



## EDICIONES UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DIRECCIÓN: Marta PRIETO VICENTE, Universidad de Salamanca, Spain

COMITÉ EDITORIAL: Antonio MURO ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain  
Raquel ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain  
Ana Isabel MORALES MARTÍN, Universidad de Salamanca, Spain  
Alfonso Jesús DOMÍNGUEZ-GIL HURLÉ, Universidad de Salamanca, Spain

AYUDANTE DE DIRECCIÓN: Javier TASCÓN ROMERO, Universidad de Salamanca, Spain

COMITÉ CIENTÍFICO: Raquel ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain  
Antonio MURO ÁLVAREZ, Universidad de Salamanca, Spain  
Ana Isabel MORALES MARTÍN, Universidad de Salamanca, Spain  
Alfonso Jesús DOMÍNGUEZ-GIL HURLÉ, Universidad de Salamanca, Spain

CORRECTOR DE ORIGINALES: María Eloísa REVILLA LÓPEZ, Spain

SECRETARÍA DE REDACCIÓN: Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca  
Campus Miguel de Unamuno, s/n - 37008 Salamanca, España

El comité científico de *FarmaJournal* quiere agradecer la colaboración durante el proceso de revisión de los artículos de investigación publicados en este número a los siguientes profesores de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca:

Antonio Blázquez Zaballos, Óscar Briz Sánchez, Alfredo Ginés Casanova Paso, Laura Gallego Yerga, José Ángel García Pedraza, José Martínez Lanao, Esther Menéndez Gutiérrez, Rafael Peláez Lamamié de Clairac Arroyo, Javier Robles Valero, Marta Rodríguez Romero, Adela María Sánchez Ávila y María Soledad San Román Vicente

FARMAJOURNAL es una revista científica en español sobre farmacología, de periodicidad semestral y en la que los artículos recibidos son evaluados por revisores y posteriormente aprobados por un tribunal docente. Los trabajos publicados pueden consultarse en: «eUSAL Revistas» <<https://revistas.usal.es/index.php/2445-1355>>, Gredos <<https://gredos.usal.es/handle/10366/127837>>, Dialnet.

REALIZA: INTERGRAF

## ÍNDICE

### ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Blanca CALDERÓN GARCÍA; María José DE JESÚS VALLE, Liofilización de liposomas para su administración pulmonar.....	7-17
Cira DIEZ; María José FERNÁNDEZ-GÓMEZ; Javier MARTÍN-VALLEJO, Efecto del consumo de tabaco en las enfermedades inflamatorias intestinales: metaanálisis .....	19-28
Oana María MACIUCA; Fernando SÁNCHEZ-JUANES; Esther MENÉNDEZ, Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en bebidas probióticas: el caso de la kombucha.....	29-39
Alejandro MARTÍN QUIJADA; Ana María GONZÁLEZ PARAMÁS; Celestino SANTOS BUELGA, Análisis de componentes bioactivos derivados de aminoácidos en el vino.....	41-51
Sara REVUELTA; Javier TASCÓN; Laura VICENTE-VICENTE; Alfredo G. CASANOVA; Ana I. MORALES; Marta PRIETO, Evaluación histológica del daño renal producido por los inhibidores del punto de control inmunitario.....	53-65

### RESÚMENES DE CONFERENCIA

Cristina MADERUELO, Presente y futuro de la industria farmacéutica.....	69-71
Luis MARCOS NOGALES; Raquel CARNERO GÓMEZ, Antibióticos vs bacterias. De la resistencia al contraataque.....	73-74
Raúl RIVAS, <i>One Health</i> : ¿estamos preparados para la próxima pandemia?....	75-75

## INDEX

### RESEARCH REPORTS

Blanca CALDERÓN GARCÍA; María José DE JESÚS VALLE, Lyophilization of Liposomes for Pulmonary Administration.....	7-17
Cira DIEZ; María José FERNÁNDEZ-GÓMEZ; Javier MARTÍN-VALLEJO, Effect of Tobacco Use on Inflammatory Bowel Diseases: Meta-analysis.	19-58
Oana María MACIUCA; Fernando SÁNCHEZ-JUANES; Esther MENÉNDEZ, Isolation and Identification of Microorganisms from Probiotic Beverages: The Case of Kombucha.....	29-39
Alejandro MARTÍN QUIJADA; Ana María GONZÁLEZ PARAMÁS; Celestino SANTOS BUELGA, Analysis in Wine of Bioactive Compounds Derived of Amino Acids.....	41-51
Sara REVUELTA; Javier TASCÓN; Laura VICENTE-VICENTE; Alfredo G. CASANOVA; Ana I. MORALES; Marta PRIETO, Histological Evaluation of the Nephrotoxicity of Immune Checkpoint Inhibitors.....	53-65

### CONFERENCE ABSTRACTS

Cristina MADERUELO, Present and Future of the Pharmaceutical Industry ....	69-71
Luis MARCOS NOGALES; Raquel CARNERO GÓMEZ, Antibiotics vs Bacteria. From Resistance to Counterattack.....	73-74
Raúl RIVAS, One Health: Are We Ready for the Next Pandemic?.....	75-76

**Artículos  
de investigación**



ISSN electrónico: 2445-1355

DOI: <https://doi.org/10.14201/fj202272717>

## LIOFILIZACIÓN DE LIPOSOMAS PARA SU ADMINISTRACIÓN PULMONAR

### *Lyophilization of Liposomes for Pulmonary Administration*

Blanca CALDERÓN GARCÍA; María José DE JESÚS VALLE

Departamento de Ciencias Farmacéuticas. Área Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno.  
Correo-e: mariajosedj@usal.es

Grupos colaboradores: Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca  
(IBSAL)

**RESUMEN:** El citrato de sildenafil se ha convertido, en los últimos años, en un agente terapéutico oral utilizado para el tratamiento de la hipertensión arterial. Debido a que presenta ciertas limitaciones, como una reducción significativa de la biodisponibilidad oral y de la actividad farmacológica debido al metabolismo hepático de primer paso, se han propuesto formulaciones innovadoras para su administración por vía pulmonar, permitiendo minimizar los efectos adversos sistémicos y el efecto de primer paso.

El objetivo del trabajo es elaborar liposomas cargados de sildenafil y posteriormente liofilizarlos. Además, evaluar las propiedades de flujo del producto sólido obtenido para su posible administración por vía pulmonar.

Los liposomas obtenidos fueron preparados mediante el método de sonicación-filtración, en ausencia de disolventes orgánicos y, por tanto, se consideran unos sistemas biocompatibles y biodegradables, muy adecuados para su posible administración por vía pulmonar. Presentaron una elevada eficacia de encapsulación de sildenafil (EE% = 85).

Se observaron adecuados resultados de flujo del producto sólido con cada uno de los lioprotectores utilizados, obteniéndose valores de ángulo de reposo inferiores a 30° e índices de Carr (IC) también inferiores al 36 %.

Por tanto, la liofilización de liposomas juega un papel fundamental en la conservación y la estabilidad de dichas vesículas.

*Palabras clave:* liposomas; liofilización; administración pulmonar; sildenafilo.

**ABSTRACT:** Sildenafil citrate has become, in recent years, an oral therapeutic agent used for the treatment of arterial hypertension. Because it has certain limitations, such as a significant reduction in oral bioavailability and pharmacological activity due to first-pass hepatic metabolism, innovative formulations have been proposed for pulmonary administration. This allows minimising systemic adverse effects and the first-pass effect.

The aim of the work is to elaborate sildenafil-loaded liposomes and subsequently lyophilise them. Furthermore, to evaluate the flow properties of the solid product obtained for possible pulmonary administration.

The liposomes obtained were prepared using the sonication-filtration method, in the absence of organic solvents, and are therefore considered to be biocompatible and biodegradable systems, highly suitable for possible pulmonary administration. They showed high sildenafil encapsulation efficiency (EE% = 85).

Adequate solid product flow results were observed with each of the lyoprotectants used, obtaining angle of repose values below 30° and Carr's index (CI) also below 36 %.

Therefore, lyophilisation of liposomes plays a fundamental role in the preservation and stability of these vesicles.

*Keywords:* liposomes; lyophilization; pulmonary administration; sildenafil.

## 1. INTRODUCCIÓN

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una patología poco frecuente donde los valores de presión arterial pulmonar media son superiores a 25 mmHg en reposo y 30 mmHg durante el ejercicio.

Su desarrollo está vinculado a una disfunción del endotelio vascular pulmonar debido a una proliferación y apoptosis celular anormal. Como consecuencia de

dicha disfunción, se originan fenómenos fisiopatológicos tales como vasoconstricción, trombosis e hiperproliferación celular (Rosas *et al.*, 2006).

Entre los fármacos susceptibles de ser usados en el tratamiento de la hipertensión pulmonar, encontramos el citrato de sildenafil. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición selectiva de la fosfodiesterasa 5 (PDE-5), una enzima ampliamente distribuida en el tejido pulmonar cuya inhibición aumentará el efecto vasodilatador pulmonar de prostaciclina y óxido nítrico (ON), además de actuar sobre el ventrículo derecho (Beltrán-Gómez *et al.*, 2015).

En los últimos años el sildenafil se ha convertido en un agente terapéutico oral de primera línea para algunos pacientes, pero al presentar ciertas limitaciones, como una reducción significativa de la biodisponibilidad oral y la actividad farmacológica debido al metabolismo hepático de primer paso, se han propuesto formulaciones más innovadoras por vía pulmonar (Barnett, Machado, 2006; Gaspar *et al.*, 2008; Zakharova *et al.*, 2021).

Entre las ventajas que presenta la vía pulmonar encontramos que es una ruta no invasiva, el proceso de absorción está favorecido por la gran superficie pulmonar, el epitelio alveolar es muy delgado y la zona está altamente irrigada. Además, se minimizan los efectos adversos sistémicos y el efecto de primer paso (Haque *et al.*, 2016).

Dadas sus características fisicoquímicas sería interesante la inclusión del citrato de sildenafil en formulaciones liposomales (Gavira Heredia, 2020).

Los liposomas son estructuras vesiculares micro- o nanoscópicas constituidas por una o más bicapas lipídicas concéntricas que encierran un número igual de compartimentos acuosos (Navarro, 2008).

Su pequeño tamaño, una composición similar a la de las membranas celulares y su capacidad de encapsulación de diferentes tipos de principios activos hacen a los liposomas eficaces sistemas transportadores de fármacos en el organismo (Suñé Negre).

Además, son capaces de liberar de manera controlada y sostenida los fármacos, evitando los “picos altos” asociados a los efectos secundarios y reduciendo la dosis necesaria para mantener los niveles terapéuticos. En consecuencia, es probable que la inhalación de fármacos encapsulados en liposomas produzca perfiles cinéticos más seguros y eficaces que la inhalación de fármacos libres (De Jesús Valle, 2018).

En este trabajo nos centraremos en la liofilización de liposomas. Esta técnica permite eliminar el agua de un producto por sublimación aplicando vacío, previa exposición a temperaturas por debajo de su punto de congelación (Saharan, 2017).

Según algunos estudios, la liofilización de las formulaciones liposomales para administración pulmonar resultaría ventajosa pues así se conseguiría reducir la viscosidad del producto, asemejándose a la del surfactante endógeno. Por otra parte, también evitaría la pérdida de fármaco y la fusión/agregación de vesículas,

así como proteger la bicapa lipídica de la oxidación (Blanco *et al.*, 2008; De Jesús Valle *et al.*, 2021).

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es la elaboración de liposomas cargados de sildenafilo, mediante el método de sonicación y gradiente de pH.

Se caracterizará y evaluará la incorporación de diferentes lioprotectores en la obtención del producto sólido liofilizado.

Además, se evaluarán las propiedades de flujo del producto sólido y liofilizado obtenido para su posible administración por vía pulmonar.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. *Material*

- *Reactivos*: Ácido clorhídrico, agua ultrapura Mili-Q, colesterol, citrato de sildenafilo (CS), fosfatidilcolina, hidróxido sódico, lactosa, manitol, tampón citrato pH = 4,7.
- *Equipos*: Balanza de precisión Mettler Toledo, baño de ultrasonidos ATU serie ATM 40-6 LCD, baño de incubación con agitación Unitronic OR, filtros CHROMAFIL® de 0,45 µm, liofilizador, pH-metro serie s-619L Peak instruments, turbidímetro portátil Hach 2100Q, voluménometro ERWEKA para determinar la densidad, equipo para la determinación de humedad residual (Karl-Fisher).

### 3.2. *Métodos*

- *Preparación de liposomas por sonicación*

Se pesan fosfatidilcolina y colesterol y se mezclan en un vaso de precipitados. Seguidamente, se incorpora el citrato de sildenafilo previamente disuelto en el tampón citrato a pH 4,7 bajo agitación constante con varilla de vidrio hasta conseguir una dispersión homogénea de los lípidos.

El contenido del vaso se transfiere a un balón de vidrio, que se lleva a un baño de ultrasonidos a  $40 \pm 2$  °C durante 20 minutos. A continuación, se retira el balón del baño y se filtra su contenido a través de filtros de 0,45 µm.

El filtrado se almacena en envase topacio a temperatura ambiente durante una hora y posteriormente se refrigera otra hora. Una vez formados los liposomas, se aplica el gradiente de pH por adición de NaOH hasta pH 7 con objetivo de optimizar el proceso de encapsulación.

La mezcla se introduce en un baño a 4 °C durante 20 horas para conseguir que el citrato de sildenafilo, en su forma molecular, difunda a través de la bicapa lipídica, quedando atrapado en el interior del liposoma en su forma ionizada.

- *Incorporación de diferentes cantidades de etanol*

Con el objetivo de mejorar las propiedades de flujo y esponjosidad del sólido, obtenido por liofilización, se añadieron lentamente pequeñas cantidades de etanol a los liposomas (0,1, 0,25 y 0,5 %).

En los estudios preliminares se incorporaron concentraciones de hasta el 1 % de etanol, pero tras la inspección visual se decidió descartar las tortas con concentraciones superiores al 0,5 % dado que no presentaban la porosidad buscada.

- *Liofilización*

Los liposomas obtenidos se dividieron en distintos lotes incorporando distintas concentraciones de lioprotectores.

Las muestras se congelaron en viales y bandejas a -80 °C durante 20 horas. Se llevó a cabo una desecación en el liofilizador durante 48 horas a -20 °C.

- *Caracterización de liposomas*

- **Eficacia de encapsulación (EE)**

Para determinar la cantidad de CS encapsulado se toman dos alícuotas del preparado. Una de ellas se analiza directamente para conocer la concentración total de CS mientras que la otra se somete a centrifugación para posteriormente cuantificar la concentración de CS que permanece en el sobrenadante. La diferencia de ambas corresponde a la concentración de CS encapsulado.

$$EE (\%) = \frac{CS \text{ total} - CS \text{ sobrenadante}}{CS \text{ total}} * 100$$

- **Turbidez**

La turbidimetría es una técnica espectroscópica que permite estudiar los agregados lipídicos y estimar sus tamaños. Aunque con este procedimiento no es posible conocer el tamaño de las partículas, nos permite evaluar la reproducibilidad de las preparaciones (Lanio *et al.*, 2009).

Se utilizó el turbidímetro portátil Hach modelo 21000Q, un aparato que lleva a cabo una determinación turbidimétrica en RATIO entre la señal de luz dispersa nefelométrica (90°) y la señal de luz transmitida, permitiendo realizar mediciones en el intervalo 0,00 a 1000 FNU (unidad de formacina nefolométrica).

- *Comportamiento reológico del polvo*
  - **Humedad residual**

La determinación se llevó a cabo mediante Karl-Fisher.  
La humedad residual condiciona el almacenamiento y la estabilidad de los preparados farmacéuticos liofilizados. Además, una mayor concentración de humedad puede reducir la biodisponibilidad y el efecto terapéutico.
  - **Reconstitución**

Después de una inspección visual y revisión del aspecto de la torta liofilizada, se añadió agua ultrapura y se agitó manualmente. El tiempo requerido para la completa desaparición del contenido sólido se determinó por inspección visual y se registró como el tiempo de reconstitución.
  - **Ángulo de reposo**

Está relacionado con la fracción interna o cohesión de las partículas. Al dejar caer una cantidad de polvo sobre una superficie horizontal, se formará un cono. Cuanto menor sea el ángulo que forma el lateral del cono con la horizontal, menor será el desplazamiento entre las capas contiguas de partículas y por tanto mejores propiedades de flujo tendrá (Martínez Pacheco, 2016).
  - **Índice de Carr (IC)**

La compresibilidad se define como la facilidad del material para reducir su volumen cuando se somete a la acción de una fuerza externa (Martínez Pacheco, 2016).  
Para calcular el índice de compresibilidad se evaluó la capacidad del polvo para reducir su volumen realizando uno de los métodos que se recoge en la Real Farmacopea Española.  
Se vertió cuidadosamente en una probeta graduada una cantidad determinada de producto y se anotó el volumen aparente no asentado para posteriormente calcular la densidad aparente previa al golpeteo.

$$\rho_{\text{aparente}} = \frac{\text{masa de la muestra (g)}}{\text{volumen previo al golpeteo (mL)}}$$

$$\rho_{\text{reducida}} = \frac{\text{masa de la muestra (g)}}{\text{volumen después del golpeteo (mL)}}$$

Para obtener la densidad reducida se empleó un volumenómetro ERWEKA, que efectuó 10, 500 y 1250 golpes sobre la muestra. Tras anotar los volúmenes correspondientes se calculó la densidad reducida y consecutivamente el porcentaje de compresibilidad.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- *Eficacia de encapsulación*

La eficacia de encapsulación de citrato de sildenafilo obtenida para los liposomas frescos y con diferentes proporciones de etanol fue similar y sin diferencias estadísticamente significativas (EE = 85 %).

- *Turbidez (FNU)*

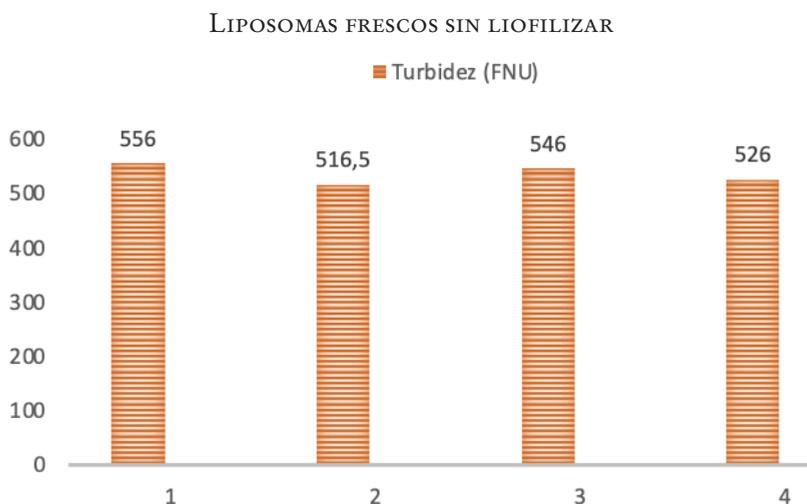


Figura 1. Resultados obtenidos de la turbidimetría en liposomas frescos.

Los lotes 1 y 3 llevaban lactosa al 4 % como lioprotector mientras que los lotes 2 y 4 contaban con una combinación de lactosa y manitol al 2 %. Las cantidades de etanol en cambio eran del 0,1 % en los lotes 1 y 2 y del 0,2 % en los lotes 3 y 4.

