



Crioconservación de ovocitos bovinos usando nanopartículas como antioxidante

Jiménez Artos, Máximo Adán

Departamento de Ciencias de la Vida y Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería en

Biotecnología

Msc. Camacho López, Christian Orlando

18 de marzo del 2024

Reporte de verificación de contenido



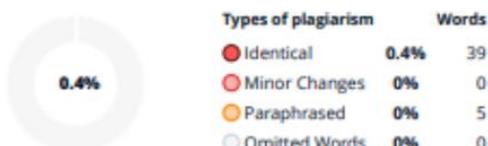
Plagiarism and AI Content Detection Report

Integracion Curricular Jiménez M. Fin...

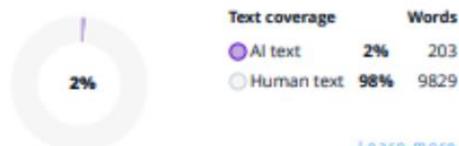
Scan details

Scan time: March 18th, 2024 at 12:30 UTC Total Pages: 41 Total Words: 10032

Plagiarism Detection



AI Content Detection



🔍 Plagiarism Results: (3)

🌐 **Tesis MTP Elizabeth Reyes.pdf** 0.1%

<https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/645/1/tesis%20mtp%20elizabeth%20reyes.pdf>

Elizabeth Reyes

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA TESIS "PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIOCOMPATIBLES Y BIODESECHABLES CARGADAS CO...

🌐 **Recuperación de ovocitos a partir de Folículos de Graff de 0,6-20 mm de d...** 0.1%

<https://docplayer.es/238184259-recuperacion-de-ovocitos-a-partir-de-foliculos-de-graff-de-0-6-20-mm-de-dia...>

Iniciar la sesión ...

🌐 **d1ra08298a1.pdf** 0.1%

<https://www.rsc.org/suppdata/d1/ra/d1ra08298a/d1ra08298a1.pdf>

Eko Kornelius Sitepu

Electronic Supplementary Material (ESI) for RSC Advances. This journal is © The Royal Society of Chemistry 2022 Supplementary Informatio...



Firmado electrónicamente por:
CHRISTIAN ORLANDO
CAMACHO LOPEZ

Firma.....

Ing. Christian Orlando Camacho López. Msc
Director



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: **"Crioconservación de ovocitos bovinos usando nanopartículas como antioxidante"** fue realizado por el señor estudiante **Jiménez Artos, Máximo Adán**, el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizada en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo, 18 de marzo del 2024



CHRISTIAN ORLANDO
CAMACHO LOPEZ

Firma.....

Ing. Christian Orlando Camacho López. Msc
Director



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Jiménez Artos, Máximo Adán**, con cédula/cédulas de ciudadanía n° 0503542060, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Crioconservación de ovocitos bovinos usando nanopartículas como antioxidante”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo, 18 de marzo del 2024

Firma

Jiménez Artos, Máximo Adán

C.C.: 0503542060



Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Jiménez Artos, Máximo Adán**, con cédula de ciudadanía n° 0503542060, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **“Crioconservación de ovocitos bovinos usando nanopartículas como antioxidante”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo, 18 de marzo del 2024

Firma

Jiménez Artos, Máximo Adán
C.C.: 0503542060

Dedicatoria

Este trabajo de titulación es dedicado con mucho esfuerzo, cariño y amor para mis padres Elvia Artos y Adán Jiménez, quienes con su trabajo y esfuerzo incansable a diario han logrado darme buenos valores, impulso para sobresalir en cualquier dificultad y el estudio. Siempre han sabido guiarme por buenos caminos haciendo lo correcto y recordándome que en cualquier lugar que me encuentre, ser buena persona, hoy quiero retribuir con lo poco o mucho que se ha alcanzado, pero con gran satisfacción dedico este logro a ellos.

Con mucho cariño también dedico a mis hermanos Nibaldo, Bertha y Wilson, quienes también con su experiencia me han apoyado en lo personal y lo profesional, también a cada uno de mis sobrinos a quienes les tengo mucho aprecio y cariño.

Agradecimientos

Quiero iniciar agradeciendo a Dios por la salud y vida a mis familiares y mi persona, y agradezco infinitamente a mi núcleo familiar, mis padres, mis hermanos y sobrinos porque son un pilar importante en mí y siempre me han brindado apoyo en muchas decisiones de mi vida.

Agradezco a cada uno de los docentes, amigos y conocidos que forman parte de tan digna y prestigiosa Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE Sede Santo Domingo, por sus conocimientos y vivencias y las prestaciones que me ha ayudado con mi formación como ingeniero en biotecnología.

