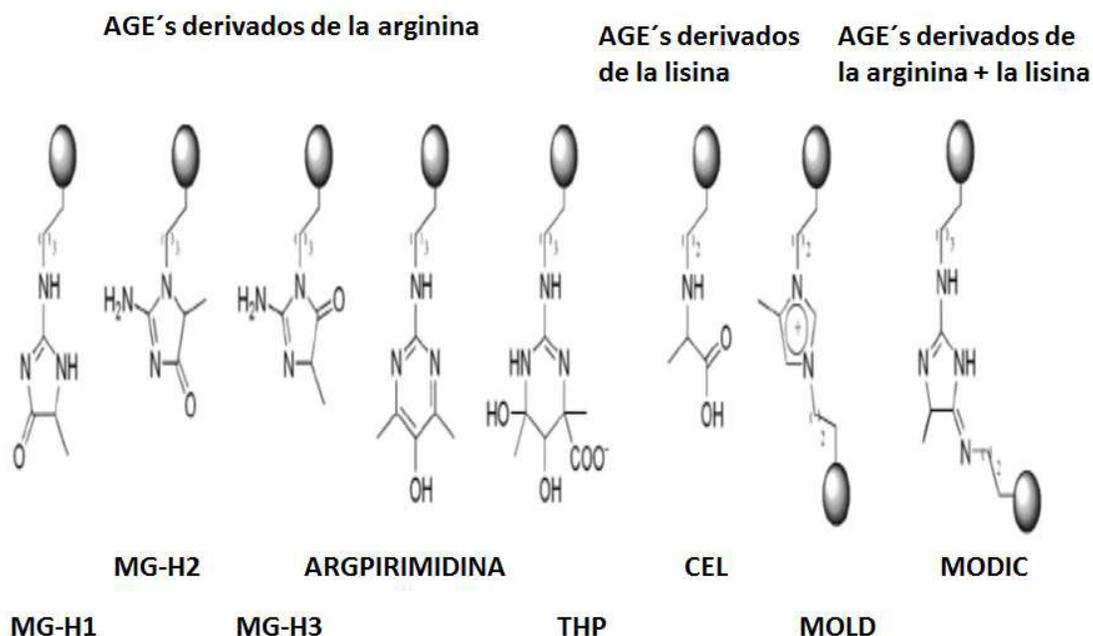
**Figura 3** Estructura de la pentosidina

Actualmente, la pentosidina es considerada un marcador químico del tratamiento térmico de alimentos[233]. Es también importante mencionar algunos estudios, donde se llevó a cabo la determinación de pentosidina en alimentos y en fluidos/tejidos biológicos con el fin de buscar posibles correlaciones entre la ingesta de los AGEs exógenos y el desarrollo de complicaciones en la diabetes [226, 227, 234]. Además de ensayos inmunoquímicos[235, 236], la pentosidina ha sido determinada mediante diversos procedimientos analíticos, aprovechando sus propiedades fluorescentes [237, 238].

En nuestro grupo de trabajo, y como parte de la investigación realizada en esta tesis, se ha sintetizado el estándar de pentosidina y hemos propuesto un procedimiento para su determinación en orina, mediante cromatografía de líquidos en fase inversa con detección espectrofluorimétrica [239].

### I.6.1.2 Glioxal y metilglioxal como precursores de los AGEs y marcadores del daño oxidativo

Glioxal ((CHO)<sub>2</sub>) y metilglioxal (CH<sub>3</sub>CO-CHO) son generados *in vivo* como productos intermediarios de las reacciones Maillard, de la degradación de glicoproteínas y de la peroxidación de lípidos; ambos son precursores de los AGEs [240, 241] (Fig. 2); además, el metilglioxal es un compuesto endógeno generado en bajas concentraciones en varios procesos metabólicos de carácter enzimático y no-enzimático [242, 243]. En la Figura 4 se presentan los AGEs derivados del metilglioxal (MG), mismos que han sido detectados *in vivo* y cuya formación ha sido asociada con diabetes y otras enfermedades[242].



**Figura 4.** Estructuras de los AGEs derivados de metilglioxal. Con los residuos de arginina MG forma: N-ε-(5-hidro-5-metil-4-imidazol-2-il)-L-ornitina (MG-H1), ácido 2-amino-5-(2-amino-5-hidro-5-metil-4-imidazol-1-il)-pentanoico (MG-H2), ácido 2-amino-5-(2-amino-4-hidro-4-metil-5-imidazol-1-il) pentanoico (MGH3); N-(5-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina-2-il)-L-ornitina (argpirimidina), N-(4-carboxi-4,6-dimetil-5,6-dihidroxi-1,4,5,6-tetrahidropirimidina-2-il)-L-ornitina (THP); con residuos de lisina, MG forma - N-ε-(carboxietil)-lisina (CEL), dimero de metilglioxal-lisina (MOLD); mientras que con lisina y arginina se han encontrado 2-amonio-6-(2-[4-amonio-5-oxido-5-oxopentil)amino]-4-metil-4,5-dihidro-1H-imidazol-5-ilideno)amino)hexanoato (MODIC)[242].

Por otra parte, existen evidencias de que metilglioxal y glioxal presentan toxicidad directa a nivel celular [244, 245]. En particular, se ha reportado que el metilglioxal puede inhibir síntesis de las proteínas, modificar las funciones biológicas de proteínas o ácidos nucleicos y que es un agente mutagénico [246, 247]. En estudios llevados a cabo en diferentes grupos de pacientes diabéticos

se han observado elevados niveles de concentración de estos dos compuestos indicando una posible relevancia en el desarrollo de complicaciones típicas de la enfermedad [243, 244, 248-250]. Por otra parte, ambos compuestos han sido aceptados como marcadores importantes de estrés oxidativo [245, 251].

Debido a la importancia de estos dos compuestos como indicadores de la formación de los AGEs, de estrés oxidativo y debido a su toxicidad directa, ambos fueron determinados en diferentes tipos de muestras incluyendo fluidos biológicos, tejidos así como en productos alimenticios. En el caso de muestras clínicas, este tipo de análisis presenta un reto debido a una compleja matriz química, la reactividad de los analitos y/o la formación de otros componentes de la muestra, su distribución intra- y extracelular así como las bajas concentraciones. Típicamente los niveles reportados están en el intervalo de picomoles por gramo de biomasa [242, 252-254]. Es por ello que las etapas del procedimiento analítico típicamente incluyen un pretratamiento dirigido a la eliminación de la matriz y una pre-concentración de los analitos, su derivatización y la separación por cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica, fluorimétrica o por espectrometría de masas [242, 243]. Se han propuesto también procedimientos basados en la separación por cromatografía de gases con diferentes tipos de detectores [253, 254].

### **I.6.2. Enfoque del estudio en el análisis de los AGEs y de sus precursores**

Dada la importancia de los AGEs endógenos y exógenos en el desarrollo y progreso de la diabetes, se considera este tema relevante para el trabajo de tesis. En particular, se define como uno de los enfoques del estudio, desarrollar nuevos procedimientos analíticos para la determinación de pentosidina, glioxal y metilglioxal en muestras clínicas y en muestras de alimentos. Con base en la revisión bibliográfica presentada en las secciones anteriores, en el desarrollo de dichos procedimientos se considera importante el diseño de la etapa de pretratamiento de muestra y se propone el uso de cromatografía de líquidos con detección fluorimétrica, explorando diferentes esquemas de derivatización pre-columna.

## I.7. Antecedentes

Este proyecto estuvo encaminado a la evaluación analítica de los factores de riesgo potenciales de diabetes mellitus 2 con aplicación al estado de Guanajuato.

En el desarrollo del trabajo se plantearon las siguientes etapas:

(1) Selección de sitios de muestreo, tipo de muestras (aguas naturales, vegetales, alimentos, fluidos biológicos) así como de los elementos metálicos, metaloides y otros compuestos reportados como factores de riesgo;

(2) Desarrollo/adaptación de los procedimientos analíticos para su determinación en muestras reales;

(3) Análisis estadístico de los resultados obtenidos.

Como antecedentes de este proyecto, considero pertinente mencionar a continuación los estudios relevantes realizados en nuestro grupo de investigación, es para mí una forma de reconocer el trabajo previo que sirvió para cimentar el propio:

1. Diagnóstico de la calidad del agua superficial con enfoque en los contenidos totales y en la especiación analítica de elementos metálicos y de algunos metaloides [83, 212, 255];
2. Diagnóstico de la calidad del agua potable en la zonas urbanas del Estado de Guanajuato enfocado a metales traza [84];
3. Determinación de metales en tortilla mexicana y el estudio de su biodisponibilidad en el modelo de tracto digestivo *in vitro* [256];
4. Perfil de elementos metálicos y de algunos metaloides en aguas de grifo de la ciudad de Guanajuato [209, 210];
5. Análisis de los niveles de algunos metales y metaloides en orinas de los niños en las ciudades de Salamanca y Pénjamo[257];
6. Estudio del efecto de la exposición a cromo trivalente de los trabajadores de la industria curtidora en los parámetros clínicos relevantes a diabetes [54];
7. Evaluación de los niveles de selenio y su relación con la actividad de glutathiona peroxidada en pacientes diabéticos tipo 2 [107].

## Capítulo II

### OBJETIVOS Y METAS

#### Objetivo general.

El objetivo general de este proyecto es incidir en el desarrollo de metodologías analíticas, cuya aplicación permita mejorar la evaluación de la incidencia y progreso de la diabetes mellitus 2 en el Estado de Guanajuato

#### Objetivos particulares.

1. Profundizar en el conocimiento del impacto de metales/metaloides en la incidencia y progreso de la diabetes mellitus 2.
2. Desarrollar nuevos procedimientos analíticos para la determinación de productos de glicación avanzada, sus precursores e indicadores de estrés oxidativo.

#### Metas correspondientes al objetivo particular 1:

1. Evaluación estadística de una posible asociación entre los niveles de metales/metaloides en aguas y la incidencia de la diabetes mellitus 2 en el Estado de Guanajuato.
2. Estudio del contenido total y biodisponibilidad de molibdeno y cobre en frijol como un posible factor asociado al progreso de la diabetes mellitus 2.

#### Metas correspondientes al objetivo particular 2:

1. Desarrollo de un nuevo procedimiento para la determinación de pentosidina en fluidos biológicos y en alimentos, mediante cromatografía de líquidos con detección espectrofluorimétrica.
2. Desarrollo de nuevos procedimientos para la determinación de glioxal y metilglioxal en muestras clínicas y en alimentos, con base en la derivatización pre-columna y cromatografía de líquidos con diferentes tipos de detectores.

## Capítulo III

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Materiales y Reactivos.

#### III. Equipo de Laboratorio

##### III.1. Instrumentación analítica

- Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) modelo 7500ce de Agilent Technologies, con celda de colisiones/reacciones tipo octápulo.
- Cromatógrafo de gases modelo Clarus 500 de Perkin Elmer equipado con detector de ionización por flama.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo 1200 de Agilent Technologies equipado con detector espectrofotométrico de arreglo de diodos y detector fluorimétrico, equipado con automuestreador, termostato de la columna y controlado por el paquete de software ChemStation.
- Espectrofotómetro UV/Vis modelo Spectronic 3000 Milton Roy con detector de arreglo de diodos.
- Espectrómetro de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (Shimadzu, ICP-7510).

##### III.1.2 Columnas cromatográficas:

- Kinetex C18 (150 x 3 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ ) de phenomenex.
- TSK-gel GMPVXL de TOSOHAAS, 7.8mm x 300mm, 13 $\mu\text{m}$ .
- ZORBAX Eclipse AAA (150 x 3.0 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) de Agilent Technologies.

##### III.2. Equipos utilizados en procesamiento de muestra y/o preparación de reactivos

- Purificador de agua destilada Martes Flex/Cole Parmer Instrument Co. Modelo 60648.
- Purificador de agua Milli Q Labconco Water PRO PS.
- Potenciómetro Corning (313 pH/temperatura).
- Liofilizador modelo 10-269 de Labconco y frasco Fast-Freeze 600 ml Labconco.
- Centrífuga Labnet.
- Speed Vac Vacufuge plus, Eppendorf.
- Bloque de calentamiento Multi-Block, Barnstead/Labline.
- Báscula de precisión Denver Instrument company ACA-100.

- Supelcoclean LC-18 SPE Tubo de 3mL, producto 57012 SUPELCO.
- Filtros con tamaño de poro 0.2  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, MA).

### III.3. Software y equipo de cómputo.

- Agilent Chemstation: LC and CE systems software.
- Agilent ICP MS Chemstation software.
- Unscrambler 7.5 (Camo, Norway).

### III.4. Microorganismos y reactivos para medio de crecimiento y condiciones de exposición

- Bacteria gram positiva *Bacillus subtilis* 168.
- Bacteria gram negativa *Escherichia coli* DH5.
- Catalasa (una solución 600 U/ml en agua estéril).
- Medio nutritivo (Bioxon)

### III.5. Reactivos para la digestión ácida de biomasa

- Ácido Nítrico Trace select (Fluka).
- Peróxido de Hidrogeno (30%) J.T.Baker.

### III.6. Estándares para la determinación de contenido total de elementos traza

- Estándar multielemental para muestras medioambientales de Agilent Technologies (100 mg/L Fe, K, Ca, Na, Mg; 10 mg/ L Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, V, Zn, U en 10%  $\text{HNO}_3$ ).
- Solución de mezcla de estándares internos: (In) (10  $\mu\text{g/L}$ ), (Li) (50  $\mu\text{g/L}$ ), (Y) (10  $\mu\text{g/L}$ ), (Bi) (10  $\mu\text{g/L}$ ), (Sc) (25  $\mu\text{g/L}$ ), (Rh) (10  $\mu\text{g/L}$ ).

### III.7. Reactivos para la digestión gastro intestinal *in vitro*.

- Pepsina (Sigma CAS 9001-75-6 Lot 010M1513.)
- Sales biliares (Sigma CAS 8008-63-7 Lot 75H0449.)
- Amilasa (Sigma A-3176 Lot 105H0281.)
- Pancreatina (Sigma CAS 8049-47-6 Lot 56H0274.)

### III.8. Reactivos para la determinación de glioxal, metilglioxal y dimetilglioxal.

- Glioxal (Go, ethanedial, Fluka).
- Metilglioxal (MGo, 2-oxopropanal, Sigma).
- Diacetil (DMGo, butane-2,3-dione, dimethylglyoxal, Fluka).
- Dietilglioxal (DEGo, hexane-2,3-dione, diethylglyoxal, Sigma).

- 4-Metoxi-o-fenilendiamina dihidroclorhídrico (4-metoxi-o-phenylenediamine dihydrochloride, Sigma ).

También se utilizaron los siguientes reactivos sigma:

- Ácido clorhídrico.
- Ácido acético.
- Fosfato dibásico de potasio.
- Hidróxido de sodio.
- 2-Mercaptoetanol.
- Cloruro de sodio.
- Trietilamina (TEA).
- Acetonitrilo.
- Metanol.

### **III.9. Reactivos para la determinación de peróxido de hidrógeno.**

Equipo comercial (Amplex<sup>®</sup> Red Assay kit A22189) de Invitrogen.

### **III.10. Reactivos para la síntesis y determinación de Pentosidina.**

Todos los reactivos utilizados en este apartado fueron provistos por Sigma-Aldrich.

- Ribosa.
- N-tBOC-Arginina.
- N-tBOC-Lisina.
- Ácido trifluoroacético.
- Ácido heptafluorobutírico.

## Capítulo IV

### RESULTADOS Y DISCUSION

El tema principal del trabajo de tesis ha sido el desarrollo y aplicación de procedimientos analíticos, potencialmente útiles en estudios sobre la incidencia y progreso de la diabetes mellitus tipo 2, enfocándose principalmente en el análisis de algunos componentes naturales y contaminantes potenciales del medio ambiente y de la dieta. Con base en la revisión bibliográfica y los resultados obtenidos anteriormente [258], se decidió enfocar una parte del trabajo en molibdeno y cobre que podrían jugar un papel específico en la enfermedad [12, 45, 98]. En las etapas posteriores, el estudio se centró en el análisis de productos finales de glicación avanzada y sus precursores.

### Capítulo IV.1.

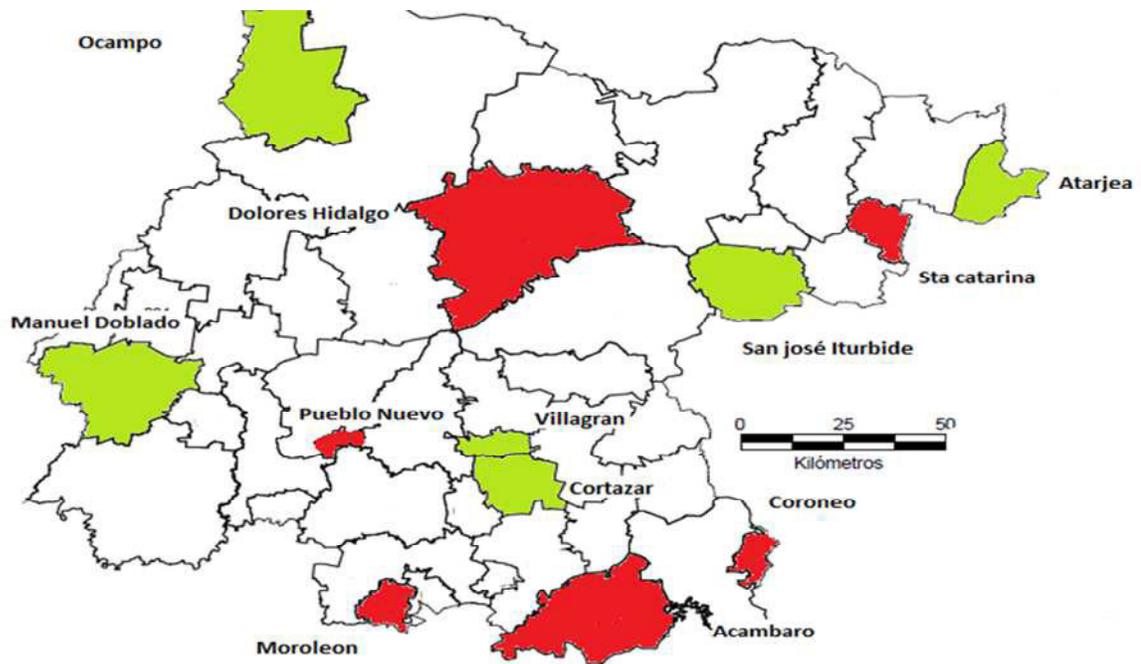
#### IV.1.1 Evaluación estadística de una posible asociación entre los niveles de metales/metaloideos en aguas y la incidencia de diabetes mellitus 2 en el Estado de Guanajuato.

Iniciando con el aspecto regional del trabajo, la primera etapa se centró en la búsqueda de posibles asociaciones entre los niveles de metales/metaloideos reportados en agua de pozos municipales del Estado de Guanajuato[8] y la incidencia de diabetes. Para ello, se realizó una búsqueda de datos sobre prevalencia de diabetes en nuestro estado en los años 2008 y 2009[94, 95] y se utilizaron los datos del censo de población 2005 (cuando se realizó el estudio aún no estaban disponibles los datos del censo 2010)[259]. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla I.1, donde se puede observar que la distribución entre los municipios no es uniforme, de tal manera que en los municipios de Acámbaro, Santa Catarina, Pueblo Nuevo y Moroleón en los dos años incluidos en el estudio, la incidencia de la diabetes en toda la población fue claramente mayor que en el resto de los municipios. Por otro lado, tomando en cuenta la población en edad productiva, la incidencia de la enfermedad fue mayor en los mismos municipios, pero también en Dolores Hidalgo y Villagrán. Para mayor claridad, en la Figura I.1, los municipios con más alta prevalencia de diabetes en los años 2008 y 2009 se marcan en el mapa del estado: con color verde una incidencia mayor a 0.5% y con rojo mayor a 0.7%. Cabe mencionar que en Acámbaro y Santa Catarina se presentan aguas termales y el análisis de metales/metaloideos indicó concentraciones relativamente elevadas de As, por ello parecía interesante explorar posibles causas de las diferencias en la prevalencia de diabetes entre municipios, haciendo énfasis en el posible papel de

los llamados metales pesados. Con base en la revisión bibliográfica presentada en la revisión anterior, se tomaron en cuenta los niveles de arsénico, cadmio, cobre, cromo, hierro, manganeso, plomo y selenio, reportados en pozos municipales del estado.[8]

**Tabla I.1.** Porcentajes de incidencia de diabetes con respecto al censo nacional de población 2005, en los municipios con mayor incidencia en el estado. [94, 95]

	Censo 2005	Porcentaje de diabetes	Porcentaje de diabetes	Rango de 15 a 64 años	Porcentaje de diabetes de 15 a 64 años	Porcentaje de diabetes de 15 a 64 años
Municipio	población	Año 2009	Año 2008	Población	Año 2009	Año 2008
Acámbaro	101762	<b>0.58</b>	<b>0.61</b>	60281	<b>0.73</b>	<b>0.81</b>
Atarjea	5035	0.34	0.40	2661	0.45	0.68
Coroneo	10972	0.52	0.40	6324	<b>0.76</b>	0.54
Cortazar	83175	0.49	0.41	50956	0.61	0.52
Dolores H.	134641	0.27	0.46	75260	0.36	<b>0.74</b>
Manuel D.	34313	0.49	0.39	19199	0.65	0.53
Moroleon	46751	<b>0.52</b>	<b>0.69</b>	28894	0.60	<b>0.83</b>
Ocampo	20579	0.32	0.42	10864	0.50	0.61
Pueblo nvo.	9750	<b>0.69</b>	0.37	5828	<b>0.93</b>	0.46
San José I.	59217	0.46	0.28	33679	0.70	0.40
<b>Sta.Catarina</b>	4544	<b>0.81</b>	<b>0.75</b>	2391	<b>1.21</b>	<b>1.05</b>
Villagrán	49653	0.48	0.50	29889	0.64	0.66



**Figura I.1.** Mapa político del estado de Guanajuato, en la que se marcan los municipios con incidencia relativamente elevada de diabetes en los años 2008 y 2009: en color verde se presentan los municipios con incidencia mayor a 0.5% y en rojo mayor a 0.7%, en por lo menos uno de los dos años ya sea en incidencia total o en población económicamente activa.

En la Tabla I.2 se presentan en forma resumida los niveles de concentración de estos elementos, encontrados en el análisis de aguas de pozos en un estudio anterior[8].

**Tabla 1.2** Resultados de la determinación de elementos traza en agua potable de pozos municipales [8], se muestran los resultados de los pozos con concentraciones que superan el máximo nivel permisible acorde con la norma: NOM PROY-NOM.SSA1-250-2007.

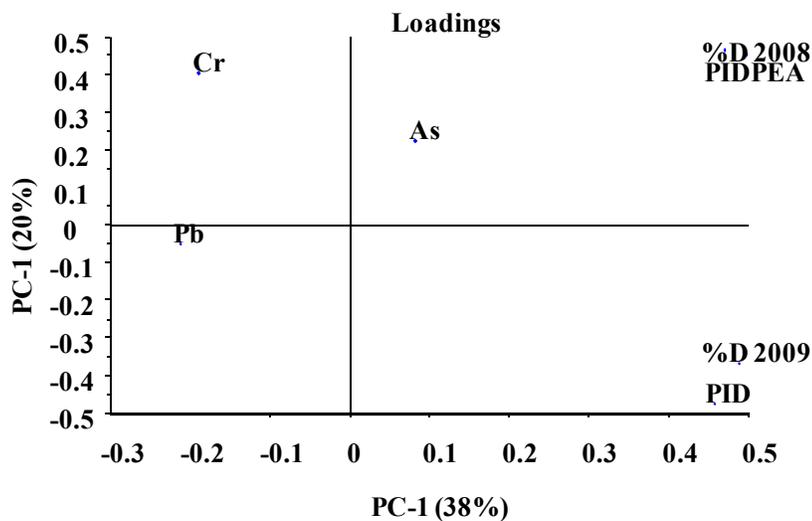
Elemento	Máximo nivel permisible*, $\mu\text{g/L}$	Concentración mínima encontrada		Concentración máxima encontrada	
		$\mu\text{g L}^{-1}$	Sito	$\mu\text{g/L}$	Sito
As	10	<10	Varios	<b>106</b>	Sta. Catarina (Nº 2)
Cd	3	<0.1	Varios	0.6	Silao (La Joyita)
Cr	50	<0.2	Varios	18.1	Abasolo (Lourdes)
Fe	300	<4	Varios	<b>4825</b>	San Luis de la Paz (Tanque la Caja)
Mn	150	<0.5	Varios	<b>3885</b>	Cortazar (Caracheo)
Pb	10	<1	Varios	<b>191</b>	Abasolo (Lourdes)
Se	10	<10	Varios	<b>224</b>	Irapuato (Nº 41)

\* Proyecto de NOM PROY-NOM.SSA1-250-2007, Agua para uso y consumo humano

El análisis estadístico fue realizado utilizando el método de componentes principales (PCA – principal component analysis), con ayuda del paquete de software estadístico Unscrambler 7.5 (Camo, Norway). En este método, los parámetros del sistema se presentan en una nueva y reducida dimensionalidad, determinada por los factores principales. Los modelos obtenidos permiten detectar posibles relaciones entre las variables, mediante su agrupación en nuevas coordenadas del sistema, definidas por los componentes principales (PCs). Las variables consideradas para cada uno de los municipios fueron los niveles de concentración de elementos en aguas de pozo y la incidencia de diabetes para la población total y para la población en edad productiva. Se construyeron varios modelos, eligiendo todos los parámetros y los municipios y, posteriormente eliminando algunos municipios y elementos (Mn, Fe, Se) con el fin de lograr el mayor porcentaje posible de descripción de la variabilidad de datos para los dos primeros PCs. En la Figura 1.2 se presenta el modelo PCA obtenido. Se puede observar que los dos primeros componentes principales describen un 58 % de la variabilidad de los datos. Respecto al factor PC1, el arsénico está relacionado directamente con la incidencia de la diabetes, sugiriendo su asociación con esta enfermedad, de acuerdo con varios reportes anteriores[120, 197-199].

#### IV.1.2 Conclusiones.

En resumen, los resultados de este análisis multivariante sugieren una posible correlación entre la incidencia de diabetes y la exposición de la población local a arsénico, mediante el consumo de agua de pozos municipales. En este sentido, en las regiones donde se presentan manantiales termales se detectaron niveles de concentración de As relativamente elevados en agua de pozos y también se registró una mayor incidencia de diabetes en los dos años de evaluación. Estos resultados, además de reforzar las evidencias sobre la importancia de algunos elementos traza en diabetes, parecen confirmar los reportes de diferentes estudios epidemiológicos anteriores, realizados en otras regiones geográficas [9].



**Figura I.2** Modelo PCA obtenido en la evaluación de posibles relaciones entre elementos en aguas de pozos y la incidencia de diabetes en el estado de Guanajuato (“PID”, “PIDEA” – promedio de la incidencia total e incidencia en la edad productiva, “% D 2008” y “% D 2009” – los porcentajes de incidencia en los dos años respectivamente)

## Capítulo IV.2

### IV.2. Frijol como fuente dietética de molibdeno y cobre – estudio analítico

#### IV.2.1 Introducción – Relevancia de Mo y Cu en diabetes.

Hoy en día se conoce que en condiciones fisiológicas ocurren ciertas interacciones entre especies de molibdeno y cobre. Los estudios realizados *in vitro* y con modelos en ratas revelaron la formación de complejos ternarios estables entre especies de tiomolibdatos y, tanto cobre libre, como unido a proteínas [17, 144, 190]. Los tiomolibdatos se utilizan actualmente en quelatoterapia de la enfermedad de Wilson para eliminar el exceso de cobre acumulado en el hígado y el cerebro. Además, se ha descrito una enfermedad en animales rumiantes que se desarrolla con una alta exposición al molibdeno, llamada molibdenosis. Los estudios llevados a cabo en animales rumiantes revelaron que la ingesta excesiva de molibdeno crea alteraciones en el metabolismo de Cu en alces, que incluyen la reducción de la actividad de enzimas con cobre como ceruloplasmina, superóxido dismutasa en sangre y citocromo c oxidasa en miocardio [260]. Debido a eso se ha sugerido que un exceso de molibdeno provoca en estos animales la deficiencia secundaria de cobre, y como consecuencia un daño oxidativo y alteraciones al metabolismo de carbohidratos [190, 260, 261]. En un estudio reciente llevado a cabo en pacientes diabéticos reclutados en el centro de México, se encontraron concentraciones elevadas de molibdeno y cobre en pacientes con diabetes avanzada y la eliminación de cobre a través de la orina se correlacionó directamente con los bio-marcadores de las complicaciones típicas de esta enfermedad [144, 189]. También se ha observado un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.02$ ) de la relación Cu / Mo en la orina con el progreso de la nefropatía, lo cual sugiere que molibdeno ayuda a la remoción de cobre de los tejidos y a su posterior eliminación en la orina en pacientes con esta condición clínica [16] [144, 189]. Estos resultados indican que el antagonismo Mo-Cu podría estar involucrado en el desarrollo de complicaciones en la diabetes.

Dado que las legumbres son componentes importantes de la dieta de los mexicanos y estos vegetales contienen concentraciones de molibdeno relativamente altas, parece interesante su evaluación como una fuente dietaria de este elemento y también de cobre [186, 187, 191].

Con los antecedentes que se acaban de describir, el objetivo de esta parte del trabajo ha sido evaluar la concentración de molibdeno y cobre en distintos tipos de frijol con el enfoque en su biodisponibilidad. Para ello, se llevó a cabo la determinación de molibdeno y cobre total en cuatro diferentes tipos de frijol, mediante espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Asimismo, se implementó un esquema de fraccionamiento con el fin de evaluar la distribución de los elementos entre el agua de remojo, los frijoles cocidos y el

caldo de los mismos. En la segunda parte del estudio se aplicó un modelo gastrointestinal *in vitro* para evaluar cuál es la fracción del total de los elementos en frijol cocido que es susceptible de ser absorbida en el tracto digestivo [262, 263].

#### **IV.2.2. Materiales y métodos.**

Para la determinación de metales y metaloides se utilizó un equipo de espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción ICP MS Agilent 7500ce. En todos los análisis se usó agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco, USA), también se utilizó el estándar ambiental para aguas Agilent 1643D; todas las mineralizaciones se realizaron con ácido nítrico ultra puro (Trace select, Fluka) y con peróxido de Hidrogeno (30%) J.T.Baker y asimismo se preparó estándar interno con la siguiente concentración: In 10 µg/L, Li 50 µg/L, Y 10 µg/L, Bi 10 µg/L, Sc 25 µg/L, y Rh 10 µg/L. Para la prueba de biodisponibilidad se utilizaron los siguientes reactivos Sigma: pepsina, sales biliares, amilasa y pancreatina.

##### **IV.2.2.1 Muestras**

Se analizaron cuatro tipos de frijol: negro, pinto, flor de mayo y peruano, cada uno de ellos fue comprado por lo menos en dos diferentes mercados locales obteniéndose dos lotes de muestras para cada uno de los frijoles. Se tomaron las muestras de material crudo y los frijoles cocidos, obtenidos siguiendo la manera típica de su preparación (el frijol crudo fue cocido en agua desionizada a 70°C en vasos de precipitados, cuando se alcanzó la ebullición se mantuvo por 2.5 horas hasta que el frijol queda suave al tacto). Las muestras de material crudo fueron molidas y las de frijol cocido homogenizadas y liofilizadas. Asimismo se llevaron a cabo las determinaciones en agua de remojo y en caldo.

Para el esquema de fraccionamiento se siguió el procedimiento típico de preparación, se tomaron muestras de aproximadamente 2 g de cada tipo de frijol, se remojaron en 40 mL de agua desionizada por una noche en vasos de precipitado, después se retiraron los frijoles para su cocción, se midió el volumen del agua de remojo y se conservó esta parte para el análisis ICP-MS. A los frijoles después de su remojo se les agregaron 40 mL de agua para su cocción, una vez cocidos (2.5 horas) y enfriados, se filtró la mezcla conservando el caldo para el análisis ICP-MS. Los frijoles cocidos fueron pesados, homogenizados, liofilizados y finalmente pesados.

##### **IV. 2.2.2 Tratamiento de muestras para el análisis de metales totales**

Se pesaron (por triplicado) 0.5 g de material crudo y molido, y 50 mg de frijol cocido y liofilizado, estas alícuotas se colocaron en tubos de ensayo de vidrio (previamente lavados con HNO<sub>3</sub> al 10% y con agua desionizada); a cada uno de los tubos se les agregaron 200 µL del estándar interno (<sup>115</sup>In, 1.25 µg/L), 2 mL del ácido nítrico concentrado, 3 mL de H<sub>2</sub>O y 1 mL de peróxido de hidrógeno al 30%. Las condiciones de la digestión fueron las siguientes: Se adicionaron 2 mL de HNO<sub>3</sub>, se calentó a 70 °C por un periodo de 30 minutos. Después de eso, las muestras se calentaron a 125 °C

por 2 horas. Finalmente se adicionó 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> calentándose a 125 °C por media hora. Después del enfriamiento se completó el volumen a 6 mL con agua desionizada y, luego de una centrifugación las soluciones fueron introducidas al ICP-MS. Cada una de las series fue corrida con un blanco en paralelo. Las muestras de agua de remojo y de caldo fueron centrifugadas, diluidas con el agua desionizada e introducidas al sistema ICP-MS.

#### **IV.2.2.3 Modelo gastrointestinal**

Se pesaron (por triplicado) 1 g de cada muestra de frijol cocido y liofilizado y se colocaron en vasos de precipitado de vidrio (previamente lavados con HNO<sub>3</sub> al 10 % y con agua desionizada), se les agregaron 4 mL de una solución de pepsina al 1%, se ajustó el pH 1.8 con HCl 2N y las muestras fueron incubados a 37 °C por una hora (este paso equivale al paso del bolo alimenticio por el estómago)[262, 263]. A continuación se cambió el pH a 6.05 con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (para inhabilitar la pepsina), se agregaron 4 mL de una solución de pancreatina al 3%, amilasa al 1% y sales biliares al 0.15% y se incubaron a 37° por 5 horas (este paso equivale al paso de los alimentos en el flujo intestinal)[262, 263]. A 1 mL del volumen del sobrenadante se le agregó estándar interno, y se mineralizó siguiendo el proceso descrito anteriormente. Se completó el volumen a 5 mL, las muestras se centrifugaron y se tomaron 1000 µL del sobrenadante para su dilución 1:5 con agua desionizada y se introdujo al ICP-MS.

#### **IV.2.2.4 Determinación de elementos por ICP-MS**

Para la determinación de elementos por ICP-MS, se utilizó un equipo modelo 7500ce de Agilent Technologies, equipado con cuadrupolo como filtro de masas, la celda de colisión/reacción, automuestreador y controlado mediante el paquete Chemstation. Asimismo, se utilizó un nebulizador concéntrico Meinhard y cámara de rociado tipo Peltier (2°C). Las condiciones del equipo fueron las siguientes: Potencia RF: 1500W, gas acarreador: 0.9 L/min, gas nebulizador: 0.35 L/min, flujo de Argón: 15 L/min. Para eliminar interferencias poliatómicas, se utilizó la celda de colisión reacción con un flujo de helio de 3.5 mL/min, manteniendo la respuesta para óxidos y dobles cargas inferior a 2%. En el modo de análisis cuantitativo, se monitorearon los isótopos Cu<sup>75</sup> y Mo<sup>111</sup> con un tiempo de integración de 300 ms por isótopo (<sup>115</sup>In como estándar interno). En lo que respecta al análisis del contenido total de elementos traza, cobre y molibdeno por ICP-MS, la selección de los parámetros instrumentales se realizó mediante el procedimiento de tuning utilizando una solución que contiene Li, Y, Tl y Ce en concentraciones de 1µg L<sup>-1</sup>. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de regresión lineal, utilizando seis niveles de concentración del estándar multielemental para muestras medioambientales consistente de: 100 mg/L Fe, K, Ca, Na, Mg; 10 mg/L Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, V, Zn, U en 10% HNO<sub>3</sub>, Agilent Technologies. Se realizaron tres determinaciones para cada una de las muestras, reportándose los valores promedios con sus respectivos

valores de desviación estándar. Para examinar la exactitud de los resultados analíticos obtenidos en muestras reales, se llevó a cabo la determinación de elementos en material de referencia certificado (NIST 1643d, Trace Elements in Water).