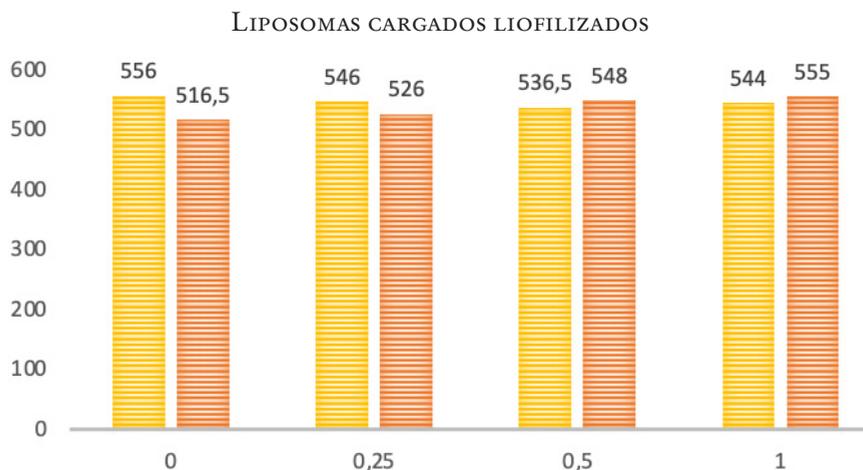


Figura 2. Resultados obtenidos de la turbidimetría en liposomas cargados.

En el gráfico de barras se encuentran representados en amarillo los lotes que contenían como lioprotector lactosa y en naranja los que llevaban incorporada la combinación de lactosa y manitol.

Los valores de turbidez obtenidos no presentan diferencias significativas entre lotes, por tanto, se puede deducir que el tamaño de partícula puede ser similar en todas las preparaciones, independientemente del lioprotector utilizado o la cantidad de etanol añadida.

	L 4 % Etanol 0,1 %	L 4 % Etanol 0,2 %	L+M 2 % Etanol 0,1 %	L+M 2 % Etanol 0,2 %
<b>Cantidad pesada (g)</b>	0,05049	0,04989	0,05227	0,05134
<b>Humedad (%)</b>	4,42428	4,49069	3,93377	3,68185
<b>Altura (cm)</b>	2,6	2,4	2,5	2,6
<b>Radio (cm)</b>	5,0	4,0	5,0	4,5
<b>a (°)</b>	27,474	30,964	26,565	26,985
<b>Masa muestra (g)</b>	7,6	7,8	7,3	7,8
<b>V inicial (mL)</b>	165	175	160	148
<b>V 10 golpes (mL)</b>	158	160	140	135

	L 4 % Etanol 0,1 %	L 4 % Etanol 0,2 %	L+M 2 % Etanol 0,1 %	L+M 2 % Etanol 0,2 %
V 500 golpes (mL)	132	135	110	118
V 1250 golpes (mL)	128	130	103	107
r aparente (g/mL)	0,046	0,044	0,045	0,053
r reducida (g/mL)	0,059	0,060	0,071	0,073
IC (%)	22,67	26,67	36,62	27,25

Figura 3. Resultados obtenidos tras la realización de los distintos ensayos.

- *Humedad residual*  
 Con el proceso de liofilización se consigue eliminar un alto porcentaje de agua siendo todos los valores de humedad residual inferiores al 5 %.
- *Ángulo de reposo (a)*  
 Tras analizar los valores obtenidos en el procedimiento experimental, se puede afirmar que el flujo de tres de las preparaciones es “excelente”, al permanecer los valores de ángulo de reposo dentro del intervalo 25-30°. El valor del lote 2 es más dudoso al encontrarse entre lo que podríamos considerar flujo “excelente” y “bueno”.
- *Índice de Carr (% compresibilidad)*  
 Los resultados obtenidos del porcentaje de compresibilidad evidencian que la fluidez del lote que contenía lactosa al 4 % y una menor concentración de etanol es “pasable”, mientras que, en el resto de preparaciones, se considera “mediocre”.  
 En este estudio existe cierta variabilidad en los resultados obtenidos y sería conveniente ampliar el número de muestras para observar la relación proporcional entre el ángulo de reposo y el porcentaje de compresibilidad del producto sólido liofilizado.

## 5. CONCLUSIONES

Los liposomas obtenidos son biocompatibles y biodegradables, preparados mediante el método de sonicación-filtración ya que es un proceso que no utiliza disolventes.

La liofilización de liposomas juega un papel fundamental en la conservación y la estabilidad, ya que constituye uno de los principales inconvenientes en el escalado de dichos sistemas vesiculares.

El comportamiento reológico y el diámetro aerodinámico de las partículas sólidas, administradas por vía pulmonar, influye en la distribución en el pulmón y es dependiente de su composición. La incorporación de pequeñas cantidades de etanol favorece el grado de esponjosidad del producto liofilizado, aunque no mejora las propiedades de flujo del mismo.

La incorporación de lioprotectores permite evitar transiciones de fase y fusión de membranas tanto durante el almacenamiento como en el proceso de liofilización.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Barnett CF, Machado RF. Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension. *Vascular Health and Risk Management*. 2006; 2(4):411-422.
- Beltrán-Gómez M *et al.* Inhibidores de fosfodiesterasa-5 para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar. *Archivos Cardiología México*. 2015; 85(3):215-224.
- Blanco O *et al.* Viscosidad y Tamaño de Partícula de Una Preparación Clínica de Surfactante Pulmonar. *Lat. Am. J. Pharm.* 2008; 27(5):826-830.
- De Jesús Valle MJ *et al.* Lyoprotective Effects of Mannitol and Lactose Compared to Sucrose and Trehalose: Sildenafil Citrate Liposomes as a Case Study. *Pharmaceutics* 2021; 13(8):1164.
- De Jesús Valle MJ *et al.* Sildenafil Citrate Liposomes for Pulmonary Delivery by Ultrasonic Nebulization. *Applied Sciences* 2018; 8(8):1291.
- Gaspar MM *et al.* Inhaled Liposomes-Current Strategies and Future Challenges. *J Biomed Nanotechnol.* 2008; 4(3):245-257.
- Gavira Heredia FJ. Preparación de liposomas biocompatibles. Ventaja de su utilización en tratamientos contra el cáncer [Trabajo Fin de Grado]. Sevilla. Universidad de Sevilla; 2020.
- Haque S *et al.* Disposition and safety of inhaled biodegradable nanomedicines: Opportunities and challenges. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2016; 12:1703-1724.
- Lanio ME *et al.* Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Rev. Cubana. Fis.* 2009; 26(1):23-30.
- Martínez Pacheco R. Reología de sólidos pulverulentos. En: Martínez Pacheco R, editor. *Tratado de Tecnología Farmacéutica. Vol. I. Sistemas farmacéuticos.* Madrid: Síntesis; 2016. p. 93-111.
- Navarro G. Diseño de liposomas para el transporte de diclofenaco sódico *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.* 2008; 37(2):212-223.
- Rosas RMJR *et al.* Sildenafil e inhibidores de fosfodiesterasa en hipertensión pulmonar. *Neumol Cir Torax.* 2006; 65(4):186-200.
- Saharan VA. Chapter 2: Freeze drying technologies for developing fast dissolving/disintegrating tablets. En: Saharan VA, editor. *Current Advances in Drug Delivery Through Fast Dissolving/Dissintegrating Dosage Forms.* Sharjah, UAE: Bentham Science Publishers; 2017. p. 35-56.

Suñé Negre JM. Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración. Formación continuada para farmacéuticos del hospital. Disponible en: <http://www.ub.edu/legmh/capitols/sunyenegre.pdf>

Zakharova AA *et al.* Phosphodiesterase type 5 inhibitors greatly affect physicochemical properties of model lipid membranes. *Membranes (Basel)*. 2021; 11(11):893.



## EFFECTO DEL CONSUMO DE TABACO EN LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES: METAANÁLISIS

### *Effect of Tobacco Use on Inflammatory Bowel Diseases: Meta-analysis*

Cira DIEZ<sup>1</sup>; María José FERNÁNDEZ-GÓMEZ<sup>2</sup>; Javier MARTÍN-VALLEJO<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.

<sup>2</sup> Departamento de Estadística. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca. IBSAL.

<sup>3</sup> Departamento de Estadística. Facultad de Enfermería. Universidad de Salamanca. IBSAL.

[jmv@usal.es](mailto:jmv@usal.es)

**RESUMEN:** La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son los dos principales tipos de enfermedad inflamatoria intestinal y afectan de manera crónica e inmunomediada al tubo digestivo. Surgen por la interacción del sistema inmune y la microbiota intestinal con factores genéticos y ambientales, siendo el tabaco uno de los más influyentes. Debido a una confusión en la bibliografía, se evalúa si existe un efecto real del tabaquismo en estas enfermedades mediante un metaanálisis. Se realizó una búsqueda en PubMed y Google Académico y se calculó un OR combinado, partiendo del modelo de efectos fijos, de los estudios que cumplieron los criterios de inclusión marcados. Nuestros resultados confirman que el tabaco es un factor protector para la colitis ulcerosa con OR combinados significativos estadísticamente y similares a los de otros metaanálisis realizados anteriormente. Sin embargo, la asociación del tabaco como factor de riesgo para la enfermedad de Crohn no está tan clara, debido a que los OR combinados obtenidos son no significativos o están cerca de la no significación y son más pequeños que en otros metaanálisis, aunque sí se detectó que debería ser analizada en estudios futuros.

*Palabras clave:* tabaquismo; tabaco; enfermedad inflamatoria intestinal; colitis ulcerosa; enfermedad de Crohn; estudio de casos y controles.

**ABSTRACT:** Ulcerative colitis and Crohn's disease are the two main types of inflammatory bowel disease and affect the gastrointestinal tract in a chronic and immune-mediated manner. They arise from the interaction of the immune system and the intestinal microbiota with genetic and environmental factors, being tobacco one of the most influential. Due to confusion in the literature, a meta-analysis was carried out to evaluate whether there is a real effect of smoking in these diseases. Research was conducted in PubMed and Google Scholar and a combined OR was calculated, based on the fixed effects model, of the studies which met the established inclusion criteria. Our results confirm that smoking is a protective factor for ulcerative colitis with statistically significant combined ORs, similar to those of other previously performed meta-analyses. Nevertheless, the association of smoking as a risk factor for Crohn's disease is not so clear, due to the fact that the combined ORs obtained are not significant or are close to non-significant and are smaller than in other meta-analyses, although we did detect that it should be analyzed in forthcoming studies.

*Keywords:* smoking; tobacco; inflammatory bowel disease; ulcerative colitis; Crohn's disease; case-control study.

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es una enfermedad crónica, inmunomediada, que afecta al tubo digestivo. Los dos tipos principales son la colitis ulcerosa (CU), que cursa con una inflamación de la mucosa del colon, comenzando en el recto y extendiéndose hacia los segmentos proximales de manera continua, y la enfermedad de Crohn (EC), que puede comprometer cualquier tramo del tubo digestivo, el íleon más frecuentemente, de forma transmural y discontinua. Alternan períodos de inactividad con períodos de crisis durante los cuales se presentan los síntomas. Algunos de ellos son diarrea (característica de la CU asociada con sangre y/o mucosidad), dolor abdominal (principalmente en la EC), pérdida de peso, fiebre, fatiga y síntomas rectales en caso de afectación del recto. En la EC son habituales plicomas, fisuras y/o fístulas con o sin abscesos. Ambas pueden cursar con manifestaciones extraintestinales, sobre todo articulares, cutáneas u oculares (Gompertz y Sedano, 2019).

Es de etiología multifactorial y compleja en la que participa el sistema inmune central, que mantiene un equilibrio entre las respuestas inmunes innatas y adaptativas, con complejas interacciones con la microbiota intestinal. Su interacción con factores genéticos y ambientales puede romper este equilibrio, conduciendo a una inflamación intestinal descontrolada (Silva *et al.*, 2019). Uno de los factores ambientales que más influencia y pruebas sólidas tiene es el tabaquismo, que puede aumentar el riesgo de padecer EC y empeora su evolución clínica o tener un efecto protector para la CU.

Debido a la confusión existente en la bibliografía sobre la asociación entre el tabaco y las EII (Thomas *et al.*, 2000) se ha realizado un metaanálisis. Este consiste en una revisión y síntesis cuantitativa de estudios relacionados, pero independientes, de manera que se aumenta la potencia del estudio para detectar un tamaño del efecto global. El objetivo principal de este trabajo es estudiar el efecto del tabaquismo sobre la EC y la CU mediante un metaanálisis. Además, se pretende explorar las posibles fuentes de heterogeneidad que pueden presentarse, así como el sesgo de publicación.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. *Búsqueda*

Se han utilizado los motores de búsqueda PubMed, que reúne la mayoría de las publicaciones clínicas, y Google Académico, por su gran extensión de búsqueda. No se aplicó restricción de años, pero sí de idioma a español o inglés, para identificar estudios observacionales, especialmente de cohortes o de casos y controles, que estudiaran los efectos del tabaquismo en la CU y la EC. En la búsqueda se utilizaron las palabras clave *smoking, tobacco, inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, Crohn's disease, case-control study* y *cohort study*, combi-nándolas con los operadores booleano *AND* y *OR* (y los correspondientes términos en español). Además, debido al número tan elevado de artículos encontrados en Google Académico, se añadió *allintitle* para una búsqueda más restringida.

Los criterios de inclusión definidos fueron que los estudios solo incluyan el tabaquismo como factor de riesgo en adultos; que aparezcan las condiciones de fumador, no fumador y exfumador, así como información suficiente para calcular el odds-ratio.

### 2.2. *Codificación de los estudios*

Se definieron a priori posibles factores causantes de la presencia de heterogeneidad entre los estudios. Estos factores son: género (%), edad (media), etnia y año de publicación.

### 2.3. *Métodos estadísticos*

Para la integración de los resultados obtenidos de los artículos elegidos se parte del modelo de efectos fijos, ya que no se pretende extrapolar las estimaciones obtenidas a estudios futuros o no recuperados. Este modelo parte de la hipótesis de que todos los OR obtenidos de los artículos estiman un único OR poblacional.

El tamaño del efecto elegido ha sido el OR debido a que las variables estudiadas eran cualitativas y el diseño de todos los estudios eran casos-controles. Para los análisis se ha utilizado la transformación logarítmica natural de los OR. El estimador Mantel-Haenszel ha sido aplicado en la integración de los resultados.

Para contrastar la presencia de heterogeneidad se ha utilizado el test Q de Cochran. Debido a su baja potencia, se ha utilizado el coeficiente  $I^2$ , que mide el porcentaje de variabilidad debida a los estudios. Si el valor de  $I^2$  es elevado indica una alta presencia de heterogeneidad.

Para detectar las causas de la heterogeneidad se han utilizado métodos gráficos como el gráfico de Baujat y el gráfico radial. También se han utilizado métodos cuantitativos como la metaregresión y la metapartición para detectar factores o covariables que pueden explicar esa heterogeneidad. En la metapartición se descompone la suma de cuadrados del test Q en una suma de cuadrados entre los grupos definidos por el factor y la suma de cuadrados dentro de los grupos. De manera que si la suma de cuadrados entre los grupos es grande y significativa nos indica que no hay una única población de estudios, sino varias.

Para la detección del sesgo de publicación se ha utilizado el método gráfico del embudo con las bandas de significación y el test de Egger.

Se ha establecido un nivel de confianza del 95 % para la elaboración de los intervalos de confianza y un nivel de significación de 0,05 para detectar heterogeneidad.

El software elegido para realizar los métodos estadísticos ha sido el plugin EZR de R Commander bajo el entorno de R.

## 3. RESULTADOS

Se encontraron 1066 artículos, pero solo trece cumplieron todos los criterios de inclusión fijados. El artículo 6 lo consideramos como 3 estudios porque aparecían datos diferentes para tres países, por lo que 15 examinaron la relación entre la CU y el tabaquismo, mientras que 10 examinaron la relación entre la EC y el tabaquismo.

### 3.1. Resultados para colitis ulcerosa

Al realizar la integración de fumadores frente a no fumadores, se detecta una heterogeneidad significativa debida a la diferencia entre estudios ( $I^2 = 45,3 \%$ ,  $p$ -valor = 0,03).

En el caso del año no se ha detectado influencia sobre la heterogeneidad ( $p$ -valor = 0,237) y tampoco en la etnia ( $p$ -valor = 0,72) (Figura 1). El género y la edad no pudieron ser analizados por falta de información en los estudios. Para cada etnia el  $p$ -valor es no significativo en asiáticos y judíos por lo que los estudios son homogéneos, pero los caucásicos sí presentan una heterogeneidad significativa.

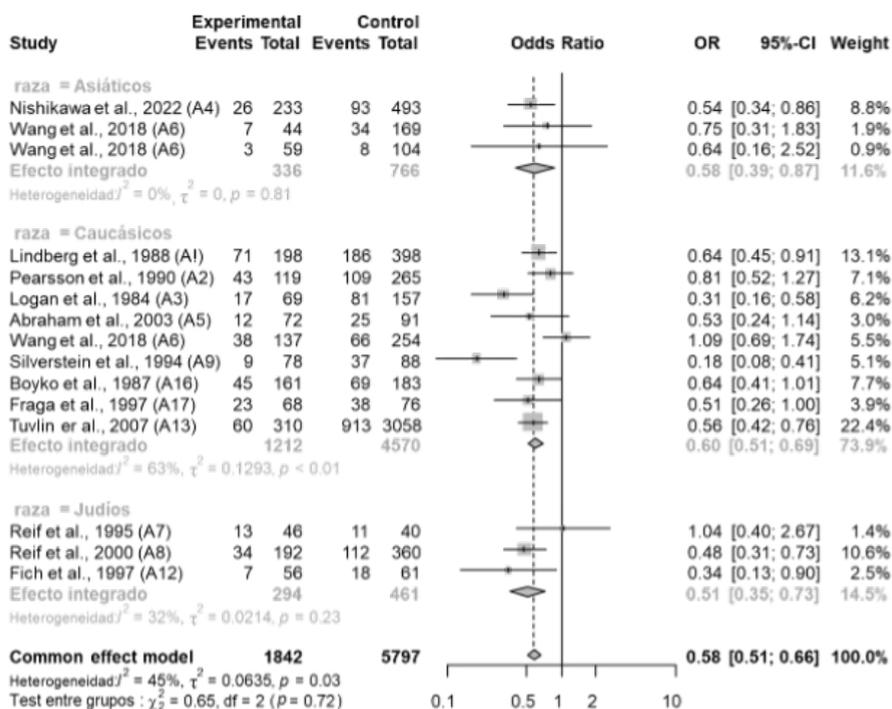


Figura 1. Forest plot de las diferentes etnias en la integración de fumadores frente a no fumadores para colitis ulcerosa.  $I^2$  es el porcentaje de variabilidad debida a los estudios,  $\tau^2$  indica la varianza entre grupos y el “test entre grupos” indica la suma de cuadrados entre estudios. El cuadrado representa el OR para cada artículo, es proporcional a la ponderación del estudio y las líneas sobre cada uno su intervalo de confianza. El rombo representa el OR global y sus vértices horizontales su intervalo de confianza. La línea vertical continua corresponde al OR igual a 1 y la discontinua el OR integrado global.

Dado que no se ha explicado la heterogeneidad por el año y la etnia, se ha medido la influencia de cada estudio particular en el tamaño del efecto global. Los gráficos *baujat plot* y *radial plot* (Figura 2A y B respectivamente) nos indican que hay dos estudios que son los que más aportan a la heterogeneidad detectada (A9 y A6 EEUU).