A tan importante y prestigiosa la Universidad Politécnica de Chimborazo ESPOCH, quiero hacer un especial agradecimiento por abrirme las puertas en su establecimiento en la ciudad de Riobamba, ya que gracias al Dr. Celso Recalde Decano de la Facultad de Ciencias, se me ha permitido con total agrado y facilidad el uso de las instalaciones, laboratorios y materiales para realizar una parte experimental de este trabajo. Al BQF. Benjamín Andrés Román agradezco por su apoyo y tutoría durante la estadía en la Universidad puesto que siempre estuvo al pendiente con materiales y el desarrollo del trabajo. De igual forma agradezco al Ing. Miguel Mauricio Álvarez docente encargado del Laboratorio de Ciencias Químicas, quien siempre estuvo predispuesto ayudarme con el uso de equipos y materiales durante el proceso experimental, así también, con el apoyo de sus conocimientos. A los docentes, estudiantes y amigos de esta prestigiosa Universidad agradezco infinitamente por el apoyo brindado en especial a Angie S. y Kevin A.

A la empresa pública GAD Provincial de Santo Domingo de los Tsáchilas, especialmente al departamento de Gestión Ambiental, hago un extenso agradecimiento a su personal por la permanencia y el apoyo para realizar prácticas preprofesionales, que me servirán en un futuro como profesional y como persona.

Al laboratorio de Biotecnología de la reproducción animal de la Universidad ESPE Sede SD, bajo el cargo del Dr. Fredy Carrera quiero agradecer por haberme permitido realizar

prácticas preprofesionales de lo cual me sirvió mucho en el desarrollo de este trabajo, ya que adquirí conocimientos muy importantes y de un enfoque personal en el futuro.

A mi tutor de tesis, Msc. Christian Camacho, quiero agradecer de manera especial porque siempre se mantuvo atento al desarrollo del trabajo y me ha apoyado en todas las necesidades requeridas de manera incondicional, además, su conocimiento fue de total apoyo.

Al Mgtr. Francisco Suasnabas, y el Dr. Fredy Carrera, agradezco por su apoyo con sus conocimientos que me ayudaron en el desarrollo experimental de esta investigación. De manera general quiero agradecer a varios amigos y conocidos, especialmente a Liliana, Julissa, Cristian y Kevin con quienes he tenido una gran amistad y he compartido muchas vivencias por lo que fueron de gran aporte durante mi vida estudiantil, y de una manera en particular agradezco a Miguel con la persona que compartimos vivencias y conocimiento durante nuestra etapa universitaria.

Índice de contenido

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos	ii
Resumen	1
Abstract.....	2
Capítulo I	3
Introducción	3
Estado del arte.....	7
Objetivos	10
Objetivo general.....	10
Objetivos específicos	10
Capitulo II.....	11
Marco Teórico.....	11
Nanotecnología	11
Nanopartículas	11
Nanopartículas de curcumina (Nano curcumina).....	11
Propiedades químicas de la nanocurcumina	12
Actividad antioxidante	12
Actividad antiinflamatoria	13
Actividad antibacterial	14
Síntesis de nanopartículas de curcumina (nano curcumina).....	14
Método de coacervación	14

Método de nano precipitación	15
Método de secado por aspersión	15
Método de extracción asistida por microondas (MAE).....	15
Método de extracción Soxhlet (SE)	16
Extracción asistida por enzimas (EAE)	16
Extracción asistida por ultrasonido (UAE)	17
Métodos para caracterización de nanopartículas.....	17
Espectroscopia UV-visible	17
Espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR).....	18
Dispersión dinámica de luz (DLS)	18
Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	18
Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	19
Nanopartículas como antioxidante.....	19
Aplicaciones de nanocurcumina.....	20
Crioconservación de ovocitos bovinos.....	20
Ovocitos bovinos.....	20
Crioconservación	20
Técnicas de crioconservación de ovocitos (CO).....	21
Nanocurcumina en crioconservación	22
Capitulo III.....	23
Metodología	23
Ubicación del lugar de investigación.....	23
Ubicación geográfica, política y ecológica.....	23

Materiales y métodos	25
1. Síntesis por ultrasonido o sonoquímica de nanocurcumina NC	26
1.1. Preparación de la muestra	26
1.2. Síntesis y purificación de NC.....	26
2. Caracterización de nanopartículas de curcumina (NC).....	27
2.1. Caracterización por Espectroscopia UV-Vis	27
2.2. Caracterización por espectrometría de infrarrojo	28
3. Capacidad antioxidante de nanocurcumina NC.....	29
3.1. Prueba de DPPH para nanocurcumina (NC)	29
4. Maduración y crioconservación de ovocitos bovinos	30
4.1. Transporte y lavado de ovarios	30
4.2. Aspiración folicular y selección de ovocitos	30
4.3. Maduración de ovocitos.....	31
4.4. Congelación de ovocitos	32
4.5. Evaluación de viabilidad en post-descongelación.....	33
Análisis experimental.....	33
Planteamiento de Hipótesis	34
Réplicas.....	35
Análisis funcional	35
Capitulo IV	36
Resultados y discusión	36
1. Síntesis por ultrasonido o sonoquímica de nanocurcumina NC	36
2. Identificación de las nanopartículas de curcumina.....	37