#### IV.2.3 Resultados y discusión.

En el contexto del posible papel de molibdeno en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes sugerido anteriormente[189], las interrogantes a responder en este trabajo fueron las siguientes:

- ¿Podría ser el frijol una fuente dietética importante de Mo?
- ¿Existen diferencias importantes entre el estatus de Mo y Cu en diferentes tipos de legumbres?
- ¿Existe alguna interacción entre las formas de Mo y Cu en frijol?
- ¿Puede el Mo ser considerado un factor de riesgo en el desarrollo de las complicaciones en diabetes?

En cuanto a las legumbres como fuentes dietéticas de Mo, cabe señalar que el molibdeno es cofactor de las enzimas responsables por la asimilación y metabolismo de nitrógeno en plantas, por lo que es de esperar su alto contenido en vegetales ricos en proteínas tales como legumbres [187]. Es por ello, que inicialmente se eligieron para el trabajo las principales legumbres consumidas en México: cuatro tipos de frijol, lentejas y habas.

En primera instancia, se procedió con la determinación de Mo total en el material crudo y en agua de remojo para descartar que el Mo se elimine de los granos mediante solubilización, durante esta etapa típica de su preparación. Este análisis se realizó en el primer lote de muestras. En la Tabla II.1 se presentan los resultados obtenidos, donde se pueden observar niveles de concentración de Mo relativamente altos en haba, lenteja y frijol peruano, de acuerdo con los datos reportados para frijol alemán[186]. Asimismo, los resultados obtenidos en el análisis de agua de remojo indican que en esta etapa se solubiliza de 1% a 9% del contenido total en granos, por lo que el procedimiento casero no permite disminuir la cantidad de Mo ingerida.

Legumbre	Mo mg/kg	Agua de remojo Mo µg/kg
Flor de mayo	4.95 ± 0.11	0.035 ± 0.003
Pinto	4.57 ± 0.36	0.067 ± 0.001
Negro	3.51 ± 0.27	0.082 ± 0.007
Peruano	9.04 ± 0.22	0.812 ± 0.036
Haba	9.36 ± 1.44	No se remojó.
Lenteja	8.08 ± 0.37	No se remojó.

**Tabla II.1.** Concentración de Mo en legumbres crudas y en agua de remojo (primer lote de muestras, los resultados se presentan como microgramos de molibdeno por 1 g de legumbre cruda, molida y seca).

A continuación, se decidió limitar el estudio a los cuatro tipos de frijol, ya que para esta legumbre se observaron importantes diferencias en los niveles de concentración de molibdeno, dependiendo de la variedad. Se utilizó el segundo lote de las muestras y se procedió con el procedimiento de remojo y cocción tal como se describe en la parte experimental.

Los resultados obtenidos en el análisis de molibdeno total en diferentes tipos de frijol crudo, en frijol cocido, en agua de remojo y en el caldo se presentan en la Tabla II.2. Aunque los resultados obtenidos para frijol crudo fueron diferentes entre dos lotes de muestras (Tabla II.1 y Tabla II.2), en cada uno de ellos se puede observar la misma tendencia: la concentración más alta de Mo fue encontrada en frijol peruano, la más baja en frijol negro, mientras los frijoles flor de mayo y pinto contenían concentraciones similares, casi dos veces más bajos que en frijol peruano. En el caso del segundo lote (Tabla II.2), la concentración total de Mo en frijol negro fue 3.7 veces más baja respecto a frijol peruano.

Con base en los resultados presentados en Tabla 5, se calculó la recuperación de molibdeno (R) en el procedimiento de fraccionamiento, utilizando la siguiente fórmula:

$$R = [(AR) + (C) + (FC)] / (T) \cdot 100 \%$$

Donde (AR), (C), (FC), (T) corresponden a la concentración de Mo en agua de remojo, en caldo, en frijol cocido y en frijol crudo después de la digestión con ácido nítrico, respectivamente. La masa del frijol crudo tomado para el fraccionamiento (AR, C, FC) y para el análisis del contenido total (T) fue de 2 g; todos los valores de concentración corresponden a microgramos de Mo por un gramo de masa seca de frijol crudo.

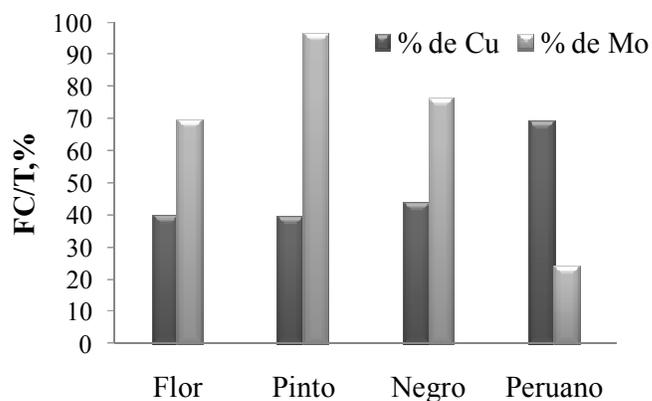
**Tabla II.2.** Las concentraciones de molibdeno en  $\mu\text{g/g} \pm \text{DE}$  ( $n = 3$ ) encontradas en agua de remojo, caldo, en frijol cocido, suma de resultados, concentración en frijol crudo y el porcentaje de recuperación en el procedimiento de fraccionamiento respecto a la determinación del contenido total mediante la digestión de la muestra. Todos los valores se expresan en relación a la masa seca del frijol crudo y molido.

Tipo de frijol	AR, $\mu\text{g Mo/g}$	C, $\mu\text{g Mo/g}$	FC, $\mu\text{g Mo/g}$	(AR+C+FC), $\mu\text{g Mo/g}$	T, $\mu\text{g Mo/g}$	R, %
Flor de mayo	$0.15 \pm 0.02$	$0.60 \pm 0.01$	$5.07 \pm 0.89$	5.82	$7.29 \pm 0.87$	79.8
Pinto	$0.22 \pm 0.01$	$1.19 \pm 0.01$	$7.63 \pm 1.37$	9.04	$7.89 \pm 1.30$	114.6
Negro	$0.19 \pm 0.01$	$0.62 \pm 0.09$	$2.73 \pm 0.37$	3.54	$3.57 \pm 0.31$	99.2
Peruano	$1.61 \pm 0.06$	$9.65 \pm 0.23$	$3.22 \pm 0.57$	14.48	$13.38 \pm 1.41$	108.2

AR: Agua de remojo. C: Caldo. FC: Frijol cocido. T: Frijol crudo. R: Porcentaje de recuperación.  
(AR+C+FC): Suma de resultados.

Con base en tres réplicas independientes del análisis de contenido total y del fraccionamiento, para los cuatro tipos de frijol del segundo lote, los valores de recuperación fueron en el intervalo de 79.8 % a 114.6 % (Tabla II.3), lo que confirma la calidad aceptable de los resultados obtenidos en los dos procedimientos para Mo. Estos resultados indican que el proceso de remojo elimina solamente una pequeña parte del contenido total de molibdeno del frijol flor de mayo, frijol pinto y frijol negro (2.6%, 2.4%, 5.4% respectivamente). En el proceso de cocción se solubiliza una cantidad un poco mayor del elemento (10.3%, 13.2%, 17.5%), mientras que la distribución relativa en la fracción de frijol cocido es la más alta (87.1%, 84.4% y 77.1%).

De manera similar como para Mo, se evaluó la distribución relativa de cobre en frijol cocido respecto a su concentración total en el material crudo. Los resultados obtenidos para los dos elementos se presentan en la Figura II.1, parece interesante que el decremento del porcentaje de Mo total en frijol cocido aparentemente está asociado con un aumento relativo del porcentaje de cobre en esta fracción, lo que sugiere un tipo de antagonismo entre los dos elementos en frijol.



**Figura II.1.** Fracciones de Cu y Mo encontrados en el frijol cocido (FC) respecto al contenido total de cada uno de los elementos en el frijol crudo (T), evaluadas en cuatro diferentes tipos de frijol.

Para evaluar la biodisponibilidad de molibdeno y de cobre en frijoles, se utilizó un modelo de tracto digestivo *in vitro*; con ello se obtuvo la simulación del proceso de digestión de los frijoles cocidos. Se ha adoptado el esquema de la enzimólisis descrito en la parte experimental, en donde la primera etapa corresponde a las condiciones en el estómago y la segunda simula las condiciones del intestino. Las concentraciones de los elementos encontradas en el sobrenadante a final del proceso se tomó como la fracción potencialmente biodisponible[262, 263]. Como ya fue mencionado, esta parte del estudio se realizó con frijoles cocidos, tomando la muestra después de la homogenización y liofilización. En la Tabla II.3 se presentan los resultados obtenidos, marcando con F las concentraciones de elementos en frijol cocido y con S las concentraciones en los sobrenadantes de la enzimólisis, en ambos casos los valores corresponden a microgramos de elemento por un gramo de frijol cocido y liofilizado. Con base en estos resultados se evaluó el porcentaje correspondiente a la fracción biodisponible en el frijol cocido (B):  $B = S/F \cdot 100 \%$  y los valores obtenidos se presentan en la misma Tabla II.3 tanto para Mo como para Cu.

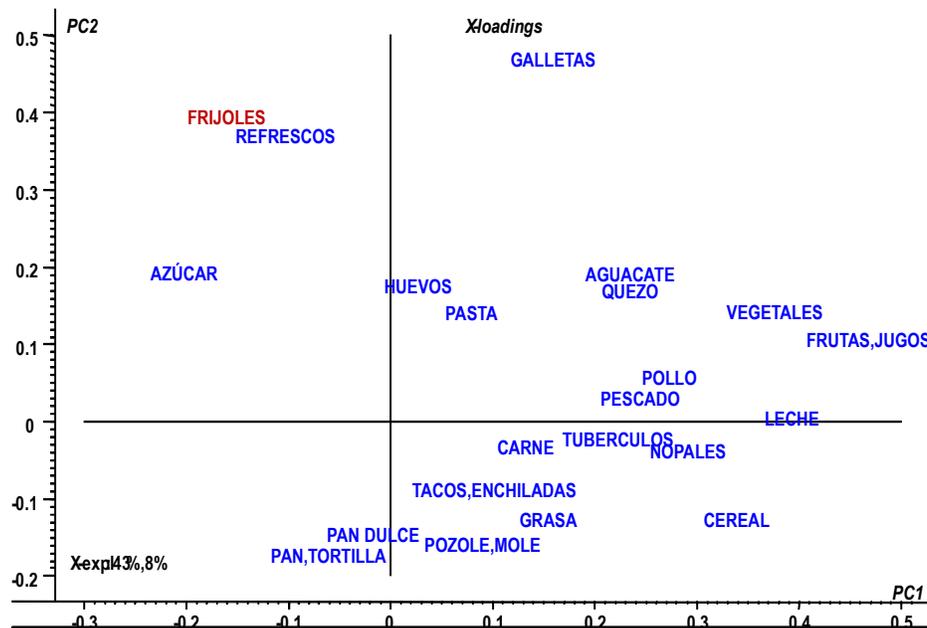
Es importante resaltar que la concentración más alta de Mo fue encontrada en frijol peruano cocido, en concordancia con los resultados del experimento anterior (Tabla II.2). En cuanto al porcentaje de biodisponibilidad de Mo, el valor más alto fue encontrado también para el frijol peruano (72.4%), seguido por el frijol pinto (39.7%) y flor de mayo (36.1%), mientras que la biodisponibilidad en frijol negro fue relativamente más baja (19.1%). Estos resultados junto con los presentados en la Tabla II.2 indican que, dependiendo del tipo del frijol, varía el contenido total de Mo de lo que depende sin duda su distribución relativa entre AR, C y FC así como la biodisponibilidad. En este sentido, entre los cuatro tipos de frijoles del estudio, el frijol pinto parece ser la mejor fuente de Mo, mientras que el negro proporciona una cantidad relativamente inferior de este elemento.

**Tabla II.3.** Las concentraciones de Mo y Cu en frijol cocido liofilizado (F) y en el sobrenadante de enzimólisis (S), ambos valores como  $\mu\text{g}$  del elemento por 1 gramo de frijol cocido liofilizado y con sus respectivos DE ( $n = 3$ ). Se presenta también el porcentaje de biodisponibilidad ( $B = S/F \cdot 100\%$ ). Las muestras corresponden al lote 2 de muestras.

Tipo de frijol	Molibdeno			Cobre		
	S, $\mu\text{g Mo/g}$	F, $\mu\text{g Mo/g}$	B, %	S, $\mu\text{g Cu/g}$	F, $\mu\text{g Cu/g}$	B, %
Flor	$0.79 \pm 0.04$	$2.19 \pm 0.39$	36.1	$2.09 \pm 0.47$	$3.66 \pm 0.57$	57.1
Pinto	$1.26 \pm 0.10$	$3.17 \pm 0.57$	39.7	$2.12 \pm 0.20$	$3.29 \pm 0.56$	64.4
Negro	$0.21 \pm 0.06$	$1.1 \pm 0.15$	19.1	$2.64 \pm 0.95$	$3.76 \pm 0.58$	70.2
Peruano	$0.92 \pm 0.11$	$1.27 \pm 0.22$	72.4	$3.78 \pm 0.19$	$6.62 \pm 0.68$	57.1

En cuanto al otro elemento de interés, de las cuatro variedades examinadas el frijol peruano resultó tener la concentración de cobre más alta ( $6.62 \mu\text{g/g}$ ), mientras que otros tres tipos de frijol contenían concentraciones de Cu relativamente más bajas pero similares ( $3.29 - 3.76 \mu\text{g/g}$ ). Asimismo, el más alto porcentaje de biodisponibilidad de Cu se encontró en el frijol negro (70.2%), seguido por el frijol pinto (64.4%) y los frijoles flor de mayo y peruano (57.1%). Por otro lado, los resultados presentados en la Tabla II.3 parecen aludir a que exista algún tipo de antagonismo entre Cu y Mo, ya que un porcentaje bajo de biodisponibilidad de Mo en frijol negro (19.1 %) está acompañado por el más alto porcentaje de biodisponibilidad para Cu (70.2 %). Se llevó el análisis estadístico de correlación entre los valores B para los dos elementos en cuatro tipos de frijol, obteniéndose un alto valor de coeficiente de correlación inversa  $-0.9834$  ( $p = 0.107$ ), lo que parece sostener la hipótesis de una relación antagonista entre estos dos elementos en planta de frijol. Asimismo, el grupo de la Dra. Ma Eugenia Garay Sevilla realizó una encuesta entre pacientes diabéticos y la frecuencia con la que ingerían ciertos alimentos, con los datos recabados, se realizó un análisis de componentes principales (Figura II.2) que arrojó como resultado una correlación entre los pacientes diabéticos con complicaciones, y la frecuencia con la que consumían refresco,

azúcares y frijoles. Este resultado es muy interesante, ayuda a soportar la hipótesis de que el frijol es una fuente dietaria importante de molibdeno, y sugiere que pudiera ser un factor de riesgo potencial para pacientes diabéticos con complicaciones. En los resultados obtenidos en la Tabla II.3, hay diferencias claras en la biodisponibilidad de molibdeno entre diferentes tipos de frijol, y con base en un estudio que evalúa la toxicidad de molibdeno en humanos[264], se establece que la ingesta diaria tolerable de molibdeno es de 0.009mg /kg día y que en sujetos con una ingesta dietaria de 0.022 mg /kg día se observaba un incremento en la excreción urinaria de cobre. De esta manera, para un adulto de 70 kg, la ingesta de 100 g de frijol negro proveen 0.005 mg/kg día, por debajo de la ingesta diaria tolerable, pero, esos mismos 100g de frijol peruano proveen 0.019 mg/kg día, lo cual está muy cercano al valor en el que se observa un incremento en la excreción urinaria de cobre. Tomando en cuenta que 100 g de frijol es una ingesta modesta para un adulto de 70 kg, este estudio sugiere que la ingesta de frijol podría ser un factor de riesgo potencial para pacientes diabéticos con complicaciones.



**Figura II.2** Modelo PCA obtenido en la evaluación de posibles relaciones entre ingesta dietaria y pacientes diabéticos en el estado de Guanajuato.

#### **IV.2.4. Conclusiones.**

Los resultados presentados en este documento confirman que el frijol mexicano contiene concentraciones relativamente altas de molibdeno; sin embargo, estas concentraciones varían dependiendo del tipo de frijol. Aparentemente, el frijol peruano proporciona una mayor cantidad de molibdeno entre las cuatro variedades estudiadas, mientras que el frijol negro contiene concentraciones relativamente bajas de este elemento. Los resultados de determinación de molibdeno en fracciones recolectadas durante el procedimiento de cocción y en el sobrenadante de enzimolisis muestran diferencias en la solubilidad y biodisponibilidad de las formas de este elemento presentes en las cuatro variedades de frijol. En este sentido, el frijol pinto podría ser la mejor fuente dietética de Mo entre los cuatro tipos de frijol estudiados, mientras que el frijol negro parece proporcionar cantidades relativamente bajas entre estos frijoles. El análisis comparativo de los resultados obtenidos para Mo y Cu en los cuatro tipos de frijol, sugieren que existe un tipo de antagonismo entre los dos elementos en estas legumbres. Tomando en cuenta los resultados del estudio estadístico realizado, estos sugieren que la ingesta reiterada de frijol podría ser un factor de riesgo potencial para pacientes diabéticos con complicaciones.

## Capítulo IV.3

### IV.3. Avances en el desarrollo de los procedimientos analíticos para la determinación de los AGEs y sus precursores

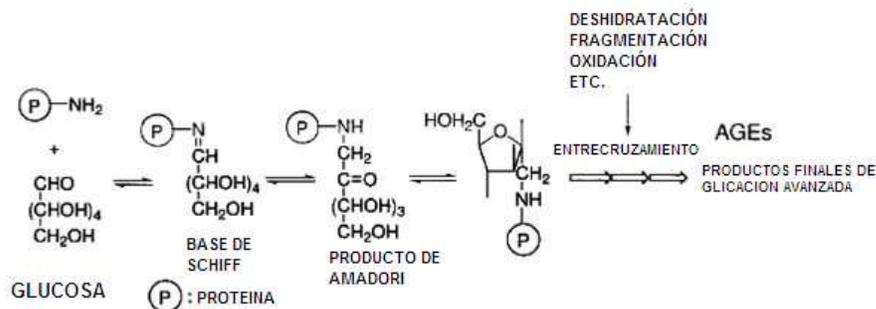
#### IV.3.1. Síntesis, purificación y determinación de pentosidina en matrices biológicas.

##### Introducción

En el contexto de la diabetes, la consecuencia directa de la hiperglucemia es la formación de enlaces químicos entre glucosa y las bio-moléculas (aminoácidos, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas entre otros.), descrita como glucosilación no enzimática (glicación) (Figura III.1). Dicha glicación altera las funciones biológicas de proteínas y ácidos nucleicos, estos productos de glicación se almacenan en diferentes compartimientos del organismo provocando daños irreversibles en diferentes tejidos, órganos y sistemas. Debido al acceso de la glucosa a diferentes compartimientos del organismo, la glicación ocurre tanto en el espacio extracelular como dentro de las células. La formación de AGEs y su acumulación son procesos que ocurren normalmente durante el envejecimiento del organismo. Sin embargo, son significativamente acelerados en diabetes[265]. Los AGEs constituyen un grupo heterogéneo, muy complejo de compuestos y, como ya se mencionó, son formados mediante las reacciones no enzimáticas de azúcares reductores con bio-moléculas. Los productos intermedios de estas reacciones se conocen como compuestos de Amadori, mismos que a través de una serie de reacciones son transformados de manera irreversible en los productos de glicación avanzada (AGEs). Dependiendo de las condiciones de reacción, se han descrito diferentes rutas para su formación, mismas que se presentan de manera global en la Figura 2 (página 29). La ruta clásica (re-arreglo Amadori) involucra una etapa de oxidación y sus productos son N-ε-(carboximetil)-lisina (CML) y pentosidina(Figura 2)[40].

Puesto que los AGEs se forman de manera irreversible, su acumulación y daño a la estructura es proporcional a la vida media de la proteína. Como ejemplo, la formación de los AGEs en el colágeno de las paredes de vasos conduce al entrecruzamiento entre moléculas de esta proteína lo que lleva a un aumento del grosor y rigidez de la pared. Además, los AGEs forman entrecruzamientos entre el colágeno y las proteínas del torrente sanguíneo, lo que resulta en la formación de placas y pérdida de elasticidad de vasos[266, 267]. Así, el efecto de los procesos de glicación en el colágeno ha sido relacionado con enfermedades del sistema circulatorio tales como hipertensión, arterioesclerosis, etc. [265, 268, 269] Cabe mencionar que, el principal daño por los AGEs en pacientes diabéticos ocurre en tejidos y órganos ricos en colágeno (La pentosidina fue aislada por primera vez del colágeno humano por Sell y Monnier y posteriormente encontrada en

una gran variedad de tejidos[225]), donde el acceso de la glucosa no está regulado por la insulina tales como el riñón, la retina y el endotelio vascular[36, 39].



**Figura III.1.** Esquema de la formación de los AGEs, mediante la reacción de Maillard.

La pentosidina es uno de varios AGEs caracterizados químicamente, está presente en varios tejidos como piel, riñones, cartílago, aorta, etc[270]. Además se ha observado su acumulación con el progreso de la diabetes y sus complicaciones[38, 226, 227]. Se ha demostrado también la presencia del mismo compuesto en alimentos [228-232] y, es considerada un marcador químico del tratamiento térmico de alimentos[233]. Lo cual es necesario destacar, ya que hay algunos estudios donde se llevó a cabo la determinación de pentosidina en alimentos y en fluidos/tejidos biológicos con el fin de buscar posibles correlaciones entre la ingesta de los AGEs exógenos y el desarrollo de complicaciones en la diabetes [226, 227, 234].

Como ya se mencionó en la introducción, la búsqueda de métodos para la determinación de AGEs es uno de los tópicos de interés no sólo local o regional, su búsqueda es relevante a nivel mundial[224], de esta forma es importante contar con procedimientos selectivos, basados en la separación cromatográfica y la cuantificación de los compuestos. En particular, se define como uno de los enfoques de este estudio, desarrollar nuevos procedimientos analíticos para la determinación de pentosidina en muestras clínicas. Además de ensayos inmunoquímicos[235, 236], la pentosidina ha sido determinada mediante diversos procedimientos analíticos, aprovechando sus propiedades fluorescentes [237, 238]. Entre las diferentes dificultades que presenta su determinación están la falta de un estándar comercial de pentosidina, sus bajas concentraciones y la complicada matriz química en la que se encuentra presente[271], lo que conlleva típicamente el uso de pre tratamientos caros y laboriosos, para preconcentrar el analito[271-273] y eliminar interferentes, además de largos tiempos de separación(Tabla III.1). Como ya ha sido mencionado, la pentosidina es un compuesto representativo para AGEs exógenos y endógenos, por lo que ha sido utilizado para evaluar una posible asociación entre la ingesta de AGEs y el desarrollo de las complicaciones en diabetes [226, 227, 234]. En este sentido, uno de los objetivos particulares del presente trabajo es poner a punto el procedimiento analítico para la determinación de pentosidina por cromatografía de líquidos y demostrar su utilidad en el análisis de muestras clínicas. El estándar de pentosidina no está disponible comercialmente, por lo que en primer lugar fue necesario llevar a cabo su síntesis, purificación y caracterización cuantitativa.

**Tabla III.1.** Algunos ejemplos de procedimientos cromatográficos con detección fluorimétrica, reportados en la literatura para la determinación de pentosidina en muestras biológicas.

Año	Referencia	Muestra biológica	Pre tratamiento	Tiempo de corrida cromatográfica	Límite de detección
2012	Braun [271]	Orina y suero.	Hidrólisis ácida (16h a 105°C). Purificado (SPE-CC31). Pre concentrado.	30 min	2.7 nmol
2006	Spacek [272]	Orina	Purificado (SPE). Pre concentrado.	30 min	17.6 fmol
2008	Kageyama[273]	Orina, suero y tejidos.	Hidrólisis ácida(18h y 110°C). Purificado (SPE). Pre concentrado.	26 min	1.6 pmol
2010	Vos [274]	Orina	Sin pre tratamiento.	30 min	No específica
2003	Tsukuhara[270]	Orina	Purificado (SPE CF-1).	No específica	28 pmol
2012	Este trabajo	Orina	Sin pre tratamiento.	20 min	30 pmol

\*SPE: extracción en fase sólida; CF1 y CC31: SPE modificado con celulosa y celulosa esférica respectivamente.

En la introducción se menciona que la pentosidina es un compuesto representativo para AGEs exógenos y endógenos, por lo que ha sido utilizado para evaluar una posible asociación entre ingesta de AGEs y desarrollo de las complicaciones en diabetes [226, 227, 234]. En este sentido, uno de los objetivos particulares del presente trabajo es poner a punto el procedimiento analítico para la determinación de pentosidina por cromatografía de líquidos y demostrar su utilidad en el análisis de muestras clínicas. El estándar de pentosidina no está disponible comercialmente, por lo que en primer lugar fue necesario llevar a cabo su síntesis, purificación y caracterización cuantitativa.

#### IV.3.2. Materiales y métodos.

Para la síntesis se utilizaron los siguientes reactivos Sigma-Aldrich: ribosa, N-tBOC-Arginina, N-tBOC-Lisina, tampón de fosfatos 0.5 M, pH 8.0 y ácido trifluoroacético. En la etapa de la purificación, se utilizó el cromatógrafo de líquidos modelo 1200, de Agilent Technologies con

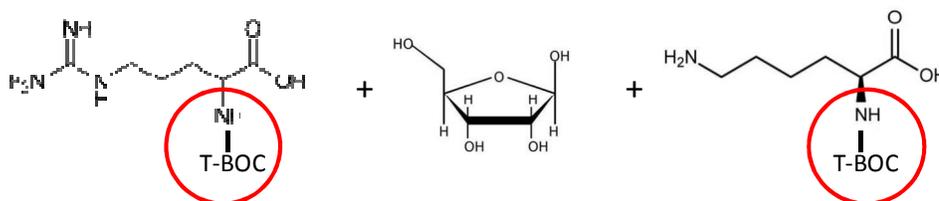
detector espectrofotométrico con arreglo de diodos y detector espectrofluorimétrico, con la columna TSK-gel GMPVXL de TOSOHAAS, 7.8mm x 300mm, 13µm.

Para el desarrollo del procedimiento, se utilizó la orina de un voluntario sano. Las muestras de orina de los pacientes diabéticos provenían de un estudio clínico realizado en el Departamento de Ciencias Médicas de la División de Ciencias de Salud, de la Universidad de Guanajuato (Dr. Carlos Kornhauser Araujo). Este estudio no forma parte del presente trabajo, por lo que no se describe a detalle. Cabe mencionar sin embargo, que participaron ocho pacientes diagnosticados con nefropatía diabética, a los que se administró telmisartan (un antagonista del receptor AT1 de la Angiotensina II).

Para la determinación cromatográfica de pentosidina, se toma una alícuota de 200 µL de cada muestra, se deposita en un tubo eppendorff, se centrifuga a 1000xg durante 10 minutos y se recolecta el sobrenadante (este paso es necesario para eliminar un posible precipitado). El sobrenadante (160 µL) se trasfiere a otro tubo, se agregan 40 µL del ácido heptafluorobutírico 100 mM y se repite la centrifugación. Finalmente, el sobrenadante se transfiere a un vial del auto muestreador para su inyección al sistema HPLC. De ser necesario, las muestras se diluyen hasta cuatro veces para ajustar la señal analítica al intervalo de calibración (0.1- 2.0 pM). Las condiciones del análisis cromatográfico se presentan en la tabla III.2.

#### IV.3.3. Resultados y discusión.

La síntesis se llevó a cabo con base en el procedimiento reportado por Grandhee y col.[275], haciendo algunas modificaciones. Para ello, se preparó una mezcla de 150.1 mg de ribosa de pureza de 99%, 246.3 mg de N-tBOC -Lisina al 99% de pureza y 274.3 mg de N-tBOC-Arginina de 95% de pureza, misma que se disolvió en 2.5 mL del tampón de fosfatos 0.5 M, pH 8.0 y se dejó incubar durante seis días en 65°C (Fig. III.2). De esta manera, además de un azúcar reductor (ribosa), los sustratos fueron los aminoácidos lisina y arginina, ambos protegidos en el nitrógeno  $\alpha$  con un grupo t-butiloxycarbonilo (t-BOC), esto con el fin de evitar la participación de este grupo amino en la reacción. La eliminación de los grupos t-BOC del producto obtenido se obtuvo mediante la hidrólisis ácida con el ácido trifluoroacético 2 M, durante 2 horas.



**Figura. III.2.** Sustratos para la síntesis de la pentosidina

Finalmente, la mezcla se evaporó hasta sequedad (SpeedVac, 60-70 °C, 2 h) y el residuo obtenido se re-disolvió en 1.5 mL de agua desionizada. La purificación de la pentosidina se obtuvo

mediante cromatografía preparativa, en la columna de exclusión por tamaño molecular TSK-gel GMPVXL de Tosohaas, 7.8 mm x 300 mm, 13  $\mu\text{m}$ , la fase móvil fue el ácido fórmico 10 mM con el flujo total 0.7 mL/min, con detección espectrofotométrica en 325 nm (ref. 420 nm) y detección espectrofluorimétrica ( $\lambda_{\text{ex}}=325$  nm y  $\lambda_{\text{em}}=385$  nm)[238]. En la Fig.III.3a se presenta el cromatograma correspondiente, observándose la elución de dos fracciones de masas moleculares con la detección UV. En la Figura Fig.III.3b se presenta el mismo cromatograma, pero registrado utilizando la detección espectrofluorimétrica, donde queda confirmada la elución de la pentosidina en la región de alta masa molecular (máximo del pico corresponde a 13.63 min). Se recolectó la fracción de la columna correspondiente a la elución de la pentosidina entre 12.2 min y 15.0 min, se evaporó utilizando SpeedVac y el residuo sólido se re-disolvió en 1.5 mL de agua desionizada. Con el fin de utilizar la pentosidina sintetizada como estándar para la cuantificación del compuesto en diferentes tipos de muestra, se tenía que demostrar la pureza del compuesto y determinar la cantidad que se obtuvo (concentración molar en la solución final de 1.5 mL). Para ello, se registró el espectro de absorción de la solución reconstituida de la pentosidina purificada en la región 225 – 400 nm, mismo que se presenta en la Figura III.4. Como se puede observar, el máximo de la banda de absorción corresponde a 315 nm, de acuerdo con el espectro de pentosidina reportado por Slowik-Zylka [238]. En este mismo trabajo citado se evaluó el valor del coeficiente de absortividad molar  $\epsilon = 4522 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  ( $\lambda_{\text{max}} = 315$  nm).

Con base en este valor y el valor de absorbancia de la solución en 315 nm ( $A = 0.394$  AU), se calculó la concentración molar de la solución obtenida, empleando la ley de Lambert-Beer.

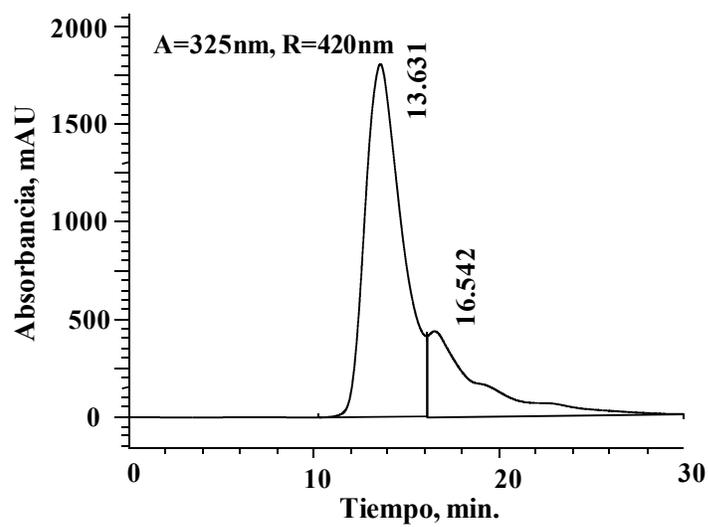
$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

$$c = A/(\epsilon \cdot b)$$

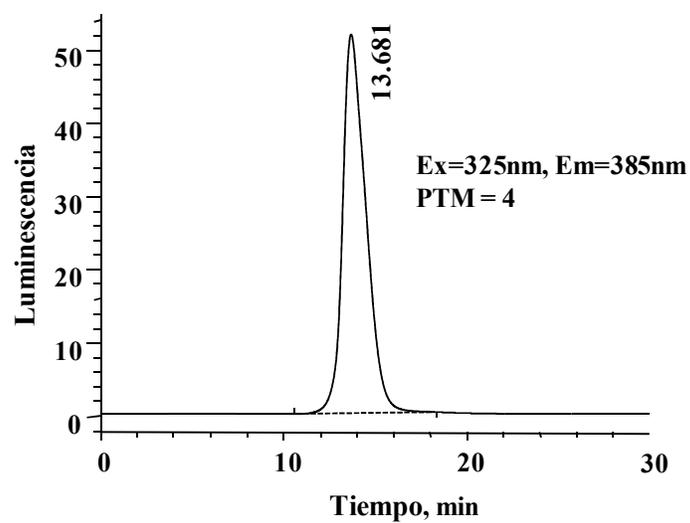
$$c = 0.394/(4522 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm} \cdot 1 \text{ cm}))$$

$$c = 87 \mu\text{mol/L}$$

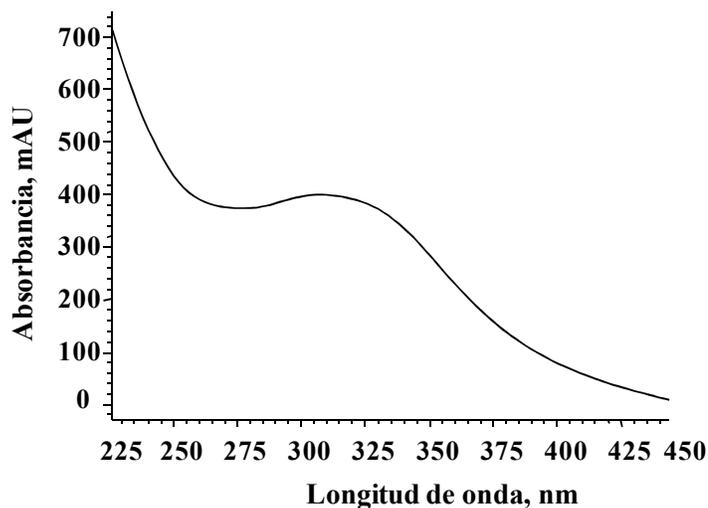
(a)



(b)



**Figura III.3.** Cromatograma de la purificación de pentosidina sintetizada y desprotegida (columna TSK-gel GMPVXL): (a) – detección espectrofotométrica, (b) detección fluorimétrica[238].



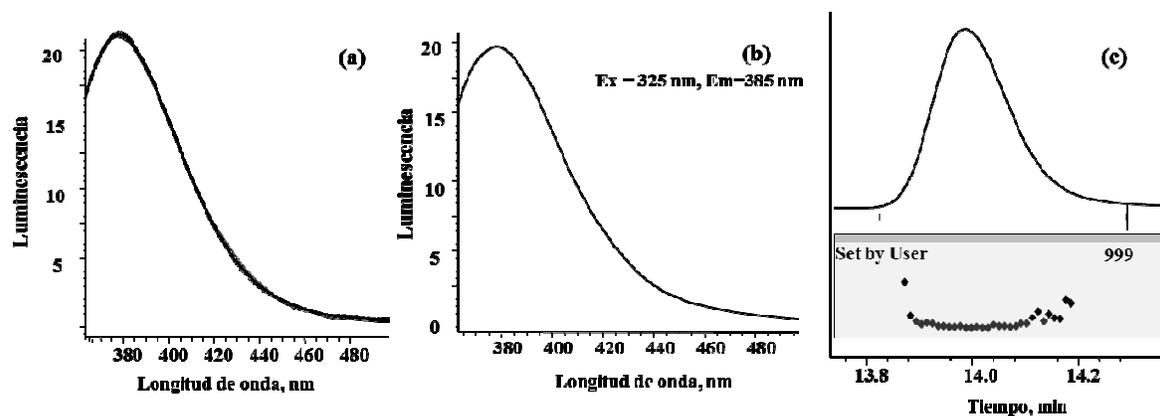
**Figura III.4.** Espectro de absorción de la solución de pentosidina.