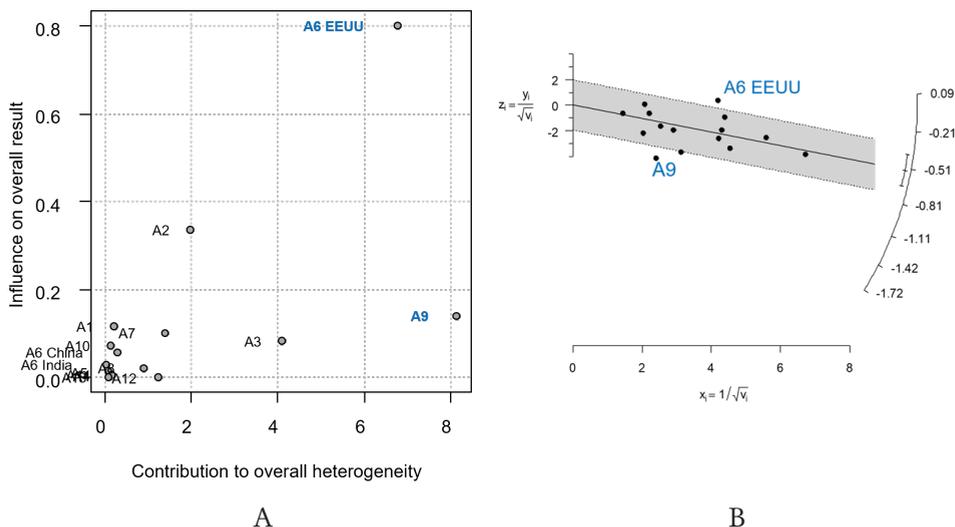


Figura 2. Gráficos de Baujat (A) y radial (B) en la integración fumadores frente no fumadores para colitis ulcerosa.

Se elimina el estudio A6 EEUU por ser el más influyente, y al realizar una nueva integración se obtiene un valor  $I^2$  del 29 % y un p-valor = 0,15, apareciendo así homogeneidad y un efecto protector significativo del tabaquismo con un OR integrado de 0,55 (IC al 95 %: 0,48-0,63) (Figura 3A).

En los casos de fumadores frente a exfumadores ( $I^2 = 69$  %; p-valor < 0,01) y no fumadores frente exfumadores ( $I^2 = 56$  %; p-valor < 0,01) se eliminan los estudios A6 EEUU y A13 (que comparan con controles simulados) que contribuyen a la heterogeneidad, obteniéndose un valor de  $I^2 = 32$  y p-valor = 0,13 e  $I^2 = 24$  % y p-valor = 0,20, respectivamente. Se comprueba que fumar es todavía más protector frente a exfumadores con un OR global de 0,31 (IC<sub>9,5%</sub>: 0,25-0,38) (Figura 2A) y no fumar también es factor protector frente a exfumar, pero con menos intensidad que fumar, con un OR global de 0,59 (IC<sub>95%</sub>: 0,51-0,69) (Figura 3A).

### 3.2. Resultados para enfermedad de Crohn

Al realizar la integración de fumadores frente a no fumadores, se detecta una heterogeneidad significativa debida a la diferencia entre estudios ( $I^2 = 72\%$ ;  $p$ -valor  $< 0,01$ ). Hemos encontrado también un mayor número de artículos que presentan heterogeneidad en comparación con la CU.

La metaregresión con los años ha sido significativa con una tendencia a reducirse la magnitud del OR con el paso del tiempo ( $p$ -valor = 0,015).

Al comprobar si es debida a las etnias, se observa un  $p$ -valor asignado a la suma de cuadrados entre estudios de 0,05, al límite de la significación y grandes diferencias entre ellas. Los asiáticos muestran un factor protector no significativo, el tamaño del efecto para los judíos no llega a ser de riesgo y tampoco es significativo. Los caucásicos sí presentan un efecto de riesgo significativo y también significativo para heterogeneidad. Esta se analiza mediante el gráfico *banjat* y vemos que los estudios A2 y A6 EEUU son muy influyentes y presentan una gran contribución.

Se eliminan y se vuelve a segmentar por etnia, obteniéndose un  $p$ -valor = 0,07, también cerca de la significación.

En la integración de fumadores frente a exfumadores, se elimina el estudio de la India por ausencia de exfumadores y también se observa una heterogeneidad debida a la etnia, tanto en caucásicos como en judíos, siendo los artículos A6 EEUU y A7 los causantes. Al eliminarlos obtenemos homogeneidad entre grupos, pero el  $p$ -valor asignado a la suma de cuadrados entre estudios sigue siendo significativo. Lo mismo ocurre en la integración no fumadores frente exfumadores, pero en este caso solo presentaban heterogeneidad en el grupo los caucásicos y se elimina el A6 EEUU.

A nivel global, fumar aparece como factor de riesgo tanto frente a no fumar como a exfumar con un OR combinado de 1,18 ( $IC_{95\%}$ : 1,01-1,39) y 1,48 ( $IC_{95\%}$ : 1,19-1,85), respectivamente; y no fumar frente a exfumar como factor de riesgo no significativo con un OR = 1,12 ( $IC_{95\%}$ : 0,92-1,37). En la Figura 3B se recogen los resultados segmentados por etnias, donde en el caso de asiáticos y judíos no se ha detectado asociación estadísticamente significativa entre los diferentes grupos, a excepción de fumadores vs exfumadores en la etnia asiática, donde el efecto del tabaco es protector.

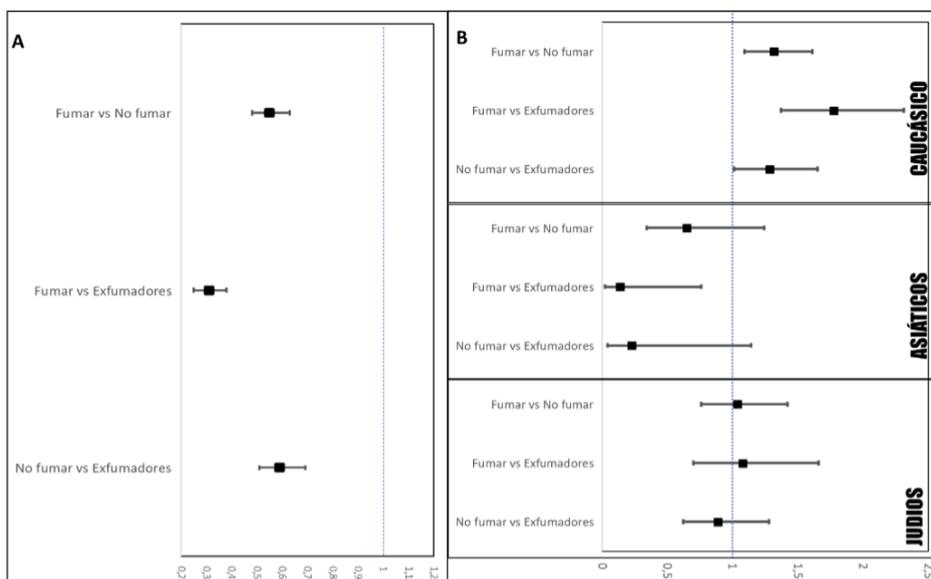


Figura 3. Gráfico *forest plot* de las tres integraciones para colitis ulcerosa (A) una vez encontrada la homogeneidad y gráfico *forest plot* de las tres integraciones y etnias para enfermedad de Crohn (B).

### 3.3. Sesgo de publicación

Debido a que es más frecuente que los estudios no significativos no se publiquen, y por lo tanto se sesgue la tendencia a resultados significativos, se realiza el gráfico *funnel plot* con bandas de significación, que compara los resultados obtenidos con el caso de que no haya asociación. Se comprueba que hay varios estudios que están en la zona no significativa, por lo tanto, no parece que pueda haber sesgo de publicación ni en CU ni en EC. Además, el test de Egger tanto para la CU (p-valor = 0,59) como para la EC (p-valor = 0,28) no ha sido significativo.

## 4. DISCUSIÓN

En la colitis ulcerosa parece ser que, efectivamente, el tabaco es un factor protector y nuestros resultados coinciden con otros metaanálisis realizados anteriormente. Calkins (1989) informó de una asociación fuerte y consistente, asociando tabaquismo actual como factor protector frente a no fumar con un OR de 0,41 (IC<sub>95%</sub>: 0,34-0,48) y haber dejado de fumar como factor de riesgo frente a

no fumar con un OR de 1,64 (IC<sub>95 %</sub>: 1,36-1,98). Mahid *et al.* (2006) obtuvieron las mismas conclusiones, con un OR de fumadores frente a no fumadores de 0,58 (IC<sub>95 %</sub>: 0,45-0,75) y exfumadores frente no fumadores de 1,79 (IC<sub>95 %</sub>: 1,37-2,34).

Para la EC se han obtenido OR menores que otros estudios donde el tamaño del efecto del tabaquismo ha sido OR = 2,0 (IC<sub>95 %</sub>: 1,65-2,47) en comparación con no fumadores y un OR = 1,8 (IC<sub>95 %</sub>: 1,33-2,51) en comparación con exfumadores (Calkins, 1989) y OR para fumar frente no fumar de 1,76 (IC<sub>95 %</sub>: 1,40-2,22) (Mahid *et al.*, 2006).

La diferente etiología entre ambas enfermedades, la localización de la enfermedad y las diferencias en la respuesta inmune, que son específicas para el tejido afectado, podrían ser las tres posibilidades que explicasen los efectos opuestos del tabaquismo sobre la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Berkowitz *et al.*, 2018).

Se detectó una relación con la etnia y se obtuvieron OR protectores en poblaciones asiáticas. Varios estudios sugieren un papel diferente del tabaquismo en asiáticos (Park y Jeon, 2017) y judíos (Reif *et al.*, 2000) en comparación con poblaciones occidentales. En los asiáticos puede influir que sean más reacios a revelar su historial de tabaquismo por la influencia de su cultura confuciana (Hwang *et al.*, 2017).

Las diferencias que hemos encontrado con relación a otros metaanálisis podrían deberse a que nosotros hemos considerado solo estudios que contemplaban el factor tabaco como único factor de riesgo y otros metaanálisis incluyen más factores. Sería conveniente realizar tanto estudios primarios como revisiones sistemáticas donde se contemplara la etnia como un factor a tener en cuenta sobre el efecto del tabaquismo en las enfermedades inflamatorias o si por el contrario existe un factor de confusión que produce la asociación detectada.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham N, Selby W, Lazarus R, Solomon M. Is smoking an indirect risk factor for the development of ulcerative colitis? An age- and sex-matched case-control study. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003; 18(2):139-146.
- Berkowitz L, Schultz BM, Salazar GA, Pardo-Roa C, Sebastián VP, Álvarez-Lobos MM *et al.* Impact of Cigarette Smoking on the Gastrointestinal Tract Inflammation: Opposing Effects in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Front Immunol.* 2018; 9(74).
- Boyko EJ, Koepsell TD, Perera DR, Inui TS. Risk of ulcerative colitis among former and current cigarette smokers. *N Engl J Med.* 1987; 316(12):707-710.
- Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 1989; 34(12):1841-1854.

- Fich A, Eliakim R, Sperber AD, Carel RS, Rachmilewitz D. The association between smoking and inflammatory bowel disease among Israeli Jewish patients. *Inflamm Bowel Dis.* 1997; 3(1):6-9.
- Fraga XF, Vergara M, Medina C, Casellas F, Bermejo B, Malagelada JR. Effects of smoking on the presentation and clinical course of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1997; 9(7):683-687.
- Gompertz M, Sedano R. Manifestaciones clínicas y endoscópicas en enfermedad inflamatoria intestinal. *Rev Med Clín Las Condes.* 2019; 30(4):273-282.
- Hwang SW, Seo H, Kim G-U, Song EM, Seo M, Park SH et al. Underestimation of smoking rates in an East Asian population with Crohn's disease. *Gut Liver.* 2017; 11(1):73-78.
- Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut.* 1988; 29(3):352-357.
- Logan RF, Edmond M, Somerville KW, Langman MJ. Smoking and ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1984; 288(6419):751-753.
- Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc.* 2006; 81(11):1462-1471.
- Nishikawa A, Tanaka K, Miyake Y, Nagata C, Furukawa S, Andoh A et al. Active and passive smoking and risk of ulcerative colitis: A case-control study in Japan. *J Gastroenterol Hepatol.* 2022; 37(4):653-659.
- Park SC, Jeon YT. Role of smoking as a risk factor in east Asian patients with Crohn's disease. *Gut Liver.* 2017; 11(1):7-8.
- Persson PG, Ahlbom A, Hellers G. Inflammatory bowel disease and tobacco smoke-a case-control study. *Gut.* 1990; 31(12):1377-1381.
- Reif S, Klein I, Arber N, Gilat T. Lack of association between smoking and inflammatory bowel disease in Jewish patients in Israel. *Gastroenterology.* 1995; 108(6):1683-1687.
- Reif S, Lavy A, Keter D, Fich A, Eliakim R, Halak A et al. Lack of association between smoking and Crohn's disease but the usual association with ulcerative colitis in Jewish patients in Israel: a multicenter study. *Am J Gastroenterology.* 2000; 95(2):474-478.
- Silva F, Gatica T, Pavez C. Etiología y fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Rev Médica Clín Las Condes.* 2019; 30(4):262-272.
- Silverstein MD, Lashner BA, Hanauer SB. Cigarette smoking and ulcerative colitis: a case-control study. *Mayo Clin Proc.* 1994; 69(5):425-429.
- Thomas GA, Rhodes J, Green JT, Richardson, C. Role of smoking in inflammatory bowel disease: implications for therapy. *Postgrad Med J.* 2000; 76(895):273-279.
- Tuvlin JA, Raza SS, Bracamonte S, Julian C, Hanauer SB, Nicolae DL et al. Smoking and inflammatory bowel disease: Trends in familial and sporadic cohorts. *Inflamm Bowel Dis.* 2007; 13(5):573-579.
- Wang P, Hu J, Ghadermarzi S, Raza A, O'Connell D, Xiao A et al. Smoking and Inflammatory Bowel Disease: A Comparison of China, India, and the USA. *Dig Dis Sci.* 2018; 63(10):2703-2713.

## AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN BEBIDAS PROBIÓTICAS: EL CASO DE LA KOMBUCHA

### *Isolation and Identification of Microorganisms from Probiotic Beverages: The Case of Kombucha*

Oana María MACIUCA<sup>1,2</sup>; Fernando SÁNCHEZ-JUANES<sup>2\*</sup>; Esther MENÉNDEZ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad Farmacia/CIALE. Departamento de Microbiología y Genética. Edificio Departamental Lab. 209. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. Pl. Doctores de la Reina, s/n. 37007 Salamanca, España

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Edificio Departamental Lab. 109. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. Pl. Doctores de la Reina, s/n. 37007 Salamanca. España

\*autores de correspondencia

Correo-e: [esthermenendez@usal.es](mailto:esthermenendez@usal.es)/[fsjuanes@usal.es](mailto:fsjuanes@usal.es)

**RESUMEN:** La kombucha es una bebida que ha ganado popularidad en los últimos años por sus aparentes propiedades probióticas. En este estudio se aislaron e identificaron microorganismos presentes en una muestra de cultivo *starter* de elaboración casera y en tres marcas comerciales de kombucha para determinar y comparar sus composiciones microbianas. Para la identificación de bacterias y levaduras se emplearon tanto la espectrometría de masas *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight* como secuenciación Sanger, analizándose tanto sus espectros como las secuencias derivadas de los genes marcadores taxonómicos de hongos (ITS) y bacterias (16S rRNA). Los resultados demostraron una amplia variabilidad de géneros microbianos entre muestras y una alta presencia de posibles contaminaciones. Además, la presencia de especies con potencial probiótico fue menor a la esperada. Mediante este estudio se concluyó que la kombucha es susceptible de presentar tanto microorganismos beneficiosos

como perjudiciales para la salud, poniendo de manifiesto la necesidad de endurecer las medidas higiénicas y la legislación en torno a la producción de kombucha y otras bebidas probióticas.

*Palabras clave:* kombucha; probióticos; contaminaciones; MALDI-TOF; secuenciación.

**ABSTRACT:** Kombucha is a very popular beverage, which is rising interest in recent years for its apparent probiotic properties. Here, we isolated and identified microorganisms present in a homemade kombucha starter culture and three commercial brands of kombucha to determine and compare their microbial composition. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and Sanger sequencing were used to identify bacteria and yeasts. We analyzed the MALDI-TOF MS spectra and the nucleotide sequences derived from the taxonomic marker genes for fungi (ITS) and bacteria (16S rRNA). The results showed a wide biodiversity of microbial genera among the samples and a high presence of putative contaminations. The presence of species with probiotic potential was lower than expected. Overall, we concluded that kombucha could harbor both potentially beneficial and putative harmful microorganisms, revealing and highlighting the necessity to harden and improve the hygienic measures and legislation around the production of kombucha and other probiotic beverages.

*Keywords:* kombucha; probiotics; contaminations; MALDI-TOF; sequencing.

## 1. INTRODUCCIÓN

La kombucha es un té negro o verde azucarado y fermentado por una simbiosis entre bacterias y levaduras que se encuentran incrustadas en una capa de celulosa microbiana, lo que recibe el nombre de SCOBY (del inglés *Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast*) (Marsh *et al.*, 2014; Arikan *et al.*, 2020; May *et al.*, 2019).

La kombucha comenzó siendo una bebida casera tradicional que con el tiempo se ha industrializado y se ha convertido en una bebida altamente consumida (Arikan *et al.*, 2020). El creciente interés por los productos fermentados y probióticos impulsó el consumo de esta bebida, a la que se le atribuyen propiedades probióticas beneficiosas para la salud. Sin embargo, su composición y efectos

no están del todo investigados y las propiedades probióticas no se han asociado directamente con los microorganismos presentes en la kombucha (Marsh *et al.*, 2014; Vargas *et al.*, 2021).

Durante la fermentación de la kombucha existen dos componentes diferenciados: la capa de celulosa microbiana y el caldo de debajo de esta. Algunos estudios se basan en la caracterización de microorganismos tanto de la película celulósica como del caldo, mientras que existen otros estudios que investigan la composición microbiana en distintos días de fermentación (Marsh *et al.*, 2014; Arikian *et al.*, 2020).

Generalmente, la simbiosis está conformada por bacterias ácido-acéticas (BAA), bacterias lácticas (BAL) y levaduras, todas ellas consideradas con potencial probiótico (Marsh *et al.*, 2014; Arikian *et al.*, 2020). Además, es muy probable encontrar microorganismos contaminantes e incluso patógenos oportunistas, ya que generalmente la kombucha casera se elabora en ambientes no asépticos y a partir de un cultivo iniciador que no está del todo caracterizado en cuanto a los microorganismos que contiene (Nguyen *et al.*, 2015).

## 2. OBJETIVOS

En este trabajo nos planteamos tres objetivos: i) aislamiento de microorganismos de una muestra de SCOBY y tres muestras de diferentes marcas comerciales de kombucha, ii) identificación de los microorganismos aislados mediante una combinación de espectrometría de masas (EM) MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*) y secuenciación Sanger y iii) comparación de las distintas microbiotas asociadas a los cultivos *starter* y kombuchas comerciales.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Muestras y medios de cultivo

Se seleccionaron 4 muestras: SCOBY (vendedor particular) y MC1, 2 y 3 (Marca Comercial 1, 2 y 3). Se seleccionaron y prepararon los medios de cultivo enumerados en la Tabla 1.