Identificación de NC mediante espectrometría de UV-Vis	38
Caracterización por espectrofometría de infrarrojo.....	40
3. Capacidad antioxidante de nanocurcumina	41
Prueba de DPPH.....	41
4. Maduración y crioconservación de ovocitos bovinos	44
Maduración de ovocitos bovinos <i>in vitro</i>	44
Crioconservación de ovocitos bovinos.....	56
Capitulo V	58
Conclusiones	58
Recomendaciones	59
Bibliografía.....	60

Índice de tablas

Tabla 1. Material de laboratorio para la síntesis de NC, determinación de DPPH y crioconservación de ovocitos.....	25
Tabla 2. Factores y niveles de experimentación.....	34
Tabla 3. Tratamientos a analizar en la prueba experimental.....	34
Tabla 4. Cantidad de nanopartículas de curcumina y su porcentaje de rendimiento.....	36
Tabla 5. Ovocitos experimentados en medio TCM 199 1x.	45
Tabla 6. Ovocitos experimentados en medio de maduración MEM 10x.	45
Tabla 7. Análisis de varianza para ovocitos en grado de maduración I.....	49
Tabla 8. Análisis de varianza para ovocitos en grado de maduración II.....	50
Tabla 9. Análisis de varianza para ovocitos en grado de maduración III.....	50

Índice de figuras

Figura 1 Estructura química de la curcumina	12
Figura 2 Propiedades de los grupos químicos que forman la nanocurcumina y expresan sus respectivas propiedades.	13
Figura 3 Ubicación geográfica del laboratorio de Química.....	23
Figura 4 Ubicación geografía del laboratorio de Ciencias Químicas.....	24
Figura 5 Ubicación geográfica del laboratorio de biotecnología de la Reproducción Animal...	25
Figura 6 Síntesis y purificación de nanopartículas curcumina (NC).....	27
Figura 7 Espectrofotometría UV-Vis	28
Figura 8 Identificación de la nanocurcumina en espectrofotómetro de IR.....	29
Figura 9 Aspiración folicular y estereoscopio de 10X a 40X.	31
Figura 10 Pajuelas para crioconservación de ovocitos bovinos.....	33
Figura 11 Nanopartículas de curcumina purificadas	36
Figura 12 Pico de absorbancia de nanopartículas de curcumina	38
Figura 13 Mayor valor de absorbancia en nanopartículas de curcumina	38
Figura 14 Caracterización de nanocurcumina en espectroscopia de infrarrojo.....	40
Figura 15 Lectura del porcentaje de actividad eliminadora de radicales libres (FRSA).....	41
Figura 16 Capacidad antioxidante de nanocurcumina frente a su concentración	42
Figura 17 Reacción de DPPH en diferentes concentraciones de nanocurcumina.....	44
Figura 18 Clasificación de ovocitos maduros.....	46
Figura 19 Cantidad de ovocitos en el estudio con medio de maduración TCM 199 1x.....	46
Figura 20 Cantidad de ovocitos en el estudio con medio de maduración MEM 10x.	48
Figura 21 Diagrama compuesto por análisis en cajas de bigotes y asociación de grupos homogéneos en ovocitos de Grado I.	51

Figura 22 Diagrama compuesto por análisis en cajas de bigotes y asociación de grupos homogéneos en ovocitos de Grado II.	52
--	----

Figura 23 Diagrama compuesto por análisis en cajas de bigotes y asociación de grupos homogéneos en ovocitos de Grado III.	53
---	----

Índice de gráficos

Gráfico 1 Medias en la cantidad de ovocitos maduros de Grado I.....	55
Gráfico 2 Medias en la cantidad de ovocitos maduros de Grado II.....	55
Gráfico 3 Medias en la cantidad de ovocitos maduros de Grado III.....	56

Resumen

Este estudio se enfoca en la síntesis de nanopartículas de curcumina con propiedades antioxidantes para la aplicación en crioconservación de ovocitos bovinos. La nanociencia permite explorar materiales a escala nanométrica, lo que modifica y mejora sus propiedades físico-químicas. La curcumina, presente en la *Cúrcuma longa*, es un fenol destacado con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, buscando analizar el efecto potencial de las nanopartículas de curcumina en la maduración y crioconservación de ovocitos bovinos mediante evaluaciones *in vitro* se extrajo nanocurcumina a partir de *Cúrcuma longa* orgánica mediante método de ultrasonido, su capacidad antioxidante se determinó mediante DPPH y se caracterizó utilizando espectrometría de UV-Vis y espectroscopia de infrarrojo mediante transformada de Fourier (FTIR). El rendimiento fue del 92.13%, equivalente a 276.4 mg de nanocurcumina. Se verificó la capacidad antioxidante mediante el método DPPH, obteniendo un porcentaje de FRSA más alto del 70.7692% a una concentración de 150 µg/ml de nanocurcumina. Se evaluó el desarrollo de células del cumulus oophorus en medios de cultivo para ovocitos TCM 199 1x y MEM 10x, con diferentes concentraciones de nanocurcumina (0µM, 5µM, 10µM, 20µM y 40µM). Se observó un 52.92% para ovocitos de Grado I y II, y un 47.08% para ovocitos de Grado III. Se determinó que las concentraciones de 5µM y 10µM tienen mayor potencial en el desarrollo de ovocitos en Grado I y II. Además, se encontró una viabilidad del 90% en ovocitos con nanopartículas y del 70% en ovocitos sin nanopartículas, con integridad de las células cumulus oophorus y ausencia de daños en el núcleo.