Esta solución se conservó para su uso como solución patrón para el proceso de calibración en la determinación de la pentosidina por cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FLD), mediante la preparación de un estándar intermedio con concentración 20 nM y diluciones sucesivas para obtener el rango de calibración 0.1-2.0 nM. Para la separación cromatográfica, fue necesario asegurar la resolución de la pentosidina de otros compuestos fluorescentes potencialmente presentes en muestras de orina. Debido a la alta polaridad del soluto, la separación se llevó en presencia de ácido heptafluorobutírico (HFBA) para formar pares iónicos y obtener la separación en la columna de fase inversa. En los experimentos preliminares, se emplearon las condiciones reportadas en un estudio anterior[276], observándose la elución de varios compuestos fluorescentes sin lograr la separación hasta línea base del pico de pentosidina. Se probaron diferentes condiciones de elución, variando la concentración de HFBA, de metanol y acetonitrilo, así como del flujo total en la columna. Con base en los resultados obtenidos, se establecieron las condiciones finales que se resumen en la Tabla III.2.

**Tabla III. 2.** Condiciones para el análisis cromatográfico de pentosidina en muestras de orina.

Parámetro	
Columna	ZORBAX Eclipse AAA (150 x 3.0 mm, 3.5 $\mu$ m) de Agilent Technologies
Fase móvil A	Agua
Fase móvil B	Acetonitrilo
Fase móvil C	HFBA 40mM
Fase móvil D	Metanol
Gradiente de elución	0 min 46% A 1% B 50% C 3% D 13.5 min 20% A 10% B 50% C 20% D 14.0 min 10% A 20% B 50% C 20% D 15.0min 46% A 1% B 50% C 3% D
Flujo en la columna	0.6 mL/min
Volumen de inyección	25 $\mu$ L
Detección espectrofotométrica	$\lambda_{anal} = 325$ nm, $\lambda_{ref} = 420$ nm
Detección fluorimétrica	$\lambda_{ex} = 325$ nm, $\lambda_{em} = 385$ nm

En la Figura III.6 se presentan los cromatogramas obtenidos para una muestra de orina de un paciente diabético con complicaciones leves, sin adición de estándar (línea continua) y con adición de pentosidina (línea punteada). En la Figura III.7 se presentan los cromatogramas obtenidos para una muestra de orina de un paciente diabético con complicaciones severas sin adición de estándar (línea continua) y con adición de pentosidina (línea punteada). De esta manera, se confirmó la identidad del pico cromatográfico con tiempo de retención  $13.98 \pm 0.08$  min, como el correspondiente a la elución de la pentosidina. La pureza del pico de la pentosidina en la región de tiempo 13.85 – 14.14 min (correspondiente a la anchura del pico) fue 0.999, demostrando una excelente separación de la pentosidina de sus interferentes (Figura III.5).

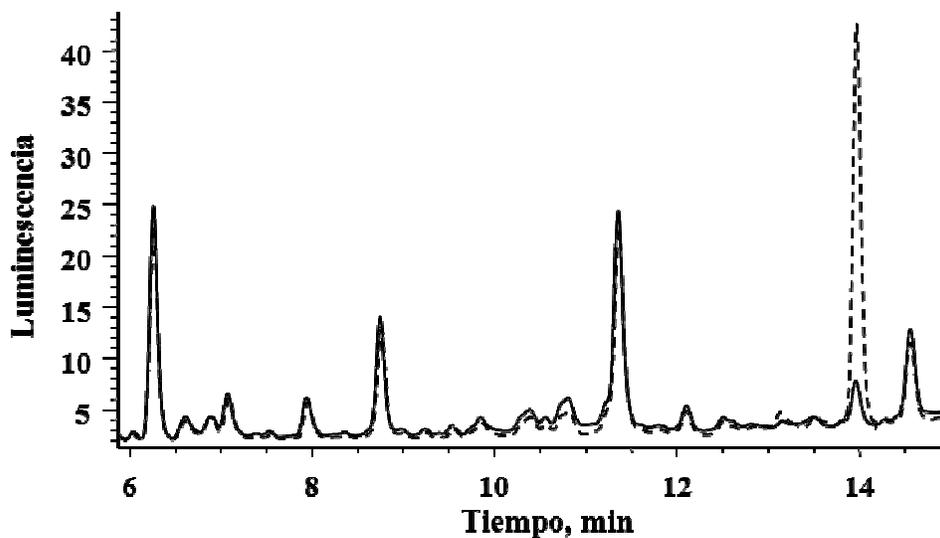


**Figura III.5.** Evaluación de pureza de pico en orina de un voluntario sano. Se presentan los espectros normalizados, registrados en diferentes tiempos dentro del pico de pentosidina en **a)**; el espectro de la solución estándar de pentosidina en **b)**; y la evaluación de pureza del pico cromatográfico de pentosidina en **c)**.

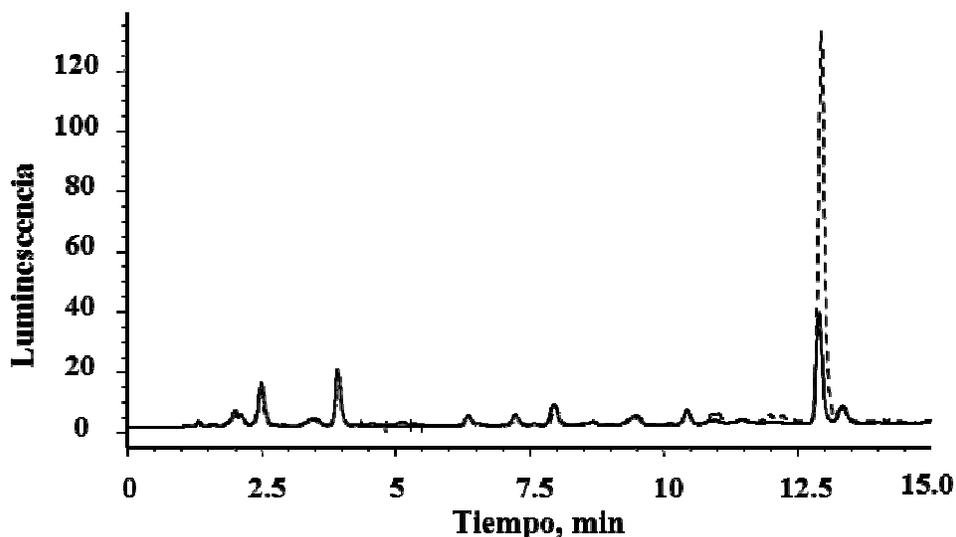
Con base en el proceso de calibración, se evaluaron las principales características analíticas; como se puede observar en la Tabla III.3, el procedimiento permite la determinación de la pentosidina en concentraciones sub-nM, de acuerdo con las concentraciones esperadas en orinas de personas sanas y en pacientes diabéticos.

**Tabla III.3.** Parámetros analíticos evaluados para el procedimiento cromatográfico propuesto.

Parámetro	
Tiempo de retención $\pm$ DE, min	13.98 $\pm$ 0.08
Ecuación de calibración	Área = 51.15·c [nM] + 0.27
R <sup>2</sup>	0.99986
Error típico de la pendiente	0.02
Error típico del intercepto	0.34
Límite de detección	0.03 nM
CV, % (1 nM)	0.9

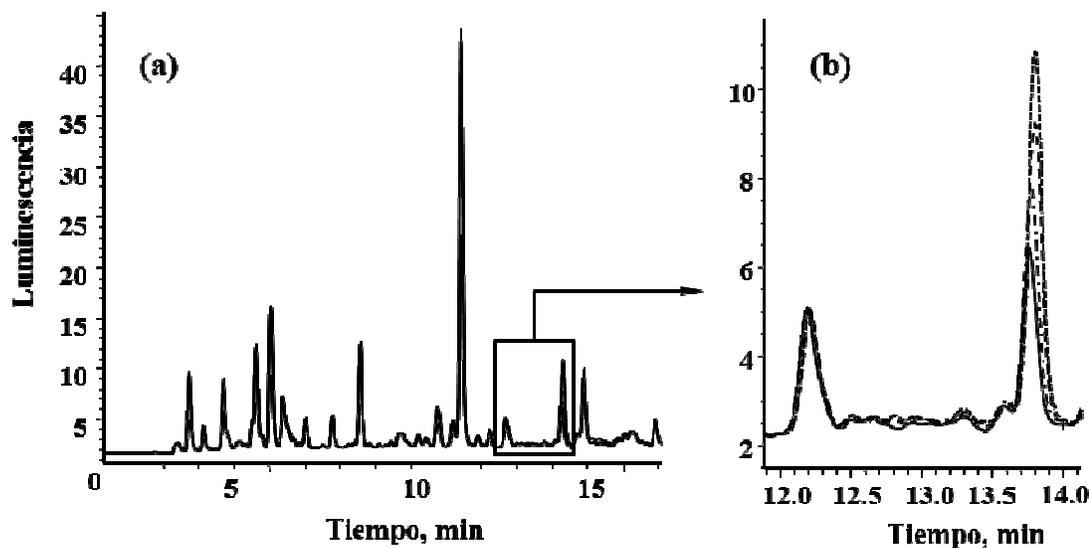


**Figura III.6.** Cromatogramas de una muestra de orina de un paciente diabético con complicaciones leves: (—) sin adición de estándar, y (---) con adición de pentosidina para obtener una concentración final 2 nM.



**Figura III.7.** Cromatogramas de una muestra de orina de un paciente diabético con complicaciones severas: (—) sin adición de estándar, y (---) con adición de pentosidina para obtener una concentración final 6 nM.

Finalmente, como se muestra en la Figura III.8, se realizó una prueba de exactitud, mediante el análisis de una muestra de orina (voluntario sano) por calibración externa y por el método de adición de estándar (0.1 nM, 0.15 nM y 0.25 nM del estándar de pentosidina).



**Figura III.8.** Cromatogramas de una muestra de orina de un voluntario sano, y la misma orina con tres puntos de adición de estándar: (—) muestra, (---) 0.1 nM pentosidina, (- - -) 0.15 nM, (····) 0.25 nM.

Los resultados obtenidos en tres réplicas independientes para cada una de las inyecciones fueron  $0.223 \pm 0.024$  nM y  $0.212 \pm 0.017$  nM, respectivamente. En la aplicación de la prueba estadística t pareada, no se detectó diferencia estadísticamente significativa entre estos dos valores ( $p < 0.05$ ), lo que indica una buena exactitud del resultado. Para demostrar la utilidad del procedimiento desarrollado en la determinación de pentosidina en muestras reales, se llevó a cabo el análisis en orinas de pacientes diabéticos. Las muestras fueron obtenidas de ocho pacientes diagnosticados con nefropatía diabética que presentaban pérdida excesiva de podocitos por vía urinaria. El término podocitos se refiere a las células que forman parte de la barrera de filtración glomerular. El daño renal, como una complicación de la diabetes, ha sido asociada con la pérdida de podocitos y su excreción en orina, por lo que es importante reducir dicha pérdida. En el estudio clínico realizado por el grupo del Departamento de Ciencias Médicas se observó que el tratamiento con Telmisartan resultó en una disminución de la excreción de podocitos. Estas mismas muestras fueron utilizadas para la determinación de pentosidina, esperando observar diferencias significativas que podrían ser de utilidad en el estudio clínico. El valor promedio de la concentración de pentosidina obtenido en el análisis de las muestras pre-tratamiento fue  $2.66 \pm 2.31$  nM y en muestras post-tratamiento  $1.52 \pm 0.85$  nM ( $p = 0.01255$ , prueba t). Estos resultados demuestran que el procedimiento propuesto permite detectar diferencias entre los niveles de concentración de pentosidina dependiendo del estado clínico del paciente. Como era de esperarse (ver Tabla III.4), las concentraciones encontradas en pacientes diabéticos fueron más altas en comparación con el nivel encontrado en orina de un voluntario sano ( $0.212 \pm 0.017$  nM), lo que confirma el incremento de los AGEs en el desarrollo de la diabetes. Por otro lado, los niveles de pentosidina en orinas de pacientes post-tratamiento con Telmisartan fueron significativamente más bajos con respecto a los encontrados antes del tratamiento.

**Tabla III.4.** Concentración de pentosidina en orina de pacientes pre y post tratamiento con Telmisartan.

Paciente	Concentración de pentosidina	
	Pre tratamiento	Post tratamiento
1	2.884	1.349
2	7.037	3.201
3	1.085	0.767
4	1.481	1.376
5	1.984	2.434
6	1.508	1.138
7	-	0.87
8	-	1.032
Promedio $\pm$ DE*	2.66 $\pm$ 2.31	1.52 $\pm$ 0.85

\*Desviación estándar.

Aunque la interpretación clínica está fuera del contenido del presente trabajo, los resultados obtenidos demuestran que la sensibilidad del procedimiento permite observar diferencias en las concentraciones de pentosidina entre diferentes grupos de sujetos. También hay que hacer notar que el procedimiento HPLC-FLD permite determinar la concentración del analito en orina. Para la interpretación confiable de posibles diferencias entre sujetos/grupos, los datos obtenidos deben normalizarse por el contenido actual de creatinina corrigiendo de esta manera diferencias entre volúmenes de orina de cada uno de los sujetos. En este sentido, se hizo una estimación tomando como punto de partida el nivel de referencia de creatinina en orina como 500 nM[277] y la concentración de pentosidina en un voluntario sano 0.22 nM. Haciendo un cálculo se obtuvo que la concentración de pentosidina en el sujeto sano fue de 0.16  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de creatinina, lo cual está de acuerdo con los datos reportados por otros autores (0.02 – 0.21  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )[278].

#### **IV. 3.4. CONCLUSIONES**

Se ha demostrado que la técnica de cromatografía de líquidos con detección espectrofluorimétrica permite cuantificar pentosidina en niveles de concentración del orden de sub-nanomoles por litro, en muestras de composición química compleja tales como orina, proporcionando así, información relevante en la práctica clínica y en estudios enfocados en la diabetes. En este trabajo se procede a la determinación de pentosidina en orina sin recurrir al uso de pre tratamientos caros y laboriosos, para preconcentrar el analito y eliminar interferentes [271-273], logrando la separación cromatográfica en un tiempo de corrida de sólo 20 minutos. El procedimiento desarrollado es de fácil implementación, y se propone su uso en laboratorios clínicos, como una herramienta auxiliar en el seguimiento del progreso de la diabetes mellitus 2.

## Capítulo IV.4

**Avances en el desarrollo de los procedimientos analíticos para la determinación de los AGEs y sus precursores.**

### **IV.4. Determinación cromatográfica de glioxal, metilglioxal y diacetil usando 4-metoxi-o-fenilendiamina como agente derivatizante.**

#### **IV.4.1 Introducción**

El estrés oxidativo y las reacciones de glicación juegan un papel perjudicial en el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas y en procesos de envejecimiento. En el control clínico de rutina, la evaluación de biomarcadores apropiados proporciona información acerca de los procesos endógenos de los pacientes, y, también, acerca del seguimiento a las recomendaciones dietéticas de los mismos. Para tales propósitos, la orina es una muestra muy conveniente debido a su recolección fácil y no invasiva y a su matriz química relativamente simple, si se le compara con otros fluidos o tejidos biológicos. Se ha demostrado que el análisis de muestras puntuales o de la primera orina de la mañana ofrece resultados útiles y confiables en el seguimiento de pacientes tanto en estudios epidemiológicos, así como en los relacionados con exposición a agentes externos [279-281]. Los dos  $\alpha$  cetoaldehidos, glioxal (Go) y metilglioxal (MGo), son generados endógenamente, principalmente durante la conversión metabólica de glucosa y la degradación oxidativa de lípidos [240, 282]. Su presencia en bebidas fermentadas y en productos alimenticios también debe mencionarse como una fuente exógena potencial [283, 284]. Dentro de la célula, MGo y Go forman aductos o entrecruzamientos con biomoléculas, por lo cual comprometen su actividad biológica e inactivan la maquinaria antioxidante [243]. Bajo condiciones fisiológicas, ambas moléculas son neutralizadas eficientemente por el sistema de glioxalasa, aldosa reductasa, betaina aldehído deshidrogenasa, y 2 oxoaldehído deshidrogenasa [242, 285]; de cualquier manera, el deterioro de las defensas antioxidantes, así como el incremento de las concentraciones de MGo y Go han sido asociados con enfermedades crónico degenerativas y con los procesos de envejecimiento [243, 244]. Debido a que ambos compuestos actúan como precursores de los productos de glicación avanzada (AGEs) y son considerados como marcadores de peroxidación lipídica [282, 286], su determinación en muestras clínicas es relevante. En particular, se ha propuesto que el monitoreo de los niveles de MGo y Go en pacientes diabéticos podría ayudar a evaluar los riesgos del progreso de las complicaciones diabéticas [249, 287-289]. Diacetil (DMGo), el tercer compuesto de interés en este trabajo, también ha sido asociado con estrés oxidativo y carbonílico como un mediador potencial de reacciones de transferencia de

electrones, un intermediario de los procesos de Maillard y un precursor de AGEs [290]. Este metabolito menor del acetaldehído, derivado del etanol es fácilmente reducido a acetoína y 2,3-butanodiol[291]; por lo mismo, no siempre se le ha detectado en muestras biológicas[292, 293]. Por otro lado, el diacetil está presente en muchas bebidas y en varios productos alimenticios como un metabolito de la fermentación microbiana o como aditivo sabor mantequilla[294, 295]. Su determinación en orina puede ser de interés en estudios sobre toxicidad y adicción al alcohol [290], y en la evaluación de exposiciones recientes a fuentes exógenas [294]. En este sentido, recientes hallazgos muestran que compuestos dicarbonílicos exógenos reaccionan con enzimas digestivas, las cuales reducen su bio disponibilidad y pudieran favorecer su eliminación en orina[296].

La cuantificación de  $\alpha$ -cetoaldehidos en muestras clínicas ha sido reportada a menudo; sin embargo, solo unos pocos estudios se han enfocado en el análisis de orina (tabla IV.1) [293, 297-304]. Es importante resaltar que se ha sugerido que la orina es la muestra más práctica para dicho análisis, debido a que puede evitarse la formación de novo espontánea de MGo de triosas fosfato, lo cual sucede en matrices biológicas más complejas [300, 305, 306]. Se pueden encontrar revisiones breves y comparaciones de procedimientos analíticos en la parte introductoria de muchos artículos encontrados en la literatura[297, 298, 302, 304, 307] y en revisiones exhaustivas[242, 308], la vasta mayoría de ellos basados en la derivatización pre columna apropiada, seguida por la separación cromatográfica o electroforética de los derivados de los compuestos de interés. En lo que concierne al uso de agentes derivatizantes en cromatografía líquida, deben resaltarse los compuestos aromáticos 1,2-diamino sustituidos, los cuales producen quinoxalinas fluorescentes [309]. En particular, 1,2-diaminobenceno[286, 306], 1,2-diamino-4,5-dimetoxibenceno[300, 305, 310], 1,2-diamino-4,5-metilenedioxibenceno [311], 4,5-dicloro,1,2-diaminobenceno[293] o 2,3-diaminonaftaleno[303] han sido utilizados hasta ahora. Como ya ha sido mencionado, el diacetil raramente ha sido detectado en orina (tabla IV.1) y algunos autores utilizaban este compuesto como estándar interno[298, 300, 302]. Es necesario resaltar, que la 4-metoxi-o-fenilendiamina (4MPD) ha sido utilizada para la determinación fluorimétrica de diacetil en vino[312]. La meta de este trabajo era establecer un nuevo procedimiento para la determinación de Go, MGo y DMGo a niveles fisiológicos en orina. Para este fin, hemos propuesto utilizar dietilglioxal (DEGo) como estándar interno, examinamos el uso de la 4-metoxi-o-fenilendiamina como agente derivatizante para la separación de las quinoxalinas fluorescentes por cromatografía líquida en fase inversa. Mediante el uso de un original pretratamiento de muestra, los resultados obtenidos en el análisis de muestras reales han demostrado que el procedimiento propuesto permite la cuantificación de los tres compuestos de interés en muestras de sujetos que presentan diversas exposiciones o condiciones clínicas.

Orina	Reactivo	Técnica Analítica	Límites de detección (LD) y concentraciones encontradas (c, rango o media ± DE)						ref
			Go		MGo		DMGO		
			LD	c	LD	c	LD	c	
No especifican	DCDB	GC-ECD	-	nd	-	nd	860 µg/L	1.73 ± 0.04 nmol/mg*	[293]
No especifican	TRI	HPLC-FLD	32 pmol	13.18 µM	11 pmol	1.50 µM	99 pmol	2.10 µM	[301]
Sano	DDB2	HPLC-FLD	-	50-250 µM 2.9-14.9 mg/L 4.7 ± 1.4 µg/mg*	-	20 – 100 µM 1.4-7.2 mg/L 2.2 ± 0.7 µg/mg*	-	nd	[300]
Sano	DDP	HPLC-DAD/FLD	5.30 µg/L	19.02 µg/L 0.43-1.50 µg/mg*	6.71 µg/L	24.07 µg/L 0.30-0.90 µg/mg*	-	nd	[299]
No especifica	DAN	SBSE-HPLC-DAD	15 ng/L	268.9±6.3 µg/L	25 ng/L	94.1±3.2 µg/L	-	nd	[303]
Diabético	DAP	GC-FID	-	Nd	40 µg/L	170-250 µg/L	50 µg/L	ne	[302]
Diabético	DDB1	GC-FID	20 µg/L	170-400 µg/L	10 µg/L	190-360 µg/L	10 µg/L	ne	[298]
Diabético control	TBA	CE-AD	1.0 µg/L	20.1-21.1 µg/L 64.1-71.4 µg/L	0.2 µg/L	11.7-12.2 µg/L 29.4-127.2 µg/L	-	nd	[297]
Diabético control	TRI	HPLC-FLD	0.16 µg/L	0.30-1.1 µg/mg* 0.57-0.84 µg/mg*	0.44 µg/L	0.1-0.3 µg/mg* 2.0-3.8 µg/mg *	0.43 µg/L	ne	[304]
Diabético sano	4MPD	HPLC-FLD	0.46 µg/L	17.0 – 43.2 µg/L 71.2 – 175 µg/L	0.39 µg/L	17.3 – 27.0 µg/L 53.8 – 249 µg/L	0.28 µg/L	13.2 ± 1.6 µg/L 64.6 ± 3.4 µg/L	Este trabajo

\* – normalizado con creatinina; nd – no determinado en este trabajo; ne – no encontrado; AD – detección amperométrica; CE – electroforesis capilar; DAN - 2,3-diaminonapftaleno; DAP - 1,2-diaminopropano; DCDB – 4,5-dicloro,1,2-diaminobenceno; DDB - 2,3-Diamino-2,3-dimetilbutano; DDB2 - 1,2-diamino-4,5-dimetilendioxibenceno; DDP – sulfato de 5,6-diamino-2,4-hidroxipirimidina; DMB - 1,2-diamino-4,5-dimetoxibenceno; SBSE – extracción con barra magnética; TBA – ácido 2-tiobarbiturico; TRI - 6-hidroxi-2,4,5-triaminopirimidina.

**Tabla IV.1.** Algunos ejemplos de procedimientos analíticos propuestos para la determinación de glioxal, metilglioxal ó diacetil en orina.

#### IV.4. 2. Materiales y métodos

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida Agilent serie 1200, equipado con bomba cuaternaria, placa automuestreadora, termostato de columna, detector fluorimétrico; asimismo se utilizó el software Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La columna cromatográfica fue Kinetex C18 (150 x 3 mm, 2.6  $\mu$ m) y precolumna C18, ambos de Phenomenex. Todos los reactivos fueron grado analítico. Se usó agua deionizada (18.2 M $\Omega$  cm, Labconco, USA) y acetonitrilo grado HPLC (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA). Las soluciones estándar conteniendo 1 mg/mL de glioxal (Go, ethanedial, Fluka), metilglioxal (MGo, 2-oxopropanal, Sigma), diacetil (DMGo, butane-2,3-dione, dimethylglyoxal, Fluka) y dietilglioxal (DEGo, hexane-2,3-dione, diethylglyoxal, Sigma) fueron preparados en agua desionizada. También se utilizaron los siguientes reactivos Sigma: 4-metoxi-o-fenilendiamina dihidroclorhídrico (4-metoxi-o-phenylenediamine dihydrochloride, 4MPD, reactivo derivatizante), ácido clorhídrico, ácido acético, fosfato dibásico de potasio, hidróxido de sodio, 2-mercaptoetanol, cloruro de sodio, trietilamina (TEA). La primera orina de la mañana fue proporcionada por voluntarios caracterizados de la siguiente manera: tres adultos sanos, estos mismos adultos después de la ingesta de alcohol la noche anterior, tres miembros del equipo de natación juvenil y tres pacientes diabéticos. Muestras adicionales de individuos saludables fueron usadas para la evaluación de los límites de detección y cuantificación del método.

##### IV.4.2.1. Protocolo del procedimiento analítico desarrollado

Los tres pequeños compuestos dicarbonílicos de interés en este trabajo son químicamente inestables y sin embargo ubicuos, por ello se requiere tener un cuidado especial durante la preparación de los estándares, reactivos y muestras. En particular, todas las soluciones fueron purificadas mediante la derivatización de dicarbonilos potencialmente presentes con 4MPD y con la subsecuente eliminación de sus respectivas quinoxalinas mediante extracción en fase sólida (Supelcoclean LC-18 SPE Tubo de 3 mL, product 57012 SUPELCO). Para la purificación de la 4MPD, un cartucho fue acondicionado con 3 mL de acetonitrilo seguido de 3 mL de acetonitrilo: agua (30:70); dicho cartucho se llevó a sequedad. Después, 1 mL de 4MPD 20 mg/ml en acetonitrilo:agua (30:70) fue pasado a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y 10  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol fueron adicionados a la solución final. Se agregó una alícuota de 4MPD para la purificación de las soluciones de fosfato; la mezcla se dejó toda la noche a 60 °C y luego fue purificada de quinoxalinas pasando la solución por el cartucho SPE; en este caso el cartucho fue acondicionado con 3 mL de acetonitrilo y 3 mL de agua. Las soluciones de trabajo de Go, MGo, DMGo y DEGo (5 mg/L cada uno) fueron preparadas diariamente, usando agua purificada y desionizada del día. Después de su recolección, 1.5 mL de la muestra de orina fueron adicionados en un tubo eppendorff, transportados al laboratorio protegiéndolos de la luz y almacenados a - 20

°C por un periodo de tiempo no mayor de un mes antes del análisis. Para el análisis, se tomó una alícuota de orina o de la solución de calibración de los estándares (200 µL fueron mezclados con 20 µL de estándar interno (5 µg/mL DEGo), se le agregaron 200 µL de acetonitrilo; la muestra fue congelada a -20 °C por 30 min y centrifugada (10 000 g, 5 min). Para la reacción de derivatización, se mezclaron 150 µL de sobrenadante con 240 µL de agua, 60 µL de tampón de fosfatos (500 mM, pH 7.4), se mezclaron en vortex, y se les añadieron 10 µL de 4MPD purificado (20 mg/mL). La mezcla se incubó a 40 °C durante 4 h. Finalmente, la muestra fue acidificada con 10 µL de HCl 3M, diluida con 200 µL de acetonitrilo, saturada con cloruro de sodio, llevada al vortex y centrifugada (10 000 g, 5 min); se tomaron 75 µL de la fase orgánica, misma que se mezcló con 150 µL de las fases móviles A y C (1:1) conteniendo 5% de 2-mercaptoetanol. El volumen de inyección en el sistema HPLC-FLD fue de 20 µL. La separación de las quinoxalinas respectivas para Go, MGo, DMGo y DEGo fue llevada a cabo usando tres fases móviles: (A – agua; B – acetonitrilo; C - 0.8% ácido acético, 0.6% trietilamina, pH 4.3) y con el siguiente gradiente de elución: 0 - 1 min 70% A, 20% B, 10% C; 1 - 6 min 50% A, 40% B, 10% C; 6 – 8 min 20% A, 70% B, 10% C; 8 - 10 min 10% A, 80% B, 10% C; 10 – 10.2 min 70%A, 20%B, 10%C; 10.2 – 12 min 70%A, 20%B, 10%C, con una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Para la detección fluorimétrica, las longitudes de onda de excitación y emisión se fijaron a 344 nm y 420 nm, respectivamente. La calibración se llevó a cabo usando una serie de soluciones estándar que contenían Go, MGo, DMGo a 0; 25; 50; 75; 100; 150; 200 µg/L cada uno, y con 500 µg/L de EI; sin embargo es importante recalcar que se observó respuesta lineal al menos hasta 1000 µg/L sin necesidad de cambiar la atenuación del detector de fluorescencia. Para la evaluación de recuperación, se agregaron 3 µL y 6 µL de la mezcla de estándares (5 µg/ml de cada analito) a las muestras de orina, obteniendo 75 y 150 µg/l de cada compuesto agregado, en las orinas.

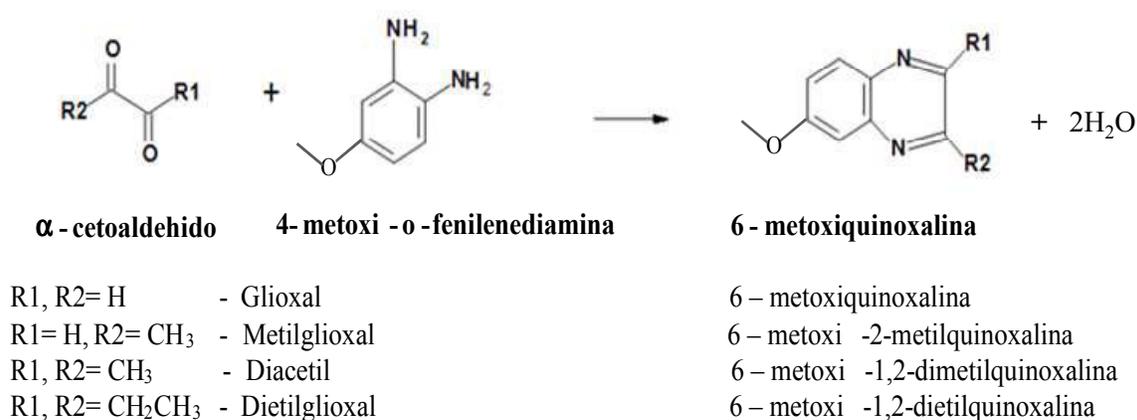
#### **IV.4.2.2. Análisis estadístico**

Los resultados presentados son la media obtenida para tres replicas independientes, tanto los cálculos de las desviaciones estándar como los trazos de las gráficas fueron obtenidos usando Microsoft Excel 2007. Los datos fueron evaluados para obtener la significancia estadística mediante la prueba t no pareada, incluida en Microsoft Excel 2007, estableciendo el valor  $p < 0.05$ .

#### **IV.4.3. Resultados y discusión**

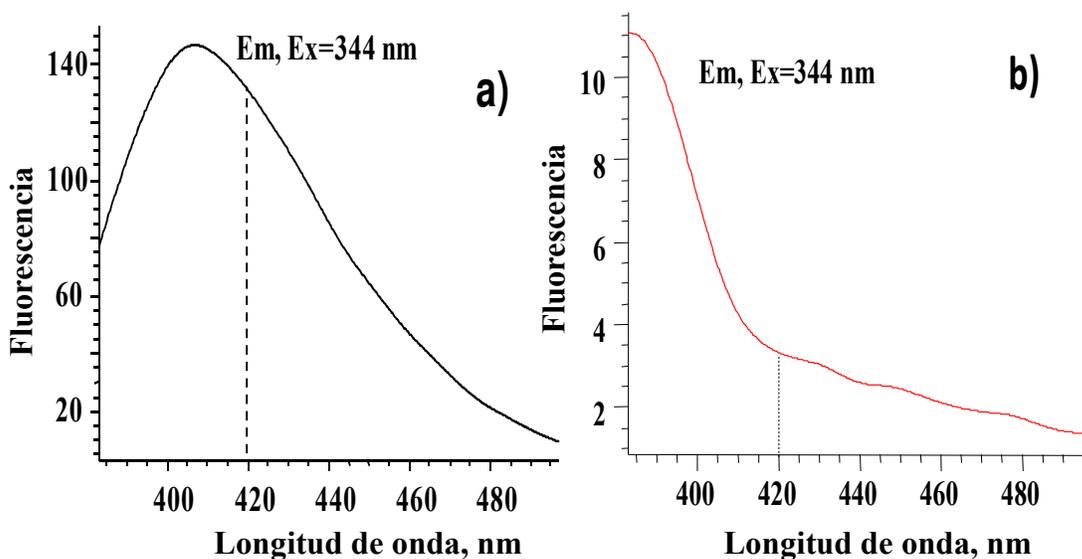
Las principales dificultades en el análisis de glioxal, metilglioxal y dimetilglioxal en matrices clínicas, abarcan desde sus bajas concentraciones, alta reactividad, posible polimerización o formación de aductos con los componentes de la mezcla, generación de novo durante el manejo de la muestra y también el riesgo de contaminación de la muestra, los reactivos, agua e incluso aire[242, 300, 308]. A este respecto, el pretratamiento de la muestra, la derivatización, el control de contaminación y la protección contra la oxidación se vuelven las partes más críticas de

cualquier procedimiento analítico que se pudiera proponer/emplear. En particular, las condiciones utilizadas en las etapas del procedimiento previas a, y durante la derivatización, deben ser tan suaves como sea posible, evitando cambios drásticos de las condiciones químicas y calentamientos prolongados. En este trabajo, todas las soluciones fueron purificadas antes de usarse, tal como se describe en materiales y métodos, las muestras de orina fueron almacenadas en tubos de plástico nuevos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , protegiéndolas de la luz. El estándar interno fue agregado directamente a la muestra; para tal propósito utilizamos DEGo, debido a su similitud estructural con los tres  $\alpha$ -cetoaldehidos y debido a su ausencia en matrices biológicas.



**Figura IV.1.** Esquema de la reacción de derivatización.

Tal como se describe en la introducción a este capítulo, muchos derivados del 1,2-diaminobenceno han sido usados con antelación para obtener quinoxalinas fluorescentes; sin embargo, dependiendo de la estructura química y de la muestra biológica, se han reportado muy diferentes condiciones de reacción [286, 293, 300, 305, 306, 309, 310]. Específicamente en el análisis de orina, el rango de pH aplicado durante la derivatización varía desde pH 2 hasta pH 10, el tiempo de la reacción varía entre 10 minutos y 15 horas y la temperatura va desde temperatura ambiente hasta  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  [293, 297-304] (Tabla IV.1). Teniendo como objetivo obtener un alto rendimiento en la formación del fluoróforo a un pH neutro, examinamos la 4MPD como agente derivatizante (el esquema de la reacción y el espectro de fluorescencia de las quinoxalinas respectivas se presentan en las Figuras IV.1 y IV.2).



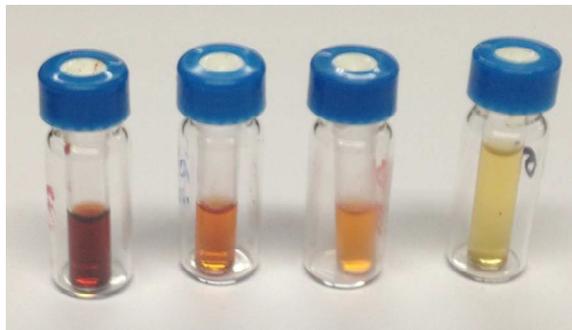
**Figura IV.2.** (a) Espectro de fluorescencia obtenido para la quinoxalina correspondiente a glioxal adquirido en el máximo de su pico cromatográfico y registrado con referencia automática. (b) Espectro de fluorescencia adquirido antes de la elución del pico (fase móvil), sin referencia. Las longitudes de onda de excitación y de detección se establecieron bajo el criterio del mayor valor posible de la relación señal/ruido; en concreto para 344 nm y 420 nm, respectivamente, el más alto valor de S/R comparado con el valor obtenido en el máximo del espectro (407 nm).

Para evitar las modificaciones oxidativas de este reactivo, a la mezcla de reacción siempre se agregó 2-mercaptoetanol. La figura IV.3a muestra fotografías de las diferentes muestras de orina después de la adición de 4MPD sin la protección antioxidante, mientras que en presencia de 2-mercaptoetanol las soluciones son transparentes y no presentan color alguno. Es necesario mencionar que también se probaron como antioxidantes bisulfito e hidrosulfito de sodio, pero se observó que su presencia impide la reacción de derivatización (los cromatogramas obtenidos para la mezcla de estándares de Go y MGo después de la adición de 2-mercaptoetanol, bisulfito de sodio e hidrosulfito de sodio se presentan en la Figura IV. 3(b)).