TABLA 1. Medios de cultivo utilizados en este trabajo

Medio de cultivo	Composición	Microorganismo diana
MYP	D-manitol 25 gL <sup>-1</sup> , extracto de levadura 5 gL <sup>-1</sup> , peptona bacteriológica 3 gL <sup>-1</sup> , CaCO <sub>3</sub> 20 gL <sup>-1</sup> y vinagre de vino filtrado 10 mL L <sup>-1</sup> + agar 15 gL <sup>-1</sup>	Bacterias ácidoacéticas (AAB)
TJA (Sigma-Aldrich)	Hidrolizado enzimático de caseína 10 gL <sup>-1</sup> , leche peptonizada 10 gL <sup>-1</sup> , jugo de tomate 20 gL <sup>-1</sup> + agar 11 gL <sup>-1</sup>	Bacterias ácido-lácticas (LAB) y levaduras
MRS (Sigma-Aldrich)	Citrato de hidrógeno diamónico 2 gL <sup>-1</sup> , fosfato de hidrógeno dipotásico 2 gL <sup>-1</sup> , D (+)-glucosa 20 gL <sup>-1</sup> , sulfato de magnesio 0,1 gL <sup>-1</sup> , sulfato de manganeso 0,05 gL <sup>-1</sup> , extracto de carne 5 gL <sup>-1</sup> , acetato sódico 5 gL <sup>-1</sup> , peptona universal 10 gL <sup>-1</sup> , extracto de levadura 5 gL <sup>-1</sup> + agar 12 gL <sup>-1</sup>	Bacterias ácido-lácticas (LAB)
PCA (Sigma-Aldrich)	Dextrosa 1 gL <sup>-1</sup> , triptona 5 gL <sup>-1</sup> , extracto de levadura 2,5 gL <sup>-1</sup> + agar 9 gL <sup>-1</sup>	Bacterias
PDA (Difco)	Fécula de patata 4 gL <sup>-1</sup> , dextrosa 20 gL <sup>-1</sup> + agar 15 gL <sup>-1</sup>	Hongos
YGC	Extracto de levadura 5 gL <sup>-1</sup> , glucosa 20 gL <sup>-1</sup> + agar 15 gL <sup>-1</sup>	Levaduras
M2Lev	Extracto de malta 20 gL <sup>-1</sup> , extracto de levadura 3 gL <sup>-1</sup> + agar 15 gL <sup>-1</sup>	Hongos filamentosos

### 3.2. Tratamiento de las muestras

Se llevaron a cabo diluciones seriadas de las muestras. Para el SCOBY, se fragmentó un trozo de película junto con caldo con ayuda del vórtex hasta obtener una muestra homogénea. Se sembraron las placas con las distintas diluciones y se incubaron a 28-30 °C durante 24-72 horas.

Una vez observado crecimiento, se llevaron a cabo recuentos de colonias en las placas de la dilución que presentasen entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC) y se calculó la carga microbiana (UFC/mL). A continuación, se aislaron las colonias por el método de agotamiento en estría.

### 3.3. EM MALDI-TOF

Se sembraron las cepas aisladas en placas de agar divididas en varias secciones. Una vez incubadas y crecidas, se inició el proceso de extracción de proteínas (Ferreira *et al.*, 2011).

La EM MALDI-TOF permite identificar microorganismos mediante el análisis de proteínas ribosómicas de cada uno (Maldonado *et al.*, 2018; Relloso *et al.*, 2015). Mediante EM MALDI-TOF se obtiene un espectro de masas que muestra la relación masa/carga frente a intensidad absoluta, representado en forma de picos. Cada uno de esos picos es una proteína diferente.

El perfil de proteínas ribosómicas del microorganismo es único para cada especie. Independientemente de las condiciones a las que esté expuesto un microorganismo, hay determinadas proteínas constantes que se mantienen (Maldonado *et al.*, 2018). De esta forma, el espectro de masas de las proteínas del microorganismo problema es comparado frente a una base de datos de espectros de referencia y, según las similitudes que presenten, el programa emite un resultado y un valor de puntuación o *score* (Maldonado *et al.*, 2018; Relloso *et al.*, 2015). En este estudio se compararon las cepas problema frente a dos bases de datos: una primera, previa a la secuenciación (Maldi Biotyper 3, base de datos con 4111 referencias [MSPs], Bruker Daltonics), y una segunda, posterior a la secuenciación (Maldi Biotyper 3, base de datos con 9997 referencias [MSPs], Bruker Daltonics).

### 3.4. Secuenciación Sanger

Se procedió a identificar por secuenciación aquellas cepas que no habían sido identificadas por el método EM MALDI-TOF. Se extrajo su ADN y se amplificó el gen del ARNr 16S en el caso de bacterias y la región ITS (Internal Transcribed Spacer) en el caso de hongos por PCR convencional. Se comprobó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Una vez obtenidos los amplicones, se procedió a purificar el ADN con el *kit* “DNA Clean & Concentrator®-5” (ZYMO RESEARCH). Las muestras se secuenciaron en Macrogen, Inc. y se editaron con el programa informático BioEdit (SAS Institute Inc.). Las secuencias obtenidas se analizaron mediante Nucleotide BLAST® de NCBI (National Center for Biotechnology Information), que compara una secuencia problema frente a secuencias de referencia de una base de datos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Recuento de colonias

Se llevó a cabo el recuento de colonias de cada muestra para conocer la carga microbiana de estas. Se observó una mayor concentración de microorganismos en la muestra de SCOBY ( $10^6$ ) que en cualquiera de las muestras comerciales ( $10^4$ ) de kombucha.

### 4.2. Aislamiento e identificación de microorganismos

Se aislaron cepas morfológicamente diferentes de cada muestra, obteniéndose un total de 54 cepas aisladas.

Por el método de EM MALDI-TOF se identificaron 29 cepas de las 54 cepas aisladas. Las cepas que no se consiguieron identificar por EM MALDI-TOF se secuenciaron por Sanger, identificándose 12 cepas, de las cuales solamente 5 fueron identificaciones nuevas adicionales al EM MALDI-TOF.

En definitiva, respecto a las 54 cepas de las que se partió, un 53.7 % de estas fue identificado por EM MALDI-TOF y un 9.3 % fue identificado por secuenciación. Por lo tanto, se identificó un 63 % de las cepas aisladas (Tabla 2).

TABLA 2. Cepas identificadas por EM MALDI-TOF y Sanger.  
 Clo: cloranfenicol, Chx: cicloheximida

Muestra	M. aislam.	Dilución	Nombre cepa	ID	ID más cercana	Score	Secuenc.
SCOBY	MRS + Chx	-4	SMRS4.1	MALDI	ID poco fiable	1.485	-
SCOBY	MRS + Chx	-4	SMRS4.2	MALDI	ID poco fiable	1.365	-
SCOBY	PCA + Chx	-4	SPCA4.3	MALDI	ID poco fiable	1.499	-
SCOBY	PDA + Clo	-4	SPDA4.4	MALDI	ID poco fiable	1.547	-
SCOBY	PDA + Clo	-4	SPDA4.5	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.279	-
SCOBY	YGC + Clo	-4	SYGC4.6	MALDI	ID poco fiable	1.556	-
SCOBY	YGC + Clo	-4	SYGC4.7	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.369	-
SCOBY	M2Lev + Clo	-4	SM2Lev4.8	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.141	-
SCOBY	M2Lev + Clo	-4	SM2Lev4.9	MALDI	ID poco fiable	1.385	-
SCOBY	TJA	-4	STJA4.10	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.291	-
SCOBY	TJA	-4	STJA4.11	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.359	-
SCOBY	TJA	-4	STJA4.12	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.396	-
SCOBY	TJA	-4	STJA3.13 A	MALDI	<i>Zygoascus meyeriae</i>	2.040	Sí
SCOBY	TJA	-4	STJA4.13 B	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.316	-
SCOBY	M2Lev + Clo	-4	SM2Lev4.14	MALDI	<i>Zygoascus meyeriae</i>	1.800	-
SCOBY	PDA + Clo	-4	SPDA4.15	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.517	-
SCOBY	PCA + Chx	-4	SPCA4.16	MALDI	<i>Hanseniaspora apuntiae</i>	1.760	-

OANA MARÍA MACIUCA; FERNANDO SÁNCHEZ-JUANES; ESTHER MENÉNDEZ  
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN BEBIDAS PROBIÓTICAS:  
EL CASO DE LA KOMBUCHA

MC1	M2Lev + Clo	-3	M1M2Lev3.17	MALDI	<i>Candida robusta</i> [ana] ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [teleo])	2.304	-	
MC1	M2Lev + Clo	-3	M1M2Lev3.18	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.781	-	
MC1	YGC + Clo	-3	M1YGC3.19	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.877	-	
MC1	YGC + Clo	-3	M1YGC3.20	MALDI	ID poco fiable	1.489	-	
MC1	PDA + Clo	-3	M1PDA3.21	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.880	-	
MC1	PDA + Clo	-3	M1PDA3.22	MALDI	ID poco fiable	1.402	Sí	
MC1	TJA	-3	M1TJA3.23 A	MALDI	ID poco fiable	1.623	Sí	
MC1	TJA	-3	M1TJA3.23 B	MALDI	<i>Candida krusei</i> [ana] ( <i>Issatchenkia orientalis</i> [teleo])	2.280	-	
MC1	TJA	-3	M1TJA3.24	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.819	-	
MC1	MRS	-3	M1MRS3.25	MALDI	ID poco fiable	1.342	-	
MC2	MRS	-3	M2MRS3.26	MALDI	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	2.060	-	
MC2	PDA	-3	M2PDA3.27	MALDI	ID poco fiable	1.416	Sí	
MC2	M2Lev	-3	M2M2Lev3.28	MALDI	ID poco fiable	1.419	Sí	
MC2	YGC	-3	M2YGC3.29	MALDI	ID poco fiable	1.380	-	
MC2	PCA	-3	M2PCA3.30	MALDI	ID poco fiable	1.359	-	
MC2	PCA	-3	M2PCA3.31	MALDI	ID poco fiable	1.271	-	
MC2	PCA	-3	M2PCA3.32	MALDI	<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	1.902	Sí	
MC2	PCA	-3	M2PCA3.33	MALDI	ID poco fiable	1.435	Sí	
MC3	TJA	-3	M3TJA3.35	MALDI	ID poco fiable	1.495	-	
MC3	TJA	-3	M3TJA3.36	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.700	-	
MC3	YGC	-3	M3YGC3.37	MALDI	ID poco fiable	1.354	-	
MC3	YGC	-3	M3YGC3.38	MALDI	ID poco fiable	1.409	-	
MC3	PDA	-3	M3PDA3.39	MALDI	ID poco fiable	1.267	-	
MC3	PDA	-3	M3PDA3.40	MALDI	ID poco fiable	1.451	-	
MC3	PDA	-3	M3PDA3.41	MALDI	ID poco fiable	1.437	-	
MC3	M2Lev	-3	M3M2Lev3.42	MALDI	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	1.920	Sí	
MC3	M2Lev	-3	M3M2Lev3.43	MALDI	ID poco fiable	1.354	-	
MC3	MRS	-2	M3MRS2.46	MALDI	ID poco fiable	1.426	-	
MC3	MRS	-2	M3MRS2.47	MALDI	<i>Oenococcus oeni</i>	2.170	-	
MC3	PCA	D	M3PCAD.48	MALDI	<i>Bacillus cereus</i>	1.915	Sí	
MC3	PCA	D	M3PCAD.49	MALDI	<i>Bacillus simplex</i>	2.194	Sí	
MC3	M2Lev	D	M3M2LevD.50	MALDI	ID poco fiable	1.457	-	
MC3	M2Lev	D	M3M2LevD.51	MALDI	<i>Bacillus subtilis</i>	2.539	-	
MC3	PDA	D	M3PCAD.52	MALDI	<i>Bacillus cereus</i>	2.165	-	
MC3	TJA	-3	M3TJA3.53	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.766	Sí	
MC3	M2Lev	-3	M3M2Lev3.54	MALDI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1.844	-	
MC3	PCA	D	M3PCAD.55	MALDI	<i>Bacillus megaterium</i>	1.867	Sí	
<b>Nombre cepa</b>		<b>Especie más cercana tipo</b>		<b>% Ident.</b>	<b>Nº Acceso</b>	<b>Especie más cercana no tipo</b>	<b>% Ident.</b>	<b>Nº Acceso</b>
STJA3.13 A			<i>Cutibacterium acnes</i> DSM 1897 <sup>1</sup>	93.27%	CP025934.1	Uncultured bacterium clone Ce.so-M-DM-HN-2-179	93.61%	HQ639500.1
M1PDA3.22			<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72 <sup>1</sup>	99.48%	NR_165974.1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72	99.48%	NR_165974.1
M1TJA3.23 A			<i>Moraxella osloensis</i> strain NCTC 10465 <sup>1</sup>	98.82%	KT989843.1	<i>Moraxella osloensis</i> strain 15a42	98.98%	M2452133.1
M2PDA3.27			<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72 <sup>1</sup>	99.48%	NR_165974.1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72	99.48%	NR_165974.1
M2M2Lev3.28			<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72 <sup>1</sup>	98.70%	NR_165974.1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> culture CBS:2547	99.21%	KY103311.1
M2PCA3.32			<i>Corynebacterium mucifaciens</i> CIP 105129 strain DMMZ 2278 <sup>1</sup>	99.32%	NR_026396.1	Uncultured bacterium clone ncm02h02c1	99.55%	KF075917.1
M2PCA3.33			<i>Bacillus australimaris</i> strain MCCC 1A05787 <sup>1</sup>	98.86%	MN077148.1	<i>Bacillus pumilus</i> strain E97C55	98.96%	MK474954.1
M3M2Lev3.42			<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72 <sup>1</sup>	99.21%	NR_165974.1	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> CBS 72	99.21%	NR_165974.1
M3PCAD.48			<i>Bacillus paranthracis</i> strain MCCC 1A00395 <sup>1</sup>	97.46%	MK508861.1	Uncultured bacterium clone 5_Am_80	97.69%	KM464182.1
M3PCAD.49			[ <i>Brevibacterium</i> ] <i>frigoritolerans</i> strain DSM 8801 <sup>1</sup>	94.93%	MK424281.1	Bacterium S27	95.05%	JX293312.1
M3TJA3.53			<i>Oenococcus oeni</i> strain JCM 6125 <sup>1</sup>	99.40%	LC071842.1	<i>Oenococcus oeni</i> strain OE37	99.40%	CP053280.1
M3PCAD.55			<i>Paenibacillus zeae</i> strain 6R2 <sup>1</sup>	95.14%	NR_145868.1	<i>Paenibacillus lautus</i> strain Q1.1.2.M17	95.14%	MTS15771.1

### 4.3. Diferencias entre muestras

Las muestras presentaron diferencias significativas en su composición microbiana. De las especies identificadas, ninguna fue identificada en todas las 4 muestras y solamente una especie aparece en 3 de las muestras (MC1, MC2 y MC3) (Figura 1).

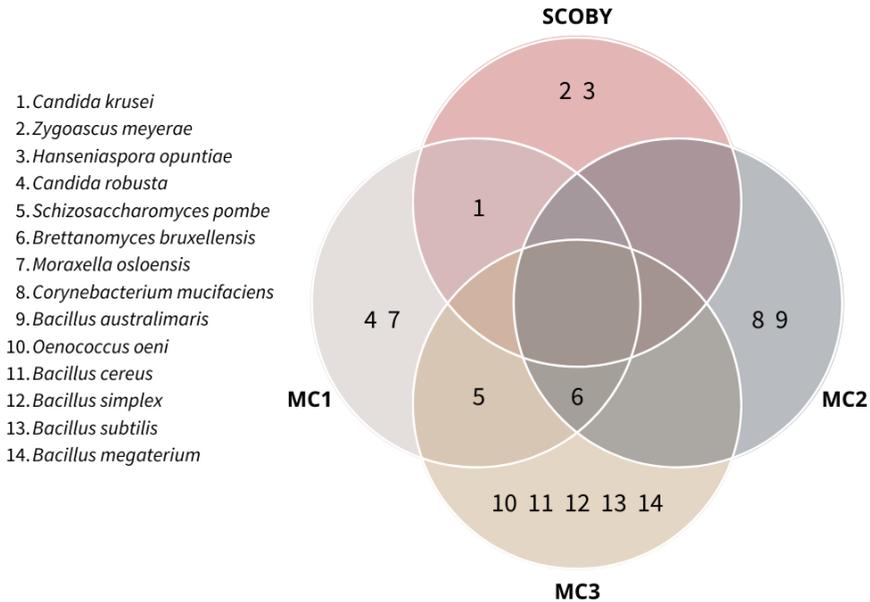


Figura 1. Diagrama de Venn en el que se observan aquellas especies que comparten o no entre las distintas muestras.

En el SCOBY, se identificaron 3 especies, destacando el elevado porcentaje de cepas pertenecientes a *Candida krusei*. En la cepa STJA3.13 A existe una incongruencia, puesto que la especie identificada por EM MALDI-TOF (*Zygoascus meyeræ*) no coincide con la identificada por secuenciación (*Cutibacterium acnes*) (Tabla 2). En la Marca Comercial 1 (MC1), se identificaron 5 especies, siendo *Schizosaccharomyces pombe* la presente en mayor porcentaje, seguida por especies del género *Candida*. En la Marca Comercial 2 (MC2), se identificaron 3 especies, destacando *Brettanomyces bruxellensis*. La cepa M2PCA3.32 se identificó tanto por EM MALDI-TOF como por secuenciación, obteniéndose por ambos métodos la especie *Corynebacterium mucifaciens* (Tabla 2). En la Marca Comercial 3 (MC3), se identificaron 7 especies, destacando *Schizosaccharomyces pombe* y *Bacillus cereus*. Se observaron incongruencias en las identificaciones por EM MALDI-TOF y secuenciación de 4 cepas (Tabla 2).

## 5. DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la composición de 4 muestras de kombucha (el cultivo *starter* o SCOBY y tres de distintas marcas comerciales). La probabilidad de encontrar contaminaciones era mayor en el caso del SCOBY al provenir de un

vendedor particular. Por el contrario, no se esperaba encontrar ninguna contaminación en las marcas comerciales, puesto que son productos regularizados a disposición del consumidor.

En el caso del SCOBY destaca la presencia de un alto porcentaje de *Candida krusei*, una especie patógena causante de infecciones. Esto podría indicar que en la elaboración de kombucha casera no se cumplan las medidas higiénicas necesarias, produciéndose así contaminaciones (Nguyen *et al.*, 2015). También se identificó la especie *Hanseniaspora opuntiae*, una levadura detectada en la fermentación de granos de cacao (Papalexandratou *et al.*, 2013) y en el biofilm de una muestra de kombucha de un estudio previo (Mas *et al.*, 2022). Además de esta especie, *Hanseniaspora valbyensis* ha sido identificada en muestras de kombucha de otros estudios (Mas *et al.*, 2022).

La MC1 presenta un alto porcentaje de levaduras de la especie *Schizosaccharomyces pombe*, identificada previamente en muestras de kombucha (May *et al.*, 2019). Se identificó también la especie *Candida robusta*, que es el anamorfó de *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura detectada en muestras de kombucha y demás bebidas probióticas y cuyo potencial probiótico ha sido comprobado en estudios previos. En la MC1 vuelve a aparecer *Candida krusei*, lo cual indica que esta muestra también sufrió contaminaciones. Los géneros *Saccharomyces* y *Candida* han sido identificados en otros productos probióticos, tales como la masa madre y el kéfir (May *et al.*, 2019).