Palabras clave: Nanocurcumina, ovocitos, cumulus, capacidad antioxidante, absorbancia.

Abstract

This study focuses on the synthesis of curcumin nanoparticles with antioxidant properties for application in bovine oocyte cryopreservation. Nanoscience allows exploring materials at the nanoscale, which modifies and improves their physicochemical properties. Curcumin, present in *Curcuma longa*, is a prominent phenol with antioxidant and anti-inflammatory properties. In order to analyze the potential effect of curcumin nanoparticles in the maturation and cryopreservation of bovine oocytes through in vitro evaluations, nanocurcumin was extracted from organic *Curcuma longa* using an ultrasound method, its antioxidant capacity was determined by DPPH and characterized using UV-Vis spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The yield was 92.13%, equivalent to 276.4 mg of nanocurcumin. Antioxidant capacity was verified by the DPPH method, obtaining a higher FRSA percentage of 70.7692% at a concentration of 150 µg/ml of nanocurcumin. The development of cumulus oophorus cells was evaluated in TCM 199 1x and MEM 10x oocyte culture media with different concentrations of nanocurcumin (0µM, 5µM, 10µM, 20µM and 40µM). A 52.92% was observed for Grade I and II oocytes, and 47.08% for Grade III oocytes. Concentrations of 5µM and 10µM were determined to have higher potential in Grade I and II oocyte development. In addition, 90% viability was found in oocytes with nanoparticles and 70% in oocytes without nanoparticles, with integrity of cumulus oophorus cells and absence of damage to the nucleus.

Key words: Nanocurcumin, oocytes, cumulus, antioxidant capacity, absorbance.

Capítulo I

Introducción

Las Técnicas de Reproducción Asistida (TRAs), surgidas en los años 70, han aportado significativamente al campo de la reproducción animal (Mata-Miranda & Vázquez-Zapién, 2019). Incluyen la inseminación artificial (IA), fecundación in vitro (FIV), transferencia de embriones (TF) y transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), junto con la crioconservación de ovocitos, embriones y espermatozoides. De acuerdo con Urrego et al., (2014) estas técnicas han sido clave para conservar el material genético y abordar problemas reproductivos en animales domésticos.

La crioconservación de ovocitos (CO) bovinos es un proceso que permite mantener las células en un estado de congelación consiguiendo preservar la genética individual de hembras para su posterior aplicación en procesos de reproducción asistida, estudios clínicos e investigación (Tharasanit & Thuwanut, 2021), permitiendo aprovechar sus características fenotípicas y genotípicas para lograr mejoramientos en los hatos ganaderos a nivel mundial.

La inversión en biotecnología animal en América Latina ha alcanzado los 1,55 mil millones de dólares para el año 2022, impulsada por el rápido crecimiento de las técnicas de reproducción asistida en bovinos. Se proyecta un crecimiento del 9,7% en el periodo 2023-2028, según Singh (2023). La inseminación artificial (IA) se destaca como la técnica más aprobada y ampliamente utilizada en varios países latinoamericanos, como Brasil, Argentina y Ecuador.

Según con la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, ESPAC (2022), la cantidad de ganado bovino en el Ecuador bordea alrededor de 3.9 millones de cabezas a nivel nacional, encontrándose que la cantidad de cabezas de ganado va en

cantidades de mayor a menor de acuerdo la región, Sierra, Costa y Amazonía, respectivamente. En la provincia de Manabí se tiene mayor prevalencia de ganado con buena genética y esto se debe a la unión de entidades gubernamentales y académicas que han creado un laboratorio de Biotecnología Animal, para facilitar el mejoramiento genético de la ganadería bovina en la provincia.

Hasta el año 2017, las técnicas de reproducción asistida en Santo Domingo de los Tsáchilas eran relativamente bajas. La situación cambió con la inauguración de la central genética ASOGAN. Según los informes hasta 2022, el uso de la FIV se ha ampliado a tres de sus cuatro regiones del país (LA HORA, 2022).

En las TRAs se busca crear un medio *in vitro* que se asemeje al proceso natural, sin embargo, aún hay ciertos parámetros que son difíciles de controlar, explícitamente porque se genera un gran número de catabolitos que interfieren con los procesos celulares normales, puesto que se forman fácilmente especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros radicales en el medio *in vitro*, por lo tanto, en la crioconservación esto conduce al daño celular (Ciani et al., 2021).