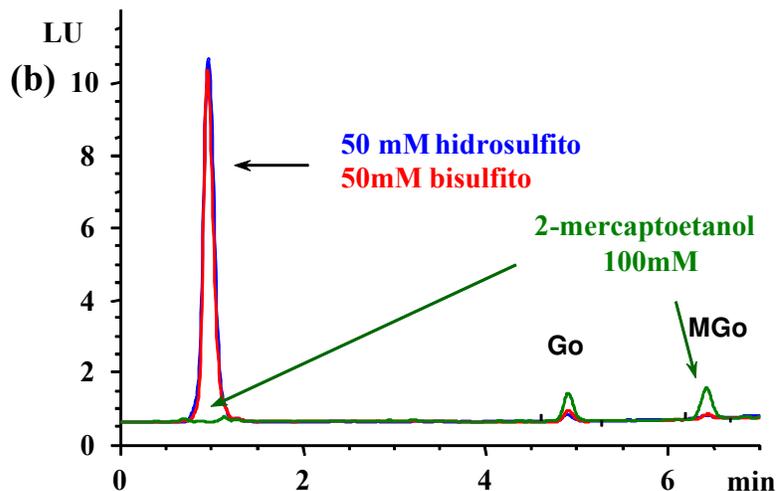
Una vez establecidas las condiciones de detección, se examinaron individualmente los efectos de la temperatura, el tiempo y el pH empleado durante la derivatización para cada uno de los compuestos, usando un exceso molar del 4MPD respecto a los solutos de 20:1 aproximadamente. Sin ajustar el pH, por periodos de tiempo relativamente cortos (menos de 1 hora) y con un rango de temperatura de 25 °C – 80 °C, las señales fluorescentes de los cuatro compuestos se fueron incrementando gradualmente; sin embargo, se observó una baja repetibilidad de las señales analíticas a partir de temperatura 60°C y las señales tendían a decrecer, especialmente en presencia de la matriz de orina. Posteriormente, examinamos periodos de incubación más largos, ajustando la temperatura a 40 °C y los resultados obtenidos se presentan en la Figura IV.4. Como puede observarse, la repetibilidad de la señal para los 4 compuestos después de 4 horas de incubación fue totalmente aceptable (RSD < 1.5% para 10 réplicas independientes). De acuerdo a

Akira et al. [300], tiempos de reacción prolongados en orina diluida favorecen la liberación de  $\alpha$ -cetoaldehidos de sus posibles aductos y la formación de derivados de 1,2-diaminobenceno, así que, para este trabajo se usaron 4 horas de incubación a 40 °C.

(a)

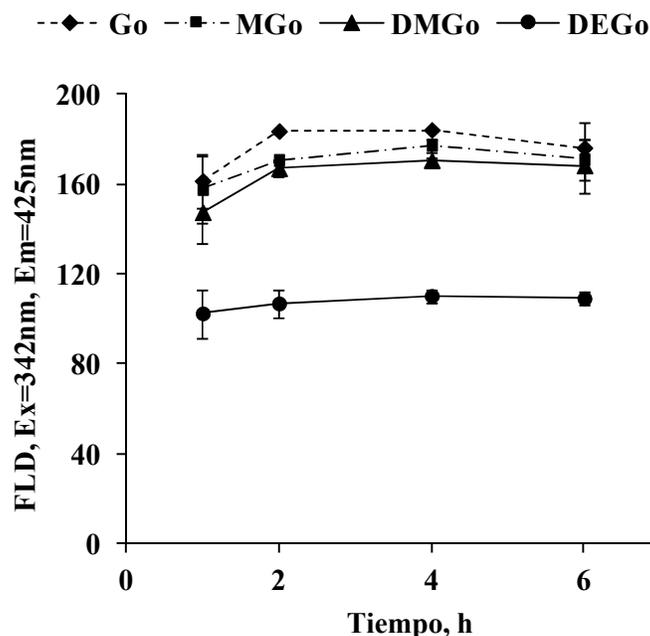


(a) Con protección antioxidante la solución final es transparente.



(b) En presencia de 2-mercaptoetanol se observa la eliminación eficiente del pico mayor que eluye primero. Los aniones bisulfito e hidrosulfito pueden causar sulfonación de la 4MPD, impidiéndole así reaccionar con los  $\alpha$ -cetoaldehidos.

**Figura IV. 3.** (a) Muestras de orina después de la reacción de derivatización con 4MPD sin protección antioxidante. (b) Cromatogramas obtenidos para los estándares de Go y MGo (50 $\mu$ g/L cada uno), usando diferentes agentes antioxidantes. (Condiciones de detección  $\lambda_{ex} = 344$  nm,  $\lambda_{em} = 420$  nm, columna Hypersil C18 150x3 mm, 3 $\mu$ m).

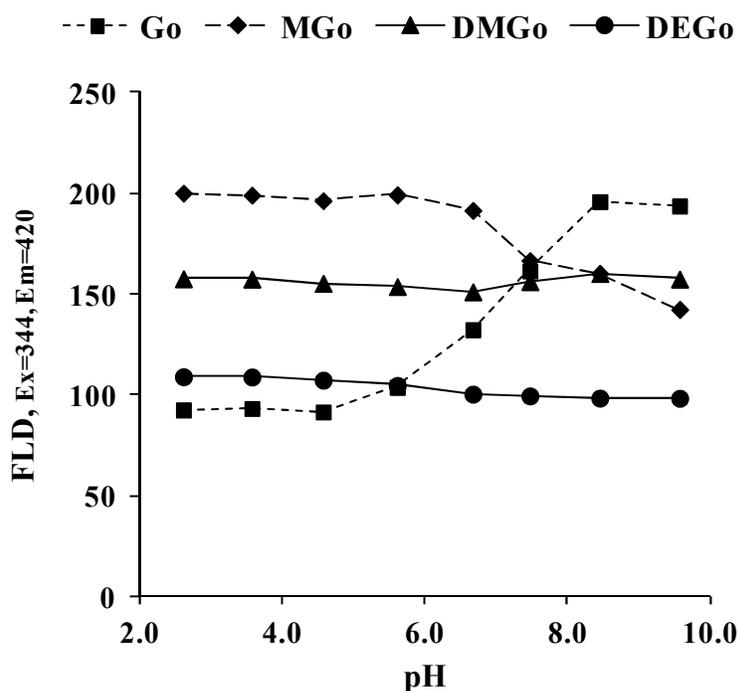


**Figura IV.4.** Señales de fluorescencia para glicoxal, metilglicoxal, diacetil (500  $\mu\text{g/L}$ , cada uno) y dietilglicoxal (1000  $\mu\text{g/L}$ ) después de su derivatización con 4MPD, obtenidas para diferentes tiempos de reacción a 40 °C. (Para mayor claridad en la presentación, se usaron las condiciones finales de reacción mientras se variaba el tiempo de incubación, ver Materiales y métodos).

La Figura IV.5 muestra el efecto del pH (en el intervalo 2 a 10 ajustado con tampón Britton-Robinson 0.1M). Como se puede observar en esta figura, entre las señales individuales de los 4 derivados de los  $\alpha$ -cetoaldehidos; este parámetro fue esencial para Go y MGo y los cambios observados pueden asociarse con procesos de polimerización que hacen que ambos compuestos sean menos reactivos en la derivatización, precisamente dependiendo del pH[313, 314]. A este respecto, nuestros resultados son consistentes con estudios computacionales que reportan diferentes vías de polimerización para MGo y Go[313]. En el citado trabajo se encontró que la estructura hidratada era inestable para MGo, por lo que la dimerización vía condensación de aldoles era favorecida termodinámicamente y este efecto podría explicar la disminución de la señal del fluoróforo de MGo en condiciones alcalinas (Fig. IV.5). Por el contrario, para Go, las estructuras completamente hidratadas son favorecidas termodinámicamente y la vía de polimerización propuesta fue por la dimerización de acetales[313], lo cual concuerda con el menor rendimiento de derivatización observado en medio ácido(Fig. IV.5). Las señales analíticas de DMGo y DEGo no fueron afectadas por los cambios de pH (Fig. IV.5), debido a que ambas moléculas tienen dos grupos alquilo en sus estructuras (es decir, son dicetonas) que obstruyen su

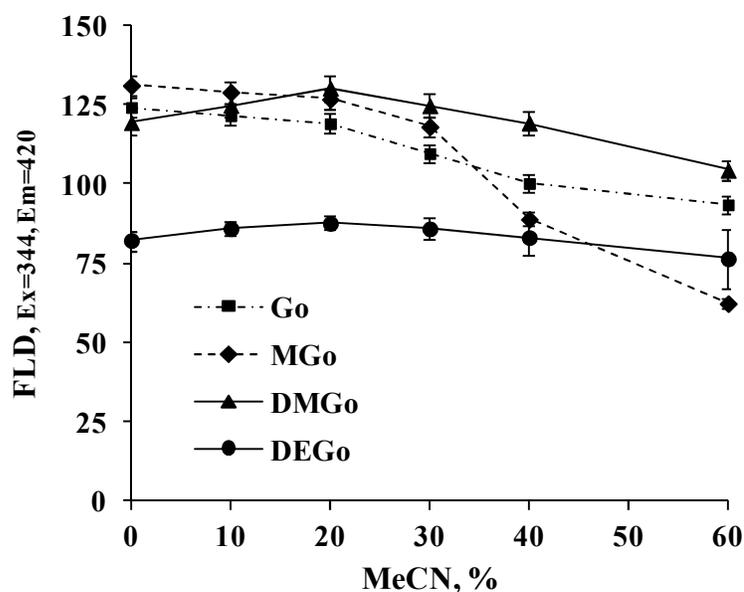
polimerización. Debe notarse que incubaciones en pH neutro, a 4° C durante 24 horas, han sido reportadas previamente para la derivatización de MGo y Go con 2,3-diaminonaftaleno en plasma sanguíneo[244, 315]; las condiciones de pH seleccionadas en este trabajo son muy similares, pero la reacción con 4MPD no puede completarse en un tiempo razonable a temperaturas menores de 40 °C. Estas condiciones de reacción relativamente suaves (pH 7.4, 40 °C, 4 horas, en la oscuridad) parecen ser muy adecuados para orina, dado que se evitan posibles transformaciones y formaciones *de novo* de los analitos [305, 316].

En cuanto a la etapa de pretratamiento de muestra, en el análisis de materiales clínicos más complejos tales como suero sanguíneo, plasma, hígado u otros tejidos, se han recomendado tratamientos ácidos, previos a la derivatización, con el fin de liberar  $\alpha$ -cetoaldehidos unidos reversiblemente, para inactivar la actividad enzimática y para la precipitación de matriz[305, 310, 316]. En el caso de orina, la muestra químicamente menos compleja, también se han reportado otros pretratamientos, como dilución simple[300, 301, 305] extracción en fase sólida [297, 304] o la adición de solvente orgánico[298, 302]. La idea original de este trabajo fue emplear acetonitrilo para precipitación de matriz y, después, para la recuperación de los analitos derivatizados, de la mezcla acidificada, mediante la separación de fases inducida por sal.



**Figura IV.5.** Efecto del pH durante la reacción de derivatización sobre las señales de las quinoxalinas de glioxal, metilglioxal, diacetil (500  $\mu\text{g/L}$ , cada uno) y dietilglioxal (1000  $\mu\text{g/L}$ ). (Para mayor claridad en la presentación, se usaron las condiciones finales de reacción mientras se variaba el pH, ver Materiales y métodos).

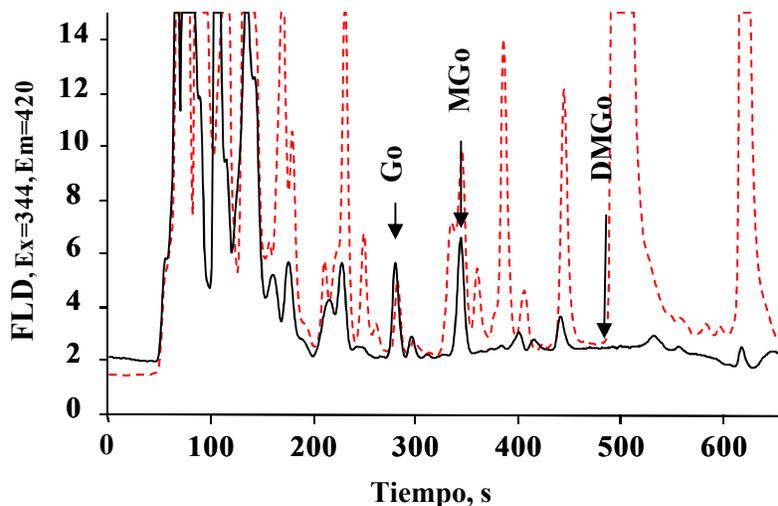
Como se presenta en la figura IV.6, para los 4 compuestos considerados en este trabajo, el acetonitrilo presente durante la reacción de derivatización tuvo un efecto insignificante sobre las señales de fluorescencia hasta una concentración del 20% (v/v). Basándonos en las consideraciones y experimentos anteriores, el protocolo final propuesto para el procesamiento de la muestra previo a su análisis cromatográfico, fue simple, no riguroso y no requiere condiciones químicas drásticas. Aunado a la detallada descripción dada en materiales y métodos, se debe subrayar que las soluciones de calibración y las muestras de orina fueron procesadas de manera idéntica, siempre en presencia del estándar interno. Después de su precipitación con acetonitrilo, la orina se diluyó 1:3 para promover la reacción de derivatización[300] y para disminuir la concentración de acetonitrilo (Fig IV.6).



**Figura IV.6.** Efecto de la concentración de acetonitrilo en la mezcla de reacción sobre las señales fluorescentes obtenidas para las quinoxalinas de glioxal, metilglioxal, diacetil (500  $\mu\text{g/L}$ , cada uno) y dietilglioxal (1000  $\mu\text{g/L}$ ). (Para mayor claridad en la presentación, se usaron las condiciones finales de reacción mientras se variaba la concentración de acetonitrilo, ver Materiales y métodos).

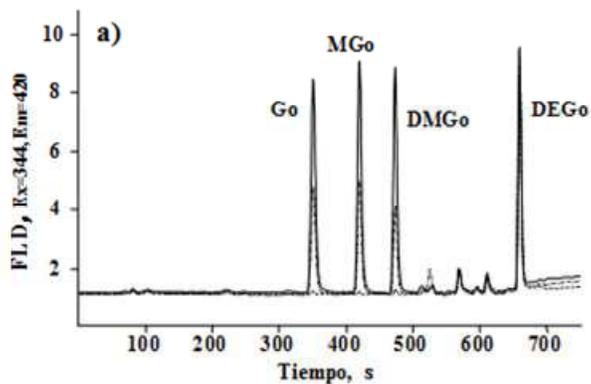
Una vez que terminó la reacción, la muestra fue acidificada con 10  $\mu\text{L}$  de HCl 3M, se agregó otra porción de acetonitrilo, la mezcla se saturó con cloruro de sodio y, después de llevarla al vortex y a centrifugar, las quinoxalinas se recuperaron en la fase orgánica (capa superior - acetonitrilo), mientras que los componentes polares de la muestra se quedan en la capa acuosa inferior (La fig. IV.7 muestra los cromatogramas obtenidos para orina con y sin pretratamiento). Obviamente, el procedimiento propuesto basado en la extracción y separación de fases mediante el efecto de sal, no puede ser controlado con precisión, los posibles errores aleatorios en este procedimiento no-riguroso fueron compensados por el uso del método del estándar interno.

La separación de quinoxalinas mediante cromatografía líquida de fase inversa ha sido reportada usando gradientes de elución con fases móviles conteniendo ácido trifluoroacético diluido o tampones ligeramente ácidos (fosfatos, formiatos, acetatos; pH < 3.5) y metanol o acetonitrilo como modificador orgánico [242, 300, 305, 306, 310, 311, 317, 318].

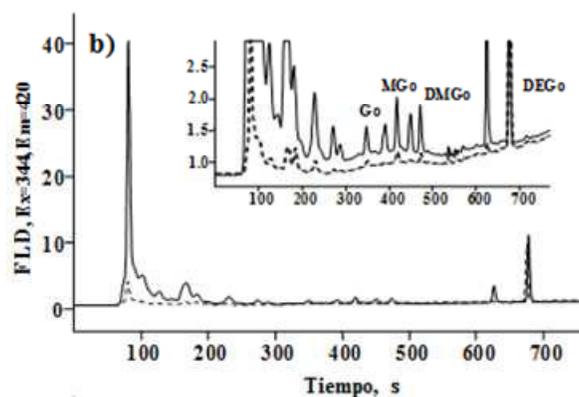


**Figura IV.7.** Cromatogramas de HPLC-FLD para muestras de orina sin pretratamiento (—) y después del pretratamiento propuesto en este trabajo (---). (Columna Hypersil C18, 150 x 3 mm, 3  $\mu$ m)

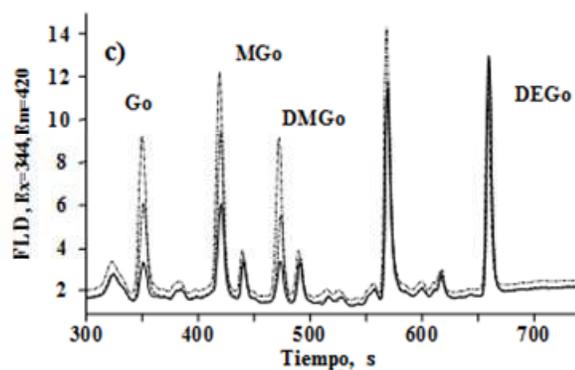
En este trabajo se usó una columna de núcleo sólido (Kinetex C18; 150 x 3 mm, 2.6  $\mu$ m) teniendo como objetivo mejorar la eficacia de separación y minimizar la anchura de pico con respecto al desempeño obtenido típicamente con las columnas analíticas clásicas. Las fases móviles acuosas anteriormente propuestas fueron probadas en combinación con acetonitrilo y variando el pH en el rango de 2.0 - 7.5. Con el fin de mejorar la forma del pico (la menor anchura posible, buena simetría), la fase móvil contenía trietilamina. Las condiciones seleccionadas finalmente se enumeran en materiales y métodos; se obtuvo resolución a línea base de los cuatro solutos con tiempos de retención  $5.833 \pm 0.003$  min para Go,  $6.987 \pm 0.004$  min para MGo,  $7.880 \pm 0.003$  min para DMGo, y  $11.120 \pm 0.004$  min para DEGo y la corrida cromatográfica se completó en 12 minutos. Vale la pena resaltar que la separación de los compuestos considerados en este trabajo no ha sido llevada a cabo antes; sin embargo, han sido reportadas corridas cromatográficas de 10 minutos para una quinoxalina (MGo) [310] hasta 45 minutos para tres quinoxalinas (Go, MGo y DMGo como EI) [300]. Los cromatogramas típicos obtenidos para las soluciones de calibración se presentan en la Figura IV. 8(a) y los parámetros analíticos evaluados con base en el proceso de calibración son resumidos en la Tabla IV.2. Estos parámetros fueron evaluados siguiendo los procedimientos de la conferencia internacional para la armonización de requerimientos técnicos para el registro de fármacos para uso humano (ICH) [319].



(a) Las soluciones de calibración para Go, MGo y DMGo a tres niveles de concentración: (---) blanco; (···) 75 µg/L; (—) 150 µg/L. (DEGo 500 µg/L como estándar interno EI).



(b) (----) Orina de un adulto saludable diluida cinco veces (blanco); (—) La orina de este mismo sujeto sin dilución alguna:  $14.3 \pm 0.9$  µg/L Go,  $11.0 \pm 0.7$  µg/L MGo,  $16.1 \pm 0.9$  µg/L DMGo. (DEGo 500 µg/L como estándar interno EI).



(c) (—) Orina de nadador ( $69.2 \pm 2.1$  µg/L Go,  $56.1 \pm 1.8$  µg/L MGo,  $42.7 \pm 1.1$  µg/L DMGo); y esta misma orina después de la adición de dos puntos de adición de estándar: (---) 75 µg/L y (···) 150 µg/L de Go, MGo, DMGo agregados. Estándar interno (500 µg/L DEGo).

**Figura IV.8.** Cromatogramas típicos obtenidos mediante el procedimiento HPLC-FLD propuesto.

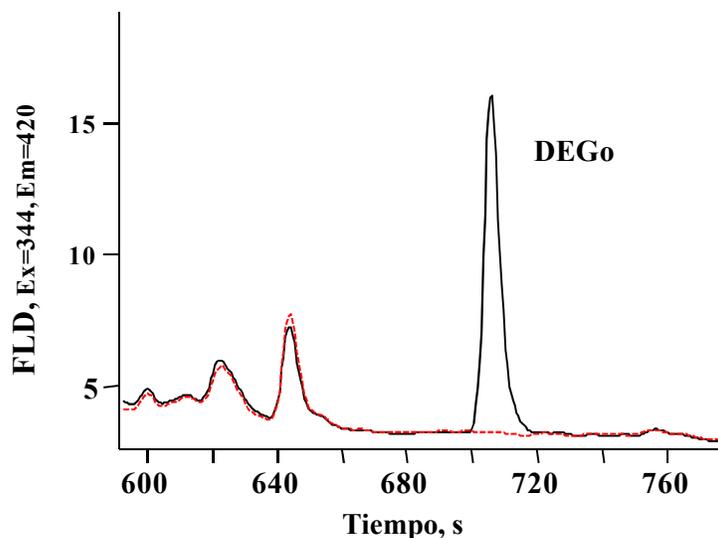
**Tabla IV.2.** Parámetros analíticos evaluados para el procedimiento propuesto.

Parámetros	Glioxal	Metilglioxal	Diacetil
$T_{ret} \pm DE$ , min	5.833 $\pm$ 0.003	6.987 $\pm$ 0.004	7.880 $\pm$ 0.003
Calibración <sup>(1)</sup>	$y = 4.009c + 0.002$	$y = 3.570c + 0.001$	$y = 3.397c + 0.002$
Error estd para la pendiente, %	3.6	3.2	2.9
Error estd para el intercepto, %	12.5	10.7	10.1
$R^2$	0.9999	0.9999	0.9997
Límite de calibración instrumental LD, $\mu\text{g/L}$	0.46	0.39	0.28
Límite de calibración instrumental LC, $\mu\text{g/L}$	0.77	0.65	0.47
LD del método, $\mu\text{g/L}$	2.31	2.01	1.82
LC del método, $\mu\text{g/L}$	3.88	3.35	3.06
$CV^{(2)}$ , %	1.1	0.5	0.6
$CV^{(3)}$ , %	2.7	1.8	1.6

<sup>(1)</sup> – ecuación de regresión lineal,  $y$  – cociente de área de pico (analito/EI),  $c$  – concentración del analito  $\mu\text{g/L}$ , <sup>(2)</sup> – el coeficiente de variación representa la repetibilidad, evaluada basándonos en 6 réplicas de la concentración del analito 500  $\mu\text{g/L}$ ; <sup>(3)</sup> – el coeficiente de variación representa la precisión intermedia, evaluada basándonos en 6 réplicas de la concentración del analito 500  $\mu\text{g/L}$  [319].

Específicamente, los límites de detección y cuantificación (LD, LC) fueron evaluados tomando en cuenta la relación señal/ruido, se adoptaron como criterios 6 y 10 desviaciones estándar para LD y LC, respectivamente, y se usó la señal obtenida para el estándar de calibración más bajo. Para evaluar LD y LC instrumentales, la línea base fue adquirida del cromatograma del blanco de calibración (Figura IV.8(a)), mientras que para el LD y LC del método, se usó como blanco, la orina de un voluntario saludable diluida cinco veces (Figura IV.8(b)). Como puede observarse, los límites de detección instrumentales son comparables a los reportados en otros estudios recientes enfocados en análisis de orina (Tabla IV.1) [297, 304].

En la aplicación del procedimiento, se analizaron muestras de orina de varios voluntarios y, en la figura IV.8(c) se presentan los cromatogramas típicos obtenidos después de la adición de dos concentraciones de adición de estándar para la orina de un nadador joven (La Figura IV.9 muestra los cromatogramas para orina con y sin EI, demostrando que DEGo no está presente en la muestra, así que se puede usar de forma segura como estándar interno).



**Figura IV.9.** Cromatograma de HPLC-FLD para una muestra de orina, se muestra la región de elución del DEGo: (---) orina sin EI; (—) orina con EI (DEGo 500 µg/L)

**Tabla IV.3.** Resultados de los experimentos de recuperación, la media se obtuvo analizando tres réplicas independientes con sus respectivos valores de desviación estándar.

Analito añadido µg/L	Gloioxal		Metilgloioxal		Diacetil	
	Media ± DE µg/L	Recuperación %	Media ± DE µg/L	Recuperación %	Media ± DE µg/L	Recuperación %
<b>Orina 1 (adulto saludable)</b>						
0	31.4 ± 2.1	-	17.3 ± 1.6	-	Nd	-
75	103 ± 6	95.5	86.2 ± 2.1	91.9	70.8 ± 2.3	94.4
150	179 ± 4	98.4	164 ± 7	97.8	145 ± 6	96.7
<b>Orina 7 (nadador joven)</b>						
0	69.2 ± 2.1	-	56.1 ± 1.8	-	42.7 ± 1.1	-
75	146 ± 4	102	126 ± 3	93.2	114 ± 4	95.1
150	224 ± 6	103	198 ± 6	94.6	192 ± 5	99.5

Los resultados de la recuperación obtenida para esta y para otra orina (adulto sano) se muestran en la tabla IV.3; como puede observarse, los porcentajes de recuperación se encuentran en el

rango de 95.5 – 103% para Go, 91.9 – 97.8% para MGo y 94.4 – 99.5% para DMGo, lo que nos indica una exactitud aceptable.

**Tabla IV.4.** Concentraciones encontradas de Go, MGo y DMGo en el análisis de soluciones estándar de glucosa (1-100 mM) analizadas directamente y después del pretratamiento SPE.

Glucosa, mM	Gloxal, µg/L		Metilgloxal, µg/L		Diacetil, µg/L	
	directo	SPE	directo	SPE	Directo	SPE
1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
50	6.4 ± 0.6	0.6 ± 0.2	3.1 ± 0.4	nd	nd	nd
100	13.4 ± 1.5	1.4 ± 0.3	7.3 ± 0.4	0.6 ± 0.2	nd	nd

nd: no detectado.

Dado que la glucosa está presente en la orina, fue necesario examinar su posible degradación oxidativa a Go, MGo y DMGo durante el pretratamiento de muestra. Para este fin, el procedimiento propuesto se llevó a cabo usando soluciones acuosas de glucosa en niveles de concentración de 1, 50 y 100 mM (niveles normales de glucosa en orina llegan hasta 0.8 mM)[320]. Las soluciones fueron purificadas con cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) previo a su análisis tal como se describe en la parte experimental de este capítulo. Al analizar la solución 1 mM de glucosa, no se detectó ninguno de los 3 analitos, y sólo se encontró Go al analizar la solución 50mM de glucosa (por debajo del límite de cuantificación). Es necesario mencionar que la glucosa como reactivo, contiene trazas de Go y MGo (comparar los resultados cuantitativos obtenidos para Go, MGo y DMGo en las soluciones de glucosa con y sin tratamiento con cartucho SPE se presentan en la tabla IV.4).

Otro aspecto importante para examinar fue la estabilidad de los  $\alpha$ - cetoaldehidos en orina. Para ello se tomó una alícuota de orina fresca y se dividió en cinco porciones, una de ellas se analizó inmediatamente y las otras cuatro se mantuvieron en tubos eppendorf a – 20 °C protegidas de la luz. Se llevó a cabo el análisis por triplicado de cada porción; la primera porción al día siguiente, la segunda después de una semana, la tercera después de un mes y la quinta después de tres meses respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos durante el primer mes; mientras que después de tres meses, las

concentraciones de los tres compuestos disminuyeron notablemente (los resultados obtenidos en estos experimentos se presentan en la tabla IV.5).

**Tabla IV.5.** Resultados obtenidos en la determinación de Go, MGo y DMGo en orina después de diferentes tiempos de almacenamiento de muestra (- 20 ° C protegidas de la luz, n=3)

Analito	Concentración $\pm$ DE, $\mu\text{g/L}$ encontradas después de diferentes periodos de tiempo.				
	2 h	24 h	7 días	1 mes	3 meses
Glioxal	43.0 $\pm$ 2.0	43.2 $\pm$ 2.1	42.5 $\pm$ 2.0	42.7 $\pm$ 2.3	37.4 $\pm$ 2.4
Metilglioxal	27.3 $\pm$ 1.8	27.0 $\pm$ 1.2	27.3 $\pm$ 1.9	27.8 $\pm$ 1.5	24.1 $\pm$ 1.8
Diacetil	13.4 $\pm$ 1.8	13.2 $\pm$ 1.6	12.9 $\pm$ 2.1	12.8 $\pm$ 1.9	6.1 $\pm$ 2.2

Los resultados después de 3 meses fueron estadísticamente más bajos comparándolos con los obtenidos después de 2 horas, (prueba t,  $p < 0.05$ ).

Finalmente, se examinó en un enfoque similar la estabilidad de los derivados de la quinoxalina, pero comparando las señales analíticas obtenidas inmediatamente después de la preparación de la muestra con las señales obtenidas cuando el extracto de acetonitrilo se dejó por 6, 12 y 24 horas a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos indican que las muestras de orina procesadas deben inyectarse al sistema HPLC-FLD a más tardar 12 horas después de completar su preparación.

Una vez caracterizado el procedimiento, se procedió con el análisis de muestras provenientes de personas con diferente grado de exposición y/o que se encontraban en diferentes condiciones clínicas; esto con el fin de examinar si el procedimiento permite detectar diferencias entre niveles de los tres analitos entre estos grupos de individuos. En la tabla IV.6, se presentan los resultados cuantitativos para tres voluntarios sanos, tres pacientes diabéticos y tres nadadores jóvenes; vale la pena señalar que para los adultos saludables y los pacientes diabéticos, los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran en los rangos reportados recientemente (Tabla IV.1). No hay datos disponibles sobre  $\alpha$ -cetoaldehidos en orina de deportistas de alto rendimiento; sin embargo, el incremento de biomarcadores de estrés oxidativo ha sido reportado recientemente en nadadores juveniles[321]. Es también conocido que las especies dicarbonílicas se generan en el agua de las albercas como productos de las reacciones derivadas de la desinfección[303, 322], así que las concentraciones relativamente altas de Go, MGo y DMGo en jóvenes atletas parecen confirmar su exposición a estos compuestos por vía respiratoria y cutánea y los resultados obtenidos en este

estudio, alertan sobre una posible problemática e indican la necesidad de un estudio más profundo. Se debe recalcar que la prueba estadística, prueba t ( $p < 0.05$ ) reveló concentraciones significativamente más altas de glioxal en pacientes diabéticos y en jóvenes nadadores comparados con el control, adultos saludables.

**Tabla IV. 6.** Resultados obtenidos para glioxal, metilglioxal y diacetil en diferentes muestras de orina obtenidos en análisis por triplicado. (Para cada par de grupos, los valores de la media fueron comparados estadísticamente y estas mismas letras indican diferencias encontradas para  $p < 0.05$ ).

Muestra de orina	Glioxal, $\mu\text{g/L}$		Metilglioxal, $\mu\text{g/L}$		Diacetil, $\mu\text{g/L}$	
	Individual	Media	Individual	Media	Individual	Media
<b>Adultos saludables</b>						
1	31.4 $\pm$ 2.1		17.3 $\pm$ 1.5		nd	
2	17.0 $\pm$ 0.8	30.5 $\pm$ 13	21.2 $\pm$ 1.1	21.8 $\pm$ 5	nd	-
3	43.2 $\pm$ 2.1	(a,b)	27.0 $\pm$ 1.2	(c,d,e)	13.2 $\pm$ 1.6	
<b>Adultos después de la ingesta de alcohol</b>						
1a	44.8 $\pm$ 2.2		51.1 $\pm$ 1.9		37.3 $\pm$ 0.8	
2a	29.2 $\pm$ 1.8	60.0 $\pm$ 40	32.7 $\pm$ 2.1	45.3 $\pm$ 11	nd	-
3a	106 $\pm$ 7		52.1 $\pm$ 0.9	(c, f)	42.9 $\pm$ 1.2	
<b>Pacientes Diabéticos</b>						
4	71.2 $\pm$ 1.8		53.8 $\pm$ 1.1		nd	
5	87.2 $\pm$ 2.3	111 $\pm$ 56	241 $\pm$ 12	181 $\pm$ 111	nd	-
6	175 $\pm$ 12	(a)	249 $\pm$ 14	(d, f)	64.6 $\pm$ 3.4	
<b>Nadadores jóvenes</b>						
7	69.2 $\pm$ 2.1		56.1 $\pm$ 1.8		42.7 $\pm$ 1.1	
8	91.3 $\pm$ 2.7	81.7 $\pm$ 11	68.3 $\pm$ 1.6	58.1 $\pm$ 9.4	37.1 $\pm$ 0.9	38.0 $\pm$ 4.3
9	84.6 $\pm$ 2.5	(b)	49.9 $\pm$ 1.5	(e)	34.2 $\pm$ 0.9	

Para metilglioxal, las concentraciones encontradas en pacientes diabéticos, atletas y adultos después de la ingesta de alcohol, fueron elevadas con respecto a los adultos control (pacientes sanos); los pacientes diabéticos tenían también concentraciones significativamente más altas de MGo en orina comparados con adultos después de la ingesta de alcohol; como ya se mencionó en la introducción, el diacetil es generado durante la metabolización del etanol, y este compuesto se

considera un metabolito clave involucrado en la toxicidad y los mecanismos de adicción del etanol[290]. En este trabajo, el diacetil se encontró en la orina analizada de un voluntario sano (muestra 3), pero después de la ingesta de alcohol, este compuesto estaba presente en dos muestras (muestras 1a y 3a, Tabla IV.6). Por otro lado, el diacetil está clasificado como un precursor de AGEs [290] y curiosamente se encontró en una orina de paciente diabético a una concentración relativamente alta, si se le compara con otras muestras. Las tres muestras de orina de nadadores contenían concentraciones de DMGo similares a los de los adultos después de la ingesta de alcohol, pero más bajos que en pacientes diabéticos.

Está claro que los resultados experimentales obtenidos en este trabajo no nos permiten ninguna interpretación biomédica concluyente; sin embargo, los resultados presentados en la Tabla IV.6 demuestran que el procedimiento aquí propuesto puede recomendarse como una herramienta analítica para tales estudios. Específicamente, el procedimiento permite determinar los 3  $\alpha$ -cetoaldehidos, a niveles fisiológicos en orina y además presenta sensibilidad suficiente para detectar diferencias entre sujetos que presentan diversas condiciones clínicas o de exposición.

#### **IV.4.4. Conclusiones**

En este trabajo, se utilizó la cromatografía de líquidos en fase inversa con detección fluorimétrica para la determinación de glioxal, metilglioxal y diacetil en orina, usando dietilglioxal como estándar interno. Se demostró que la derivatización con 4-metoxi-o-fenilendiamina se puede llevar a cabo de manera eficiente a pH neutro y empleando 4 horas de incubación a 40°C, minimizando así los riesgos de cambio en la concentración de los analitos antes y durante el curso de la reacción, respecto a otros procedimientos descritos en la bibliografía. En cuanto al tratamiento de muestra, para evitar la adición directa de ácidos fuertes a la orina, usamos acetonitrilo para lograr la precipitación de la matriz. La concentración de este solvente durante la reacción de derivatización tuvo que mantenerse en 20% v/v. Después de la etapa crítica que es la derivatización, la inestabilidad de los analitos ya no era un problema, por lo que se pudo acidificar la muestra, lo que nos permitió la recuperación de los analitos en forma de sus quinoxalinas respectivas en este mismo solvente (acetonitrilo), obteniendo la separación de fases inducida por sal. La resolución cromatográfica de las cuatro quinoxalinas se obtuvo en 12 minutos, lo cual junto con el protocolo de tratamiento de muestra, hace que todo el procedimiento sea relativamente rápido y simple. Cabe destacar, sin embargo que es necesario tener especial cuidado para evitar la contaminación y la degradación oxidativa de las muestras. Los límites de cuantificación evaluados para los 3  $\alpha$ -cetoaldehidos, nos permiten su determinación a niveles fisiológicos; el procedimiento es adecuado para la detección de diferencias de concentración entre muestras/individuos en diferentes estudios clínicos o de exposición.