Por secuenciación se identificó *Brettanomyces bruxellensis*, una de las levaduras mayoritarias en muestras de kombucha de estudios previos (Marsh *et al.*, 2014; May *et al.*, 2019; Angela *et al.*, 2020), junto con la única especie bacteriana de la muestra, *Moraxella osloensis*, que ha sido aislada en otras ocasiones de la piel humana y de ropa húmeda, de manera que no es habitual encontrarla asociada a alimentos.

En la MC2 la única levadura identificada fue *Brettanomyces bruxellensis*, de forma que es la muestra que menor variedad de levaduras presenta (Angela *et al.*, 2020). Esta es la responsable del sabor característico de la kombucha (Marsh *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2015) y de favorecer la producción de ácido glucurónico, una sustancia con propiedades desintoxicantes, por parte de las BAA (Nguyen *et al.*, 2015). También aparece el género *Bacillus*, presente en el etiquetado de marcas comerciales de kombucha de otros estudios.

La MC3 presenta un mayor porcentaje de bacterias que de levaduras, al contrario que el resto. Destaca la presencia de la especie *B. cereus*, una especie de bacterias en la que se han descrito numerosas cepas productoras de toxinas causantes de intoxicaciones alimentarias. No es habitual encontrar esta especie en bebidas probióticas. Sin embargo, la especie *Bacillus subtilis* presente en la MC3 ha sido reportada como un probiótico incluido en kombucha comercial.

También se identificó la especie *Oenococcus oeni*, una bacteria láctica presente en vino, vinagre y kombucha (Lorentzen *et al.*, 2019). Las BAL han demostrado ser potentes probióticos beneficiosos para la salud, de forma que la identificación de una única BAL en las distintas muestras no es un buen indicio, sino que debería haber una mayor presencia de este tipo de bacterias.

Respecto a las incongruencias detectadas en la Tabla 2, podrían deberse a la presencia de más de una cepa en la muestra o a errores en la identificación, ya que en alguna ocasión por un método se detecta un hongo y por el otro una bacteria, de forma que no se puede asegurar ninguna identificación como correcta.

## 6. CONCLUSIONES

Como conclusiones directas de este trabajo podemos decir que las levaduras mayoritarias de las distintas muestras han sido *Candida krusei*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Brettanomyces bruxellensis*. En el caso de las bacterias se ha observado una mayor variabilidad entre muestras.

Esta bebida puede presentar tanto microorganismos beneficiosos como perjudiciales para la salud, sobre todo en cultivos *starter* de origen poco fiable. Las medidas higiénicas y la legislación para la producción de kombucha y otras bebidas probióticas deben endurecerse para evitar contaminaciones y adulteraciones del producto.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Angela C, Young J, Kordayanti S, Devanthi PVP, Katherine. Isolation and screening of microbial isolates from kombucha culture for bacterial cellulose production in sugarcane molasses genoma. *KnE Life Sci.* 2020; 5:111-127.
- Arikan M, Mitchell AL, Finn RD, Gürel F. Microbial composition of Kombucha determined using amplicon sequencing and shotgun metagenomics. *Food Sci.* 2020; 85:455-464.
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, García-Fraile P, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, González-Buitrago JM, Velázquez E. MALDI-TOF Mass Spectrometry Is a Fast and Reliable Platform for Identification and Ecological Studies of Species from Family Rhizobiaceae. *PLOS ONE.* 2011; 6(5):e20223.
- Lorentzen, MP, Campbell-Sills, H, Jorgensen, TS et al. Expanding the biodiversity of *Oenococcus oeni* through comparative genomics of apple cider and kombucha strains. *BMC Genomics.* 2019; 20:330.
- Maldonado N, Robledo C, Robledo J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio.* 2018; 22:35-45.
- Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol.* 2014; 38:171-178.

- Mas P et al. Evolution in composition of kombucha consortia over three consecutive years in production context. *Foods*. 2022; 11:1-13.
- May A, Narayanan S, Alcock J, Varsani A, Maley C, Aktipis A. Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*. 2019; 7:1-22.
- Nguyen NK, Nguyen PB, Nguyen HT, Le PH. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. *Food Sci. Technol*. 2015; 64:1149-1155.
- Papalexandratou Z, Lefeber T, Bahrim B, Lee OS, Daniel HM, De Vuyst L. *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiol*. 2013; 35:73-85.
- Relloso MS et al. Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Rev Argent Microbiol*. 2015; 47:103-107.
- Vargas BK, Fabricio MF, Ayub MAZ. Health effects and probiotic and prebiotic potential of Kombucha: A bibliometric and systematic review. *Food Biosci*. 2021; 44:1-12.



ISSN electrónico: 2445-1355

DOI: <https://doi.org/10.14201/fj2022724151>

## ANÁLISIS DE COMPONENTES BIOACTIVOS DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS EN EL VINO

### *Analysis in Wine of Bioactive Compounds Derived of Amino Acids*

Alejandro MARTÍN QUIJADA; Ana María GONZÁLEZ PARAMÁS; Celestino SANTOS BUELGA\*

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. 37007 Salamanca. España

Correo-e: [csb@usal.es](mailto:csb@usal.es)\*

**RESUMEN:** Melatonina, tirosol e hidroxitirosol son sustancias bioactivas cuya presencia se ha descrito en el vino en baja concentración, lo que representa un reto para su análisis. El presente trabajo plantea la puesta a punto de un método para su determinación, mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a detección por espectrofotometría de diodos y espectrometría de masas (HPLC-DAD-MS) y su aplicación posterior para su análisis en muestras de diversos tipos de vinos.

*Palabras clave:* tirosol; hidroxitirosol; melatonina; vino; HPLC.

**ABSTRACT:** Melatonin, tyrosol and hydroxytyrosol are bioactive substances whose presence has been described in wine in low concentration, making their analysis challenging. The present work deals with the development of a method for their determination using high performance liquid chromatography coupled to double online detection by diode array spectrophotometry and mass spectrometry (HPLC-DAD-MS), which was further applied to their analysis in samples of different types of wines.

*Keywords:* tyrosol; hydroxytyrosol; melatonin; wine; HPLC.

## 1. INTRODUCCIÓN

El vino es una bebida obtenida por fermentación alcohólica de la uva (*Vitis vinifera* L.) por acción de levaduras, que transforman los azúcares naturales del fruto en etanol y dióxido de carbono. Agua, azúcares y ácidos orgánicos (málico y tartárico, principalmente) son los compuestos mayoritarios de la uva, pero existen también otros componentes importantes para las características del vino, como sustancias aromáticas y compuestos fenólicos, entre los que se encuentran los antocianos, responsables del color en los vinos tintos, o los taninos, que confieren características como la astringencia, el cuerpo o la capacidad para envejecer.

Además, tanto en la uva como en el vino se pueden encontrar aminoácidos libres y proteínas en baja concentración. Los aminoácidos de la uva son metabolizados total o parcialmente por las levaduras durante la fermentación, pero en contrapartida otros son excretados por las levaduras en la fase final de la fermentación o liberados posteriormente en la autólisis de estas; algunos son también producidos por degradación enzimática de las proteínas de la uva. Los aminoácidos libres (arginina, prolina, alanina, ácido glutámico, treonina, serina y ácido gamma-aminobutírico) de la uva son fuente de nitrógeno para las levaduras durante la fermentación y precursores de compuestos aromáticos que se forman durante esta (aldehídos, ésteres, etc.), teniendo un destacado impacto en las características organolépticas del vino. A partir de estos aminoácidos se forman también, en pequeña cantidad, productos como melatonina, tirosol o hidroxitirosol, particularmente interesantes por poseer propiedades bioactivas. Sin embargo, su detección y determinación en los vinos es complicada, debido a las bajas concentraciones en las que se encuentran (Fracassetti *et al.*, 2019).

La melatonina es una sustancia con actividad hormonal, presente en el organismo en concentraciones que varían de acuerdo al ciclo diurno/nocturno. En los seres humanos se sintetiza principalmente en la glándula pineal a partir del neurotransmisor serotonina y participa en una gran variedad de procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos, como controlar el ciclo diario del sueño (Mercolini *et al.*, 2012).

El tirosol es un compuesto fenólico presente en una variedad de alimentos, como el aceite de oliva. Posee capacidad para proteger las células contra el daño oxidativo. Aunque no es tan potente como otros antioxidantes presentes en el aceite, su concentración más elevada y buena biodisponibilidad han llevado a proponer que puede contribuir de manera significativa a los beneficios para la salud asociados al consumo de aceite de oliva virgen (EFSA, 2011).

El hidroxitirosol se considera uno de los antioxidantes naturales más potentes después del ácido gálico, con una capacidad de captación de radicales del oxígeno (ORAC, *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) estimada de 40.000

$\mu\text{mol TE}^1/\text{g}$ , dos veces mayor que la de la coenzima Q10. Se han descrito diversos efectos beneficiosos del hidroxitirosol, entre los que destacan el descenso en el riesgo cardiovascular, la prevención frente a ciertos tipos de cáncer, propiedades antiinflamatorias y antiviricas y mantenimiento de concentraciones normales de colesterol HDL en sangre y de la presión arterial (EFSA, 2011).

## 2. OBJETIVO

Teniendo en cuenta las propiedades bioactivas de melatonina, tirosol e hidroxitirosol y que su presencia en pequeñas cantidades se encuentra descrita en el vino, el objetivo del trabajo es la puesta a punto de un método analítico cuantitativo para su determinación mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a detección por espectrofotometría de diodos y espectrometría de masas. Una vez desarrollado el método, se procederá a aplicarlo analizando muestras de vinos.

## 3. MATERIALES

### 3.1. *Reactivos*

Ácido fórmico concentrado (Panreac), acetonitrilo LiChrosolv<sup>®</sup> (Supelco), patrones de tirosol, hidroxitirosol, melatonina y ácido anísico (Sigma-Aldrich).

### 3.2. *Material y equipos*

- Balanza analítica “Sartorius” Extend ED124S con aproximación de 0,1 mg.
- Sistema de purificación de agua ultrapura Direct-QTM “Millipore”.
- Baño ultrasonido “Branson” modelo 5510.
- Microcentrífuga “Thermo Scientific” Heraeus Fresco 17.
- Cartuchos de extracción en fase sólida Sep-Pak<sup>®</sup> de Waters.
- Equipo de cromatografía Agilent series 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) provisto de bomba cuaternaria y detector de diodos (DAD), controlado por el software ChemStation (versión B.04.01) y acoplado a un espectrómetro de masas API 3200 Qtrap AB Sciex (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania; MDS Sciex), equipado con una sonda de ionización por electropulverización (Electrospray Ionization Probe, ESI) y un analizador de masas de triple cuadrupolo, controlado por el software Analyst 5.1.
- Equipo y material habitual de laboratorio.

1. Equivalentes de Trolox (TE), siendo el trolox un análogo hidrosoluble de la vitamina E.

### 3.3. Muestras

El análisis de los compuestos de interés se llevó a cabo en 19 muestras de vino, que incluyeron vinos blancos (n = 6) y tintos (n = 9) de diferentes zonas geográficas y denominaciones, así como vinos de Oporto (n = 4).

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Preparación de las muestras

Como se indicará en la parte de resultados, se ensayaron varios métodos de preparación sin conseguir ninguno totalmente eficaz, por lo que se optó por la inyección directa de la muestra de vino, previa adición del patrón interno (ácido anísico) en concentración constante de 0,1 mg/mL. En concreto, se tomaban 450 µL de vino, a los que se añadían 50 µL de solución de ácido anísico (0,1 mg/mL) y se centrifugaba 1 min a 10000 rpm antes de su inyección en HPLC.

### 4.2. Análisis por HPLC-DAD-MS

Tras una serie de ensayos preliminares, las condiciones cromatográficas finalmente puestas a punto para el análisis de los compuestos de interés fueron las siguientes:

- Fase estacionaria: columna Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,7 µm (4,6 mm x 150 mm), termostatzada a 35 °C.
- Fase móvil: ácido fórmico 0,1 % (eluyente A) y acetonitrilo:ácido fórmico (99,9:0,1) (eluyente B).
- Gradiente de elución: 100 % de A a 10 % de B en 5 minutos, 10 % a 15 % de B en 5 min, de 15 % a 35 % de B en 10 minutos, 35 % a 40 % de B en 20 min.
- Flujo: 0,7 mL/min.
- Volumen de inyección: 100 µL.

Se realizó una doble detección en línea por espectrofotometría de diodos, seleccionando como longitud de onda preferente 280 nm, y espectrometría de masas, operando en modo de ionización negativo a una temperatura de 550 °C y registrando las señales entre  $m/z$  50 y  $m/z$  250. Se utilizó aire Zero como gas nebulizador (35 psi) y gas turbo (550 °C, 35 psi) para el secado del eluyente, y nitrógeno como gas cortina (10 psi) y gas de colisión medio.

El método de detección de masas empleado fue un *full scan* a alta sensibilidad (*Enhanced MS*, EMS) seguido de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) utilizando

un tiempo de transición de 150 milisegundos (*dwell time*). Los parámetros utilizados en ambos modos de detección fueron los siguientes: voltaje del capilar -4500 V, *declustering potential* (DP) -50 V, potencial de entrada (EP) -10.5 V; mientras que para la energía de colisión (CE) se fijaron -12 V en modo EMS y -20 V en modo MRM. Adicionalmente, en el modo *full scan* se definió 200 como valor de la lente de cuello (C2B) mientras que en el modo MRM se utilizó -3 V como valor para el parámetro *Collision Cell Exit Potential* (CXP).

La identificación y cuantificación de los compuestos se realizó con base en criterios de tiempos de retención y transiciones de masa seleccionadas (137 Da a 119 Da para tirosol, 153 Da a 123 Da para hidroxitirosol, 231 Da a 144 Da para melatonina y 151 Da a 107 Da para ácido anísico). La cuantificación se realizó por comparación de las áreas de los picos registrados para cada compuesto con rectas de calibrado de tirosol, hidroxitirosol y melatonina (0,0625 mg/L a 2 mg/L) preparadas en ácido fórmico 0,1 %:metanol (90:10). Como patrón interno se empleó ácido anísico, en una concentración final constante de 0,1 mg/mL.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el desarrollo del método cromatográfico se llevó a cabo inicialmente una búsqueda bibliográfica de métodos descritos en la literatura para la determinación cuantitativa de tirosol, hidroxitirosol y melatonina en vino. La mayoría de autores empleaban cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) como método de separación, acoplada a detección por fluorescencia. Tan solo se encontró un método en el que, además de fluorescencia, se utilizaba detección UV para tirosol e hidroxitirosol (Piñeiro *et al.*, 2011).

En el laboratorio no se disponía de detector de fluorescencia por lo que se decidió probar la detección y cuantificación fotométrica en el UV. Se comenzó por utilizar las condiciones descritas en la bibliografía por Piñeiro *et al.* (2011) utilizando patrones individuales de los compuestos objeto de estudio. Se comprobó que se conseguía una buena separación y resolución de los tres compuestos, así como una correcta detección basándose en sus tiempos de retención y espectros UV. Sin embargo, al analizar las muestras de vino (Figura 1), la complejidad de la matriz impedía la adecuada detección de los compuestos, puesto que eluían a tiempos de retención idénticos a otros compuestos presentes en los vinos en mayor concentración o con mayores extinciones. Resultados similares se obtuvieron cuando se llevaba a cabo una etapa previa de purificación, utilizando un cartucho de fase reversa C18 (Sep-Pak®) para separar algunos de los posibles interferentes.

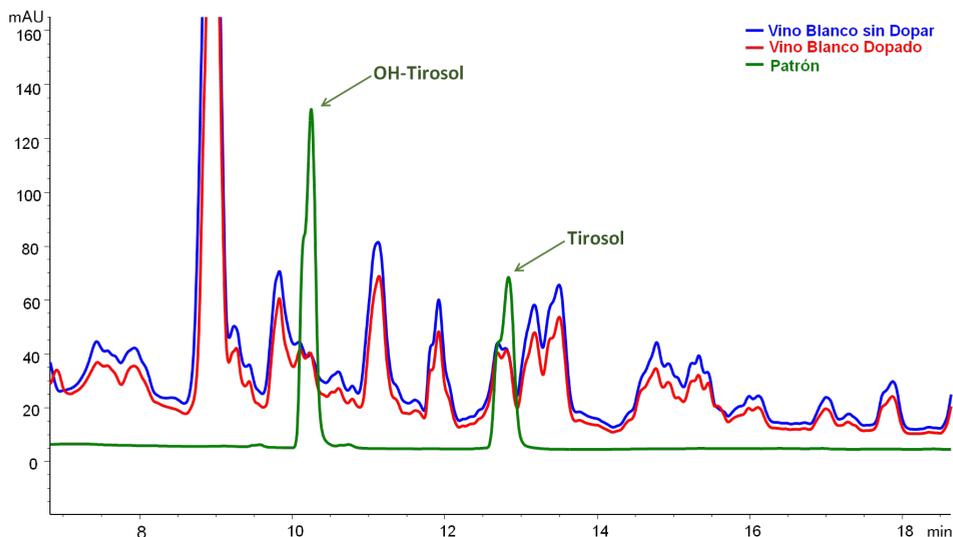


Figura 1. Cromatogramas superpuestos de una solución de patrones de tirosol e hidroxitirosol (OH-Tir) (0,1 mg/mL), una muestra de vino blanco y otra del mismo vino al que se habían añadido los compuestos patrón (concentración final 0,01 mg/mL).

Se procedió entonces a ensayar un método mediante espectrometría de masas que permitiese la detección y la cuantificación inequívocas de los compuestos objeto de estudio. La utilización de la espectrometría de masas con fines cuantitativos hacía necesario el empleo de un patrón interno, para soslayar la variabilidad de respuesta inter- e intradía del método. En bibliografía se recogen como posibles patrones internos triptófano deuterado (Álvarez *et al.*, 2020) y 8-hidroximirtzapina (Mercolini *et al.*, 2012), sin embargo, se optó por emplear ácido anísico, un ácido fenólico cuya presencia no está descrita en vinos, ya que ofrecía una respuesta similar y su tiempo de retención no interfería con la determinación de tirosol, hidroxitirosol y melatonina.

Por otra parte, teniendo en cuenta la complejidad de la matriz y la existencia de sustancias de pesos moleculares similares a los compuestos a analizar, se decidió recurrir a un método de masas basado en transiciones de masa en lugar de la detección de los pseudoiones moleculares, monitorizando la fragmentación característica de cada compuesto, lo que permitía su identificación y cuantificación específicas. La cuantificación se llevó a cabo a partir de las áreas de los picos registrados en los cromatogramas de masas, considerando el tiempo de retención y la intensidad de la transición seleccionada. En la Figura 2 se muestran cromatogramas con los picos de cada uno de los compuestos y del patrón interno.