La curcumina es un compuesto con propiedades nutraceuticas derivado naturalmente de la *Cúrcuma longa* y tiene propiedades antioxidantes, lo que la convierte en una excelente candidata para contrarrestar los efectos oxidativos (Hosseinzadeh et al., 2011) haciendo que su eficacia sea mayor con la reducción a tamaño nanométrico.

La nanociencia ha buscado crear materiales con propiedades a nano escala con mayor estabilidad y reactividad, los cuales son utilizados en diversos campos como la electrónica, la salud (Páez Aguinaga, 2022) y otras áreas. Esta disciplina ha recibido poca atención en Ecuador, ya que desde el 2008 solo se practica en algunas instituciones

académicas. Esto se debe a que los equipos necesarios son costosos y los materiales utilizados deben cumplir con regulaciones para garantizar su correcto uso.

La crioconservación de células animales es un proceso de altos estándares económicos por todos los procedimientos, equipos e insumos utilizados en su ejecución, además, en ciertos casos la viabilidad y tasa de éxito suele ser muy reducida debido a varios factores que pueden influir en el proceso.

La sensibilidad de los ovocitos bovinos en la crioconservación suele darse principalmente por su alto contenido lipídico, lo cual en el proceso de congelamiento existe la aparición de cristales y especies reactivas al oxígeno (ROS) que generan criolesiones a varios componentes celulares llegando hasta causar apoptosis celular, por lo cual, es importante el uso de algunos componentes extras que permitan reducir este tipo de afecciones (Tharasanit & Thuwanut, 2021), tales como los crioprotectores (CPA) y antioxidantes.

Las ROS en condiciones normales regulan el crecimiento y diferenciación celular, sin embargo, en la crioconservación al haber una drástica reducción de temperatura, se eleva la producción de ROS, causando daños que provocan la destrucción celular como la peroxidación lipídica, daño en el ADN y oxidación de algunas proteínas (Liu et al., 2021).

El uso de antioxidantes debe ser de forma moderada y en concentraciones adecuadas ya que su mal uso tiene efectos negativos en el mecanismo anticongelante de las células y también puede provocar estrés reductivo, afectando la función y estructura de las células (Liu et al., 2021).

En este contexto, se busca desarrollar un protocolo para la producción de nanopartículas de curcumina con propiedades antioxidantes para su uso en la maduración y

crioconservación de ovocitos bovinos con el fin de obtener un antioxidante rentable, de alto rendimiento y potente.

Estado del arte

En su investigación, Cao et al. (2022) llevaron a cabo un examen de los impactos del estrés oxidativo y las condiciones asociadas a la Criopreservación de ovocitos. El estrés oxidativo, caracterizado como la acumulación de ROS, conlleva a tener daños en mitocondrias y retículo endoplasmático, especialmente durante el proceso de criopreservación. La revisión abordó de manera integral las causas y ubicaciones primordiales de los ovocitos afectados por estrés oxidativo, así como los mecanismos de acción de antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos. Se concluyó que el uso adecuado de antioxidantes contribuye a mitigar los impactos del daño oxidativo y ciertos efectos asociados a la criopreservación.

En un estudio de Somfai & Hirao. (2021) desarrollado en la vitrificación de ovocitos bovinos con medios libres de proteínas desarrollado en Japón, encontraron un protocolo con medios de maduración libres de proteínas (TCM-199 y NCSU-37) que permitía una optimización de los recursos y una buena eficiencia, realizado en dos combinaciones de crioprotectores (propilenglicol + etilenglicol) y (etilenglicol + DMSO) en medios de maduración ajustados con pCPA (crioprotector permeable) del 4% y 15%, respectivamente. Encontraron que ambas combinaciones dieron buenos resultados se y concluye que encontraron un protocolo con medios de maduración y crioprotectores de buena calidad para la supervivencia de ovocitos bovinos inmaduros.

En una investigación realizada por Olexiková et al. (2022) en la mitigación del impacto letal de los ovocitos bovinos luego de la descongelación utilizando glutatión, se utilizó un antioxidante en el medio de recuperación de los ovocitos para tener una mayor viabilidad en el proceso de fecundación in vitro, luego de la descongelación se colocaron concentración de 0, 1.5 y 5 mmol/L de glutatión al medio de recuperación, determinando

que la concentración de 5 mmol/L demostró una mayor capacidad antioxidante y además se observó un reducción de tiempo en la formación de blastocistos.

Un estudio realizado por Abdelnour et al. (2020) investiga la capacidad antioxidante de las nanopartículas de cúrcuma. En este estudio se utilizaron diferentes concentraciones de nanocurcumina en el proceso de crioconservación de espermatozoides de conejo. Se agregaron tres concentraciones diferentes de nanocurcumina, es decir, 0.5, 1 y 1.5 $\mu\text{g/ml}$, al espermatozoides diluido, que luego se congeló a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los resultados mostraron que después de la descongelación, la concentración de 1,5 $\mu\text{g/ml}$ mostró una mayor motilidad y una viabilidad avanzada. En conclusión, se demostró que las nanopartículas de cúrcuma actúan eficazmente como antioxidante en el proceso de crioconservación.