## Capítulo IV.5

### IV.5. Avances en el desarrollo de los procedimientos analíticos para la determinación de los AGEs y sus precursores

#### IV.5. Jarabes de agave de alta fructuosa y sus altas concentraciones de metilglioxal: ¿Una opción saludable para pacientes diabéticos?

##### IV.5.1. Introducción

Durante siglos, las plantas de la familia *Agavaceae* han sido usadas de manera extensiva con propósitos tanto culinarios como medicinales. En particular, el alto contenido de fructo oligosacáridos hace de estas plantas una rica fuente de prebióticos, mientras que, fitoquímicos tales como flavonoides y saponinas son responsables por su actividad antiinflamatoria, antiviral y anticancerígena[323, 324]. Entre sus diferentes especies, *Agave tequilana* Weber es la materia prima para la elaboración del tequila y de jarabes de alta fructuosa. Tradicionalmente, la hidrólisis de fructanos, principalmente inulina, se lleva a cabo cocinando las piñas del agave en un horno de ladrillo por 36 horas; este proceso a menudo se complementa con una hidrólisis ácida adicional[325]. De manera alternativa, diferentes inulasas de bacterias, hongos o levaduras, se han introducido para mejorar la recuperación de mono azúcares, al tiempo que se evita la acidificación y el calentamiento prolongado. [326, 327]. En la producción de jarabes, los hidrolizados obtenidos son filtrados y sometidos a evaporación en vacío a 90 °C [328]. El jarabe de Agave presenta rangos similares de color, densidad y sabor comparado con mieles de abeja o de maple; sin embargo su índice glicémico y su dulzura son aproximadamente dos veces más bajos. La norma oficial mexicana regula los sacáridos en los jarabes de agave de alta fructuosa (HFAS por sus siglas en inglés) de *A. tequilana* de la siguiente forma: > 80% fructosa, < 15% glucosa, < 4% sucrosa, inulina > 0.5%; y el valor de pH en el intervalo 4.0 - 6.0 [329].

El consumo de jarabes de alta fructuosa ha sido discutido ampliamente en términos de su supuesta contribución a los crecientes problemas de obesidad y diabetes; sin embargo, se debe tener en cuenta que, si se les compara con la sacarosa, se requieren cantidades menores de estos productos para lograr la misma dulzura. Además, los jarabes de fructuosa derivados del agave proveen fibra dietética y pueden contener varios compuestos bioactivos [330]. Aun cuando la composición química de las plantas de agave y la bioactividad de los extractos de las plantas han sido estudiados extensivamente [323, 324, 331, 332], el análisis de los jarabes de agave solo ha sido llevado a cabo recientemente y los datos cuantitativos respecto a los compuestos potencialmente bioactivos son escasos. [328].

Como se describió anteriormente, cualquier proceso de elaboración de HFAS involucra calentamiento, el cual, junto con las condiciones ligeramente ácidas y con la presencia de proteínas, favorece las reacciones de Maillard [328]. En el contexto del presente trabajo, es de especial interés, la posible generación de compuestos carbonílicos, así como la degradación de productos del azúcar y los intermediarios de la glicación de proteínas. A nivel celular, es sabido que los  $\alpha$ -cetoaldehidos son agentes citotóxicos, mutagénicos, carcinogénicos y prooxidantes[333]; sin embargo, estos compuestos dan sabor a la comida y algunos de ellos presentan actividad bactericida, antiviral e incluso antitumoral[284, 330]. El impacto a la salud de los  $\alpha$ -cetoaldehidos exógenos ingeridos en la comida no ha sido entendido del todo. Se ha demostrado que al unirse a enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal puede reducir su biodisponibilidad; sin embargo, este mismo proceso puede también contribuir al incremento en la formación de productos de glicación avanzada [296, 334]. Como un ejemplo de esta aparente controversia, metilglioxal (MGo) es uno de los constituyentes, el cual junto con la liberación de peróxido de hidrógeno, un pH bajo y alta osmolaridad, es responsable por la bien conocida actividad antibacteriana de la miel de abeja[335, 336]. En particular, la comercialización de la miel neo zelandesa Manuka, como UMF®(Unique Manuka Factor), se basa en su excepcional actividad antimicrobiana no relacionada con peróxido de hidrógeno, con concentraciones cerca de 100 veces mayores de MGo comparada con otras mieles de abeja (Hasta 800 mg/kg de MGo en miel manuka fresca y hasta 1500 mg/kg en miel almacenada mucho tiempo o en productos sometidos a calentamiento) [337-339]. Vale la pena señalar que el ungüento de miel manuka para heridas ha sido aprobado por la agencia de Administración de Medicinas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) [340], un aspecto muy importante en la cura de las heridas de los pacientes diabéticos.

Basándonos en las consideraciones mencionadas, esta parte del trabajo de tesis se ha enfocado en la determinación de glioxal, metilglioxal y diacetil, buscando su posible asociación con la actividad bactericida de los jarabes de agave de alta fructuosa. Con fines comparativos, se incluyeron mieles de abeja y jarabes de maíz de alta fructuosa. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte sobre pequeños  $\alpha$ -cetoaldehidos en jarabes de agave de alta fructuosa (HFAS); la determinación se llevó a cabo mediante el procedimiento de cromatografía de líquidos con detección fluorimétrica (HPLC-FLD), adaptada de la parte anterior de este documento [341]. Los resultados obtenidos muestran concentraciones similares de MGo comparándolos con los reportados para miel manuka y sugieren que, al menos en parte, este compuesto es responsable por las propiedades antibacterianas no relacionadas con la liberación del peróxido de hidrógeno de los jarabes de agave.

## IV.5.2 Materiales y Métodos

Todos los reactivos fueron grado analítico. Para todos los análisis se usó agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco, USA) y acetonitrilo grado HPLC (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA). Para la determinación de  $\alpha$ -cetoaldehidos, las soluciones estándar contenían 1 mg/mL de glioxal (Go, etanodial, Fluka), metilglioxal (MGo, 2-oxopropanal, Sigma) y diacetil (DMGo, butano-2,3-diona, dimetilglioxal, Fluka) (DEGo, hexano-3,4-diona, dietilglioxal, Sigma) y fueron preparados en agua desionizada. También se usaron los siguientes reactivos Sigma: 4-metoxi-*o*-fenilendiamina (4MPD, reactivo derivatizante), ácido clorhídrico, ácido acético, fosfato de potasio dibásico, hidróxido de sodio, 2-mercaptoetanol, cloruro de sodio, trietilamina (TEA), glucosa y fructosa. Los dicarbonilos potencialmente presentes en las soluciones de reacción fueron eliminados mediante la derivatización con 4MPD y la extracción en fase sólida de sus respectivas quinoxalinas (Supelcoclean LC-18 SPE Tubo de 3mL, producto 57012 SUPELCO). Específicamente, para la purificación de 4MPD se siguió el mismo procedimiento utilizado en la parte anterior (capítulo IV.2.3 [341]). Las soluciones de trabajo de Go, MGo, DMGo y DEGo (5 mg/L cada uno) fueron preparadas diariamente, usando agua desionizada el mismo día de la preparación.

Para la determinación de peróxido de hidrógeno se utilizó un kit comercial (Amplex<sup>®</sup> Red Assay kit A22189) de Invitrogen. Los ocho jarabes de agave comerciales (A1-A8), las tres mieles de abeja (H1-H3) y los tres jarabes de maíz (C1-C3) fueron comprados en un mercado local.

### IV.5.2.1. Determinación cromatográfica de glioxal, metilglioxal y diacetil en mieles, usando 4-metoxi-*o*-fenilendiamina como agente derivatizante.

Para la determinación de glioxal (Go), metilglioxal (MGo) y diacetil (DMGo), se pesó con precisión (1.0 g) una alícuota de la muestra y se diluyó con 25 mL de agua desionizada. Debido a los altos valores de MGo encontrados en los jarabes de agave, para la determinación precisa de dicho analito, las muestras A1-A8 fueron diluidas 10 veces más, adicionalmente, antes de analizarse. La derivatización pre-columna con 4-metoxi-*o*-fenilendiamina (4MPD) y la separación de las quinoxalinas obtenidas fue llevada a cabo como se describió anteriormente (IV.2.3 [341]). En breve, 200  $\mu$ L de la muestra diluida o del estándar de calibración se mezclaron con 10  $\mu$ L de estándar interno (10  $\mu$ g/mL DEGo) y 200  $\mu$ L de acetonitrilo; la mezcla fue congelada (-20 °C, 30 min) y después centrifugada (10 000 g, 5 min). La calibración se llevó a cabo usando una serie de mezclas de soluciones de estándares que contenían Go, MGo, DMGo 0; 25; 50; 75; 100; 200, 400, 800  $\mu$ g/L de cada uno, y 500  $\mu$ g/L de estándar interno (EI). Para la evaluación de recuperación, se agregaron directamente 200  $\mu$ L y 400  $\mu$ L de las soluciones estándar (5  $\mu$ g/mL de cada analito) a las muestras H1 y A1 obteniendo 1 y 2 mg/kg de cada compuesto agregado a la miel y al jarabe de agave respectivamente. Como ya se mencionó anteriormente, los jarabes de agave contienen

concentraciones más altas de MGo al comparársele con Go y DMGo; por ello la recuperación de este compuesto fue evaluado en un experimento separado, en el cuál 2.0 mL y 4.0 mL de la solución del estándar (5 µg/mL MGo) fueron agregados a la muestra A1 obteniendo 10 y 20 mg/kg en jarabe de agave (se diluyó adicionalmente 10 veces más, como se describió anteriormente(IV.2.3 [341])).

#### IV.5.2.2. Ensayo para peróxido de hidrógeno

El nivel de peróxido de hidrógeno producido por los jarabes de agave y las muestras de miel fue determinado usando un kit comercial para el ensayo peróxido de hidrógeno/ peroxidasa (Amplex Red, Molecular Probes, Invitrogen, Burlington, ON, Canada). El ensayo se llevó a cabo en viales de la placa auto muestreadora del HPLC; después de 5 min de haber mezclado la muestra y los reactivos, se introdujeron automáticamente (cada 60s) alícuotas (5 µL) en modo del análisis por inyección en flujo (FIA), para las mediciones de fluorescencia en el detector cromatográfico FLD ( $\lambda_{ex} = 530$  nm,  $\lambda_{em} = 590$  nm). Para la cuantificación, se llevó a cabo una calibración externa de 5 puntos (0; 1.0; 5.0; 10; 15; 20 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); todas las muestras se diluyeron 1:10 previo al análisis.

#### IV.5.2.3. Ensayo para actividad antibacteriana

Se evaluó la actividad antibacteriana de ocho jarabes de agave (A1-A8) y una miel de abeja (H1) mediante un ensayo espectrofotométrico en caldo diluido [342, 343]. Las dos cepas de laboratorio utilizadas para este propósito fueron: bacteria gram positiva *Bacillus subtilis* 168 y bacteria gram negativa *Escherichia coli* DH5. Se preparó una solución estándar 50 % (masa/volumen) de cada muestra, pesando 10 g de jarabe o miel y llevando el volumen a 20 mL con caldo nutritivo y dichas soluciones fueron esterilizadas a través de filtros con tamaño de poro 0.2 µm Millipore, Bedford, MA). Se hicieron diluciones subsiguientes con caldo nutritivo para obtener concentraciones: 25%, 12.5%, 6.3%, 3.1%, 1.6% (masa/volumen). Para examinar una posible contribución del peróxido de hidrógeno a la actividad bactericida, para cada muestra se llevó a cabo un ensayo en ausencia y en presencia de catalasa (una solución 600 U/mL en agua estéril). Se inoculó en caldo nutritivo una colonia bacteriana por 12 h[344]. El crecimiento bacteriano se monitoreo midiendo la densidad óptica del cultivo (DO a 620 nm, Espectrofotómetro Spectronic 3000 Milton Roy con arreglo de diodos). La suspensión bacteriana fue diluida adicionalmente con caldo nutritivo para obtener una concentración final del inóculo  $1 \times 10^5$  CFU/ml. El volumen final en cada tubo de ensayo fue 1 mL, del cual 0.95 mL es jarabe diluido o miel con o sin catalasa y 0.05 mL de inóculo bacteriano. Para cada ensayo se midió la densidad óptica de la muestra que contenía inóculos y caldo (DO<sub>s</sub>) junto con los tres controles siguientes: (1) Caldo con nutrientes (DO<sub>caldo</sub>); (2) Caldo con nutrientes e inóculo (DO<sub>inoculo+caldo</sub>); (3) Caldo con nutrientes y jarabe o miel (DO<sub>caldo+muestra</sub>). Las muestras se

incubaron a 37°C por 18 horas; todas las pruebas se llevaron a cabo en triplicado y fueron repetidas 3 veces. La inhibición del crecimiento (Inh, %) para cada muestra a diferentes diluciones se determinó mediante la fórmula:

$$\text{Inh} = [1 - (\text{DO}_s - \text{DO}_{\text{caldo+muestra}}) / (\text{DO}_{\text{inoculo+caldo}} - \text{DO}_{\text{caldo}})] \times 100\%.$$

#### IV.5.2.4. Análisis estadístico

Los resultados presentados son la media obtenida para tres réplicas, las desviaciones estándar se calcularon usando Microsoft Excel 2007, y con este mismo programa fueron trazadas las gráficas. Los datos fueron evaluados para significancia estadística usando la prueba t no pareada incluida en Microsoft Excel 2007. Para el análisis de los componentes principales (PCA), se usó el paquete de software estadístico The Unscrambler 7.0 (CAMO, Norway). La significancia estadística se estableció para  $p < 0.05$ .

#### IV.5.3. Resultados y discusión

##### IV.5.3.1. Determinación de compuestos dicarbonílicos

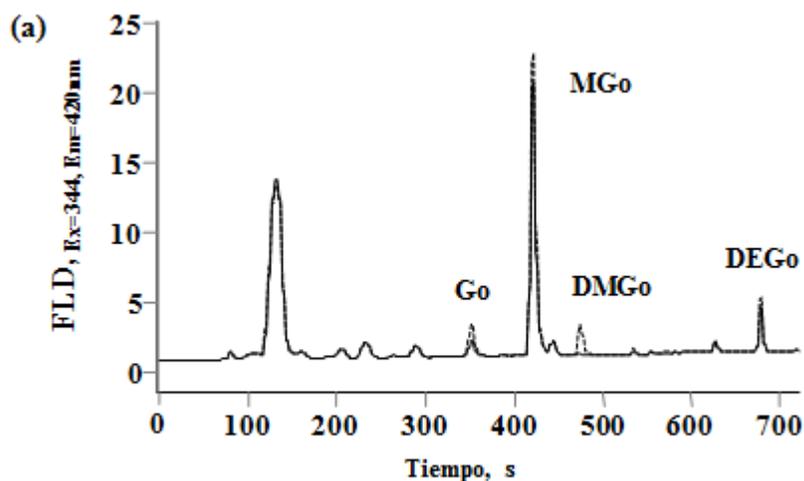
Los 3  $\alpha$ -cetoaldehidos reactivos considerados en este trabajo fueron glioxal, metilglioxal y diacetil. Los dos primeros a menudo han sido determinados en miel de abeja [337, 345-348], pero no se han encontrado datos publicados sobre el contenido de estos compuestos en jarabes de agave. El tercer compuesto, diacetil (DMGo), es un producto de la fermentación microbiana que contribuye al aroma de la miel [349, 350] y, como un mediador potencial de las reacciones de transferencia de electrones, presenta actividad química similar como Go y MGo [290]. Determinaciones confiables de dicarbonilos reactivos en jarabes de alta fructuosa y en miel de abeja presentan un reto no solo debido a la compleja matriz química y a la posible generación *de novo* de los citados compuestos durante el procedimiento analítico, pero también debido a problemas de contaminación relacionados con su ubicuidad característica [330, 347, 348]. Específicamente, las condiciones aplicadas a las etapas del procedimiento antes y durante la derivatización deben ser tan suaves como sea posible, evitando cambios drásticos de los parámetros químicos y calentamientos prolongados que puedan promover reacciones de Maillard [330]. A este respecto, el procedimiento de cromatografía líquida en fase reversa recientemente desarrollado para el análisis de orina fue adoptado en este trabajo [341]. En breve, la utilización de 4-metoxi-o-fenilendiamina (4MPD) como agente derivatizante permite la formación eficiente de las quinoxalinas fluorescentes respectivas, bajo condiciones de reacción relativamente suaves (pH

neutro, 40 °C, 4h, en la oscuridad), minimizando así el riesgo de cambios en la concentración del analito antes y durante el curso de la reacción.

En cuanto al tratamiento previo de la muestra, se ha usado una simple dilución de miel de abeja o jarabe de maíz [337, 346-348, 351]; mientras que en este trabajo, se agregó acetonitrilo a la muestra diluida para precipitar los constituyentes de la matriz (péptidos, proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos). La reacción de derivatización fue llevada a cabo en el sobrenadante, después la mezcla fue acidificada para la recuperación de quinoxalinas en este mismo solvente (acetonitrilo) mediante una separación de fases inducida por sal. Las soluciones de calibración se procesaron de manera idéntica, siempre en presencia de un estándar interno, así se controló la inevitable imprecisión debida a un protocolo no riguroso. Como ha resaltado White en su rigurosa revisión del tema, el estándar interno ha sido aplicado muy raramente en el análisis de especies dicarbonilo reactivas en productos alimenticios [330]; en estudios más recientes se ha usado la diacetilquinoxalina en el análisis de jarabes de maíz [347]. Dado que encontramos diacetil en todas las muestras analizadas en este trabajo, elegimos dietilglioxal (DEGo) como estándar interno y este fue agregado de manera directa a las muestras y a las soluciones de calibración [341].

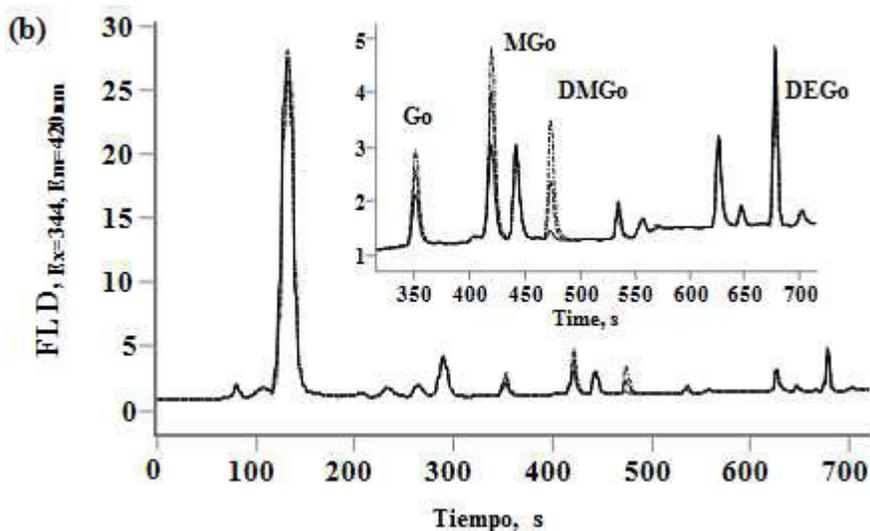
Para comprobar la probable formación *de novo* de  $\alpha$ -cetoaldehidos en el transcurso de nuestro procedimiento analítico y también para investigar posibles problemas de contaminación, se preparó una solución acuosa que contenía 80% de fructuosa y 15 % de glucosa (m/v) [329] y se analizó mediante el procedimiento completo, de RP-HPLC-FLD descrito en materiales y métodos. Una porción fue analizada directamente y otra porción fue limpiada mediante extracción en fase sólida previo a su análisis. Las concentraciones de los tres compuestos de interés en la solución estándar de glucosa + fructuosa después del SPE estuvieron por debajo de sus respectivos límites de cuantificación; mientras que, si no se realiza la limpieza correspondiente, se obtenían las siguientes concentraciones:  $27.3 \pm 1.3 \mu\text{g/L Go}$ ,  $3.9 \pm 0.6 \mu\text{g/L MGo}$  and  $8.1 \pm 1.2 \mu\text{g/L DMGo}$  (analizados por triplicado). Estos resultados demuestran que la degradación de azúcares en  $\alpha$ -cetoaldehidos durante el procedimiento analítico, fue insignificante; sin embargo, estos resultados también indican que los reactivos de glucosa y/o de fructuosa contienen cantidades considerables de estos pequeños compuestos dicarbonilo, o se contaminan durante la preparación/almacenamiento, así que, es obligatorio un paso de limpieza para evitar posibles errores sistemáticos, de acuerdo con trabajos previos [341]. En la aplicación del procedimiento de RP-HPLC-FLD, la separación de los cuatro compuestos se logró en 12 min. Los límites de detección y cuantificación (LD, LC) se evaluaron basándonos en la relación señal/ruido; se adoptó como criterio 6 y 10 desviaciones estándar para LD y LC, respectivamente, usando la señal obtenida para el más bajo de los estándares de calibración (2012ICH). Los valores de LD y LC para el proceso de calibración estuvieron en el intervalo  $0.3 - 0.5 \mu\text{g/L}$  y  $0.5 - 0.8 \mu\text{g/L}$ , respectivamente, para los tres compuestos de interés [341]. Para evaluar los límites de detección y cuantificación del método, la solución estándar de fructuosa + glucosa mencionada anteriormente fue usada como blanco

(después de ser limpiada mediante cartucho SPE) y los valores obtenidos para LD fueron: 2.83  $\mu\text{g/L}$  Go, 2.44  $\mu\text{g/L}$  MGo, 2.04  $\mu\text{g/L}$  DMGo y para LC: 4.72  $\mu\text{g/L}$  Go, 4.07  $\mu\text{g/L}$  MGo, 3.40  $\mu\text{g/L}$  DMGo.



(a) Jarabe de agave A1 (—) y esta misma muestra después de la adición de estándar (2.0 mg/kg de cada compuesto) (----).

(b)



(b) Miel de abeja H1 (—) y esta misma muestra, después de dos puntos de adición de estándar: (---) 1.0 mg/kg y (.....) 2.0 mg/kg de Go, Mgo y DMGo adicionados. Estándar interno (500  $\mu\text{g/l}$  DEGo

**Figura V.1.** Cromatogramas típicos de cromatografía de líquidos en fase reversa con detección fluorimétrica. (500  $\mu\text{g/L}$  DEGo como estándar interno). Se muestran los resultados cuantitativos en la Tabla V.1.

En la figura V.1, se presentan los cromatogramas típicos obtenidos para jarabe de agave (A1) y miel de abeja (H1) y para estas mismas muestras después de la adición de estándar. Los resultados de recuperación obtenidos en estos experimentos se muestran en la Tabla V.1; específicamente, los valores obtenidos para Go (94.0 – 99.5%), MGo (98-99.5%) y DMGo (102-106%), nos indican una precisión aceptable.

**Tabla V. 1.** Resultados de los experimentos de recuperación; se muestran los valores promedio para tres réplicas independientes con su respectiva desviación estándar.

Analito agregado, mg/kg	Gloxal		Metilgloxal		Diacetil	
	Media ± DE mg/kg	Recuperación %	Media ± DE mg/kg	Recuperación %	Media ± DE mg/kg	Recuperación %
<i>Miel de abeja (H1)</i>						
0	1.91 ± 0.12	-	3.04 ± 0.18	-	0.32 ± 0.05	-
1.0	2.85 ± 0.09	94.0	4.02 ± 0.20	98.2	1.37 ± 0.11	105
2.0	3.87 ± 0.14	98.2	5.03 ± 0.28	99.5	2.38 ± 0.18	103
<i>Jarabe de agave (A1)</i>						
0	2.20 ± 0.12	-	39.5 ± 2.6	-	0.40 ± 0.09	-
1.0*	3.18 ± 0.18	98.0	49.4 ± 3.1*	98.8	1.42 ± 0.10	102
2.0*	4.19 ± 0.15	99.5	59.1 ± 3.9*	98.0	2.52 ± 0.16	106

\* MGo se determinó en una corrida diferente, después de la adición de estándar correspondiente a 10 y 20 mg/kg en el jarabe.

En la tabla V.2 se presentan los resultados obtenidos para ocho jarabes de agave de alta fructuosa (HFAS), tres mieles de abeja y tres jarabes de maíz de alta fructuosa (HFCS). Como puede observarse, los jarabes de agave contenían concentraciones significativamente más altas de los tres  $\alpha$ -cetoaldehidos comparado con los otros productos (prueba t no pareada,  $p < 0.05$ ). En particular, las concentraciones de MGo estuvieron en el rango 15.6 – 315 mg/kg (media  $102 \pm 91$  mg/kg, mediana 88.4 mg/kg), lo que significa que en promedio son 25 veces más altas que las concentraciones encontradas en mieles de abeja comerciales (3.04 – 4.90 mg/kg, Tabla V.2) y cercanas a los valores reportados para miel manuka (41 – 1500 mg/kg), [337-339, 351]. Por otro lado, las concentraciones de Go y MGo determinadas en miel de abeja estuvieron dentro del rango de los valores reportados previamente (Go desde no detectable hasta 10.9 mg/kg; MGo desde no detectable hasta 5.7 mg/kg), [330, 337, 346], lo cual confirma la consistencia de nuestros datos analíticos.

**Tabla V.2** Resultados obtenidos para glioxal, metilglioxal y diacetil en jarabes de agave, mieles de abeja y jarabes de maíz (en la tabla la misma letra indica diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de los analitos en dos productos diferentes, evaluados mediante la prueba t no pareada,  $p < 0.05$ ).

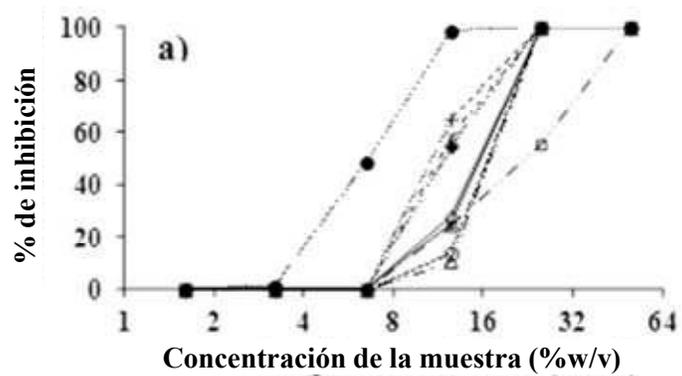
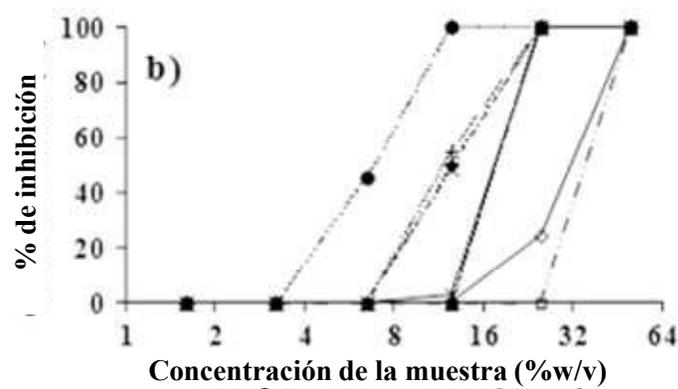
Muestra	Glioxal, mg/kg $\pm$ DE		Metilglioxal, mg/kg $\pm$ DE		Diacetil, mg/kg $\pm$ DE	
	Individual	Media	Individual	Media	Individual	Media
<i>Jarabes de agave de alta fructuosa</i>						
A1	2.20 $\pm$ 0.12		39.5 $\pm$ 2.6		0.40 $\pm$ 0.09	
A2	1.90 $\pm$ 0.08		67.3 $\pm$ 3.1		2.02 $\pm$ 0.05	
A3	2.21 $\pm$ 0.05		315 $\pm$ 12		2.70 $\pm$ 0.09	
A4	2.40 $\pm$ 0.11	2.28 $\pm$ 0.35	15.6 $\pm$ 1.2	102 $\pm$ 91	0.73 $\pm$ 0.04	2.05 $\pm$ 2.05
A5	2.60 $\pm$ 0.05	(a, b)	108 $\pm$ 7.2	(d, e)	2.13 $\pm$ 0.09	(g, h)
A6	2.14 $\pm$ 0.10		92.4 $\pm$ 3.8		0.86 $\pm$ 0.03	
A7	1.86 $\pm$ 0.05		90.6 $\pm$ 2.9		0.84 $\pm$ 0.06	
A8	2.92 $\pm$ 0.09		86.1 $\pm$ 4.3		6.71 $\pm$ 0.92	
<i>Mieles de abeja</i>						
H1	1.91 $\pm$ 0.12		3.04 $\pm$ 0.18		0.32 $\pm$ 0.05	
H2	1.40 $\pm$ 0.07	1.55 $\pm$ 0.31	4.90 $\pm$ 0.32	4.25 $\pm$ 1.05	0.73 $\pm$ 0.06	0.58 $\pm$ 0.23
H3	1.34 $\pm$ 0.14	(a, c)	4.80 $\pm$ 0.36	(d, f)	0.69 $\pm$ 0.04	(g)
<i>Jarabes de maíz de alta fructuosa</i>						
C1	0.63 $\pm$ 0.05		1.57 $\pm$ 0.03		0.59 $\pm$ 0.04	
C2	0.71 $\pm$ 0.03	0.62 $\pm$ 0.09	1.84 $\pm$ 0.02	1.70 $\pm$ 0.14	0.43 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.11
C3	0.53 $\pm$ 0.04	(b, c)	1.69 $\pm$ 0.03	(e, f)	0.38 $\pm$ 0.02	(h)

Como se muestra en la Tabla V.2, los jarabes de maíz contienen las concentraciones más bajas de los tres compuestos, también de acuerdo con estudios previos (0.18 – 0.51 mg/kg Go y 1.1 – 3.8 mg/kg MGo,[330]); aunque recientemente han sido reportadas concentraciones más elevadas [347]. En cualquier caso, los niveles significativamente más bajos de MGo encontrados en este trabajo en jarabes de maíz de alta fructuosa comparando con productos de agave indican la importancia del tipo de planta y nos llama a realizar mayores investigaciones acerca de posibles fuentes de MGo en jarabes de agave. Vale la pena resaltar que la determinación de diacetil no ha sido llevada a cabo antes; nuestros datos demuestran su presencia en bajas concentraciones en todas las muestras, lo cual excluye la utilización de este compuesto como estándar interno. Dado que el diacetil es a menudo usado como aditivo saborizante en alimentos, incluimos en la tabla V.2 los resultados de productos no aromatizados. También fueron analizados dos jarabes de maíz comerciales, sabor vainilla y maple, los cuales tuvieron las concentraciones más elevadas de diacetil (hasta 12.4 mg/kg).

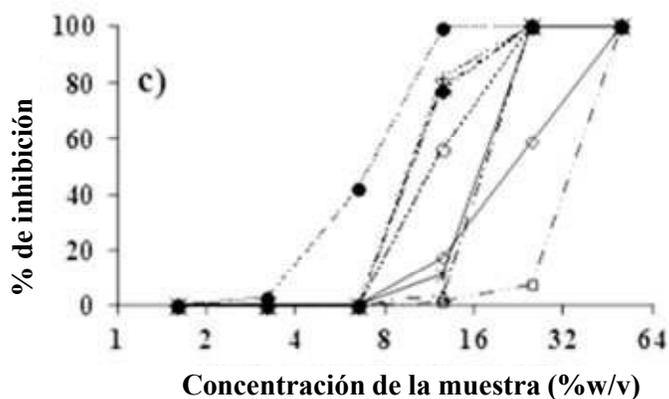
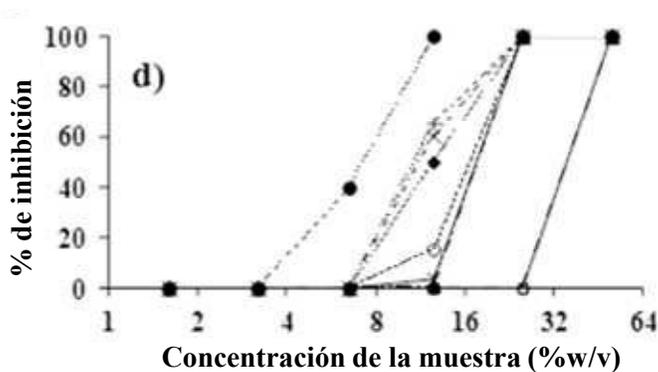
#### IV.5.3.2. Evaluación para actividad antibacteriana.

Se llevó a cabo un ensayo espectrofotométrico en caldo diluido tal como se describe en materiales y métodos. Los dos microorganismos probados fueron las bacterias gram positivo *Bacillus subtilis* 168 y gram negativo *Escherichia coli* DH5, respectivamente. Ambas son organismos ubicuos y han sido utilizados previamente en pruebas antibacteriales en miel, en otros productos alimenticios relacionados y también en ensayos de actividad biocida teniendo como contexto la curación de heridas [352-355]. En la figura V.2, se presenta el porcentaje evaluado de inhibición de crecimiento para las dos cepas bacterianas (Fig. V.2a, 2b – *E. coli*; Fig. 2c,d – *B. subtilis*) a diferentes diluciones de muestra en presencia (Fig. V.2b,d) y en ausencia de catalasa (Fig. V.2a,c). A pesar de que la generación de peróxido de hidrógeno después de la dilución fue menos pronunciada en HFASs comparado con mieles de abeja (Tabla V.3); se utilizó catalasa para comparar la actividad bactericida con y sin la inactivación de la generación de peróxido de hidrógeno. Como puede observarse, todos los jarabes y mieles de abeja presentaron una actividad bactericida similar contra las dos cepas probadas; La mayor inhibición corresponde a los jarabes de agave A3, A6, A7 y A8 que contienen las concentraciones relativamente más altas de MGo (Tabla V.2).

Además, para estos cuatro productos, la adición de catalasa tuvo un efecto mínimo sobre la inhibición de crecimiento. Por otro lado, los jarabes de agave A1 y A4 con las concentraciones más bajas de MGo presentaron una inhibición de crecimiento relativamente débil de las dos cepas bacterianas, y la adición de catalasa provocó un decremento en la inhibición. Para los otros HFASs (A2, A5), los resultados fueron muy similares a aquellos obtenidos para la miel de abeja H1; la inhibición de crecimiento fue detectada a la concentración de muestra 12.5% (peso/volumen) y disminuyó después de la adición de catalasa. Como se esperaba, para la concentración de muestra 50% (peso/volumen) todos los productos examinados inhibieron totalmente el crecimiento bacteriano, debido al alto contenido de azúcares y a su alta viscosidad de la muestra. Las concentraciones mínimas que presentaron inhibición fueron 50% para A4; 25% para A1, A2, A5, A6, A7, A8, H1 y 12.5% para A3. Estos resultados demuestran que concentraciones altas de MGo contribuyen a la actividad antibacteriana no relacionada con peróxido de hidrógeno en los jarabes de agave (Fig. V.2, Tabla V.2).

(a) *E. coli*;(b) *E. coli* con catalasa;

**Figura V.2.** Resultados obtenidos en un ensayo espectrofotométrico en caldo diluido para medir la actividad antimicrobiana: (—◇—) A1; (-△-) A2; (●) A3; (-□-) A4; (-○-) A5; (+) A6; (-x-) A7; (◆) A8; (-\*-) H1.

(c) *B. subtilis*;(c) *B. subtilis* con catalasa;

**Figura V.2.** Resultados obtenidos en un ensayo espectrofotométrico en caldo diluido para medir la actividad antimicrobiana: (—◇—) A1; (-·-△-·-) A2; (···●···) A3; (-·-□-·-) A4; (-·-○-·-) A5; (···+···) A6; (-·-x-·-) A7; (···◆···) A8; (—\*—) H1.