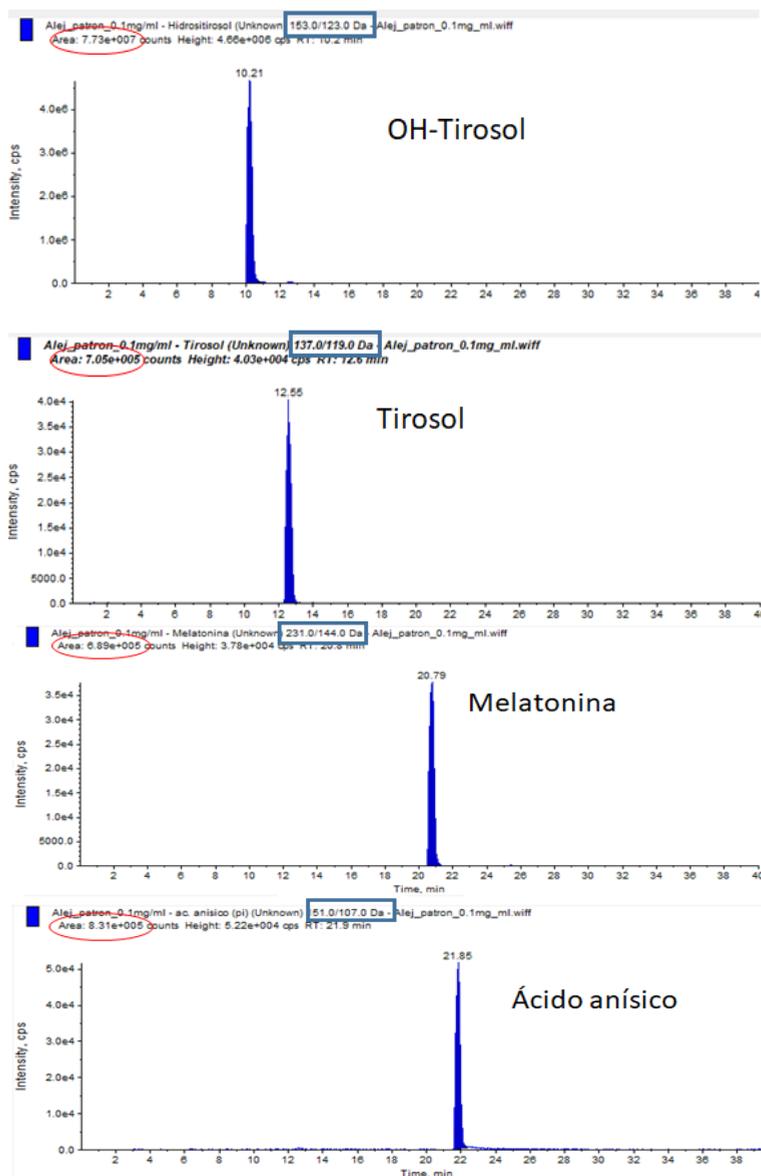


Figura 2. Ejemplo de cromatogramas obtenidos para tirosol, hidroxitirosol, melatonina y ácido anísico utilizando las transiciones de masas seleccionadas (recuadro azul). En el óvalo rojo se muestran las áreas de los picos correspondientes a una concentración de 0,1 mg/mL.

Para el método optimizado se realizaron rectas de calibrado en el intervalo de concentraciones indicado en el apartado de métodos, representando concentración del compuesto frente a la relación área del compuesto/área del patrón interno, para cada uno de los tres compuestos considerados. Las ecuaciones de las rectas fueron las siguientes:

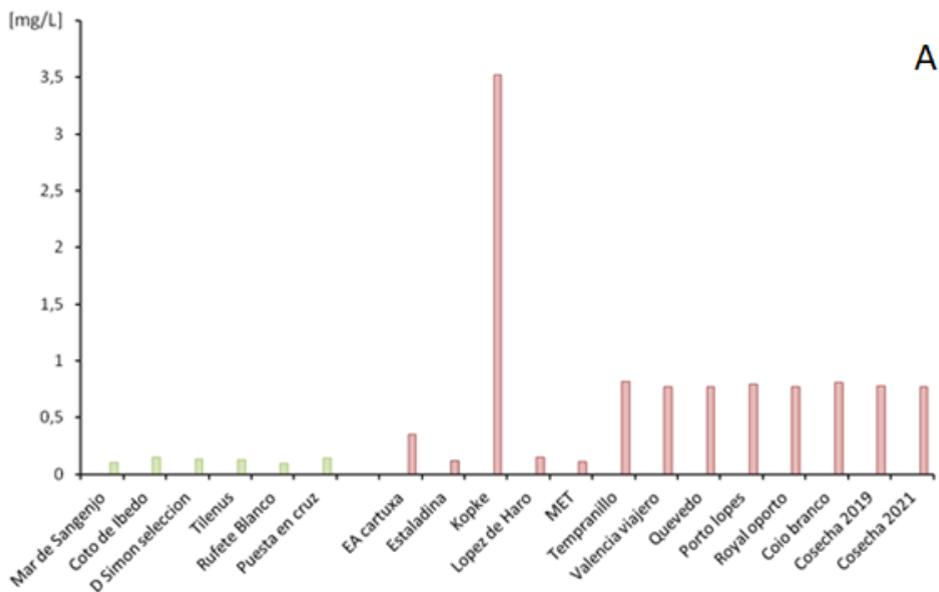
$$\text{Tirosol: } y = 52,085x - 0,0047$$

$$\text{Hidroxitirosol: } y = 21266x - 0,1459$$

$$\text{Melatonina: } y = 113,69x - 0,0024$$

En todos los casos el coeficiente de determinación fue superior a 0,99.

Posteriormente, se procedió a analizar los compuestos de interés en 19 muestras de vino de diferente tipo y origen (Figura 3). El compuesto presente en mayor concentración en todas las muestras fue el tirosol (contenidos entre 0,093 y 3,52 mg/L), seguido a distancia por el hidroxitirosol (0,007-0,108 mg/L), mientras que la melatonina se detectó solo en algunas muestras, pero en niveles que estaban en la mayor parte de los casos cercanas o por debajo del límite de cuantificación calculado para el compuesto en el método utilizado (17,6 µg/L). Otros autores que han analizado estos compuestos indican igualmente la presencia mayoritaria de tirosol (Bordiga *et al.*, 2016).



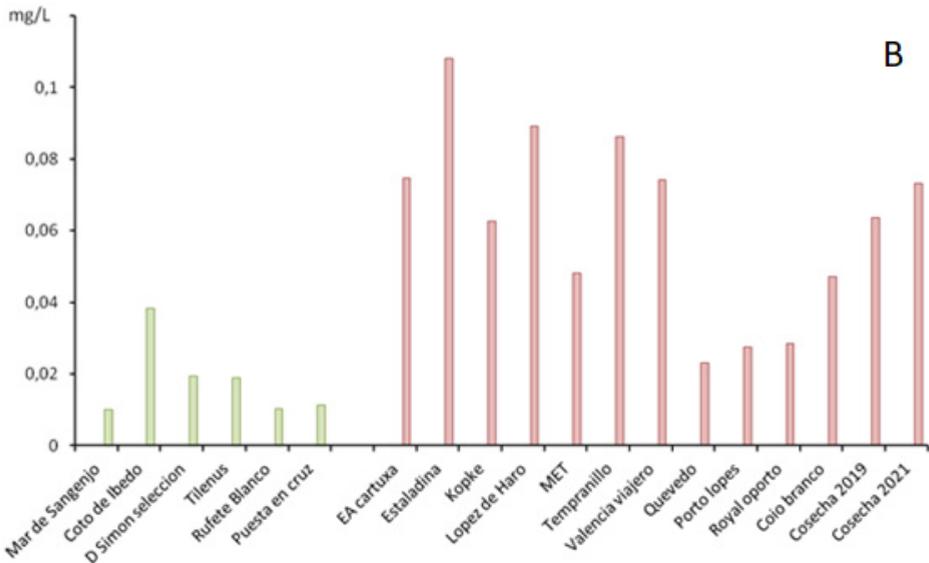


Figura 3. Comparación de las concentraciones de tirosol (A) e hidroxitirosol (B) determinadas en los vinos blancos (barras de color verde) y tintos (barras rojas) analizados.

En general, los contenidos determinados en nuestro caso fueron inferiores a los encontrados por otros autores. Sin embargo, hay que tener en cuenta que para los mismos se recoge una gran variabilidad de resultados en la bibliografía, atribuida a la influencia de factores como temperatura, disponibilidad de nitrógeno o contenido de azúcares sobre la actividad de las levaduras durante el proceso de fermentación (Piñeiro *et al.*, 2011). Los valores descritos por otros autores (Albu *et al.*, 2020; Bocalandro *et al.*, 2011; Bordiga *et al.*, 2016; Carneiro *et al.*, 2020; Fracassetti *et al.*, 2019; Mercolini *et al.*, 2012; Piñeiro *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020) oscilan dentro de los siguientes límites:

- Tirosol: 0,1 a 44,46 mg/L
- Hidroxitirosol: 0,071 a 9,2 mg/L
- Melatonina: 0,05 a 423 µg/L

En las muestras analizadas en nuestro caso, se observó una notable diferencia de contenidos entre vinos blancos y tintos, con concentraciones en estos últimos entre 6-7 veces más elevadas de tirosol (Figura 3 A) y 3-4 veces más elevadas de hidroxitirosol (Figura 3 B). Destaca especialmente el valor de tirosol encontrado en una de las muestras de vino de Oporto, que no se cree que pueda atribuirse a esta categoría de vinos, ya que en los otros tres vinos analizados del mismo tipo

no se encontraron valores tan altos. En cualquier caso, sería necesario analizar más muestras de diferentes tipos, orígenes y edad para obtener conclusiones que pudieran tener un carácter más general.

## 6. CONCLUSIONES

1. El método cromatográfico puesto a punto ofrece buena resolución, pero la detección por espectrofotometría UV no permite una correcta detección y cuantificación de tirosol, hidroxitirosol y melatonina en los vinos debido a sus bajas concentraciones y la complejidad de la matriz, con diversas sustancias solapadas a los mismos tiempos de retención.

2. Los problemas para la detección y cuantificación selectiva de los compuestos de interés se pudieron resolver mediante la utilización de la espectrometría de masas utilizando un método desarrollado al efecto, basado en el empleo de transiciones de masa, utilizando el modo MRM, y de un patrón interno (ácido anísico) para normalizar las variaciones de las señales de una inyección a otra.

3. En las muestras de vino analizadas, las concentraciones determinadas de tirosol e hidroxitirosol fueron generalmente inferiores o similares a las encontradas por otros autores en vinos de distinto origen. En cualquier caso, al igual que otros autores, en las muestras analizadas el contenido de tirosol fue siempre mayor que el de hidroxitirosol. Por otra parte, las concentraciones de tirosol e hidroxitirosol fueron superiores en vinos tintos que en vinos blancos. La melatonina se encontró siempre en concentraciones muy bajas, en torno al límite de cuantificación del método.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Albu C, Radu LE, Radu GL. Assessment of Melatonin and Its Precursors Content by a HPLC-MS/MS Method from Different Romanian Wines. *ACS Omega*. 2020; 5(42):27254-27260.
- Álvarez-Fernández MA, Carafa I, Vrhovsek U, Arapitsas P. Modulating Wine Aromatic Amino Acid Catabolites by Using *Torulasporea delbrueckii* in Sequentially Inoculated Fermentations or *Saccharomyces cerevisiae* Alone. *Microorganisms*. 2020; 8(9):1349.
- Boccalandro HE, González CV, Wunderlin DA, Silva MF. Melatonin levels, determined by LC-ESI-MS/MS, fluctuate during the day/night cycle in *Vitis vinifera* cv Malbec: evidence of its antioxidant role in fruits. *J Pineal Res*. 2011; 51(2):226-232.
- Bordiga M, Lorenzo C, Pardo F, Salinas MR, Travaglia F, Arlorio M, Coisson JD, Garde-Cerdán T. Factors influencing the formation of histaminol, hydroxytyrosol, tyrosol, and tryptophol in wine: Temperature, alcoholic degree, and amino acids concentration. *Food Chem*. 2016; 197:1038-1045.

- Carneiro CN, Gomez FJV, Spisso A, Silva MF, Azcarate SM, Dias F. Geographical characterization of South America wines based on their phenolic and melatonin composition: An exploratory analysis. *Microchem J.* 2020; 158:105240.
- EFSA Panel on Dietetic Products; Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive. *EFSA J.* 2011; 9:203.
- Fracasetti D, Vigentini I, Lo Faro AFF, De Nisi P, Foschino R, Tirelli A, Orioli M, Iriti M. Assessment of Tryptophan, Tryptophan Ethylester, and Melatonin Derivatives in Red Wine by SPE-HPLC-FL and SPE-HPLC-MS Methods. *Foods.* 2019; 8(3):99.
- Mercolini L, Mandrioli R, Raggi MA. Content of melatonin and other antioxidants in grape-related foodstuffs: measurement using a MEPS-HPLC-F method. *J Pineal Res.* 2012; 53(1):21-28.
- Piñeiro Z, Cantos-Villar E, Palma M, Puertas B. Direct liquid chromatography method for the simultaneous quantification of hydroxytyrosol and tyrosol in red wines. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(21):11683-11689.
- Wang ST, Le J, Peng R, Li Y. Efficient extraction and sensitive LC-MS quantification of hydroxytyrosol in wine, oil and plasma. *Food Chem.* 2020; 323:126803.



ISSN electrónico: 2445-1355

DOI: <https://doi.org/10.14201/fj2022725365>

## EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DEL DAÑO RENAL PRODUCIDO POR LOS INHIBIDORES DEL PUNTO DE CONTROL INMUNITARIO

### *Histological Evaluation of the Nephrotoxicity of Immune Checkpoint Inhibitors*

Sara REVUELTA; Javier TASCÓN; Laura VICENTE-VICENTE; Alfredo G. CASANOVA;  
Ana I. MORALES; Marta PRIETO\*

Unidad de Toxicología. Departamento de Fisiología y Farmacología. Edificio  
Departamental. Laboratorios 223-226. Universidad de Salamanca. Campus Miguel  
de Unamuno. 37007 Salamanca. España

Correo-e: [martapv@usal.es](mailto:martapv@usal.es)\*

**RESUMEN:** Los inhibidores del punto de control inmunitario (ICI) constituyen el grupo inmunoterapéutico más relevante del ámbito oncológico, pero no están exentos de efectos adversos. Las lesiones renales, aunque raras, empeoran el pronóstico. Actualmente existen combinaciones de inmunoterapia y quimioterapia que mejoran la eficacia, pero aumentan el riesgo de sufrir efectos secundarios nefrotóxicos. El objetivo fue la evaluación histológica del daño renal asociado a los ICI anti-CTLA-4 y anti-PD-1 en combinación con cisplatino.

Se diseñó un modelo experimental en ratones C57BL/6 tratados con la terapia combinada de cisplatino (10 mg/kg, dosis única) con anti-CTLA-4 o anti-PD-1 (10 o 15 mg/kg/día, durante 6 días). Se incluyeron grupos con las monoterapias de los fármacos y un grupo control. La evaluación del daño renal histológico se realizó de forma ciega siguiendo un protocolo de cuantificación de lesión tisular basado en una escala. Los datos fueron analizados con el programa estadístico IBM SPSS Statistics.

Los resultados mostraron daño renal tubular, más pronunciado en la corteza externa, asociado al tratamiento con cisplatino, mientras que no

hubo alteraciones estructurales en la monoterapia con ICI. El cotratamiento potenció el daño estructural renal del cisplatino. Esta potenciación fue más evidente en la región corticomedular, lo que sugiere que la combinación de fármacos provoca una lesión más profunda en el riñón.

*Palabras clave:* inhibidores del punto de control inmunitario (ICI); cisplatino; terapia combinada; daño renal; cuantificación histológica.

**ABSTRACT:** Immune checkpoint inhibitors (ICI) constitute the most relevant immunotherapeutic group in the oncology field, but they are not exempt from adverse effects. Renal lesions, although rare, worsen the prognosis. Currently there are combinations of immunotherapy and chemotherapy that improve efficacy but increase the risk of nephrotoxic side effects. The objective was the histological evaluation of renal damage associated with ICI anti-CTLA-4 and anti-PD-1 in combination with cisplatin.

An experimental model was designed in C57BL/6 mice treated with the combined therapy of cisplatin (10 mg/kg, single dose) with anti-CTLA-4 or with anti-PD-1 (both 10 or 15 mg/kg/day, for 6 days). Groups with drug monotherapies and a control group were included. Histological kidney damage assessment was performed blindly following a scale-based tissue injury quantification protocol. The data were analyzed with the statistical program IBM SPSS Statistics.

The results showed renal tubular damage, more pronounced in the outer cortex, associated with cisplatin treatment, while there were no structural alterations in monotherapy with ICI. Co-treatment potentiated renal structural damage from cisplatin. This potentiation was more evident in the corticomedullary region, so it seems that the drug combination causes a deeper injury in the kidney.

*Keywords:* Immune Checkpoint Inhibitors (ICI); cisplatin; combination therapy; kidney damage; histological quantification.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. *Cáncer y líneas de tratamiento*

La Sociedad Española de Oncología Médica define cáncer como un término que engloba numerosas enfermedades caracterizadas por el desarrollo de células anormales, que se dividen, crecen y se diseminan sin control en cualquier parte

del organismo. Esto puede formar masas, llamadas “tumores”, que destruyen a los tejidos sanos (SEOM, 2019).

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo. En 2020, se registraron 19,3 millones de casos y casi 10 millones de muertes, según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2022).

El tratamiento que recibe cada paciente depende del tipo de cáncer y del estadio en que se encuentre. Algunos pacientes reciben un solo tratamiento, aunque la mayoría se someten a una combinación de estos (NIH, 2022).

### 1.2. *Inmunoterapia*

Los avances en el conocimiento de la respuesta inmune frente a los tumores, junto con el estudio de sus mecanismos de evasión, han conducido al diseño de nuevos tratamientos enfocados a potenciar la respuesta inmune y a aumentar la supervivencia de los pacientes (Cancer Research UK, 2021). Es el caso del tratamiento inmunoterápico basado en los inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI), anticuerpos capaces de bloquear moléculas que modulan dichos puntos (ASCO, 2020).

### 1.3. *Inhibidores del punto de control inmunitario (ICI)*

Los puntos de control inmunitario son proteínas reguladoras que forman parte del sistema inmunitario (SI) impidiendo que la respuesta inmunológica resulte desmesurada y destruya las células del organismo (NIH, 2022). Cuando los receptores de los linfocitos T reconocen los antígenos de superficie de una célula cancerosa, se activan para eliminarla, pero también es necesaria una señal de *stop* que asegure que no haya sobreactivación (De Francisco *et al.*, 2019). Existen dos vías de regulación de linfocitos T mediante receptores de inhibición: 1) antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y 2) receptor de muerte programada 1 (PD-1) (De Francisco *et al.*, 2019). Las vías de CTLA-4 y PD-1 actúan en diferentes etapas de la respuesta inmune.

Las células tumorales han desarrollado formas de evadir el SI integrando estos mecanismos (Buchbinder y Desai, 2016). El conocimiento de estas vías ha llevado al desarrollo de nuevos medicamentos, los ICI, que son: ipilimumab (anti-CTLA-4); atezolizumab, avelumab y durvalumab (anti-PD-L1); pembrolizumab y nivolumab (anti-PD-1) (Buchbinder y Desai, 2016).

#### 1.4. Toxicidad derivada del uso de ICI

La inmunoterapia (IT) mejora la respuesta en cánceres que no responden a la quimioterapia (QT). Aumenta su eficacia, disminuye la probabilidad de recaída y causa menos efectos secundarios (sus dianas farmacológicas se encuentran en el SI) (Booth, 2021).