En diversas regiones de Ecuador, los hatos ganaderos no poseen una genética avanzada. Según Chamba (2021), durante los años 2015 y 2017, se importaron bovinos de alta genética desde Chile, Paraguay y EE. UU., con el propósito de impulsar el mejoramiento genético en el país.

Por lo tanto, en nuestro país se han realizado procedimientos de fertilización y criopreservación de embriones de ganado vacuno. Según el estudio de Gutiérrez-Cumbajin (2015) estudió la crioconservación de ovocitos provenientes de ganado vacuno del sacrificio buscando proteger el material genético de las hembras de un rebaño de 20 vacas. Los resultados mostraron una alta viabilidad de ovocitos con el 95%, concluyendo que los procesos de criopreservación son útiles en la conservación y el mejoramiento de la genética.

El uso de antioxidantes comerciales suele ser complicado principalmente por sus altos costos, que muchas veces se basan en una producción con materias primas

reducidas, procesos de purificación, alta demanda y diferentes políticas de los países comerciales, provocan una reducción en la libertad de compra (Conde, 2021).

En nuestro país se debe priorizar la búsqueda de nuevas metodologías que permitan la extracción de antioxidantes, pues según (Araujo-Baptista et al, 2020) el Ecuador es muy rico en diferentes plantas que tienen varias propiedades bioactivas, con alrededor de 3200 plantas que tienen propiedades medicinales es posible obtener sus componentes y utilizarlos como antioxidantes en medicina, nutrición y crioconservación.

El Ecuador ha estado trabajando en mejorar los métodos genéticos, como la inseminación artificial, fecundación in vitro y transferencia de embriones. Sin embargo, enfrenta desafíos en términos de eficiencia reproductiva y costos, principalmente debido a la importación de tecnología e insumos. En base a esto, se busca desarrollar un antioxidante a base de nanopartículas extraídas de plantas como la cúrcuma. Este enfoque pretende sustituir a los antioxidantes comerciales, manteniendo las mismas expectativas a un costo inferior (Chamba, 2021).

La cúrcuma es un producto con buena producción en la Sierra, Costa y Oriente del Ecuador, sin embargo, es un producto poco aprovechado en el país, pero tiene gran potencial de exportación, justamente por sus propiedades que atribuyen a múltiples beneficios en la salud (Altamirano & Vásquez, 2016).

Objetivos

Objetivo general

- Crioconservar ovocitos usando nanopartículas como antioxidante.

Objetivos específicos

- Generar nanopartículas con propiedades antioxidantes.
- Extraer ovocitos de ganado bovino.
- Evaluar la efectividad de las nanopartículas como antioxidante en la crioconservación de ovocitos.

Capítulo II

Marco Teórico

Nanotecnología

La etimología de "nano" proviene del griego "enano", denotando algo extraordinariamente pequeño, equivalente a la millonésima parte de un metro 10^{-9} . No obstante, es esencial distinguir entre nanociencia y nanotecnología. La nanociencia aborda principalmente el estudio de componentes o materiales en la escala nanométrica, con tamaños que oscilan entre 1 y 100 nm. En contraste, la nanotecnología se define como la aplicación práctica de estos nanomateriales en diversas áreas, buscando generar beneficios tanto en el ámbito médico como industrial, según la perspectiva de Mansoori & Soelaiman (2005).

Nanopartículas

Nanopartículas de curcumina (Nano curcumina)

La Cúrcuma conocida como "especia dorada" o "azafrán indio" es una planta herbácea perenne de la familia de las zingiberáceas del jengibre, originaria en el sur de Asia tropical, de uso ancestral de al menos 4000 años en países como China, África y la India, además, han sido identificadas alrededor de 133 especies a nivel mundial (Prasad & Aggarwal, 2011) presenta un color amarillo, insoluble en agua (solo se disuelve a los 30 nm) pero contiene múltiples propiedades que presentan beneficios a la salud.

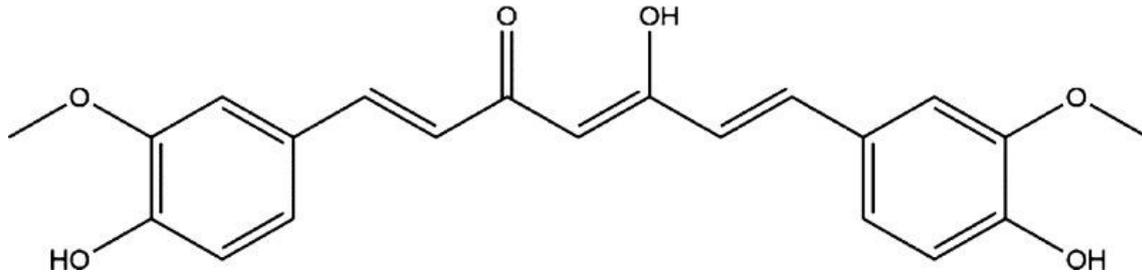
La curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona) también conocida como diferuloimetano es un componente natural que se encuentra en el rizoma de la *Cúrcuma longa* (Aggarwal et al., 2003) siendo el componente bioactivo que posee propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias, entre otras.