#### IV.5.3.3. Evaluación para peróxido de hidrógeno.

En mieles de abeja, el peróxido de hidrógeno producido por la actividad de la glucosa oxidasa tras ser diluida es otro agente antibacteriano importante[356]. Para tener mayor evidencia sobre el papel que sugerimos tiene MGo en los jarabes de agave, se llevó a cabo un ensayo para peróxido de hidrógeno en las muestras A1-A8 y H1-H3. Para este propósito usamos el equipo Amplex Red<sup>®</sup>, el cual mide la oxidación catalizada enzimáticamente de un sustrato no fluorescente a una resorufina altamente fluorescente mediante la acción del peróxido de hidrógeno. Para soluciones estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a diferentes concentraciones, se observó que la reacción se completaba en tan solo 5 minutos y después de este tiempo, la señal fluorescente permanecía estable al menos

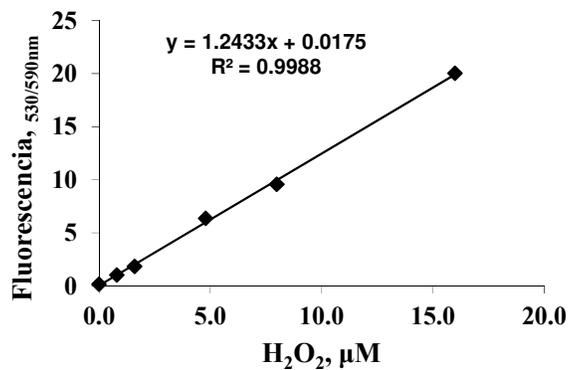
durante 25 minutos, lo cual nos permitió medir la velocidad de liberación del peróxido de hidrógeno en la muestra diluida en el intervalo de tiempo de 5 y 25 minutos (La curva de calibración típica, la estabilidad de las señales de fluorescencia y los resultados de la producción de  $H_2O_2$  en A1, A4 y H1 se muestran en la figura V.3 ). El factor de dilución (10:1) se aplicó basándonos en estudios previos[342]. Se resumen los resultados obtenidos en la tabla V.3.

**Tabla V.3** Resultados del ensayo para peróxido de hidrógeno en jarabes de agave y en mieles de abeja.

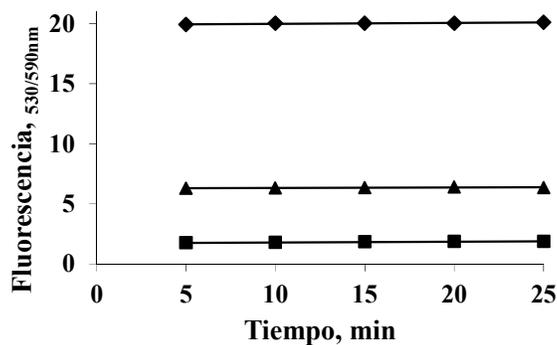
Muestra	R <sup>2</sup>	Pendiente	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , mM/h
A1	0.9947	0.18	0.22
A2	0.9924	1.14	1.37
A3	0.9981	0.45	0.54
A4	0.9777	0.11	0.14
A5	0.9795	0.31	0.37
A6	0.9987	0.21	0.25
A7	0.9996	0.17	0.22
A8	0.9789	0.23	0.27
H1	0.9897	0.41	0.49
H2	0.9889	0.47	0.57
H3	0.9937	0.28	0.58

Para todas las muestras se obtuvo una linealidad aceptable del incremento de la señal de fluorescencia durante el transcurso de la producción de  $H_2O_2$  ( $R^2 > 0.977$ ); basándonos en los valores de la pendiente, se calcularon los resultados en mM de  $H_2O_2$  liberado por hora. Para las tres mieles de abeja, los resultados (0.49 – 0.58 mM/h) estuvieron de acuerdo con otros reportes [357]. En jarabes de agave, también se observó la liberación de peróxido de hidrógeno, pero a velocidades más bajas, excepto para la muestra A2 (Tabla V.3). Estos resultados indican que hay actividad enzimática involucrada, y también sugieren que el  $H_2O_2$  puede contribuir a las propiedades bactericidas de los HFASs diluidos. Para mayor evidencia de la actividad enzimática, se obtuvieron los perfiles de azúcares en los dos tipos de productos, mediante cromatografía de gases con detector de ionización en flama( Se muestra un cromatograma típico en la figura V.4) y, como se esperaba, se encontró que la fructuosa era un azúcar principal en los jarabes de agave, mientras que en la miel de abeja prevaleció la glucosa. Además, se encontró ácido glucónico en las mieles de abeja, pero no en los jarabes de agave; lo cual excluye al sistema glucosa/glucosa oxidasa como una fuente de peróxido de hidrógeno en estos últimos. Parece posible que otras enzimas de la planta de agave pudieran participar en la producción de  $H_2O_2$ , también debieran ser

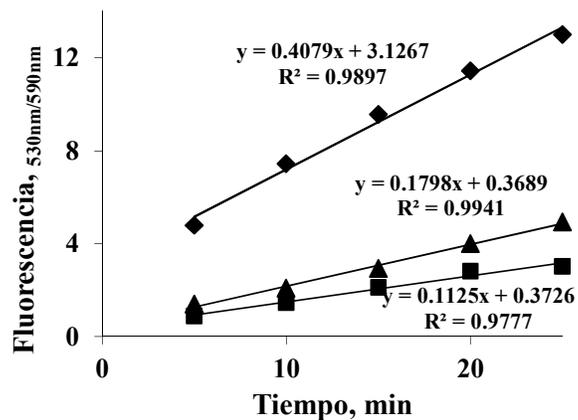
consideradas como otra fuente de enzimas los microorganismos utilizados para obtener las inulinasas mediante la hidrólisis no térmica de fructanos[326, 327].



(a) Curva de calibración;

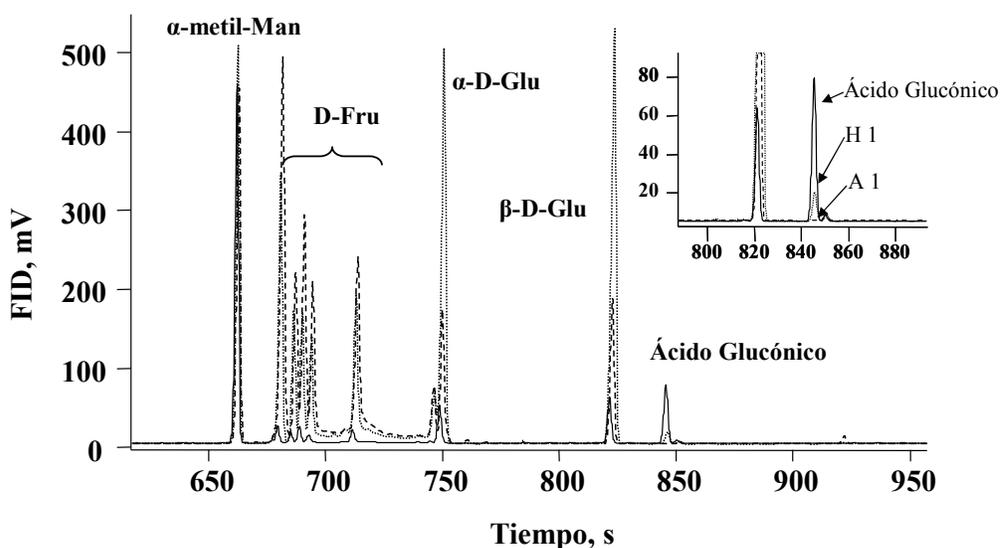


(b) Estabilidad de las señales de fluorescencia en soluciones estándar de  $H_2O_2$  (0.5; 5.0; 15  $\mu M$ );



(c) Análisis de muestras reales: ■ - A4; ▲ - A1; ♦ - H1

Figura V.3. Resultados del ensayo para peróxido de hidrógeno.

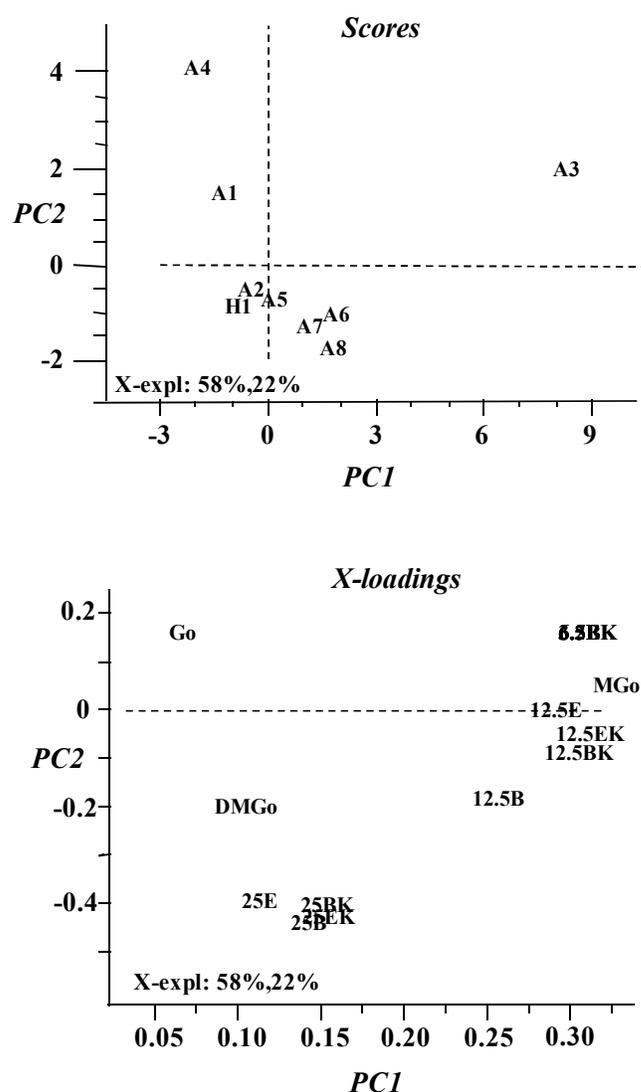


**Figura V.4.** Cromatogramas típicos de GC-FID mostrando el perfil de azúcares en la miel de abeja H1 (---) y en el jarabe de agave A1(---); mezcla de estándares 1 mg/mL (—). La solución de la mezcla de estándares contenía: D-Fructosa, D-Glucosa y Ácido Glucónico. Se utilizó  $\alpha$ -methylmanosido como estándar interno. El análisis se llevó a cabo después de la derivatización pre columna con BSTFA (Clarus 500, Perkin Elmer).

#### IV.5.3.4. Análisis de componentes principales

Para hallar las posibles relaciones entre los parámetros medidos y para revelar cuáles de estos parámetros pudieran ser responsables de la inhibición de crecimiento bacteriano al ser expuestos a jarabes de agave, se aplicó el análisis de componentes principales (PCA), usando matrices de los datos obtenidos para las muestras A1-A8 y H1 (Tabla V.2, Fig. V.2). Inicialmente, se consideraron las siguientes variables: concentraciones de Go, MGo, DMGo y el % de inhibición de crecimiento observado para cada cepa bacteriana a diluciones de la muestra en el rango de 1.5 – 25%, en ausencia y en presencia de catalasa; sin embargo el modelo PCA obtenido, no fue estadísticamente significativo (menos del 35 % del total de la variabilidad de los datos descrita por los dos primeros componentes principales (PC's)) y los eigenvalores para la inhibición de crecimiento para concentraciones bajas de jarabe fueron inferiores a 0.08, así que estas variables fueron eliminadas. En el segundo modelo, los dos primeros componentes principales representan el 80 % de la variabilidad de los datos (Fig. V.5). En la Fig. V.5a se representa la distribución de las muestras en un espacio de dimensionalidad reducida (coordenadas PC1 y PC2), observándose dos grupos: (1) Miel de abeja H1, jarabes de agave A2, A5-A8 y (2) jarabes de agave A1 y A4, mientras que la muestra A3 con la concentración más alta de MGo está claramente separada de las demás muestras. El primer componente principal (PC1) está relacionado aparentemente con la concentración de MGo, dado que separa los jarabes A3, A5-A8 con altas concentraciones de dicho compuesto, de las muestras A1, A2, A4 y H1 con concentraciones de MGo significativamente más bajas. Más importante aún, el modelo PCA detectó una asociación cercana entre MGo y la

inhibición de crecimiento bacteriano, como puede observarse sobre el trazo del eje X (X-loading) (Fig.V.5b). Específicamente, los eigenvalores del PC1 para MGo, para la inhibición de crecimiento de *B. subtilis* en concentraciones de jarabe de 3.2 – 12.5 % y *E. coli* en concentración de jarabe 12.5 % (en ausencia y presencia de catalasa) fueron mayores de 0.25. En general, los resultados del modelo PCA indican claramente que el MGo que contienen los jarabes de agave es al menos en parte responsable de la actividad antibacteriana no peroxidante de estos productos.



**Figura V.5.** Análisis de componentes principales (PCA) de los datos obtenidos en el análisis de los jarabes de agave (A1-A8) y de la miel de abeja (H1): (a) El puntaje (scores) muestra la distribución de las muestras y (b) el eje X (X-loadings) muestra la distribución de las variables (3.1B; 12.5B; 25B – las concentraciones respectivas de los jarabes en los cultivos de *B subtilis*; 6.3BK, 12.5BK; 25BK – cultivos de *B subtilis* con catalasa; 12.5E, 25E – las concentraciones respectivas de los jarabes en los cultivos de *E. coli*; 12.5EK, 25EK – estas mismas muestras con catalasa).

#### IV.5.4. Conclusiones

En este trabajo, se reporta por primera vez la determinación de pequeños  $\alpha$ -cetoaldehidos en jarabes de agave de alta fructuosa. En la aplicación del procedimiento de RP-HPLC-FLD propuesto anteriormente, los límites de cuantificación del método fueron 0.11 mg/kg, 0.10 mg/kg, 0.09 mg/kg para Go, MGo y DMGo respectivamente. Los resultados obtenidos indican concentraciones elevadas de metilglioxal en HFASs comparándolos con las mieles de abeja y jarabes de maíz disponibles comercialmente en México, los cuales fueron seleccionados al azar. Se detectó la generación de peróxido de hidrógeno después de dilución en todos los HFASs, aunque la liberación de  $H_2O_2$  fue menos importante que para mieles de abeja. Todos los jarabes de agave presentaron actividad bactericida tanto contra *B. subtilis* como contra *E. coli* en un ensayo espectrofotométrico de dilución en caldo, y la adición de catalasa tuvo un efecto mínimo sobre los resultados de los ensayos, especialmente en jarabes con concentraciones relativamente elevadas de MGo. El análisis de componentes principales reveló una asociación directa entre la inhibición de crecimiento bacteriano y MGo para las dos cepas bacterianas e independientemente de la inactivación de la generación de peróxido de hidrógeno. Se llegó a la conclusión de que concentraciones elevadas de MGo en jarabes de agave de alta fructuosa son al menos en parte responsables por la actividad antibacteriana no peroxidante de estos productos. Nuestros hallazgos son relevantes debido a que cada vez son más necesarios nuevos alimentos funcionales que contengan agentes terapéuticos biocidas para contrarrestar los problemas crecientes de resistencia a antibióticos. Es necesario realizar más estudios que nos provean mayor evidencia experimental y que nos aclaren cual es el origen del MGo y de la generación de peróxido de hidrógeno en jarabes de agave. Por otro lado, parece interesante explorar en un trabajo futuro la factibilidad del uso de jarabes de agave en la cura de heridas tan importante en pacientes diabéticos.

## Capítulo V.

### Conclusiones generales.

De acuerdo con el objetivo general, en este trabajo se han desarrollado/adaptado diferentes procedimientos analíticos, cuya aplicación en el análisis de muestras reales (alimentos, fluidos biológicos) permite contribuir en la evaluación de riesgos en el desarrollo y progreso de la diabetes mellitus tipo 2 en el estado de Guanajuato. Para tal efecto, abordamos este estudio con dos enfoques particulares: el primero de ellos, consistió en profundizar en el conocimiento del impacto de metales y metaloides en la incidencia y progreso de la enfermedad, y el segundo, en la determinación de productos de glicación avanzada y, sobretodo, en la de sus precursores.

Dentro del primer enfoque, entre los múltiples factores que pueden tener injerencia directa sobre el desarrollo y progreso de la enfermedad, los resultados del análisis estadístico que llevamos a cabo sugieren una posible correlación entre la incidencia de diabetes y la exposición de la población local a arsénico, mediante el consumo de agua de pozos municipales. En las regiones donde se detectaron niveles de concentración de arsénico relativamente elevados en aguas de pozo, también se registró una mayor incidencia de diabetes en los dos años de evaluación. Esto parece confirmar los reportes de diferentes estudios epidemiológicos llevados a cabo anteriormente en otras regiones geográficas.

Finalmente, bajo este mismo enfoque, los resultados obtenidos en nuestros estudios confirmaron que el frijol es una fuente dietética importante de molibdeno, y no sólo eso, sino que distintos tipos de frijol tienen diferentes niveles de concentración de molibdeno y cobre, así como marcadas diferencias en la solubilización y biodisponibilidad de ambos elementos, lo que parece sugerir una relación antagónica entre molibdeno y cobre en estas legumbres. Además, con base en un estudio estadístico, se encontró una correlación entre los pacientes diabéticos con complicaciones, y la frecuencia con la que consumían refresco, azúcares y frijoles. Este resultado es muy interesante, ya que, junto un estudio que evalúa la toxicidad de molibdeno en humanos[264], nos fue posible evaluar la cantidad de frijol ingerida de manera regular, que podría alterar la homeostasis de cobre en pacientes diabéticos con complicaciones. Todo ello ayuda a soportar la hipótesis de que el frijol es una fuente dietaria importante de molibdeno, y sugiere que pudiera ser un factor de riesgo potencial para pacientes diabéticos con complicaciones. Sin embargo, los resultados obtenidos no nos permiten concluir si el molibdeno puede ser considerado como un factor de riesgo en el desarrollo de las complicaciones diabéticas, por lo cual es necesario realizar más estudios. Los resultados obtenidos en este rubro, además de reforzar las evidencias sobre la importancia de algunos elementos traza en diabetes, nos permiten

profundizar sobre el impacto que algunos metales y metaloides tienen sobre la incidencia y el progreso de la diabetes mellitus 2.

Bajo el segundo enfoque, se desarrolló un procedimiento analítico para la determinación (incluyendo la síntesis y purificación del estándar) de uno de los AGEs mejor caracterizados: la pentosidina. En este trabajo se utilizó para evaluar el efecto del medicamento telmisartan en pacientes diabéticos con nefropatía, pudiéndose evaluar el progreso de los pacientes a partir de la concentración de pentosidina en orina, antes y después de la administración del medicamento. Con ello queda demostrado que la metodología desarrollada no solo permite la determinación en niveles fisiológicos de pentosidina en orina, si no que proporciona información relevante en la práctica clínica y en estudios enfocados en la diabetes mellitus 2. Con base en los resultados obtenidos se propone el uso de este procedimiento en laboratorios clínicos como una herramienta auxiliar en el seguimiento del progreso de la diabetes mellitus 2.

En el caso de los precursores de los AGEs, se desarrolló una metodología analítica para la determinación de tres pequeños  $\alpha$ -cetoaldehidos en matrices biológicas, *in vivo* y en alimentos. Para su determinación en orina no solo nos fue posible detectar y cuantificar estos pequeños analitos a niveles fisiológicos sino que, además, el procedimiento es lo suficientemente sensible y confiable como para detectar diferencias de concentración tanto entre individuos en diferentes etapas clínicas (sanos, diabéticos y diabéticos con complicaciones), como en personas sanas expuestas a diferentes fuentes exógenas. Esto pudiera ser especialmente útil en el seguimiento dietético de pacientes diabéticos y en estudios que exploren mecanismos de adicción al alcohol.

En cuanto a los niveles de concentración de los  $\alpha$ -cetoaldehidos en jarabes de agave, es necesario realizar más estudios para evaluar la inocuidad de los niveles de concentración relativamente altos de metilglioxal en estos jarabes, ya que se vende como un edulcorante alternativo para pacientes diabéticos, de quienes, sobra decir, pudieran ser especialmente vulnerables a la ingesta de un conocido precursor de AGEs. Por otro lado, se abre un promisorio campo a la investigación debido a que estas altas concentraciones de metilglioxal parecen contribuir sobremanera a la capacidad antibacteriana de estos jarabes, lo cual es una cualidad que, sin duda, puede ser aprovechada en el desarrollo de ungüentos antibacterianos (como los que tanto necesitan los pacientes diabéticos que sufren algún tipo de laceración o llaga), sin la necesidad de recurrir a antibióticos que eventualmente generen cepas bacterianas resistentes a estos[22, 23, 358].

Este estudio no pretendía evaluar todos los factores de riesgo potenciales en diabetes, eso sería demasiado ambicioso, sin embargo, creemos que contribuye a develar algunos de ellos y a ahondar un poco en este amplio campo de estudio. También, creemos, generó nuevas preguntas: ¿qué tanta injerencia tienen las altas concentraciones de arsénico en la incidencia de diabetes en algunos municipios de Guanajuato?, ¿las películas de alginato funcionan para la remoción conjunta de otros metales además de plomo?, ¿puede el molibdeno ser considerado como un factor de riesgo de las complicaciones dietéticas? y, de ser así, ¿pueden ciertos tipos de frijol ser considerados como un potencial factor de riesgo para pacientes con complicaciones diabéticas?.

Otras interrogantes derivadas de nuestro estudio fueron estas: ¿pueden las metodologías analíticas desarrolladas para la determinación de AGEs y sus precursores usarse como análisis rutinarios en la evaluación de pacientes diabéticos?, ¿cuál es el origen del metilglioxal y de la generación de peróxido de hidrógeno en los jarabes de agave? La respuesta a todas estas preguntas aún no las sabemos. Lo que queda muy claro es que es necesario redoblar esfuerzos y realizar más estudios que nos permitan contestar todas ellas, y las nuevas que pudieran surgir, con la esperanza de que todas estas respuestas y las nuevas preguntas que vayan surgiendo, en algún momento nos permitan comprender mejor los mecanismos de desarrollo y progreso de la diabetes mellitus. Hasta entonces, es imprescindible no ceder en el esfuerzo para desarrollar nuevas y mejores metodologías analíticas cuya aplicación nos permita alcanzar nuestras metas.

## **Anexo 1. Reporte de estancia.**

### **Factibilidad del uso de películas de alginato para la remoción de plomo de aguas contaminadas.**

#### **A.1. Introducción – Plomo como elemento tóxico en diabetes y posible estrategia de remoción en aguas naturales.**

El análisis estadístico presentado en el Capítulo IV.1 sugirió una posible asociación entre la incidencia de diabetes en el estado de Guanajuato y los niveles de arsénico en agua potable. La problemática de arsénico ha sido descrita en nuestro estado [9, 82], en otras regiones de México (Coahuila) y del mundo [359]. Asimismo se han desarrollado diferentes estrategias para la remoción de este y otros metales/metaloideos contaminantes [360, 361] ; como ejemplo, en nuestro grupo de investigación se demostró la factibilidad de uso de nanopartículas de hierro para la eliminación de las formas inorgánicas de arsénico de aguas naturales [214]. Como se puede observar en la Tabla I.1, arsénico no fue el único elemento contaminante en algunos pozos del estado; en varias localidades se encontraron también concentraciones relativamente altas de plomo, de acuerdo con otros estudios [213]. Este elemento presenta alta toxicidad y ha sido asociado con la diabetes, tal como se describe en la parte de la introducción. En este contexto y atendiendo el enfoque regional, parecía interesante realizar un estudio de remoción de plomo. Esta parte del trabajo fue realizada durante una estancia de tres meses en la Universidad de Nagaoka, Japón. El grupo de investigación japonés tiene amplia experiencia en estudios sobre fabricación, modificación y uso de alginatos en remoción de especies contaminantes de sistemas acuosos[362, 363].

Los metales pesados son agentes tóxicos y carcinógenos bien conocidos, los residuos de dichos metales en el ambiente conllevan una amenaza no sólo a la salud pública, también para el ambiente debido a su biopersistencia, esta tiene efectos tóxicos muy serios para los ecosistemas acuáticos[364]. Los metales pesados son ampliamente usados en electrodeposiciones, pinturas, tratamiento de superficies, manufactura de circuitos impresos para teclados, etc. Muchos métodos se han sugerido para la remoción de metales tóxicos de soluciones acuosas, tales como precipitación química, evaporación, intercambio iónico, adsorción, cementación, electrólisis y ósmosis inversa. Debido a la naturaleza específica de los efluentes industriales (pH bajo, variedad de cationes y aniones, emulsiones con aceites, partículas, etc.) la remoción efectiva ha probado ser un proceso costoso y muy difícil[79]. Aunque la adsorción es el método más efectivo y ampliamente usado[365], las resinas quelantes comerciales, uno de los sorbentes más utilizados, son aún un material caro y en su mayoría no biodegradable. De aquí, la investigación se ha enfocado en la preparación de sorbentes nuevos, baratos y más efectivos. Uno de esos prometedores materiales, que ofrece tales ventajas, es el alginato, un polímero aniónico natural.

El alginato de sodio es un copolímero lineal de guluronato (G) y manuronato (M), el cual constituye 10-40 % del peso seco de todas las especies de algas cafés[366-368]. La capacidad de este copolímero para formar geles biodegradables estables en presencia de cationes divalentes ha sido conocida y estudiada extensivamente[369, 370]. Estas propiedades de gelación pueden atribuirse al enlace simultáneo de cationes divalentes tales como Ca(II) a diferentes cadenas de bloques de guluronato (bloques – G). Como resultado de su configuración, estas cadenas forman cavidades electronegativas, capaces de mantener a los cationes vía sus interacciones iónicas, resultando en el entrecruzamiento de las cadenas en una estructura similar al empaque de huevo en cartones (“egg-box”)[369]. Convencionalmente, el alginato de calcio es ampliamente preparado en forma de perlas, el mecanismo de remoción de los iones metálicos pesados es mediante el intercambio iónico entre los iones Ca(II) de las perlas y los iones metálicos pesados en la solución acuosa.

En este estudio, se comparó el desempeño de remoción de iones Pb(II) mediante alginato de sodio (Na-Alg) y alginato de calcio (Ca-Alg), el primero está disponible comercialmente como material de partida, el segundo es producido mediante el entrecruzamiento (cross - linking) de iones Ca(II) al Na-Alg. Vale la pena señalar que, el Na-Alg disponible comercialmente está en forma de polvo y es soluble en agua, por lo tanto, este estudio desarrolla un método para formar películas de Na-Alg a gran escala, las cuales son más prácticas para llevar a cabo la remoción de iones metálicos pesados. También se llevó a cabo una investigación sobre el desempeño de remoción de iones de Pb (II) entre las películas de Ca-Alg y las perlas de Ca-Alg convencionales.

El objetivo general del trabajo fue hacer un estudio comparativo sobre la determinación de metales, con un enfoque especial en iones de plomo, mediante espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado por inducción (ICP- AES), en muestras de alginato de calcio y alginato de sodio. El alginato es un polisacárido que se obtiene de algunas "algas marrones" del género Phaeophyceae[368, 371], es bien conocido su uso como biopolímero absorbente fácilmente accesible y económicamente atractivo, el uso de alginato de calcio para fabricar adsorbentes para su uso en el tratamiento de aguas contaminadas está bien establecido[368, 372, 373], su gran afinidad por cationes metálicos divalentes permite cambiar las propiedades de una película soluble en agua a una insoluble que puede ser fácilmente removida del agua contaminada[368, 372, 374]. Usualmente se fabrica una membrana de alginato de sodio y se sumerge en una solución de iones de calcio para producir en el alginato un proceso de entrecruzamiento que provoca que de ser soluble en agua, se transforme en alginato de calcio insoluble. Después de un proceso de secado dicha película puede ser usada para la remoción de metales pesados[368, 371-375]. Esta investigación es para determinar el desempeño de dos tipos de películas de alginato en la remoción de iones de plomo de aguas contaminadas. Lo novedoso de este estudio es que se propone en este caso el uso de la película de alginato de sodio directamente, sin un entrecruzamiento previo, simplemente colocar directamente la película de alginato sobre la muestra de agua contaminada, y los iones metálicos presentes en la muestra serán los encargados

de realizar el entrecruzamiento en la película de alginato, permitiendo que se vuelva insoluble, lo cual nos permite su rápida y efectiva remoción.

## **A.2. Materiales y métodos**

Para la determinación de iones de plomo se utilizó un espectrómetro de emisión óptica con plasma acoplado por inducción ICP OES, Shimadzu ICP-7510. Para todos los análisis se usó agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco, USA) y los siguientes reactivos: alginato de sodio extra puro, nitrato de plomo  $Pb(NO_3)_2$  grado analítico y cloruro de calcio  $CaCl_2$  grado reactivo que fueron provistos por Nacalai Tesque. También se usaron los siguientes reactivos Sigma, carbonato de calcio  $Ca_2CO_3$  provisto por Sigma y carbonato de potasio  $K_2CO_3$  provisto por Merck.

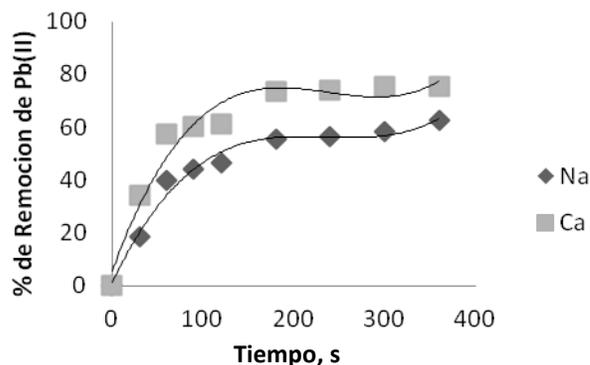
### **A.2.1. Preparación de los diferentes tipos de alginatos para remoción.**

Para preparar una solución al 2% en peso de Na-Alg, se disolvieron 2 g de Na-Alg (alginato de sodio extra puro Nacalai Tesque) en 100 mL de agua bajo vigorosa agitación. Para fabricar las películas de Na-alg, 8 mL de la solución descrita anteriormente se esparció en marcos de 8.5 cm X 5.5 cm, y se secaron por 24 horas a 50 °C. La película seca tenía aproximadamente una masa de 0.2 g. Para la fabricación de las películas de Ca-Alg, las películas de Na-Alg se sumergieron en una solución 0.2 M de cloruro de calcio (Nacali Tesque) por 3 horas. Las películas fueron enjuagadas con agua desionizada para remover cualquier exceso de cloruro de calcio sobre la película y se secaron por 12 horas a 50 °C. Para producir las perlas de alginato, 8 ml de la solución de alginato mencionada anteriormente fue medida con una jeringa, lentamente se fue goteando sobre una solución 0.2 M de cloruro de calcio bajo agitación vigorosa y se dejaron así durante 3 horas. Las perlas fueron enjuagadas con agua de intercambio iónico y se secaron durante 12 horas a 50 °C.

### **A.2.2. Procedimiento experimental para la remoción de Pb (II).**

Se prepararon soluciones de Pb(II) (10mM, 1mM, 0.1mM) usando  $Pb(NO_3)_2$ . El experimento de sorción fue llevado a cabo colocando ya sea la película de Na-Alg, película de Ca-Alg ó las perlas de Ca-Alg en un vaso de precipitados de boca ancha, el cual contenía 100 mL de la solución de Pb(II). Las muestras se dejaron por 6 horas. Las concentraciones de Pb(II) fueron determinadas con un espectrofotómetro de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (Shimadzu, ICP-7510). Cada experimento fue al menos triplicado bajo condiciones idénticas.

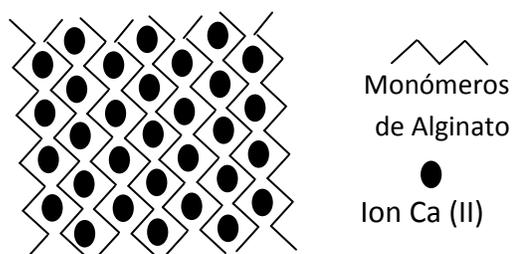
### A.3. Resultados y Discusión.



**Figura A.1.** Porcentaje de remoción de Pb (II) contra tiempo (en minutos).

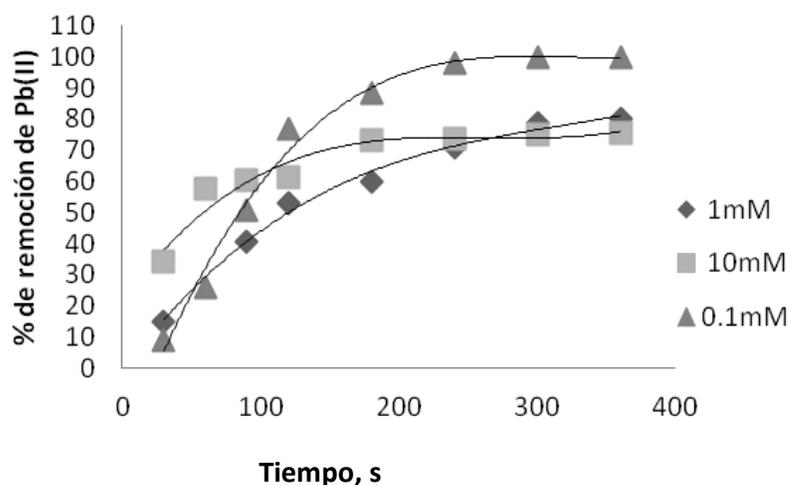
La concentración de alginato al 2% usada en el estudio fue escogida entre tres diferentes concentraciones, 1%, 2% y 2.5%, debido a que procesarlas fue relativamente fácil. La Figura A.1 muestra el desempeño en la remoción de Pb(II) entre las películas de Na-Alg y Ca-Alg. Este experimento fue llevado a cabo por 6 horas en una solución 10 mM de Pb (II). En esta parte del estudio las películas de Ca-Alg mostraron de manera consistente, un mejor desempeño en la remoción de Pb(II) comparado con las películas de Na-Alg. Para ambas muestras la remoción de Pb(II) alcanzó su máximo de adsorción después de 3 horas.

El mejor desempeño en la remoción de Pb(II), mostrado por las películas de Ca-Alg puede ser explicado por la formación del modelo “egg box” (“caja de huevo”) la cuál fue descrita en la introducción. Para las películas de Ca-Alg, la estructura de “caja de huevo” se logró mediante el proceso de entrecruzamiento (cross-linking) usando una solución de Ca(II), la estructura esquemática de Ca-Alg se muestra en la Figura A.2. Por lo tanto, los iones de Ca(II) que están localizados en las cavidades del “egg box” son fácilmente substituidos con iones Pb(II) los cuales tienen una mayor afinidad por el alginato[376-378]. Así como la película de Na-Alg, consiste solamente de monómeros de alginato dispuestos al azar sin ninguna estructura establecida, por lo tanto los iones de Pb(II), los cuales tienen un mayor radio iónico comparado con los iones Ca(II) y Na(I), no pueden enlazarse tan fácilmente con los monómeros de alginato.



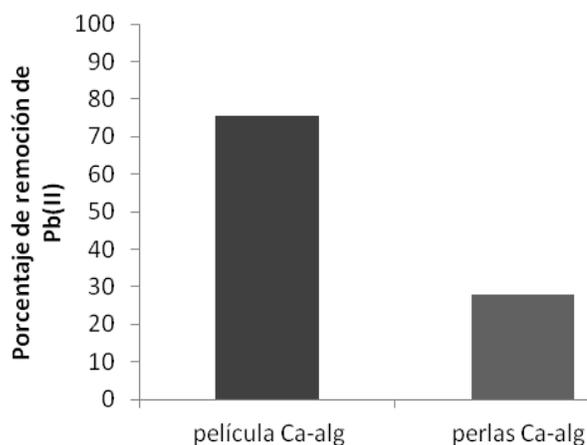
**Figura A.2.** Diagrama esquemático de la estructura del Ca-Alg.

La Figura A.3 muestra los resultados del desempeño en la remoción de Pb(II) mediante una película de Ca-Alg en soluciones de Pb(II) de diferente concentración. Debido a la alta concentración de Pb(II) en la solución 10 mM, el desempeño inicial en la remoción de Pb(II) (esto es, antes de 100 minutos), fue el más alto. Sin embargo, en el rendimiento global en la remoción de Pb(II), las películas de Ca-Alg mostraron el mejor desempeño para soluciones 0.1 mM de Pb(II). Para soluciones 1 mM y 10 mM, el desempeño fue relativamente similar. Los resultados indican que las películas de Ca-Alg tienen una buena capacidad de remoción en soluciones de Pb(II) de concentraciones bajas, en este estudio, son capaces de remover más del 98% de los iones Pb(II) de una solución 1 mM.



**Figura A.3.** Porcentaje de remoción de plomo contra tiempo para películas de Ca-Alg en soluciones de Pb (II) con diferentes concentraciones.

La Figura A.4 muestra la comparación en la remoción de Pb(II) entre películas de Ca-Alg y perlas de Ca-Alg que es el método convencional de preparación de Ca-Alg. El estudio fue llevado a cabo en una solución 10 mM de Pb(II). Los resultados muestran que el Ca-Alg tipo película permite un mayor porcentaje de remoción de Pb(II), este es cerca de 3 veces mayor que para las perlas de Ca-Alg. A esto contribuye la mayor superficie de la película, la cual es mucho mayor que en las perlas con el mismo peso usadas en el experimento, por ello proporcionan una abundancia de sitios activos para enlazarse con el Pb(II).