Sin embargo, el tratamiento basado en ICI se asocia a efectos adversos derivados de una respuesta autoinmune (IrAEs), limitando su uso. Presentan toxicidad generalizada en la mayoría de los sistemas del organismo. Recientemente, se han aprobado terapias basadas en la combinación de IT y QT, las cuales mejoran la eficacia, pero aumentan el riesgo de sufrir efectos adversos (Perazella y Shirali, 2020).

#### 1.5. Daño renal asociado a ICI

Una complicación de los ICI son los efectos adversos renales. Aunque la nefrotoxicidad es menos común que otras complicaciones, y apenas ha sido estudiada, se ha demostrado que los efectos renales empeoran el pronóstico de los pacientes. La incidencia de nefrotoxicidad en monoterapia es del 2 %, mientras que estudios basados en combinaciones demuestran un aumento de la toxicidad renal (El Rassy *et al.*, 2018). Estos efectos adversos incluyen daño renal agudo, proteinuria y anomalías electrolíticas. El daño renal agudo debido a nefritis tubulointersticial aguda es la lesión más común (Perazella y Shirali, 2020).

En nuestro laboratorio se ha puesto a punto un modelo experimental en ratón para caracterizar el daño renal asociado a los ICI en monoterapia y en combinación con cisplatino. La determinación de biomarcadores urinarios de daño renal subclínico pone de manifiesto que la terapia combinada de cisplatino con anti-CTLA-4 o anti-PD-1 presenta un efecto potenciador del daño renal funcional en comparación con los tratamientos en monoterapia (datos no publicados). Con base en estos resultados, nuestra hipótesis es que el daño funcional asociado al cotratamiento con ICI y cisplatino se acompaña de daño estructural renal.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo es la caracterización histológica del daño renal asociado a los ICI (anti-CTLA-4 y anti-PD-1) en monoterapia y en combinación con quimioterapia (cisplatino), en un modelo murino.

Los objetivos específicos fueron:

- 1) Establecer si el daño estructural renal asociado a los ICI es dosis-dependiente.

- 2) Determinar si existen diferencias entre el daño producido en distintas estructuras (glomérulos, túbulos, vasos e intersticio) y/o localizaciones renales (corteza externa, zona corticomedular y médula).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. *Modelo experimental*

Se emplearon ratones macho C57BL/6 de 8 semanas y peso medio de 25 gramos. En el *Anexo I* se encuentran los cronogramas asociados a los distintos grupos de tratamiento.

El día de sacrificio, los ratones se anestesiaron por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (100 mg/kg). Después se realizó una incisión en “V” en el abdomen y se abrió la cavidad torácica. Ambos riñones se extirparon y uno de ellos se fijó en formaldehído (3,7-4,0 % w/v) para realizar los estudios histológicos.

#### 3.2. *Procesamiento de los riñones*

Los riñones fijados en formaldehído se procesaron con el fin de obtener cortes para realizar estudios estructurales renales.

Los riñones fueron enviados al Servicio de Patología Molecular Comparada de la Universidad de Salamanca. Fueron tratados en el procesador de tejidos con formol, xilol y alcoholes degradados hasta colocarlos en parafina líquida, formando bloques una vez que esta solidifica. Se hicieron cortes del tejido embebido en parafina de 2-3  $\mu\text{m}$  con el microtomo. Para la tinción se desparafinaron las muestras. Tras ello se hidrataron, se sumergieron en hematoxilina, luego en eosina y se lavó con agua el exceso de colorante.

#### 3.3. *Evaluación y cuantificación del daño histológico*

Los portas con los cortes se visualizaron al microscopio óptico de campo claro (Olympus31 multicabezal de 5 posiciones) acoplado a una cámara (Olympus DP70) y, posteriormente, se obtuvieron las fotografías con un aumento de 600X utilizando el programa informático DPController.

Se tomaron en total 420 fotografías de los riñones de los ratones de los 8 grupos experimentales. De cada riñón se tomaron 5 fotos de la región cortical externa y otras 5 de la región corticomedular. Se obvió la región medular, puesto que en la visualización general previa no se observó ninguna alteración en esta asociada a ninguno de los tratamientos.

La evaluación y la cuantificación se realizaron de forma ciega siguiendo un protocolo de cuantificación de daño renal histológico que se detalla a continuación.

Con el programa PowerPoint se dividió cada foto en 6 áreas iguales. Para evaluar el daño se asignó a cada área una puntuación:

- 0: sin daño
- 1: daño en hasta 1/3 del área
- 2: daño entre 1/3 y 2/3 del área
- 3: daño en más de 2/3 del área

Una vez obtenidas las puntuaciones de cada área se registraron en una hoja de Excel, donde se recopiló información referente a la identificación del riñón.

### 3.4. *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos fueron tratados del siguiente modo:

- 1) Cálculo de las medias de las puntuaciones de las 6 áreas de cada riñón.
- 2) Cálculo de la media de los valores obtenidos en todas las fotografías de un mismo riñón/zona evaluada (zona externa y zona corticomedular).
- 3) Cálculo de las medias de los valores de los riñones de un mismo grupo de tratamiento, así como el error estándar de la media.

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa informático IBM SPSS Statistics. Se introdujeron como variables el grupo de tratamiento, el valor de cuantificación del daño renal y la identificación del ratón.

Para averiguar si los datos seguían una distribución normal o no normal se realizó la prueba de Shapiro-Wilk.

Si los datos seguían una distribución normal se aplicó el test ANOVA de un factor comparando medias y se realizó el test de Scheffe como post-hoc. En cambio, cuando eran no normales se aplicaron pruebas no paramétricas y se compararon medianas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

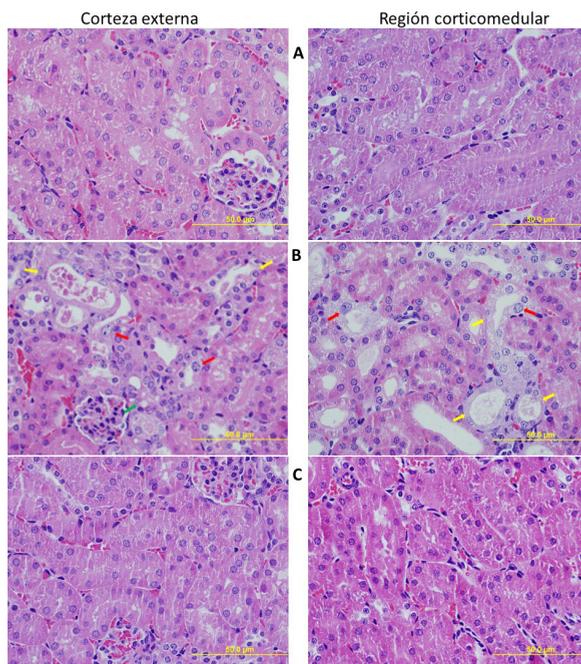
Finalmente, se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas entre grupos cuando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El daño histológico asociado a anti-CTLA-4 se valoró en los cortes de riñón teñidos con hematoxilina-eosina. Los resultados mostraron que el tratamiento con cisplatino causó alteraciones en los túbulos proximales y distales con acumulación

vacuolar y puntualmente agrandamiento nuclear (Figura 1B), mientras que la monoterapia con anti-CTLA-4 a las dosis estudiadas no causó alteraciones estructurales (Figura 1C); hay que señalar que estos ratones tampoco presentaron daño funcional renal (datos no mostrados). La combinación de ambos fármacos (Figuras 1D y 1E) parece provocar una potenciación del daño causado por el cisplatino, el cual parece ser dosis-dependiente ya que el aumento de dosis de anti-CTLA-4 (Figura 1E) acentuó el daño y su extensión. Se apreció un agrandamiento nuclear, además de desorganización y destrucción de los túbulos con acúmulo de contenido proteináceo, de manera similar en túbulos distales y proximales. En ocasiones se detectaron complejos apoptóticos (Figura 1E). Los glomérulos estaban bien conservados y tampoco se observó daño en los vasos y en el intersticio asociado a ninguno de los tratamientos. Cabe destacar que no se evidenció daño en la región de la médula renal asociado a ninguno de los tratamientos.

Aunque el tratamiento con cisplatino cause lesiones renales estructurales (a dosis que no produce daño funcional evaluado no solo por creatinina, sino también por biomarcadores urinarios de daño renal temprano; datos no mostrados), estas son más acentuadas en la combinación de fármacos, pudiendo ser el ICI el responsable del aumento del daño.



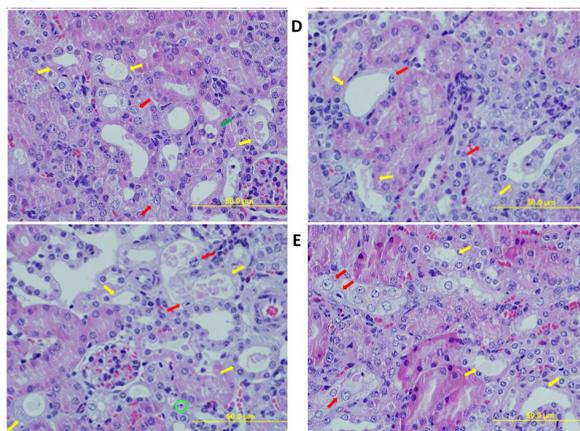


Figura 1. Valoración de la estructura renal tras el tratamiento con anti-CTLA-4 en monoterapia y combinado con cisplatino (CP). Imágenes representativas de los cortes de riñón teñidos con hematoxilina-eosina. A: control; B: cisplatino 10 mg/kg; C: anti-CTLA-4 20 mg/kg; D: cisplatino 10 mg/kg y anti-CTLA-4 10 mg/kg; E: cisplatino 10 mg/kg y anti-CTLA-4 15 mg/kg. La flecha verde señala una zona de acumulación vacuolar. Las flechas amarillas señalan daño tubular con dilatación tubular, en algunos casos, con depósitos de material hialino en la luz tubular. Las flechas rojas indican zonas de agrandamiento nuclear. El círculo verde señala células apoptóticas.

En el caso de los grupos de tratamiento con el otro ICI estudiado, anti-PD-1, la histología fue semejante a la de anti-CTLA-4; excepto la combinación de cisplatino 10 mg/kg + anti-PD-1 10 mg/kg, que produjo menos alteraciones estructurales en comparación con la misma dosis de anti-CTLA-4. La monoterapia del ICI no produjo alteraciones estructurales (Figura 2C). En la monoterapia por el cisplatino (Figura 2C) se observaron alteraciones en los túbulos proximales y distales, las cuales se van agravando con la combinación de fármacos (Figura 2E) con un aumento de la destrucción tubular, acumulación de depósitos proteináceos y agrandamiento nuclear. Igualmente se detectaron complejos apoptóticos (Figura 2E). Esto sugiere una potenciación del daño renal del cisplatino por el ICI.

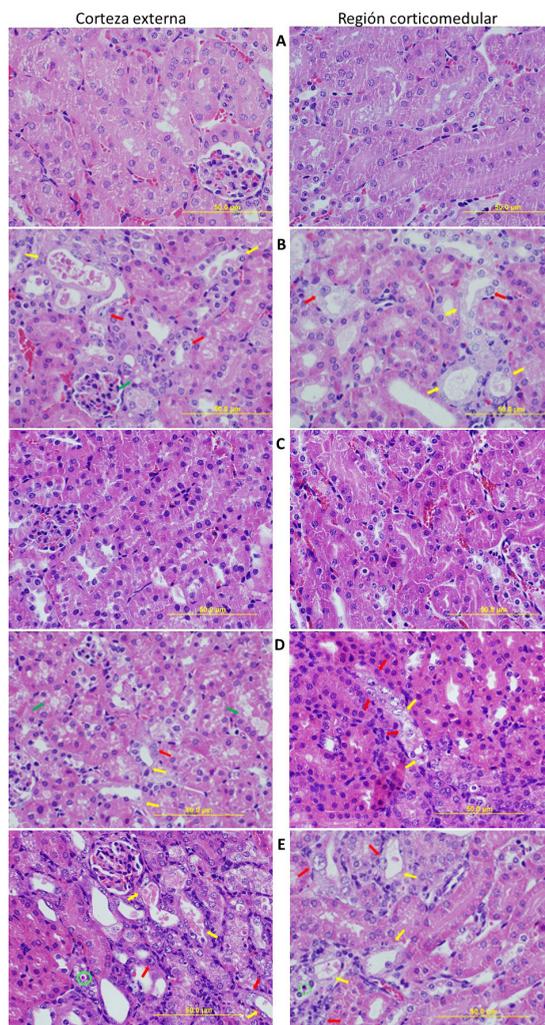


Figura 2. Valoración de la estructura renal tras el tratamiento con anti-PD-1 en monoterapia y combinado con CP. Imágenes representativas de los cortes de riñón teñidos con hematoxilina-eosina. A: control; B: cisplatino 10 mg/kg; C: anti-PD-1 20 mg/kg; D: cisplatino 10 mg/kg y anti-PD-1 10 mg/kg; E: cisplatino 10 mg/kg y anti-PD-1 15 mg/kg. Las flechas verdes señalan una zona de acumulación vacuolar. Las flechas amarillas señalan zonas representativas de daño tubular con dilatación tubular, en algunos casos, con depósitos de material hialino en la luz tubular. Las flechas rojas indican zonas de agrandamiento nuclear. El círculo verde señala células apoptóticas.

Tras la cuantificación del daño histológico en la corteza renal, se representaron gráficamente los datos obtenidos (datos no mostrados). Se observó que la monoterapia con ICI no causa daño estructural, a las dosis y tiempos estudiados. Esto concuerda con la bibliografía existente, ya que los IrAEs que afectan al riñón ocurren raramente en el tratamiento con ICI (Spiers *et al.*, 2019). La monoterapia del cisplatino causa daño, el cual se ve aumentado en las combinaciones con el ICI [lo que ya ha sido demostrado (El Rassy *et al.*, 2018)]; a excepción de la combinación del cisplatino con la dosis de anti-PD-1 más baja, que no parece que se potencie el daño por cisplatino, puede ser que no haya potenciación a esa dosis. Esta potenciación del daño por el ICI es significativa en la combinación con la dosis más alta de ICI respecto a la monoterapia de anti-CTLA-4 y anti-PD-1, lo cual sugiere que podría ser dosis-dependiente.

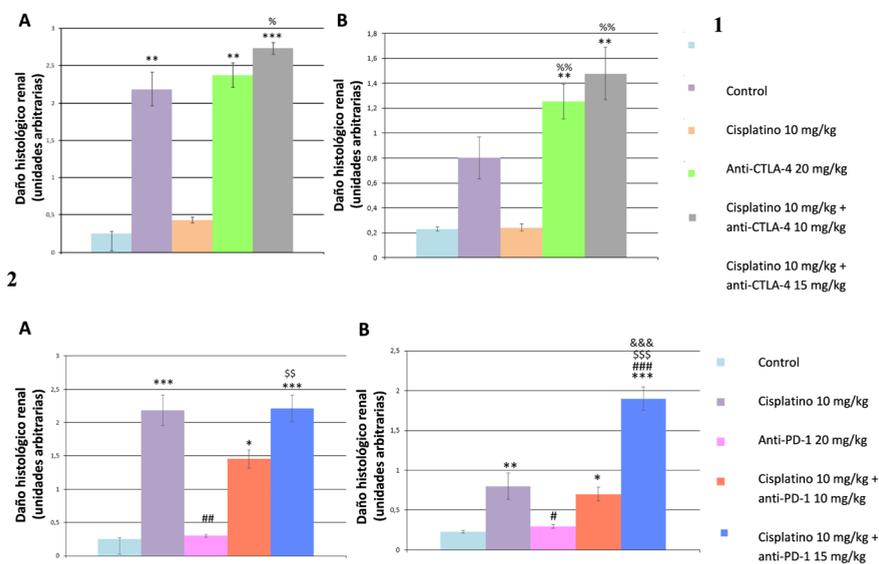


Figura 3. Cuantificación del daño histológico en (1) el modelo de anti-CTLA-4 y en (2) el modelo de anti-PD-1 en (A) la corteza externa y en (B) la región corticomedular. Escala de cuantificación: 0, sin daño; 1, daño en hasta 1/3 del área cuantificada; 2, daño entre 1/3 y 2/3 del área cuantificada; 3, daño en más de 2/3 del área cuantificada. (1) Diferencias estadísticamente significativas vs. grupo control: \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; vs. Grupo anti-CTLA-4 20 mg/kg: %p < 0,05; %%p < 0,01. N = 5, excepto en el grupo control (n = 7). (2) Diferencias estadísticamente significativas vs. grupo control: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; vs. grupo cisplatino 10 mg/kg: #p < 0,05; ##p < 0,01; ###p < 0,001; vs. grupo anti-PD-1 20mg/kg: \$p < 0,01; \$\$\$p < 0,001; vs. grupo cisplatino 10 mg/kg + anti-PD-1 10 mg/kg: &&&p < 0,001. N = 5, excepto en el grupo control (n = 7).

El daño causado por el cisplatino fue más intenso en la corteza externa sin producir casi alteraciones en la región corticomedular (Figura 3.1.B y 3.2.B). Existen estudios que también han demostrado que las lesiones por cisplatino más prominentes se producen en la corteza externa (Figura 3.1.A y 3.2.A) (Prost y Cinat, 2017). La combinación de fármacos genera un daño más extenso, es decir, el daño se extiende más hacia la región corticomedular que en la monoterapia con el cisplatino. Esto se podría explicar por un mayor efecto potenciador del ICI en la región corticomedular.

La terapia combinada de QT e IT puede proporcionar beneficios antineoplásicos superiores al uso de estos individualmente (El Rassy *et al.*, 2018; Spielbauer *et al.*, 2018). Sin embargo, la potenciación del daño renal resultante de la combinación se ha descrito en diversos estudios (Dumoulin *et al.*, 2020; Puzanov *et al.*, 2017). Actualmente, la nefrotoxicidad asociada a la IT y su combinación con la QT no se conoce en profundidad. Con este estudio se ha logrado un modelo preclínico que ha permitido estudiar el daño histológico renal asociado a los ICI en combinación con cisplatino. Este modelo permitirá el estudio de sus mecanismos de toxicidad, así como la búsqueda de biomarcadores asociados al daño. Dichos biomarcadores pueden proporcionar información relativa a las lesiones renales que evitaría la necesidad de realizar biopsias diagnósticas en la práctica clínica.