La forma reducida de la curcumina a escala nanométrica es la que se conoce como nanocurcumina "NC" o nanopartículas de curcumina, según (Gómez et al., 2018) el tamaño

de la nano curcumina en su estudio es de aproximadamente 45 nm, pero puede oscilar a los 50-55 nm, sin embargo, el tamaño puede depender el tipo de síntesis.

Figura 1

Estructura química de la curcumina



Nota: Este es el componente más importante de la cúrcuma, debido a sus múltiples propiedades. Fuente: (Lee et al., 2013).

Propiedades químicas de la nanocurcumina

La nanocurcumina posee las propiedades químicas de la curcumina, pero se ha descubierto que al reducir el tamaño molecular o estructural las propiedades mejoran en cuanto a la solubilidad, capacidad antioxidante, antiinflamatorio y otras (Manikandan et al., 2022). Se ha considerado que mientras mayor sea la reducción del tamaño, mayor es el efecto terapéutico que genera.

Actividad antioxidante

El Oxígeno es un elemento esencial para el funcionamiento de las células vivas, contribuyendo en algunas de sus actividades biológicas, sin embargo, se pueden generar algunos derivados como la aparición de radicales libres y la formación de ROS (Shinde et al., 2012). En conjunto, la elevada producción provoca una reacción en cadena y se da un efecto de estrés oxidativo dando como consecuencia cambios estructurales o génicos e incluso muerte celular.

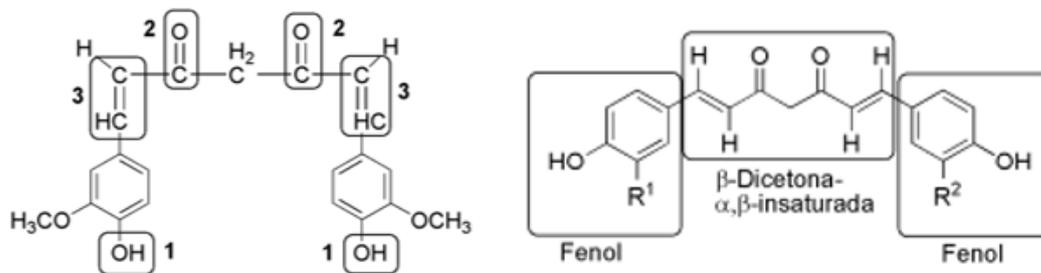
Para neutralizar los elevados niveles de radicales libres y ROS se utilizan diversos tipos de antioxidantes con moléculas de origen enzimático; catalasas, dismutasas y

peroxidasas (Sen et al., 2010), no enzimático; la ceruloplasmina, la ferritina, la albumina y lactoferrina (Bayomi et al., 2013).

La curcumina presenta una actividad antioxidante con gran similitud a las vitaminas C, E y carotenos (vitamina A) gracias a su grupo fenolico presenta la capacidad de eliminar radicales libres, previniendo la peroxidacion lipidica, además, de la propiedad antioxidante según Bhullar et al. (2013) también puede actuar como enzima citoprotectora.

Figura 2

Propiedades de los grupos químicos que forman la nanocurcumina y expresan sus respectivas propiedades.



1. Grupos hidróxilo: actividad antioxidante.

2. Grupos cetónicos: actividad antiinflamatoria, anticancerígena.

3. Dobles enlaces C-C: actividad antiinflamatoria, anticancerígena.

Nota: Según González- Albadalejo et al. (2015) la capacidad antioxidante de la nanocurcumina está dada por su grupo fenol “di fenólico”.

Actividad antiinflamatoria

Los procesos de inflamación en un organismo pueden ser esenciales y a la vez grave, si es que se da en forma aguda ayuda a prevenir algunos agentes patógenos, por el contrario, de manera crónica puede terminar en una enfermedad cancerígena o desarrollarse otro tipo de enfermedades crónica (Basnet & Skalko-Basnet, 2011). Para evitar un proceso descontrolado de inflamación se han estudiado agentes antiinflamatorios de origen natural como la curcumina (Basnet & Skalko-Basnet, 2011).

Actividad antibacterial

El mundo enfrenta un importante reto frente a la resistencia bacteriana frente a los antibióticos, complicación que se ha generado por el mal uso de estos medicamentos, dosis inadecuadas y abuso en el uso (Mun et al., 2013) la ineficiencia de algunos medicamentos, los complicados efectos secundarios y los elevados costos de tratamiento han llevado a buscar alternativas en productos de origen natural como la curcumina (Adamczak et al., 2020).