**Figura A.4.** Porcentaje de remoción de plomo obtenido para películas y perlas de Ca-Alg después de 360 minutos.

#### **A.4. Conclusiones.**

El presente estudio establece que tanto las películas de Ca-Alg como las de Na-Alg son capaces de remover Pb(II), mostrando un mejor desempeño en la remoción de Pb(II) las películas de Ca-Alg. El desempeño en la remoción de Pb(II) entre las películas de Ca-Alg y las perlas de Ca-Alg indican que la superficie efectiva que es expuesta a la solución de Pb(II) es esencial para el desempeño en la remoción de Pb(II). Así mismo, se demostró la utilidad de las películas de alginato de calcio para la remoción de iones de plomo en soluciones acuosas, lo que podría tener una potencial aplicación para la remediación de aguas contaminadas.

## REFERENCIAS.

1. <http://www.am.com.mx/leon/local/54-mil-quanajuatenses-padecen-diabetes-62710.html>. 2013.
2. <http://www.periodicocorreo.com.mx/comunidades/estado/131608-diabetes-segunda-causa-de-muerte.html>. 2013.
3. Orwell, G., 1984. 1949.
4. Brunetti, A., E. Chiefari, and D. Foti, *Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus*. World J Diabetes, 2014. 5(2): p. 128-140.
5. oxfam, <http://site.oxfam.mx/mexico-es-ya-el-mayor-consumidor-de-refresco-en-el-mundo-3/>.
6. CNN, <http://mexico.cnn.com/salud/2013/03/19/mexico-es-el-pais-con-mas-muertes-por-el-consumo-de-refrescos-en-el-mundo>. 2013.
7. alianzasalud-org.mx, <http://alianzasalud.org.mx/2013/03/estudio-internacional-asocia-consumo-de-refrescos-con-mortalidad-y-mexico-ocupa-el-primer-lugar/>.
8. Mendoza, E., *DIAGNOSTICO DE LA CALIDAD DEL AGUA POTABLE EN LAS ZONAS URBANAS DEL ESTADO DE GUANAJUATO*. 1999, Universidad Iberoamericana León. p. 92.
9. Tseng, C.H., et al., *Epidemiologic evidence of diabetogenic effect of arsenic*. Toxicol Lett, 2002. 133: p. 69-76.
10. Mendoza Amezcuita, E., *Diagnóstico de la calidad del agua potable en las zonas urbanas del estado de Guanajuato*. 1999, >Universidad Iberoamericana, Campus León.
11. and J.A.D.R. Coronado-González, Luz María; García-Vargas, Gonzalo; Sanmiguel-Salazar, Francisca; Escobedo-de la Peña, Jorge., *Inorganic arsenic exposure and type 2 diabetes mellitus in Mexico*. Environmental Research, 2007. 104(3).
12. Zheng, Y., et al., *The role of zinc, copper and iron in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications: therapeutic effects by chelators*. Hemoglobin, 2008. 32(1-2): p. 135-45.
13. Liu, Q., et al., *Role of iron deficiency and overload in the pathogenesis of diabetes and diabetic complications*. Curr Med Chem, 2009. 16(1): p. 113-29.
14. Begg, D.P., et al., *Effect of guanylate cyclase-C activity on energy and glucose homeostasis*. Diabetes, 2014.
15. Park J, Y.Y., Han HS, Kim YH, Ogawa Y, Park KG, Lee CH, Kim ST, Koo SH, *SIK2 is critical in the regulation of lipid homeostasis and adipogenesis in vivo*. Diabetes, 2014.
16. Rodriguez Flores, C., et al., *Trace element status in diabetes mellitus 2: Possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications*. Diab Res Clin Pract, 2011. 91: p. 333-341.
17. Aupperle, H., H.A. Schoon, and A. Frank, *Experimental copper deficiency, chromium deficiency and additional molybdenum supplementation in goats--pathological findings*. Acta Vet Scand, 2001. 42(3): p. 311-21.
18. Howell, J.M. and J.S. Kumaratilake, *Effect of intravenously administered tetrathiomolybdate on plasma copper concentrations of copper-loaded sheep*. J Comp Pathol, 1990. 103(3): p. 321-34.
19. Alvarez, H.Y.X., Chandler D. Robinson, Mónica A. Canalizo-Hernández, and R.A.K. Rebecca G. Marvin, Alfonso Mondragón, James E. Penner-Hahn, Thomas V. O'Halloran, *Tetrathiomolybdate Inhibits Copper Trafficking Proteins Through Metal Cluster Formation*. SCIENCE, 2010. 327.
20. Morales, S., J.A. Garcia-Salcedo, and M. Munoz-Torres, *[Pentosidine: a new biomarker in diabetes mellitus complications]*. Med Clin (Barc), 2011. 136(7): p. 298-302.
21. organization, W.h., *ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on surveillance*. 2014.
22. Grant, B., *It's an Antibiotic-Resistant World*. The scientist, 2014.
23. <http://www.jornada.unam.mx/2014/05/02/ciencias/a02n1cie>, *Grave amenaza mundial, la resistencia a los antibióticos: OMS*. 2014.

24. Mellitus, T.E.C.o.t.D.a.C.o.D., *report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes care, 2003. **26**(1).
25. Zimmet, P., K.G.M.M. Alberti, and J. Shaw, *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature, 2001. **414**: p. 782-787
26. [//www.diabetesforum.com/blog/2009/06/the-alarming-statistics-on-diabetes/](http://www.diabetesforum.com/blog/2009/06/the-alarming-statistics-on-diabetes/), h.
27. Sheng, X.Q., K.X. Huang, and H.B. Xu, *Influence of alloxan-induced diabetes and selenite treatment on blood glucose and glutathione levels in mice*. J Trace Elem Med Biol, 2005. **18**(3): p. 261-7.
28. Rudeman, N., J. Williamson, and M. Brownlee, *Glucose and diabetes vascular disease*. Faseb J, 1992. **6**: p. 2905-2914.
29. Mendez, J.D., *AGEs and chronic complications of diabetes mellitus*. Gac Med Mex, 2003. **139**: p. 49-55.
30. Miura, J., et al., *Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation endproducts are correlated to severity of microvascular complications in patients with Type 1 diabetes*. J Diabetes Complications, 2003. **17**(1): p. 16-21.
31. Bucala, R. and H. Vlassara, *Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease*. Am J Kidney Dis, 1995. **26**(6): p. 875-88.
32. Cohen, M.P. and F.N. Ziyadeh, *Role of Amadori-modified nonenzymatically glycosylated serum proteins in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 1996. **7**(2): p. 183-90.
33. Daimon, M., et al., *Increased serum levels of pentosidine, but not carboxymethyl lysine, in type 2 diabetes without obvious diabetic nephropathy*. Diabetes Care, 1999. **22**(5): p. 877-8.
34. Barbagallo, M., et al., *Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X*. Mol Aspects Med, 2003. **24**(1-3): p. 39-52.
35. Friedman, E.A., *Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications*. Diabetes Care, 1999. **22 Suppl 2**: p. B65-71.
36. Kalousova, M., et al., *Advanced glycation end products in clinical nephrology*. Kidney Blood Press Res, 2004. **27**(1): p. 18-28.
37. Endo, M., et al., *Increased levels of vascular endothelial growth factor and advanced glycation end products in aqueous humor of patients with diabetic retinopathy*. Horm Metab Res, 2001. **33**(5): p. 317-22.
38. Hirata, K. and K. Kubo, *Relationship between Blood Levels of N-Carboxymethyl-lysine and Pentosidine and the Severity of Microangiopathy in Type 2 Diabetes*. Endocr J, 2004. **51**(6): p. 537-44.
39. Karachalias, N., et al., *Accumulation of fructosyl-lysine and advanced glycation end products in the kidney, retina and peripheral nerve of streptozotocin-induced diabetic rats*. Biochem Soc Trans, 2003. **31**(Pt 6): p. 1423-5.
40. Singh, R., et al., *Advanced glycation end-products: a review*. Diabetologia, 2001. **44**(2): p. 129-46.
41. Turk, Z., R. Mesic, and B. Benko, *Comparison of advanced glycation endproducts on haemoglobin (Hb-AGE) and haemoglobin A1c for the assessment of diabetic control*. Clin Chim Acta, 1998. **277**(2): p. 159-70.
42. Vlassara, H., M. Brownlee, and A. Cerami, *Nonenzymatic glycosylation: role in the pathogenesis of diabetic complications*. Clin Chem, 1986. **32**(10 Suppl): p. B37-41.
43. Urata, Y., et al., *Reactive oxygen species accelerate production of vascular endothelial growth factor by advanced glycation end products in RAW264.7 mouse macrophages*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(8): p. 688-701.
44. Lalla, E., et al., *Receptor for advanced glycation end products, inflammation, and accelerated periodontal disease in diabetes: mechanisms and insights into therapeutic modalities*. Ann Periodontol, 2001. **6**(1): p. 113-8.
45. Meyer, J., and Spence, D., *A perspective on the role of metals in diabetes: past findings and possible future directions* Metallomics, 2009. **1**(1): p. 32-41.
46. Wyness, L., *Understanding the role of diet in type 2 diabetes prevention*. Br J Community Nurs, 2009. **14**(9): p. 374-9.

47. Kaizu S, K.H., Iwase M, Fujii H, Ohkuma T, Ide H, Jodai T, Kikuchi Y, Idewaki Y, Hirakawa Y, Nakamura U, Kitazono T., *Impact of Leisure-Time Physical Activity on Glycemic Control and Cardiovascular Risk Factors in Japanese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: The Fukuoka Diabetes Registry*. PLoS One, 2014. **9**(6).
48. Hypponen, E., *Micronutrients and the risk of type 1 diabetes: vitamin D, vitamin E, and nicotinamide*. Nutr Rev, 2004. **62**(9): p. 340-7.
49. Soory, M., *Relevance of nutritional antioxidants in metabolic syndrome, ageing and cancer: potential for therapeutic targeting*. Infect Disord Drug Targets, 2009. **9**(4): p. 400-14.
50. Kowluru, R.A., et al., *Inhibition of retinopathy and retinal metabolic abnormalities in diabetic rats with AREDS-based micronutrients*. Arch Ophthalmol, 2008. **126**(9): p. 1266-72.
51. Lau, F.C., et al., *Nutrigenomic basis of beneficial effects of chromium(III) on obesity and diabetes*. Mol Cell Biochem, 2008. **317**(1-2): p. 1-10.
52. Murat, A., et al., *Sodium selenite protects against diabetes -induced alterations in the antioxidant defense system of the liver*. Diabetes/Metab Res Rev, 2006. **22**: p. 295-299.
53. Thompson, K.H. and C. Orvig, *Vanadium in diabetes : 100 years from Phase 0 to Phase I*. J Inorg Biochem 2006. **100**: p. 1925-1935.
54. Wrobel, K., et al., *Effect of Chromium on Glucose Tolerance, Serum Cholesterol and Triglyceride Levels in Occupational Exposure to Trivalent Species, in Type 2 Diabetic Patients and in Control Subjects*. Tr Elem Electrol, 1999. **16**: p. 199-205.
55. Srivastava, A.K. and M.Z. Mehdi, *Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds*. Diabet Med, 2005. **22**(1): p. 2-13.
56. Shindea, U.A., et al., *Insulin sensitising action of chromium picolinate in various experimental models of diabetes mellitus*. J Trace Elem Med Biol, 2004. **18**(1): p. 23-32.
57. Soinio, M., et al., *Serum zinc level and coronary heart disease events in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2007. **30**(3): p. 523-8.
58. Qi, L., et al., *Heme iron from diet as a risk factor for coronary heart disease in women with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2007. **30**(1): p. 101-6.
59. Maret, W. and H.H. Sandstead, *Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation*. J Trace Elem Med Biol, 2006. **20**(1): p. 3-18.
60. Thompson, K.H., M. Battell, and J.H. McNeill, *Toxicology of vanadium in mammals*. Adv Environ Sci Technol 1998. **31**: p. 21-37.
61. Segura, R., et al., *Other relevant components of nuts: phytosterols, folate and minerals*. Br J Nutr, 2006. **96 Suppl 2**: p. S36-44.
62. Choudhury, R.P., et al., *Availability of essential trace elements in medicinal herbs used for Diabetes mellitus and their possible correlations*. J Radioanal Nucl Chem, 2008. **276**: p. 85-93. .
63. Lai, M.H., Y.Y. Chen, and H.H. Cheng, *Chromium yeast supplementation improves fasting plasma glucose and LDL-cholesterol in streptozotocin-induced diabetic rats*. Int J Vitam Nutr Res, 2006. **76**(6): p. 391-7.
64. Bartlett, H.E. and F. Eperjesi, *Nutritional supplementation for type 2 diabetes: a systematic review*. Ophthalmic Physiol Opt, 2008. **28**(6): p. 503-23.
65. Jones, O.A., M.L. Maguire, and J.L. Griffin, *Environmental pollution and diabetes: a neglected association*. Lancet, 2008. **371**(9609): p. 287-8.
66. Lamm, S.H., A. Engel, and M. Feinleib, *Arsenic exposure and diabetes mellitus risk*. J Occup Environ Med, 2006. **48**(10): p. 1001-3; author reply 1003-4.
67. Yoshida, T., H. Yamauchi, and G. Fan Sun, *Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **198**(3): p. 243-52.
68. Hendryx, M. and K.J. Zullig, *Higher coronary heart disease and heart attack morbidity in Appalachian coal mining regions*. Prev Med, 2009. **49**(5): p. 355-9.
69. Silbergeld, E.K. and K. Nachman, *The environmental and public health risks associated with arsenical use in animal feeds*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1140**: p. 346-57.

70. Edwards, J.R. and W.C. Prozialeck, *Cadmium, diabetes and chronic kidney disease*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **238**(3): p. 289-93.
71. Guerrero-Romero, F., et al., *Hypomagnesaemia and risk for metabolic glucose disorders: a 10-year follow-up study*. Eur J Clin Invest, 2008. **38**(6): p. 389-96.
72. Bleys, J., A. Navas-Acien, and E. Guallar, *Selenium and diabetes: more bad news for supplements*. Ann Intern Med, 2007. **147**(4): p. 271-2.
73. Tseng, C.H., *The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **197**(2): p. 67-83.
74. Nordberg, G.F., *Historical perspectives on cadmium toxicology*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **238**(3): p. 192-200.
75. Bener, A., et al., *Association between blood levels of lead, blood pressure and risk of diabetes and heart disease in workers*. Int Arch Occup Environ Health, 2001. **74**(5): p. 375-8.
76. Kang, J.O., *Chronic iron overload and toxicity: clinical chemistry perspective*. Clin Lab Sci, 2001. **14**(3): p. 209-19; quiz 222.
77. Domingo, J.L., *Vanadium and tungsten derivatives as antidiabetic agents: a review of their toxic effects*. Biol Trace Elem Res, 2002. **88**(2): p. 97-112.
78. Domingo, J.L., *Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity*. Reprod Toxicol, 1996. **10**(3): p. 175-82.
79. Crist, J., Martin, J., Chanko, J., Crist, D., , *Uptake of metals on peat moss: an ion-exchange process*. Environmental Science Technology, 1996. **30**: p. 2456-2461.
80. Hallfrisch, J., et al., *Water content of minerals associated with type 2 diabetes mellitus of samples collected on the Navajo reservation, in Trace Elements in Man and Animals 10, Proceedings of the International Symposium on Trace Elements in Man and Animals], 10th, Evian, France, May 2-7, 1999 (2000)*. 2000. p. 519-521.
81. Carrillo-Chavez, A., et al., *Environmental geochemistry of the Guanajuato Mining District, Mexico*. Ore Geol. Rev., 2003. **23**: p. 277-297.
82. Garcia-Meza, V., et al., *Mineralogical and chemical characterization of historical mine tailings from the Valenciana mine, Guanajuato, Mexico: Environmental implications*. Bull Environ Contam Toxicol, 2004. **72**: p. 170-177.
83. Landero Figueroa, J.A., *Estudio sobre diferentes aspectos de especiación de elementos traza en material de plantas con enfoque a las fitoquelatinas, tesis de doctorado, Posgrado en Química, Universidad de Guanajuato 2009*.
84. Mendoza Amezcua, E., *Diagnostico de la calidad del agua potable en la zona urbana del Estado de Guanajuato enfocado a metales traza, tesis de maestría, Universidad Iberoamericana, campus en León*. 1999.
85. Morton-Bermea, O., et al., *Determination of metals for leaching experiments of mine tailings: Evaluation of potential environmental hazard in the Guanajuato mining district, Mexico*. Bull Environ Contam Toxicol, 2004. **73**: p. 770-776.
86. Ramos Arroyo, Y.R. and C. Siebe, Catena, 2007. **71**: p. 497.
87. Querol, S.F., G.K. Lowther, and E. Navarro, *Mineral deposits of the Guanajuato Mining District, Guanajuato, in Econ. Geol. Mex., GSA, G.P. Salas, Editor*. 1991. p. 403-414.
88. *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia*. [http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes\\_new.pdf](http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes_new.pdf), 2006.
89. *Diabetes en el mundo*. <http://www.idf.org/espa%C3%B1ol>, 2010.
90. SSA, *Programa de acción específico 2007-2012. Diabetes mellitus*. <http://www.cenave.gob.mx/progaccion/diabetes.pdf>, 2008.
91. SINAIS, *Principales causas de mortalidad general*. Sistema Nacional de Información de Salud, 2008.
92. 2012, E., <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>. 2012.
93. ENSANUT, *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006* <http://www.dof.gob.mx/documentos/3868/Salud/Salud.htm> 2006.

94. SINAIS, *Casos nuevos de diabetes en el estado de Guanajuato. De la semana 1 hasta la semana 52 del 2008*, S.N.d.S.D.g.d. epidemiologia, Editor. 2009.
95. SINAIS, *Casos nuevos de diabetes en el estado de Guanajuato. De la semana 1 hasta la semana 52 del 2009*, S.N.d.S.D.g.d. epidemiologia, Editor. 2010.
96. salud, S.d., *Programa de accion específico 2007-2012. Diabetes mellitus*. subsecretaria de prevención y promoción de la salud, 2008.
97. [/www.cenave.gob.mx/progaccion/diabetes.pdf](http://www.cenave.gob.mx/progaccion/diabetes.pdf), h. *Programa de acción específico Diabetes mellitus 2007-2012*.
98. Valko, M., H. Morris, and M.T. Cronin, *Metals, toxicity and oxidative stress*. Curr Med Chem, 2005. **12**(10): p. 1161-208.
99. Afridi, H.I., et al., *Status of essential trace metals in biological samples of diabetic mother and their neonates*. Arch Gynecol Obstet, 2009. **280**(3): p. 415-23.
100. Elamin, A. and T. Tuvemo, *Magnesium and insulin-dependent diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 1990. **10**(3): p. 203-9.
101. Serdar, M.A., et al., *Trace and toxic element patterns in nonsmoker patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus, impaired glucose tolerance, and fasting glucose*. Int J Diabetes Dev Ctries, 2009. **29**(1): p. 35-40.
102. Thompson, K. and D. Godin, *Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes*. Nutrition Research 1995. **15**(9): p. 1377-1410.
103. Bhanot, S., K.H. Thompson, and J.H. McNeill, *Essential trace elements of potential importance in nutritional management of diabetes mellitus* Nutrition Research, 1994. **14**(4): p. 593-604.
104. Houstis, N., E.D. Rosen, and E.S. Lander, *Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance*. Nature, 2006. **440**(7086): p. 944-8.
105. Ercal, N., H. Gurer-Orhan, and N. Aykin-Burns, *Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage*. Curr Top Med Chem, 2001. **1**(6): p. 529-39.
106. Wrobel, K., et al., *Efect of chromium on glucose tolerance, serum cholesterol and triglyceride levels in occupational exposure to trivalent speciers in type 2 diabetic patients and in control subjects*. Tr Elem Electrol, 1999. **16**: p. 199-205.
107. Kornhauser, C., et al., *Serum selenium and glutathione peroxidase concentrations in type 2 diabetes mellitus patients*. Prim Care Diabetes, 2008. **2**(2): p. 81-5.
108. Bhanot, S.T., K., McNeill, J., *Essential trace elements of potential importance in nutritional management of diabetes mellitus* Nutrition Research, 1994. **14**(4): p. 593-604.
109. Ghosh, D., et al., *Role of chromium supplementation in Indians with type 2 diabetes mellitus*. J Nutr Biochem, 2002. **13**(11): p. 690-697.
110. Thompson, K.H., et al., *Vanadium treatment of type 2 diabetes: a view to the future*. J Inorg Biochem, 2009. **103**(4): p. 554-8.
111. Marcason, W., *What is the latest research on the connection between selenium and diabetes?* J Am Diet Assoc, 2008. **108**(1): p. 188.
112. Beckett, G.J. and J.R. Arthur, *Selenium and endocrine systems*. J Endocrinol, 2005. **184**(3): p. 455-65.
113. Karmaker, S., et al., *A Zinc(II)/poly(gamma-glutamic acid) complex as an oral therapeutic for the treatment of type-2 diabetic KKAY mice*. Macromol Biosci, 2009. **9**(3): p. 279-86.
114. Yasumatsu, N., et al., *Antidiabetic copper(II)-picolinate: impact of the first transition metal in the metallopicolinate complexes*. Bioorg Med Chem, 2007. **15**(14): p. 4917-22.
115. Mathews, C., Holde, K., Ahern, K., *Bioquímica*. 1a ed, ed. P. Educación. 2002, Madrid: Pearson Educación. 1368.
116. Barrett, J.R., *Mother load: arsenic may contribute to gestational diabetes*. Environ Health Perspect, 2009. **117**(7): p. A310.
117. Marreiro, D.N., et al., *Urinary excretion of zinc and metabolic control of patients with diabetes type 2*. Biol Trace Elem Res, 2007. **120**(1-3): p. 42-50.
118. Hasan, N.A., *Effects of trace elements on albumin and lipoprotein glycation in diabetic retinopathy*. Saudi Med J, 2009. **30**(10): p. 1263-71.

119. Kazi, T.G., et al., *Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients*. Biol Trace Elem Res, 2008. **122**(1): p. 1-18.
120. Afridi, H.I., et al., *Evaluation of status of toxic metals in biological samples of diabetes mellitus patients*. Diabetes Res Clin Pract, 2008. **80**(2): p. 280-8.
121. Al-Saleh, E., et al., *Maternal-foetal status of copper, iron, molybdenum, selenium and zinc in obese gestational diabetic pregnancies*. Acta Diabetol, 2007. **44**(3): p. 106-13.
122. Aguilar, M.V., et al., *Plasma mineral content in type-2 diabetic patients and their association with the metabolic syndrome*. Ann Nutr Metab, 2007. **51**(5): p. 402-6.
123. Alarcón-Corredor, O.M., *Los elementos traza*. Revista médica de la extensión portuguesa, 2009. **4**(5): p. 107-124.
124. Sadi, G. and T. Guray, *Gene expressions of Mn-SOD and GPx-1 in streptozotocin-induced diabetes: effect of antioxidants*. Mol Cell Biochem, 2009. **327**(1-2): p. 127-34.
125. Oberley, L., *Free radicals and diabetes*. Free Radical Biology and Medicine 1988. **5**(2): p. 113-124.
126. Sajithlal, G., Chithra, P., Chandrakasan, G., *The Role of Metal -Catalyzed Oxidation in the Formation of Advanced Glycation End Products: An In Vitro Study on Collagen* Free Radical Biology and Medicine 1998. **25**(3): p. 265-269.
127. Squadrito, G.L. and W.A. Pryor, *Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide*. Free Radic Biol Med, 1998. **25**(4-5): p. 392-403.
128. Fridovich, I., *Encyclopedia of Biological Chemistry* Vol. 4. 2004, Durham: Elsevier. 135-138.
129. Batinic-Haberle, I., J.S. Reboucas, and I. Spasojevic, *Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential*. Antioxid Redox Signal. **13**(6): p. 877-918.
130. Benov, L. and I. Batinic-Haberle, *A manganese porphyrin suppresses oxidative stress and extends the life span of streptozotocin-diabetic rats*. Free Radic Res, 2005. **39**(1): p. 81-8.
131. Loven, D.P., et al., *Superoxide dismutase activity in the intestine of the streptozotocin-diabetic rat*. Endocrinology, 1982. **111**(3): p. 737-42.
132. Spasojevic, I., et al., *Mn porphyrin-based superoxide dismutase (SOD) mimic, MnIIIITE-2-PyP5+, targets mouse heart mitochondria*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(8): p. 1193-200.
133. Brigelius-Flohé, R., *Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **27**( 9-10 ): p. 951-965.
134. Olivares-Corichi, I., Guzmán-Grenfell, A., Sierra, M., Mendoza, R., Hicks, J., *Perspectivas del uso de antioxidantes como coadyuvantes en el tratamiento del asma*. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex, 2005. **18**(2): p. 154-161.
135. Boosalis, M.G., *The role of selenium in chronic disease*. Nutr Clin Pract, 2008. **23**(2): p. 152-60.
136. Zwolinska, D., et al., *Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in children on maintenance dialysis*. Pediatr Nephrol, 2006. **21**(5): p. 705-10.
137. Ogunro, P.S., et al., *Plasma Selenium Concentration and Glutathione Peroxidase Activity in HIV-1/AIDS Infected Patients: A Correlation with the Disease Progression*. Niger Postgrad Med J, 2006. **13**(1): p. 1-5.
138. Kornhauser, C., et al., *Serum selenium and glutathione peroxidase concentrations in type 2 diabetes mellitus patients* Primary Diab Care, 2008. **2**: p. 81-85.
139. Yoshimoto, S., et al., *Effect of chromium administration on glucose tolerance in stroke-prone spontaneously hypertensive rats with streptozotocin-induced diabetes*. Metabolism, 1992. **41**(6): p. 636-42.
140. Corazza, M., et al., *Nickel contact dermatitis due to the needle of an infusion pump, confirmed by microanalysis*. Contact Dermatitis, 1998. **39**(3): p. 144.
141. Fowler, J.F., Jr., *Systemic contact dermatitis caused by oral chromium picolinate*. Cutis, 2000. **65**(2): p. 116.
142. Sargent, T., 3rd, T.H. Lim, and R.L. Jenson, *Reduced chromium retention in patients with hemochromatosis, a possible basis of hemochromatotic diabetes*. Metabolism, 1979. **28**(1): p. 70-9.
143. Stearns, D.M., *Is chromium a trace essential metal?* Biofactors, 2000. **11**(3): p. 149-62.

144. Tanaka, A., et al., *Role of copper ion in the pathogenesis of type 2 diabetes*. *Endocr J*, 2009. **56**(5): p. 699-706.
145. Gillery, P., Monboisse, J., Maquart, F., Borel, J. , *Does oxygen free radical increased formation explain long term complications of diabetes mellitus?* . *Medical Hypotheses*1989. **29**(1): p. 47- 50.
146. Goldstein, S., D. Meyerstein, and G. Czapski, *The Fenton reagents*. *Free Radic Biol Med*, 1993. **15**(4): p. 435-45.
147. Pawlak, K., Pawlak, D., Mysliwiec, M., *Cu/ Zn superoxide dismutase plasma levels as a new useful clinical biomarker of oxidative stress in patients with end-stage renal disease* *Clinical Biochemistry*, 2005. **38**(8): p. 700-705.
148. Baruch-Suchodolsky, R. and B. Fischer, *Can nucleotides prevent Cu-induced oxidative damage?* *J Inorg Biochem*, 2008. **102**(4): p. 862-81.
149. Cooper, G.J., et al., *Demonstration of a hyperglycemia-driven pathogenic abnormality of copper homeostasis in diabetes and its reversibility by selective chelation: quantitative comparisons between the biology of copper and eight other nutritionally essential elements in normal and diabetic individuals*. *Diabetes*, 2005. **54**(5): p. 1468-76.
150. Uriu-Adams, J.Y., et al., *Diabetes and dietary copper alter 67Cu metabolism and oxidant defense in the rat*. *J Nutr Biochem*, 2005. **16**(5): p. 312-20.
151. Rajpathaka, S., Crandallb, J., Wylie-Rosetta, J., Kabata, G., Rohan, T., Hu, F., *The role of iron in type 2 diabetes in humans* *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005. **16**(5): p. 312-320.
152. Van Campenhout, A., et al., *Iron-binding antioxidant capacity is impaired in diabetes mellitus*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **40**(10): p. 1749-55.
153. Mojiminiyi, O., Marouf, R., Abdella,N., *Body iron stores in relation to the metabolic syndrome, glycemic control and complications in female patients with type 2 diabetes*. *European Journal of Pharmacology* 2007. **565**(1-3): p. 232-239.
154. Rajpathak, S.N., et al., *The role of iron in type 2 diabetes in humans*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1790**(7): p. 671-81.
155. Meneghini, R., *Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage*. *Free Radic Biol Med*, 1997. **23**(5): p. 783-92.
156. Afkhami-Ardekani, M., Rashidi, M., *Iron status in women with and without gestational diabetes mellitus*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2000. **14**(1): p. 21-27.
157. Bo, S., et al., *Iron supplementation and gestational diabetes in midpregnancy*. *Am J Obstet Gynecol*, 2009. **201**(2): p. 158 e1-6.
158. Mojiminiyi, O.A., R. Marouf, and N.A. Abdella, *Body iron stores in relation to the metabolic syndrome, glycemic control and complications in female patients with type 2 diabetes*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008. **18**(8): p. 559-66.
159. Rajpathak, S., et al., *Iron intake and the risk of type 2 diabetes in women: a prospective cohort study*. *Diabetes Care*, 2006. **29**(6): p. 1370-6.
160. Ma, J., et al., *Associations of serum and dietary magnesium with cardiovascular disease, hypertension, diabetes, insulin, and carotid arterial wall thickness: the ARIC study*. *Atherosclerosis Risk in Communities Study*. *J Clin Epidemiol*, 1995. **48**(7): p. 927-40.
161. Corica, F., et al., *Effects of oral magnesium supplementation on plasma lipid concentrations in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus*. *Magnes Res*, 1994. **7**(1): p. 43-7.
162. Mogre, K., S.J. Kashalikar, and S.M. Kendurkar, *Effect of Mn<sup>++</sup> on blood sugar level in rats*. *Indian J Physiol Pharmacol*, 1982. **26**(3): p. 227-30.
163. Nomiya, T., et al., *The polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients*. *J Hum Genet*, 2003. **48**(3): p. 138-41.
164. Petrovic, M.G., I. Cilensek, and D. Petrovic, *Manganese superoxide dismutase gene polymorphism (V16A) is associated with diabetic retinopathy in Slovene (Caucasians) type 2 diabetes patients*. *Dis Markers*, 2008. **24**(1): p. 59-64.

165. Rodriguez-Mulero, S. and E. Montanya, *Islet graft response to transplantation injury includes upregulation of protective as well as apoptotic genes*. Cell Transplant, 2008. **17**(9): p. 1025-34.
166. Stranges, S., et al., *A prospective study of dietary selenium intake and risk of type 2 diabetes*. BMC Public Health. **10**: p. 564.
167. Mueller, A.S., et al., *Selenium and diabetes: an enigma?* Free Radic Res, 2009. **43**(11): p. 1029-59.
168. Can, B., et al., *Selenium treatment protects diabetes-induced biochemical and ultrastructural alterations in liver tissue*. Biol Trace Elem Res, 2005. **105**(1-3): p. 135-50.
169. Ayaz, M. and B. Turan, *Selenium prevents diabetes-induced alterations in [Zn<sup>2+</sup>] and metallothionein level of rat heart via restoration of cell redox cycle*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(3): p. H1071-80.
170. Fairweather-Tait, S., et al., *Selenium in Human Health and Disease*. Antioxid Redox Signal.
171. Sies, H., *Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic*. Free Radical Biology and Medicine 1993. **14**(3): p. 313-323
172. Ulusu, N.N. and B. Turan, *Beneficial effects of selenium on some enzymes of diabetic rat heart*. Biol Trace Elem Res, 2005. **103**(3): p. 207-16.
173. Ozdemir, S., et al., *Effect of selenite treatment on ultrastructural changes in experimental diabetic rat bones*. Biol Trace Elem Res, 2005. **107**(2): p. 167-79.
174. Appelblad, P.K., D.C. Baxter, and J.O. Thunberg, *Determination of metal-humic complexes, free metal ions and total concentrations in natural waters*. J Environ Monit, 1999. **1**(3): p. 211-7.
175. Quraishi, I., et al., *Role of zinc and zinc transporters in the molecular pathogenesis of diabetes mellitus*. Med Hypotheses, 2005. **65**(5): p. 887-892.
176. Pai, L., Prasad, A, *Cellular zinc in patients with diabetes mellitus* Coordination Chemistry Reviews, 1988. **253**(21-22): p. 2588-2598.
177. Sjögren A., E., L., Flgrén C., Abdulla M., *Zinc and copper in striated muscle and body fluids from subjects with diabetes mellitus type I* Toxicology and Applied Pharmacology, 1986. **197**(2): p. 67-83.
178. Donaldson, D., Smith, C., Koh, E, *Effects of obesity and diabetes on tissue zinc and copper concentrations in the zucker rat* Nutrition Research, 1994. **14**(4): p. 593-604.
179. Jansen, J., W. Karges, and L. Rink, *Zinc and diabetes--clinical links and molecular mechanisms*. J Nutr Biochem, 2009. **20**(6): p. 399-417.
180. Priel, T., B. Aricha-Tamir, and I. Sekler, *Clioquinol attenuates zinc-dependent beta-cell death and the onset of insulinitis and hyperglycemia associated with experimental type I diabetes in mice*. Eur J Pharmacol, 2007. **565**(1-3): p. 232-9.
181. Horrobin, D., Cunnane, S, *Interactions between zinc, essential fatty acids and prostaglandins: Relevance to acrodermatitis enteropathica, total parenteral nutrition, the glucagonoma syndrome, diabetes, anorexia nervosa and sickle cell anaemia* Toxicology and Applied Pharmacology, 2004. **196**(1): p. 114-123.
182. Priel, T., Aricha-Tamir, B., Sekler, I., *Clioquinol attenuates zinc-dependent  $\beta$ -cell death and the onset of insulinitis and hyperglycemia associated with experimental type I diabetes in mice* Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2008. **18**(8): p. 559-566.
183. Sprietsma, J.E. and G.E. Schuitemaker, *Diabetes can be prevented by reducing insulin production*. Med Hypotheses, 1994. **42**(1): p. 15-23.
184. Priel, T. and M. Hershinkel, *Zinc influx and physiological consequences in the beta-insulinoma cell line, Min6*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **346**(1): p. 205-12.
185. Thompson, K.H., et al., *Comparison of anti-hyperglycemic effect amongst vanadium, molybdenum and other metal maltol complexes*. J Inorg Biochem, 2004. **98**(5): p. 683-90.
186. Seifert, M., Dorn, W., Muller, R., Holzinger, S., and Anke, M., *The Biological and Toxicological Importance of Molybdenum in the Environment and in the Nutrition of Plants, Animals and Man Part III. Molybdenum Content of the Food*. Acta alimentaria, 2009. **38**: p. 471-481.
187. Anke, M. and M. Seifert, *The biological and toxicological importance of molybdenum in the environment and in the nutrition of plants, animals and man. Part 1: Molybdenum in plants*. Acta Biol Hung, 2007. **58**(3): p. 311-24.