## 5. CONCLUSIONES

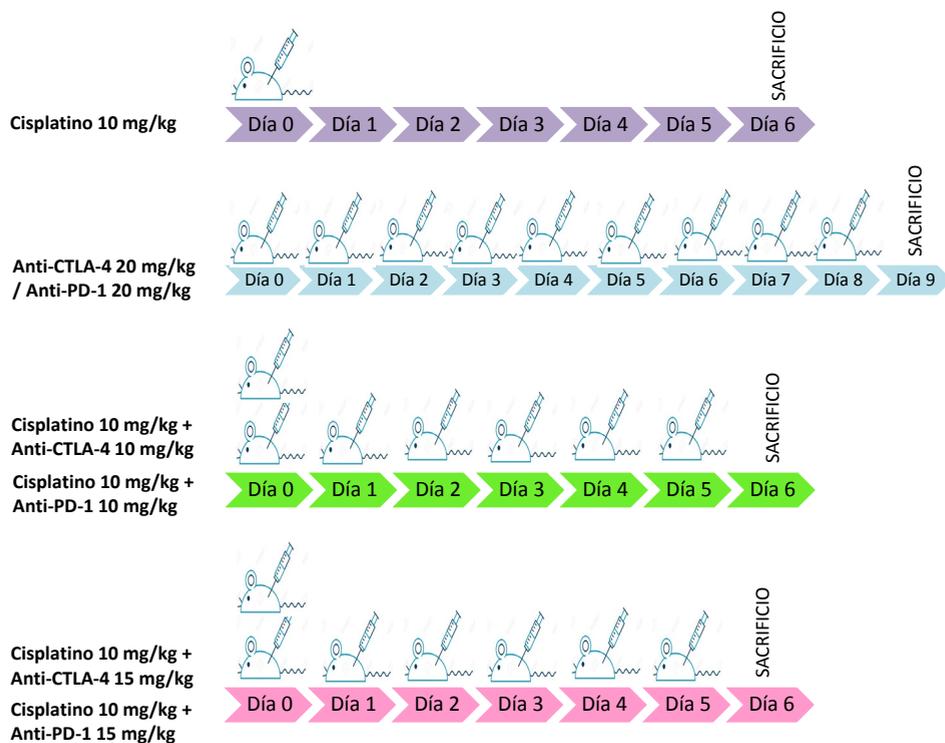
1. La IT basada en anti-CTLA-4 o anti-PD-1 no produce daño histológico por sí misma en nuestro modelo experimental.
2. La combinación de cisplatino con anti-CTLA-4 o anti-PD-1 potencia el daño renal causado por cisplatino.
3. Las alteraciones estructurales renales son mayores en la corteza externa, sin embargo, la potenciación por los ICI es más pronunciada en la región corticomedular.
4. La potenciación del daño observado podría ser dosis-dependiente, tanto en el caso de anti-CTLA-4 como de anti-PD-1.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *J. Clin. Oncol.* 2016; 39(1):98-106.
- Cancer.Net [Internet]. EE. UU.: American Society of Clinical Oncology; 2020 [actualizado may 2020; citado 5 abr 2022]. Disponible en: <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atencion-del-cáncer/cómo-se-trata-el-cáncer/inmunoterapia/qué-es-la-inmunoterapia>

- Cancer Research UK [Internet]. Londres: Cancer Research UK; 2021 [actualizado 20 ene 2021; citado 5 abr 2022]. Disponible en: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/immunotherapy/what-is-immunotherapy>
- De Francisco ALM, Macía M, Alonso F, García P, Gutiérrez E, Quintana LF et al. Onco-Nefrología: cáncer, quimioterapia y riñón. *Nefrología*. 2019; 39(5):473-481.
- Dumoulin DW, Visser S, Cornelissen R, van Gelder T, Vansteenkiste J, von der Thusen J et al. Renal Toxicity From Pemetrexed and Pembrolizumab in the Era of Combination Therapy in Patients With Metastatic Nonsquamous Cell NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2020; 15(9):1472-1483.
- El Rassy E, Bakouny Z, Yared F, Chelala DN, El Karak F, Ghosn M. The nephrotoxicity of immune checkpoint inhibitor-based combinations. *Eur J Cancer*. 2018; 103:274-278.
- Perazella MA, Shirali AC. Immune checkpoint inhibitor nephrotoxicity: what do we know and what should we do? *Kidney Int*. 2020; 97(1):62-74.
- Prost, DM, Cinat, G. Manejo de toxicidades por inmunoterapia. *Puesta al día*. 2017; 22:46-51.
- Puzanov I, Diab A, Abdallah K, Bingham CO, Brogdon C, Dadu R et al. Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group. *J Immunother Cancer*. 2017; 5(1):95.
- Spielbauer K, Cunningham L, Schmitt, N. PD-1 Inhibition Minimally Affects Cisplatin-Induced Toxicities in a Murine Model. *Sage Journals*. 2018; 159(2):343-346.
- Spiers L, Coupe N, Payne M. Toxicities associated with checkpoint inhibitors—an overview. *Rheumatology*. 2019; 58(7):7-16.
- Who.int [Internet]. World Health Organization; 2022 [actualizado 2 feb 2022; citado 5 abr 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

## ANEXO I: modelo experimental



Cronogramas de los modelos experimentales: el cisplatino se administró a dosis única el primer día del experimento y los ICI con pauta diaria.



# **Resúmenes de conferencia**



## PRESENTE Y FUTURO DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

### *Present and Future of the Pharmaceutical Industry*

Cristina MADERUELO

Facultad de Farmacia. Departamento de Ciencias Farmacéuticas. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno. Calle Lic. Méndez Nieto, s/n. 37007 Salamanca. España

Correo-e: [cmaderuelo@usal.es](mailto:cmaderuelo@usal.es)

**RESUMEN:** En los últimos dos siglos, la industria farmacéutica ha experimentado una enorme evolución hacia una fabricación compleja de productos farmacéuticos y formas de dosificación muy sofisticadas acompañada de grandes cambios en las prácticas de fabricación y en las instalaciones, utilizando tecnologías avanzadas asociadas a estrictas normas de calidad. Este tránsito comúnmente se representa en cuatro 4 etapas. La industria farmacéutica se encuentra actualmente en la tercera de ellas, marcada por el fuerte desarrollo de los ordenadores y las tecnologías de la comunicación, siendo una realidad la fabricación en continuo, la tecnología analítica de procesos (PAT) y la calidad por diseño (QbD). La fabricación en continuo supone un flujo continuo integrado donde las operaciones básicas suceden simultáneamente, evitando paros, acortando procesos, minimizando la manipulación y el trasvase manual del producto, así como su exposición al ambiente. El PAT permite hacer un seguimiento analítico de los materiales de partida, intermedios y producto, en línea o muy cerca de la línea en poco tiempo, a tiempo real, sin parar el proceso. Algunos ejemplos del PAT son el uso del NIR o del RAMAN para la determinación del punto final de algunas operaciones básicas o la determinación en línea de las propiedades de las formas farmacéuticas, entre otros. La fabricación en continuo y el PAT suponen ventajas en términos de eficacia y de calidad, disminuyendo la variabilidad en los productos y su posible contaminación. Asociado a ellas

se encuentra el QbD, metodología aplicable al desarrollo farmacéutico que permite establecer los factores críticos relacionados con los materiales y el proceso; llevar a cabo un diseño de experimentos más completo a partir de estos factores, y, tras el análisis de los resultados obtenidos, establecer el espacio de diseño, es decir, aquel espacio para cada factor dentro del cual se obtiene un producto de la calidad establecida previamente.

La fabricación en continuo, el QbD y el PAT sientan las bases para potenciar la denominada Farma 4.0, etapa en la que, a estos elementos, se unen otros como el Internet de las cosas (IoT), la inteligencia artificial, la robótica o la computación avanzada, que permitirán disponer de sistemas autónomos y autoorganizados que funcionan independientemente de la participación humana. Se prevé que, en un entorno de este tipo, seremos capaces de recoger una cantidad enorme y variada de datos que podrán analizarse mediante algoritmos y utilizarse para tomar decisiones en tiempo real que impactarán directamente en los resultados de producción.

*Palabras clave:* Qbd; PAT; fabricación continua; Farma 4.0; farmacia computacional; redes neuronales.

*Keywords:* Qbd; PAT; continuous manufacturing; Pharma Industry 4.0; computational pharmaceuticals; neuronal networks.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arden NS, Fisher AC, Tyner K, Yu LX, Lee SL, Kopcha, M. Industry 4.0 for pharmaceutical manufacturing: Preparing for the smart factories of the future. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021; 602:120554. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120554>
- Aucamp M, Milne M. The physical stability of drugs linked to quality-by-design (QbD) and in-process technology (PAT) perspectives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019; 139:105057. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105057>
- Beke ÁK, Gyürkés M, Nagy ZK, Marosi G, Farkas A. Digital twin of low dosage continuous powder blending – Artificial neural networks and residence time distribution models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2021; 169:64-77. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.09.006>
- Grangeia HB, Silva C, Simões SP, Reis MS. Quality by design in pharmaceutical manufacturing: A systematic review of current status, challenges and future perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020; 147:19-37. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.12.007>
- Kim B, Woo YA. Coating process optimization through in-line monitoring for coating weight gain using Raman spectroscopy and design of experiments. *Journal of*

- Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2018; 154:278-284. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.001>
- Liu R, Li L, Yin W, Xu D, Zang H. Near-infrared spectroscopy monitoring and control of the fluidized bed granulation and coating processes—A review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017; 530(1):308-315. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.051>
- Rehrl J, Hörmann-Kincses T, Sibanc R, Hsiao WK, Franke M, Khinast J. Fluidization characterization in the ConSigma 25 dryer via process data – A method of advanced quality assurance in continuous manufacturing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021; 607:121041. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121041>
- Sebastian Escotet-Espinoza M, Moghtadernejad S, Oka S, Wang Y, Roman-Ospino A, Schäfer E, ... Muzzio F. Effect of tracer material properties on the residence time distribution (RTD) of continuous powder blending operations. Part I of II: Experimental evaluation. *Powder Technology*. 2019; 342:744-763. doi:<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.10.040>
- Singh M, Sachan S, Singh A, Singh KK. Chapter 7 - Internet of Things in pharma industry: possibilities and challenges. En: Balas VE, Solanki VK, Kumar R, editores. *Emergence of Pharmaceutical Industry Growth with Industrial IoT Approach*. Academic Press; 2020. p. 195-216.
- Thomas J, Sinha K, Shivkumar G, Cao L, Funck M, Shang S, Nere NK. A CFD Digital Twin to Understand Miscible Fluid Blending. *AAPS PharmSciTech*. 2021; 22(3):91. doi:[10.1208/s12249-021-01972-5](https://doi.org/10.1208/s12249-021-01972-5)
- Trenfield SJ, Awad A, McCoubrey LE, Elbadawi M, Goyanes A, Gaisford S, Basit, AW. Advancing pharmacy and healthcare with virtual digital technologies. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022; 182:114098. doi:<https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.114098>
- Vanhoorne V, Vervaeck C. Recent progress in continuous manufacturing of oral solid dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020; 579:119194. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119194>



ISSN electrónico: 2445-1355

DOI: <https://doi.org/10.14201/fj2022727374>

## ANTIBIÓTICOS VS BACTERIAS. DE LA RESISTENCIA AL CONTRAATAQUE

### *Antibiotics vs Bacteria. From Resistance to Counterattack*

Luis MARCOS NOGALES; Raquel CARNERO GÓMEZ

Farmacia Luis Marcos. Plaza de la Fuente, 9. 37002 SALAMANCA

[farmaciamarcos@yahoo.es](mailto:farmaciamarcos@yahoo.es); [raquelecarnero@yahoo.es](mailto:raquelecarnero@yahoo.es)

*Palabras clave:* antibióticos; resistencia; divulgación científica; salud pública.

El uso inadecuado de los antibióticos ha comportado un nuevo y muy grave problema de salud pública: la aparición de bacterias multirresistentes (las llamadas «superbacterias»), causantes de infecciones difíciles de tratar y con un alto coste para la sociedad, que se ha visto acrecentado por la pandemia del COVID-19. Por todo ello, ahora más que nunca, es necesario disponer de amplio conocimiento y rigor científico sobre el valor de los antibióticos y la resistencia a los mismos. Ese es el propósito que orienta el libro *Antibióticos vs. bacterias. De la resistencia al contraataque* y la charla impartida en Farmaforum 2022 el pasado mes de mayo en la Facultad de Farmacia de Salamanca.

La *lucha contra las resistencias bacterianas* es un problema de salud pública muy grave, con importantes implicaciones a nivel global, por lo que es necesaria la concienciación ciudadana. Una de las claves para que la divulgación científica sea efectiva es que el mensaje sea transmitido de manera correcta y orientado a un público general. En el libro se utiliza un estilo ameno, respaldado por las ilustraciones llenas de humor de Íñigo Ansola. Este libro expone el conocimiento actual sobre las bacterias, sus beneficios (incluyendo el papel de la microbiota en nuestra salud) y también sus perjuicios; expone los modos de combatir las infecciones, muestra el papel esencial de los antibióticos para lograrlo y define los cambios necesarios para que dicho combate sea (o vuelva a ser) efectivo. Además, como

divulgadores y farmacéuticos insistimos en el concepto *One Health* como estrategia mundial que busca promover la colaboración interdisciplinar en el cuidado de la salud de las personas, los animales y el medio ambiente, con el fin de poder elaborar e implementar programas, políticas y leyes que mejoren la salud pública.

Partiendo de la historia desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928, comprobamos que la medicina ha contado con los antibióticos como sus mejores aliados para hacer frente a las infecciones. Un siglo después, estamos en un momento crítico, con 33.000 muertes al año en Europa debidas a infecciones resistentes a antimicrobianos. Durante la Segunda Guerra Mundial hubo una carrera investigadora para conseguir producción suficiente de penicilina para las tropas, pero ahora la carrera es por conseguir nuevos antibióticos, con un escenario en el que cada vez hay más bacterias multirresistentes y panresistentes.

Hay alternativas que pueden llegar a ser buenas armas frente a las infecciones bacterianas, entre ellas las terapias con fagos, pero sobre todo hay que cuidar el arsenal que tenemos y ser escrupulosos con el seguimiento de los tratamientos prescritos.

#### BIBLIOGRAFÍA

Marcos Nogales L, Carnero Gómez R. Antibióticos vs bacterias. De la resistencia al contraataque. Ed. Larousse. <https://www.larousse.es/libro/libros-ilustrados-practicos/antibioticos-vs-bacterias-raquel-carnero-gomez-9788418473388/>

## ONE HEALTH: ¿ESTAMOS PREPARADOS PARA LA PRÓXIMA PANDEMIA?

### *One Health: Are We Ready for the Next Pandemic?*

Raúl RIVAS

Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca.  
raulrg@usal.es

*Palabras clave:* cambio climático; enfermedad infecciosa emergente; virus; One Health.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) apunta a que han sido descritas más de 250 enfermedades zoonóticas. Cada año aparecen cinco nuevas enfermedades humanas, y tres de ellas tienen origen animal. Al menos un 75 % de los agentes patógenos responsables de las enfermedades infecciosas emergentes tienen origen zoonótico. Muchas de estas enfermedades destacan por su gran impacto económico y en la salud pública.

La aparición de enfermedades infecciosas emergentes resulta de diversos factores antropogénicos, genéticos, ecológicos, socioeconómicos y climáticos que actúan como fuerzas motrices interrelacionadas dificultando la predicción y la prevención de las enfermedades.

Es evidente que combatir las enfermedades infecciosas emergentes requiere de un esfuerzo interdisciplinar amplio que promueva la cooperación intersectorial e interregional. Esta estrategia pasa por la necesidad de progresar en el concepto *One Health* (Una Salud), un enfoque que implica el reconocimiento de la naturaleza multifactorial del problema. La idea de *One Health* manifiesta que la salud humana, animal y ambiental están inextricablemente vinculadas, que las especies animales no humanas pueden actuar como reservorios de patógenos y que las formas en que los animales humanos y no humanos interactúan generan oportunidades para la transmisión y el desarrollo de enfermedades (Aarestrup *et al.*, 2021).

Predecir la manifestación de una nueva pandemia es complejo, pero la evaluación de diversos factores, entre los que destacan el cambio climático, la deforestación, el cambio del uso del suelo o la globalización, entre otros, constituirá una pieza clave para identificar los orígenes y los patrones de aparición de los potenciales futuros patógenos. La hoja de ruta marcada para los próximos años implica la necesidad de afrontar un objetivo integrador que aborde las investigaciones sobre la ecología, la patología y la biología poblacional de los sistemas huésped-parásito desde perspectivas individuales, poblacionales, animales, ambientales y humanas.

#### BIBLIOGRAFÍA

Aarestrup FM, Bonten M, Koopmans M. Pandemics-One Health preparedness for the next. *The Lancet Regional Health-Europe*. 2021; 9:100210.

El comité científico de *FarmaJournal* quiere agradecer la colaboración durante el proceso de revisión de los artículos de investigación publicados en este número a los siguientes profesores de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca: Antonio Blázquez Zaballos, Óscar Briz Sánchez, Alfredo Ginés Casanova Paso, Laura Gallego Yerga, José Ángel García Pedraza, José Martínez Lanao, Esther Menéndez Gutiérrez, Rafael Peláez Lamamié de Clairac Arroyo, Javier Robles Valero, Marta Rodríguez Romero, Adela María Sánchez Ávila y María Soledad San Román Vicente.



## NORMAS DE PRESENTACIÓN DE ORIGINALES

### ENVÍOS EN LÍNEA A TRAVÉS DE «USAL REVISTAS»

Previamente habrá que estar registrado en FarmaJournal; si es así le pedirá el nombre de usuario/a y contraseña.

[insertar enlace a <https://revistas.usal.es/index.php/2445-1355/login>]

En caso contrario tendrá que registrarse:

[insertar enlace a <https://revistas.usal.es/index.php/2445-1355/user/register>]



### LISTA PRELIMINAR PARA LA PREPARACIÓN DE ENVÍOS

Como parte del proceso de envíos, los autores/as están obligados a comprobar que su envío cumpla todos los elementos que se muestran a continuación. Se devolverán a los autores/as aquellos envíos que no cumplan estas directrices.

1. El envío no ha sido publicado previamente ni se ha sometido a consideración por ninguna otra revista (o se ha proporcionado una explicación al respecto en los Comentarios al editor/a).
2. El archivo de envío está en formato OpenOffice, Microsoft Word, RTF o WordPerfect.
3. Siempre que sea posible, se proporcionan direcciones URL para las referencias.
4. El texto tiene un interlineado sencillo, un tamaño fuente de 12 puntos, se utiliza cursiva en lugar de subrayado (excepto en las direcciones URL), y todas las ilustraciones, figuras y tablas se encuentran colocadas en los lugares del texto apropiados, en vez de al final.
5. El texto reúne las condiciones estilísticas y bibliográficas incluidas en Pautas para el autor/a, en Acerca de la revista.
6. En el caso de enviar el texto a la sección de evaluación por pares, se siguen las instrucciones incluidas en asegurar una evaluación anónima.

### DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD

Los nombres y las direcciones de correo electrónico introducidos en esta revista se usarán exclusivamente para los fines establecidos en ella y no se proporcionarán a terceros o para su uso con otros fines.



## ÍNDICE

### ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

- Blanca CALDERÓN GARCÍA; María José DE JESÚS VALLE, Liofilización de liposomas para su administración pulmonar..... 7-17
- Cira DIEZ; María José FERNÁNDEZ-GÓMEZ; Javier MARTÍN-VALLEJO, Efecto del consumo de tabaco en las enfermedades inflamatorias intestinales: metaanálisis ..... 19-28
- Oana María MACIUCA; Fernando SÁNCHEZ-JUANES; Esther MENÉNDEZ, Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en bebidas probióticas: el caso de la kombucha..... 29-39
- Alejandro MARTÍN QUIJADA; Ana María GONZÁLEZ PARAMÁS; Celestino SANTOS BUELGA, Análisis de componentes bioactivos derivados de aminoácidos en el vino..... 41-51
- Sara REVUELTA; Javier TASCÓN; Laura VICENTE-VICENTE; Alfredo G. CASANOVA; Ana I. MORALES; Marta PRIETO, Evaluación histológica del daño renal producido por los inhibidores del punto de control inmunitario..... 53-65

### RESÚMENES DE CONFERENCIA

- Cristina MADERUELO, Presente y futuro de la industria farmacéutica..... 69-71
- Luis MARCOS NOGALES; Raquel CARNERO GÓMEZ, Antibióticos vs bacterias. De la resistencia al contraataque..... 73-74
- Raúl RIVAS, *One Health*: ¿estamos preparados para la próxima pandemia?... 75-76