188. Levina, A., et al., *Reactivity of potential anti-diabetic molybdenum(VI) complexes in biological media: a XANES spectroscopic study*. J Inorg Biochem, 2007. **101**(11-12): p. 1586-93.
189. Rodríguez , C., Preciado, M., Wrobel, K., Garay Sevilla, M.E. , Wrobel, K. "Estatus de metales/metaloideos en pacientes con complicaciones de diabetes mellitus tipo 2: Posible papel de molibdeno en el progreso de enfermedad". in XIV Congreso ALAD. 2010. Santiago de Chile, Chile.
190. Frank, A., et al., *A syndrome of molybdenosis, copper deficiency, and type 2 diabetes in the moose population of south-west Sweden*. Sci Total Environ, 2000. **249**(1-3): p. 123-31.
191. Anke, M., et al., *The biological and toxicological importance of molybdenum in the environment and in the nutrition of plants, animals and man. Part 2: Molybdenum in animals and man*. Acta Biol Hung, 2007. **58**(3): p. 325-33.
192. Stohs, S.J. and D. Bagchi, *Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions*. Free Radic Biol Med, 1995. **18**(2): p. 321-36.
193. Woods, J.S. and M.E. Ellis, *Up-regulation of glutathione synthesis in rat kidney by methyl mercury. Relationship to mercury-induced oxidative stress*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(10): p. 1719-24.
194. Levine, S.N., G.B. Sonnier, and K. Abreo, *Effects of diabetes mellitus and aluminum toxicity on myocardial calcium transport*. Toxicology, 1990. **65**(1-2): p. 137-48.
195. Nagaraj, G., et al., *Tooth element levels indicating exposure profiles in diabetic and hypertensive subjects from Mysore, India*. Biol Trace Elem Res, 2009. **131**(3): p. 255-62.
196. Slodowska-Hajduk, Z., *[Effect of cadmium and lead compounds on behavior of some enzymes in peripheral blood of rats with experimental diabetes]*. Folia Med Cracov, 1992. **33**(1-4): p. 73-83.
197. Diaz-Villasenor, A., et al., *Arsenic-induced alteration in the expression of genes related to type 2 diabetes mellitus*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **225**(2): p. 123-33.
198. Walton, F.S., et al., *Inhibition of insulin-dependent glucose uptake by trivalent arsenicals: possible mechanism of arsenic-induced diabetes*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **198**(3): p. 424-33.
199. Paul, D.S., et al., *Examination of the effects of arsenic on glucose homeostasis in cell culture and animal studies: development of a mouse model for arsenic-induced diabetes*. Toxicol Appl Pharmacol, 2007. **222**(3): p. 305-14.
200. Grotto, D., et al., *Mercury exposure and oxidative stress in communities of the Brazilian Amazon*. Sci Total Environ. **408**(4): p. 806-11.
201. Ilback, N.G., J. Fohlman, and G. Friman, *Changed distribution and immune effects of nickel augment viral-induced inflammatory heart lesions in mice*. Toxicology, 1994. **91**(2): p. 203-19.
202. Cartana, J. and L. Arola, *Nickel-induced hyperglycaemia: the role of insulin and glucagon*. Toxicology, 1992. **71**(1-2): p. 181-92.
203. Koppenaal, D.W. and G.M. Hieftje, *Metallomics - the future of atomic spectroscopy?* J Anal At Spectrom, 2007. **22**: p. 111.
204. Haraguchi, H., *New development of chemical speciation analysis for metallomics research*. Biomedical Research on Trace Elements, 2005. **16**: p. 217-232.
205. Jakubowski, N., R. Lobinski, and L. Moens, *Metallobiomolecules. The basis of life, the challenge of atomic spectroscopy*. J Anal At Spectrom, 2004. **19**: p. 1-4.
206. Lopez-Barea, J. and J.L. Gomez-Ariza, *Environmental proteomics and metallomics*. Proteomics, 2006. **6 Suppl 1**: p. S51-62.
207. Arruda, M.A.Z. and R.A. Azevedo, *Metallomics and chemical speciation: towards a better understanding of metal-induced stress in plants*. Ann Appl Biol, 2009. **155**(3): p. 301-307.
208. Haraguchi, H., *Metallomics as integrated biometal science*. J Anal At Spectrom, 2004. **19**: p. 5.14.
209. Gomez Ojeda, A., *Determinación de metales pesados en aguas del Estado de Guanajuato por espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción*. tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Guanajuato, 2008.
210. Landero Figueroa, J.A., et al., *Perfil de Elementos Metálicos y de Algunos Metaloides en Aguas de Grifo de la Ciudad de Guanajuato*. Acta Universitaria, 2008. **17**: p. 5-10.
211. Landero Figueroa, J.A., et al., *Effect of some heavy metals and soil humic substances on the phytochelatin production in wild plants from silver mine areas of Guanajuato, Mexico*. Chemosphere, 2008. **70**: p. 2084-2091.

212. Landero Figueroa, J.A., K. Wrobel, and K. Wrobel, *Diagnóstico de la calidad del agua en el río Lerma, estado de Guanajuato, con enfoque en los contenidos totales de elementos metálicos y de algunos metaloides*. Memorias de 9<sup>o</sup> Reunión de Egresados del Instituto de Investigaciones Médicas de la Universidad de Guanajuato, 6-7 de Agosto del 2009, León, Gto, 2009: p. 31-35.
213. Wrobel, K., J.A. Landero Figueroa, and K. Wrobel, *Phytochelatin in the wild plants from Guanajuato city - an important silver and gold mining center in Mexico*, in *Causes and effects of heavy metal pollution*, M.L. Sanchez, Editor. 2008, Novapublisher.
214. Maldonado Santoyo, M., *desarrollo de nuevos procedimientos analíticos de especiación de metales y metaloides en muestras de relevancia medio ambiental con el uso de ICP-MS como detector específico de elementos*. 2011, Universidad de Guanajuato.
215. Acevedo Aguilar, F., et al., *Hexavalent chromium removal in vitro and from industrial wastes using chromate-resistant strains of filamentous fungi indigenous from contaminated*. Can J Microbiol, 2006. **52**: p. 809-815.
216. Coreño Alonso, A., et al., *Cr(VI) reduction by an Aspergillus tubingensis strain: Role of carboxylic acids and implications for natural attenuation and biotreatment of Cr(VI) contamination*. Chemosphere, 2009. **76**: p. 43-47.
217. Tietz.
218. Sell, D.R., et al., *Pentosidine: a molecular marker for the cumulative damage to proteins in diabetes, aging, and uremia*. Diabetes Metab Rev, 1991. **7**(4): p. 239-51.
219. Mao, Y., et al., *The involvement of advanced glycation endproducts (AGEs) in renal injury of diabetic glomerulosclerosis: association with phenotypic change in renal cells and infiltration of immune cells*. Clin Exp Nephrol, 2003. **7**(3): p. 201-9.
220. Heidland, A., K. Sebekova, and R. Schinzel, *Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease*. Am J Kidney Dis, 2001. **38**(4 Suppl 1): p. S100-6.
221. Hofmann, S.M., et al., *Improved insulin sensitivity is associated with restricted intake of dietary glycoxidation products in the db/db mouse*. Diabetes, 2002. **51**(7): p. 2082-9.
222. Tessier, F.J. and C. Niquet, *The metabolic, nutritional and toxicological consequences of ingested dietary Maillard reaction products: a literature review*. J Soc Biol, 2007. **201**: p. 199-207.
223. Wrobel, K., et al., *Novel analytical approach to monitoring advanced glycosylation end products in human serum with on-line spectrophotometric and spectrofluorometric detection in a flow system*. Clin Chem, 1997. **43**(9): p. 1563-9.
224. Singh, V.P., et al., *Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications*. Korean J Physiol Pharmacol, 2014. **18**(1): p. 1-14.
225. Monnier, V.M., et al., *The mechanism of collagen cross-linking in diabetes: a puzzle nearing resolution*. Diabetes, 1996. **45 Suppl 3**: p. S67-72.
226. Morales, S., J.A. Garcia-Salcedo, and M. Munoz-Torres, *[Pentosidine: a new biomarker in diabetes mellitus complications]*. Med Clin (Barc). **136**(7): p. 298-302.
227. Yamamoto, M., et al., *Serum pentosidine levels are positively associated with the presence of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(3): p. 1013-9.
228. Henle, T., U. Schwarzenbolz, and H. Klostermeyer, *Detection and quantification of pentosidine in foods*. Zeitsch Lebens Untersuch Forsch A, 1997. **204**: p. 95-98.
229. Somoza, V., et al., *Dietary bread crust advanced glycation end products bind to the receptor for AGEs in HEK-293 kidney cells but are rapidly excreted after oral administration to healthy and subtotaly nephrectomized rats*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1043**: p. 492-500.
230. Chao, P.C., C.C. Hsu, and M.C. Yin, *Analysis of glycativ products in sauces and sauce-treated foods*. Food Chem, 2009. **113**, **262-266**.
231. Henle, T., *Maillard reactions of food proteins: chemical, nutritional and functional aspects*. Nahrung, 2001. **45**(3): p. 149.
232. Van Boekel, M.A.J.S., *Effect of heating on Maillard reactions in milk*. Food Chemistry, 1998. **62**(4): p. 403-14.

233. Erbersdobler, H.F. and V. Somoza, *Forty Years of furosine - forty years of using Maillard reaction products as indicators of nutritional quality of foods*. Mol Nutr & Food Res, 2007. **51**: p. 423-430.
234. Salman, A.G., et al., *Pentosidine - a new biochemical marker in diabetic retinopathy*. Ophthalmic Res, 2009. **42**(2): p. 96-8.
235. Matsumoto, K., et al., *Immunohistochemical detection of advanced glycation end products in human bladder with specific monoclonal antibody*. Int J Urol, 2009. **16**(4): p. 402-5; discussion 405-6.
236. Sanaka, T., et al., *Plasma pentosidine levels measured by a newly developed method using ELISA in patients with chronic renal failure*. Nephron, 2002. **91**(1): p. 64-73.
237. Scheijen, J.L., et al., *Measurement of pentosidine in human plasma protein by a single-column high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(7): p. 610-4.
238. Slowik-Zylka, D., et al., *A sensitive and specific HPLC method for the determination of total pentosidine concentration in plasma*. J Biochem Biophys Methods, 2004. **61**(3): p. 313-29.
239. Bravo Covarrubias, A., *tesis de licenciatura in Departamento de Química,, Universidad de Guanajuato*. 2012.
240. Thornalley, P.J., *Endogenous alpha-oxoaldehydes and formation of protein and nucleotide advanced glycation endproducts in tissue damage*. Novartis Found Symp, 2007. **285**: p. 229-43; discussion 243-6.
241. Thornalley, P.J., *Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1043**: p. 111-7.
242. Nemet, I., L. Varga-Defterdarovic, and Z. Turk, *Methylglyoxal in food and living organisms*. Mol Nutr Food Res, 2006. **50**: p. 1105-1117.
243. Rabbani, N. and P.J. Thornalley, *Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders*. Sem Cell & Develop Biol 2011. **22**: p. 309-317.
244. Han, Y., et al., *Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes*. Mol Cell Biochem, 2007. **305**(1-2): p. 123-31.
245. Sejersen, H. and S.I. Rattan, *Dicarbonyl-induced accelerated aging in vitro in human skin fibroblasts*. Biogerontology, 2009. **10**(2): p. 203-11.
246. Chaplen, F.W.R., W.E. Fahl, and D.C. Cameron, *Detection of Methylglyoxal as a Degradation Product of DNA and Nucleic Acid Components Treated with Strong Acid*. Anal Biochem, 1996. **236**: p. 262-269.
247. Cordeiro, C. and A.P. Freire, *Methylglyoxal assay in cells as 2-methylquinoxaline using 1,2-diaminobenzene as derivatizing reagent*. Anal Biochem, 1996. **234**: p. 221-224.
248. Kumar, M.S., et al., *Effect of dicarbonyl-induced browning on alpha-crystallin chaperone-like activity: physiological significance and caveats of in vitro aggregation assays*. Biochem J, 2004. **379**(Pt 2): p. 273-82.
249. Nakayama, K., et al., *Plasma alpha-oxoaldehyde levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease patients*. Am J Nephrol, 2008. **28**(6): p. 871-8.
250. Cantero, A.V., et al., *Methylglyoxal induces advanced glycation end product (AGEs) formation and dysfunction of PDGF receptor-beta: implications for diabetic atherosclerosis*. FASEB J, 2007. **21**(12): p. 3096-106.
251. Zatterale, A., et al., *Oxidative stress biomarkers in four Bloom syndrome (BS) patients and in their parents suggest in vivo redox abnormalities in BS phenotype*. Clin Biochem, 2007. **40**(15): p. 1100-3.
252. Wilker, S.C., et al., *Chromatographic Quantification of Argpyrimidine, a Methylglyoxal-Derived Product in Tissue Proteins: Comparison with Pentosidine*. Anal Biochem, 2001. **290**: p. 353-358.
253. Wu, M.Y., et al., *A novel derivatization approach for simultaneous determination of glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone in plasma by gas chromatography-mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2008. **1204**: p. 81-86.

254. Khuhawar, M.Y., A.J. Kandhro, and F.D. Khand, *Liquid chromatographic determination of glyoxal and methylglyoxal from serum of diabetic patients using meso-stilbenediamine as derivatizing reagent*. Anal Lett, 2006. **39**(10): p. 2205-2215.
255. Wrobel, K., *reporte técnico del proyecto CONCYTEG GTO-2006-C01-23681*. 2009.
256. Wrobel, K., et al., *Studies on Bioavailability of Some Bulk and Trace Elements in Mexican Tortilla Using Gut Model In-Vitro*. Biol Tr Elem Res, 1999. **68**: p. 97-106.
257. Rodriguez Flores, C., et al., *Analisis comparativo de los niveles de concentración de elementos metálicos en orinas de niños en Salamanca y en Penjamo*. Memorias de 8° Reunión de Egresados del Instituto de Investigaciones Médicas de la Universidad de Guanajuato, 10-11 de Abril del 2008, León, Gto.: p. 61-70.
258. Rodriguez Flores, C., et al., *Trace elements status in diabetes mellitus type 2: possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications*. Diabetes Res Clin Pract, 2011. **91**: p. 333-341.
259. INEGI, <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/ccpv/cpv2005/Default.aspx>. 2005.
260. Frank, A., *A review of the "mysterious" wasting disease in Swedish moose (Alces alces L.) related to molybdenosis and disturbances in copper metabolism*. Biol Trace Elem Res, 2004. **102**(1-3): p. 143-59.
261. Frank, A., R. Wibom, and R. Danielsson, *Myocardial cytochrome c oxidase activity in Swedish moose (Alces alces L.) affected by molybdenosis*. Sci Total Environ, 2002. **290**(1-3): p. 121-9.
262. Crews, H., Clarke, P., Lewis D., Owen L., Strutt, P., Izquierdo, A., *Investigation of selenium speciation in in vitro gastrointestinal extracts of cooked cod by HPLC ICPMS and Electro spray MS*. J Anal Atom Spectrom, 1996. **11**: p. 1177-1182.
263. Wrobel, k., Urbina, E., Reyes, L., Wrobel, K., *Effect of some weak organic acids contained in fruit juices on bismuth bioavailability from pepto-bismol studied using in vitro gut model*. trace elements and electrolytes, 2001. **18**(3): p. 101-106.
264. Vyskocil, A. and C. Viau, *Assessment of molybdenum toxicity in humans*. J Appl Toxicol, 1999. **19**(3): p. 185-92.
265. Aronson, D., *Cross-linking of glycated collagen in the pathogenesis of arterial and myocardial stiffening of aging and diabetes*. J Hypertens, 2003. **21**(1): p. 3-12.
266. Ulrich, P. and A. Cerami, *Protein glycation, diabetes, and aging*. Recent Prog Horm Res, 2001. **56**: p. 1-21.
267. Dyer, D.G., et al., *Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2463-9.
268. Tsilibary, E.C., *Microvascular basement membranes in diabetes mellitus*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 537-46.
269. Basta, G., A.M. Schmidt, and R. De Caterina, *Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(4): p. 582-92.
270. Tsukahara, H.R.S., Naoko Ohta, Shuko Sato, Masahiro Hiraoka, and E.N. Setsuko Ito, and Mitsufumi Mayumi, *High Levels of Urinary Pentosidine, an Advanced Glycation End Product, in Children With Acute Exacerbation of Atopic Dermatitis: Relationship With Oxidative Stress*. Metabolism 2003. **52**(12): p. pp 1601-1605.
271. Braun Martin, H.H.J.G., Mária Filková, Andrea Pavelková, Olga Šléglová, Nikola Kaspříková, Jiří Vencovský Karel Pavelka, Ladislav Šenolt, *Pentosidine, an Advanced Glycation End-Product, May Reflect Clinical and Morphological Features of Hand Osteoarthritis*. Open Rheumatol J. , 2012. **6**: p. 64-69.
272. Spacek, P. and M. Adam, *Pentosidine in osteoarthritis: HPLC determination in body fluids and in tissues*. Rheumatol Int, 2006. **26**(10): p. 923-7.
273. Kageyama, Y.M.T.T.N.E.T.A.N., *Etanercept reduces the oxidative stress marker levels in patients with rheumatoid arthritis*. Rheumatol Int, 2008. **28**: p. 245-251.

274. Vos, P.A.J.M.J.D., A.M. Huisman , J.C.M. Oostveen , A.C.A. Marijnissen , J.W.J. Bijlsma, and A.M.Z. B. van El , F.P.J.G. Lafeber, *Skin and urine pentosidine weakly correlate with joint damage in a cohort of patients with early signs of osteoarthritis (CHECK)*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2010(18): p. 1329-1336.
275. Grandhee, S.K. and V.M. Monnier, *Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(18): p. 11649-53.
276. Spacek P, A.M., *HPLC method for pentosidine determination in urine, serum and tissues as a marker of glycation and oxidation loading of the organism* *Journal of Liquid Chromatography & Related Techniques* 2002. **12**(25): p. 1807-1820.
277. Bogialli, S., et al., *A liquid chromatography-mass spectrometry assay for analyzing sulfonamide antibacterials in cattle and fish muscle tissues*. *Anal Chem*, 2003. **75**(8): p. 1798-804.
278. Kato, S., et al., *Increased pentosidine, an advanced glycation end-product, in urine and tissue reflects disease activity in inflammatory bowel diseases*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008. **23 Suppl 2**: p. S140-5.
279. Qian, G.S., et al., *A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994. **3**: p. 3-10.
280. Cvetkovic, T., et al., *The significance of urinary markers in the evaluation of diabetic nephropathy*. *J Med Biochem (Belgrade, Serbia)*, 2008. **27**: p. 376-382.
281. Laambers Heerspink, H.J., et al., *Albuminuria assessed from first-morning-void urine samples versus 24-hour collections as a predictor of cardiovascular morbidity and mortality*. *Am J Epidemiol*, 2008. **168**: p. 897-905.
282. Shangari, N. and P.J. O'Brien, *The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **68**: p. 1433-1442.
283. Tan, D., et al., *Methylglyoxal: its presence in beverages and potential scavengers*. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. **1126**: p. 72-75.
284. Wang, Y. and C.T. Ho, *Flavour chemistry of methylglyoxal and glyoxal*. *Chem Soc Rev*, 2012. **41**(11): p. 4140-9.
285. Vander Jagt, D.L. and L.A. Hunsaker, *Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase*. *Chem Biol Interact*, 2003. **143-144**: p. 341-351.
286. Shiryayeva, Y.K., V.V. Krylin, and V.N. Titov, *Chromatographic Determination of Methyl Glyoxalin Blood Plasma as the Test for Glycototoxicity and Accumulation of Glycation End-Products* Yu. K. Shiryayeva, V. V. Krylin, and V. N. Titov. *Bull Exp Biol Med*, 2012. **153**: p. 114-117.
287. Turk, Z., *Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications*. *Physiol Res*, 2010. **59**: p. 147-156.
288. Distler, M.G. and A.A. Palmer, *Role of Glyoxalase 1 (Glo1) and methylglyoxal (MG) in behavior: recent advances and mechanistic insights*. *Front Genet*, 2013. **3**: p. 250.
289. Beisswenger, P.J., et al., *Susceptibility to diabetic nephropathy is related to dicarbonyl and oxidative stress*. *Diabetes*, 2005. **54**(11): p. 3274-81.
290. Kovacic, P. and A.L. Cooksy, *Role of diacetyl metabolite in alcohol toxicity and addiction via electron transfer and oxidative stress*. *Arch Toxicol*, 2005. **79**: p. 123-128.
291. Otsuka, M., et al., *A detoxication route for acetaldehyde: Metabolism of diacetyl, acetoin and 2,3-butanediol in liver homogenate and perfused liver of rats*. *J Biochem*, 1996. **119**: p. 246-251.
292. Otsuka, M., et al., *Blood and urinary levels of ethanol, acetaldehyde, and C4 compounds such as diacetyl, acetoin, and 2,3-butanediol in normal male students after ethanol ingestion*. *Alcohol*, 1999. **17**: p. 119-124.
293. Otsuka, M. and S. Ohmori, *Simple and sensitive determination of diacetyl and acetoin in biological samples and alcohol beverages*. *J Chromatogr*, 1992. **577**: p. 215-220.

294. Rigler, M.W. and W.E. Longo, *Emission of diacetyl (2,3 butanedione) from natural butter, microwave popcorn butter flavor powder, paste and liquid products*. *Int J Occup Med Environ Health*, 2010. **16**: p. 291-302.
295. Wainwright, T., *Diacetyl - A review. Part I - Analytical and biochemical considerations; Part II: Brewing experience*. *J Inst Brewing*, 1973. **79**: p. 451-470.
296. Amoroso, A., G. Maga, and M. Daglia, *Cytotoxicity of alpha-dicarbonyl compounds submitted to in vitro simulated digestion process*. *Food Chem*, 2013. **140**(4): p. 654-9.
297. Zhang, J., et al., *A novel capillary electrophoretic method for determining methylglyoxal and glyoxal in urine and water samples*. *J Chromatogr A*, 2010. **1217**: p. 5124–5129.
298. Zardari, L.A., M.Y. Khuhawar, and A.J. Laghari, *Capillary GC analysis of glyoxal and methylglyoxal in the serum and urine of diabetic patients after use of 2,3-diamino-2,3-dimethylbutaneas derivatizing reagent*. *Chromatographia*, 2009. **70**: p. 891–897.
299. Espinosa-Mansilla, A., et al., *High-performance liquid chromatographic determination of glyoxal and methylglyoxal in urine by prederivatization to lumazinic rings using in serial fast scan fluorimetric and diode array detectors*. *Anal Biochem*, 2007. **371**: p. 82–91.
300. Akira, K., Y. Matsumoto, and T. Hashimoto, *Determination of urinary glyoxal and methylglyoxal by high-performance liquid chromatography*. *Clin Chem Lab Med*, 2004. **42**(2): p. 147-53.
301. Espinosa-Mansilla, A., I. Duran-Meras, and F. Salinas, *High-performance liquid chromatographic–fluorometric determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine by prederivatization to pteridinic rings*. *Anal Biochem*, 1998. **255**: p. 263–273.
302. Khuhawar, M.Y., L.A. Zardari, and A.J. Laghari, *Capillary gas chromatographic determination of methylglyoxal from serum of diabetic patients by precolumn derivatization with 1,2-diaminopropane*. *J Chromatogr B*, 2008. **873**: p. 15–19.
303. Neng, N.R., et al., *Determination of glyoxal and methylglyoxal in environmental and biological matrices by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization*. *J Chromatogr A*, 2007. **1169**(1-2): p. 57-52.
304. Hurtado-Sanchez, M.C., et al., *Development of a method for the determination of advanced glycation end products precursors by liquid chromatography and its application in human urine samples*. *J Sep Sci*, 2012. **35**: p. 2575–2584.
305. McLellan, A.C., S.A. Phillips, and P.J. Thornalley, *The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene*. *Anal Biochem*, 1992. **206**(1): p. 17-23.
306. Chaplen, F.W., W.E. Fahl, and D.C. Cameron, *Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture*. *Anal Biochem*, 1996. **238**(2): p. 171-8.
307. Mirza, M.A., et al., *Determination of glyoxal and methylglyoxal in the serum of diabetic patients by MEKC using stilbenediamine as derivatizing reagent*. *Electrophoresis*, 2007. **28**(21): p. 3940-7.
308. Shibamoto, T., *Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems*. *J Pharm Biomed Anal*, 2006. **41**: p. 12-25.
309. Hara, S., et al., *1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a highly sensitive fluorogenic reagent for α-διχαρβονϒλ χομπονδσ*. *Anal Chim Acta*, 1988. **215**: p. 267-276.
310. Nemet, I., L. Varga-Defterdarovic, and Z. Turk, *Preparation and quantification of methylglyoxal in human plasma using reverse-phase high - performance liquid chromatography*. *Clin Biochem*, 2004. **37**(10): p. 875-881.
311. Yamaguchi, M., et al., *Determination of glyoxal, methylglyoxal, diacetyl and 2,3-pentadione in fermented foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. *J Liq Chromatogr* 1994. **17**: p. 203-211.
312. Maroulis, A.J., A.N. Voulgaropoulos, and C.P. Hadjiantoniou-Maroulis, *Fluorimetric determination of biacetyl*. *Talanta*, 1985. **32**: p. 504-506.
313. Krizner, H.E., D.O. De Haan, and J. Kua, *Thermodynamics and Kinetics of Methylglyoxal Dimer Formation: A Computational Study*. *J Phys Chem*, 2009. **113**: p. 6994–7001.

314. Houdier, S., et al., *Sensitive determination of glyoxal, methylglyoxal and hydroxyacetaldehyde in environmental water samples by using dansylacetamidooxamine derivatization and liquid chromatography/fluorescence* Anal Chim Acta, 2011. **704**: p. 162-173.
315. Odani, H., et al., *Increase in three  $\alpha,\beta$ -dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo determination of intermediates in advanced maillard reaction*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **256**: p. 89-93.
316. Dhar, A., et al., *Methylglyoxal, protein binding and biological samples: Are we getting the true measure?* J Chromatogr B, 2009. **877**: p. 1093-1100.
317. Randell, E.W., S. Vasdev, and V. Gill, *Measurement of methylglyoxal in rat tissues by electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2005. **51**(2): p. 153-7.
318. Degen, J., M. Hellwig, and T. Henle, *1,2-dicarbonyl compounds in commonly consumed foods*. J Agric Food Chem, 2012. **60**: p. 7071-7079.
319. *ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology (Q2/R1)*. [http://www.ish.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ish.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf). 2012 ICH.
320. Burtis, C.A. and E.R. Ashwood, *Tietz textbook of clinical chemistry*. 1999, Philadelphia: W.B. Saunders Company.
321. Koparan, S.S., *Increased oxidative stress inflammatory response in juvenile swimmers after a 16-week swimming training*. Eur J Exp Biol, 2013. **3**: p. 211217.
322. Zwiener, C., T. Glauner, and F.H. Frimmel, *Method optimization for the determination of carbonyl compounds in disinfected water by DNPH derivatization and LC-ESI-MS-MS*. Anal Bioanal Chem, 2002. **372**(5-6): p. 615-21.
323. Ahumada-Santos, Y.P., et al., *Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six Agave species from Sinaloa, Mexico*. Ind Crops Prod, 2013. **49**: p. 143-149.
324. Santos-Zea, L., et al., *Agave (Agave spp.) and its traditional products as a source of bioactive compounds*. Curr Bioactive Compounds, 2012: p.??
325. Waleckx, E., et al., *Hydrolysis of fructans from Agave tequilana Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process*. Food Chem, 2008. **108**: p. 40-48.
326. Garcia-Aguirre, M., et al., *Strategy for biotechnological process design applied to the enzymatic hydrolysis of agave fructo-oligosaccharides to obtain fructose-rich syrups*. J Agric Food Chem, 2009. **57**: p. 10205-10210.
327. Waleckx, E., et al., *Use of inulinases to improve fermentable carbohydrate recovery during tequila production*. Food Chem, 2011. **124**: p. 1533-1542.
328. Willems, J.L. and N.H. Low, *Major carbohydrate, polyol, and oligosaccharide profiles of agave syrup. Application of this data to authenticity analysis*. J Agric Food Chem, 2012. **60**: p. 8745-8754.
329. NMX-FF-110-SCFI-2008, Diario Oficial de la Federacion Mexicana, Norma Mexicana. Productos alimenticios. Jarabe de agave. Especificaciones y metodos de prueba., 2008.
330. White, J.S., *Misconceptions about high-fructose corn syrup: Is it uniquely responsible for obesity, reactive dicarbonyl compounds, and advanced glycation endproducts?* J Nutr, 2009. **139**: p. 1219S-1227S.
331. Lachenmeier, D.W., et al., *Quantification of selected volatile constituents and anions in mexican agave spirits (equila, mezcal, sotol, bacanora)*. J Agr Food Chem, 2006. **54**: p. 3911-3915.
332. Lopez, M.G., N.A. Mancilla-Margalli, and G. Mendoza-Diaz, *Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul*. J Agric Food Chem, 2003. **51**(27): p. 7835-40.
333. Kovacic, P. and R. Somanathan, *Cell signaling and receptors in toxicity of advanced glycation end products (AGEs):  $\alpha$ -dicarbonyls, radicals, oxidative stress and antioxidants*. J Recept Signal Transduct Res, 2011. **31**(5): p. 332-9.
334. Papetti, A., et al., *Effect of in vitro digestion on free  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in balsamic vinegars*. J Food Sci, 2013. **78**(4): p. C514-9.

335. Irish, J., S. Blair, and D.A. Carter, *The antibacterial activity of honey derived from Australian flora*. PLoS ONE, 2011. **6**: p. e18229.
336. Degen, J., et al., *Metabolic transit of dietary methylglyoxal*. J Agric Food Chem, 2013. **61**: p. 10253-10260.
337. Mavric, E., et al., *Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (Leptospermum scoparium) honey from New Zealand*. Mol Nutr & Food Res, 2008. **52**: p. 483-489.
338. Adams, C.J., M. Manley-Harris, and P.C. Molan, *The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (Leptospermum scoparium) honey*. Carbohydr Res, 2009. **344**: p. 1050-1053.
339. Daglia, M., et al., *Influence of in vitro simulated gastroduodenal digestion on methylglyoxal concentration of manuka (Leptospermum scoparium) honey*. J Agr Food Chem, 2013. **61**: p. 2140-2145.
340. Pieper, B., *Honey-based dressings and wound care: An option for care in the United States*. J Wound Ostomy Cont, 2009. **36**: p. 60-66.
341. Gomez Ojeda, A., et al., *HPLC determination of glyoxal, methylglyoxal and diacetyl in urine using 4-methoxy-o-phenylenediamine as derivatizing reagent*. Anal Biochem, 2014. **accepted**.
342. Brudzynski, K., K. Abubaker, and D. Miotto, *Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H2O2-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation*. Food Chem, 2012. **133**: p. 329-336.
343. Patton, T., et al., *Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey*. J Microbiol Methods, 2006. **64**: p. 84-95.
344. Patton, T., et al., *Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey*. J Microbiol Methods, 2006. **64**(1): p. 84-95.
345. Kilty, S.J., et al., *Methylglyoxal: (active agent of manuka honey) in vitro activity against bacterial biofilms*. Int Forum Allergy Rhinol, 2011. **1**: p. 348-350.
346. Arena, E., et al., *Survey of 1,2-dicarbonyl compounds in commercial honey of different floral origin*. J Food Sci, 2011. **76**(8): p. C1203-C1210.
347. Gensberger, S., et al., *Identification and quantification of six major  $\alpha$ -dicarbonyl process contaminants in high-fructose corn syrup*. Anal Bioanal Chem, 2012. **403**: p. 2923-2931.
348. Lo, C.Y., et al., *Reactive dicarbonyl compounds and 5-(hydroxymethyl)-2-furfural in carbonated beverages containing high fructose corn syrup*. Food Chem, 2008. **107**: p. 1099-1105.
349. Ruisinger, B. and P. Schieberle, *Characterization of the key aroma compounds in rape honey by means of the molecular sensory science concept*. J Agric Food Chem, 2012. **60**: p. 4186-4194.
350. Agila, A. and S. Barringer, *Effect of adulteration versus storage on volatiles in unifloral honeys from different floral sources and locations*. J Food Sci, 2013. **78**: p. C184-C191.
351. Oelschlaegel, S., et al., *Classification and characterization of manuka honeys based on phenolic compounds and methylglyoxal*. J Agric Food Chem, 2012. **60**: p. 7229-7237.
352. Tan, H.T., et al., *The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey*. BMC Complement Altern Med, 2009. **9**: p. 34.
353. Kwakman, P.H.S. and s.A.J. Zaat, *Antibacterial components of honey*. IUBMB Life, 2012. **64**: p. 48-55.
354. Boorn, K.L., et al., *Antimicrobial activity of honey from the stingless bee Trigona carbonaria determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology*. J Appl Microbiol, 2010. **108**: p. 1534-1543.
355. Kwakman, P.H.S., et al., *Medical-grade honey kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization*. Clin Infect Dis, 2008. **46**: p. 1677-1682.
356. Lu, J., et al., *The effect of New Zealand kanuka, manuka and clover honeys on bacterial growth dynamics and cellular morphology varies according to the species*. PLoS One, 2013. **8**: p. e55898.
357. Oelschlaegel, S., et al., *Floral markers of cornflower (Centaurea cyanus) honey and its peroxide antibacterial activity for an alternative treatment of digital dermatitis*. J Agric Food Chem, 2012. **60**: p. 11811-11820.
358. <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/39512/title/Overcoming-Resistance/>. The scientist., 2014.

359. Kuehnelt, D., et al., *Arsenic Compounds in Terrestrial Organisms III: Arsenic Compounds in Formica sp. From an Old Arsenite Smelter Site*. Appl Organomet Chem, 1997. **11**: p. 859-867.
360. Yang, X., et al., *Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation*. J Trace Elem Med Biol, 2005. **18**(4): p. 339-53.
361. Mkandawire, M. and E.G. Dudel, *Accumulation of arsenic in Lemna gibba L. (duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany*. Sci Total Environ, 2005. **336**(1-3): p. 81-89.
362. Srimala Sreekantan, S.M.Z., Chin Wei Lai and Teoh Wah Tzu. , . *Post-Annealing Treatment for Cu-TiO<sub>2</sub> Nanotubes and Their Use in Photocatalytic Methyl Orange Degradation and Pb(II) Heavy Metal Ions Removal* . . The European Physical Journal Applied Physics, 2014.
363. Gomez, A.W., Kazimierz; Wrobel, Katarzyna; Kazunori, Sato; Teoh Wah Tzu, *Lead Ion Uptake By Sodium Alginate And Calcium Alginate Film: A Comparison Study*. International Proceedings of Computer Science & Information Tech, 2012. **38**: p. 143.
364. Dantas, T., Neto, A., Moura, M., Neto, E., Telemaco, E., *Chromium adsorption by chitosan impregnated with microemulsion*. Langmuir 2001. **17**: p. 4256-4260.
365. Wan Ngah, W., Endud, C., Mayanar, R., *Removal of copper (II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads*. . React. Funct. Polym., 2002. **50**: p. 181-191.
366. Papageorgiou, S., Katsarosa, F., Kouvelos, E., Nolan, J., Le Deit, H. Kanellopoulos, N., *Heavy metal sorption by calcium alginate beads from Laminaria digitata*. Journal of Hazardous Materials, 2006. **137**(3): p. 1765-1772.
367. Volesky, B., *Biosorption process simulation tools*. . Hydrometallurgy, 2003. **71**: p. 179-190.
368. Pavlath A. , G.C., Camirand W., Robertson ,G., *Ionomeric films of Alginic acid*. journal of food science, 1999. **64**(1).
369. Grant, G., Morris, E., Rees, D., Smith, P., Thom, D. , *Biological interactions between polysaccharides and divalent cation: the egg-box model*. . FEBS Lett., 1973. **32**: p. 195-198.
370. Smidsrod, O., *Molecular basis for some physical properties of alginate in gel state*. . Faraday Discuss. Chem. Soc., 1974. **57**: p. 263-274.
371. Calvo, M. <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/alginato.html>.
372. Ibañez J., U.Y., *Uptake of trivalent chromium from aqueous solutions using protonated dry alginate beads*. Hidrometallurgy, 2003. **72**: p. 327-334.
373. Yasuhiro K., S.A., Yuji M. & Muneharu O., *Recovery of Zinc, Cadmium, and Lanthanum by Biopolymer Gel Particles of Alginic Acid*. Separation Science and Technology 1993. **28**(9): p. 1691-1702.
374. Benavidesa S., V.-C.R., Reyesb J., *Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration*. Journal of Food Engineering, 2011.
375. Nestlé N, K.R., *Heavy metal uptake of alginate gels studied by NMR microscopy*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1996. **115**: p. 141-147.
376. Arica, M., Arpa, C., Ergene, A., Bayramoğlu, G., Genç, Ö *Ca-alginate as a support for Pb(II) and Zn(II) biosorption with immobilized Phanerochaete chrysosporium*. Carbohydrate Polymers 2003. **52**(2): p. 167-174.
377. Haug, A., *The Affinity of Some Divalent Metals to Different Types of Alginates*. Acta Chemica Scandinavica, 1961. **15**(8): p. 1794-1795.
378. Haug, A., Smidsrod, O., *The Effect of Divalent Metals on the Properties of Alginate Solutions*. Acta Chemica Scandinavica, 1964. **19**(2): p. 341-351.