Se ha determinado que la curcumina es un potente agente antibacteriano frente a diferentes cepas grampositivas y gramnegativas como *E-coli*, *S. aureus*, *Salmonella*, *P. Seudomonas* (Bhullar et al., 2013). Los grupos fenólico de la curcumina forman enlaces de hidrógeno con los grupo amino e hidroxilo en la proteína bacteriana y polimeros de celulasa, inhibiendo su actividad (Ammayappan & Moses, 2009).

Síntesis de nanopartículas de curcumina (nano curcumina)

Se han identificado varios métodos de extracción de nano curcumina cada uno de ellos tienden a tener sus cualidades de procesamiento que permiten conservar las propiedades químicas y mejorarlas para su posterior aplicación. Dado que la cúrcuma es un componente liposoluble se han basado en el uso de solventes orgánicos como el acetato de etilo, hexano, etanol, metanol, cetona e isopropanol (Hettiarachchi et al., 2021).

Método de coacervación

La síntesis de nano curcumina para este método se realiza mediante una mezcla de un polímero, disolvente orgánico (acetato de etilo, diclorometano, etc.) y la cúrcuma. La suspensión debe ser agitada y mezclada adecuadamente tratando de hallar una solución homogénea, para luego con proceso de centrifugación se recojan las nanopartículas (Rai et al., 2015).

Al no ser necesario de equipamiento muy sofisticado y los disolventes nada peligrosos se considera un método económico y sencillo, pero el inconveniente es que se requiere de un elevado volumen del disolvente y tiene un enfoque algo específico en la obtención de nanopartículas encapsuladas (Rai et al., 2015).

Método de nano precipitación

El método de nano precipitación o también conocido como el método de desplazamiento de un solvente. Es un método que se utiliza para la obtención de diversos tipos de nanopartículas incluyendo la nano curcumina, el principio de esta técnica se basa en suspender un polímero de interés (p.ej., polisorbato 80, Tween 80) en un solvente orgánico como: etanol o cetona, añadiendo la cúrcuma a la solución polimérica, para finalizar mientras la solución es agitada se añade agua al punto de observar la precipitación de las nanopartículas (Rai et al., 2015).

Método de secado por aspersion

Este método es usado para obtener diferentes tipos de nanopartículas solidas a partir de una solución líquida, el cual consiste en la combinación del material de interés en un solvente adecuado y atomizar la solución mientras pasa un flujo de aire caliente, secando rápidamente en condiciones controladas para que se obtengan las nanopartículas (Rios-Aguirre & Gil-Garzón, 2021).

Existe la posibilidad de la formulación de monocristales de curcumina mediante el secado por aspersion (Ravichandran , 2013).

Método de extracción asistida por microondas (MAE)

Este método consiste en el rompimiento celular producto del calentamiento interno producido por las ondas del microondas, de esta manera se liberan los componentes bioactivos. Este efecto facilita la penetración del solvente y solubiliza el componente activo de interés generando un mecanismo de extracción rápido y eficiente, en comparación de

métodos convencionales como Soxhlet y macerado con MAE tienen ciertas ventajas, como: reducción de tiempo, selectividad, entre otras (Mandal et al., 2008).

Para la obtención de nano curcumina se utilizan disolventes orgánicos como; metanol y acetona, el metanol para modificar que la muestra se caliente de forma selectiva y con mayor eficiencia, mientras la acetona se utiliza para extraer la curcumina por su buena solubilización y su buen factor de disipación del calor (Mandal et al., 2008).

Método de extracción Soxhlet (SE)

Este es un equipo convencional de extracción sólido-líquido diseñado para separar componentes bioactivos en muestras de plantas, semillas, alimentos, suelo, etc. Es principalmente usado en la extracción de aceites para análisis de laboratorio (López-Bascón & Luque de Castro, 2020) así también se ha utilizado para la extracción de nanopartículas obteniendo altos porcentajes de rendimiento, pero suele ser un proceso bastante laborioso y costoso.

Según (Ciuca & Racovita, 2023) en el extractor Soxhlet el solvente orgánico (p.ej., etanol) cuando llega al punto de vapor se introduce a la pared celular de la muestra sólida (cúrcuma) extrayendo y desplazando el componente activo de interés hasta el matraz de destilación, hoy en día se le considera un método que induce buenos rendimientos en la extracción de curcumina.

Extracción asistida por enzimas (EAE)

La pared celular es aquella estructura que cumple con diferentes funciones como; la división celular, soporte o barrera protectora de los componentes bioactivos internos y diferenciación celular ya tiene componentes que responden a factores externos mediante estímulos. Es así que existen diferentes grupos de enzimas capaces de interactuar tales como; hemicelulosas, pectinasas, celulosas y proteasas (Łubek-Nguyen et al., 2022).

Según (Kurmudle et al., 2013) para la extracción de componentes de la cúrcuma demuestran que las enzimas α -amilasa y la glucoamilasa presentan un rendimiento en la extracción de curcumina con 26,04% y 31,83%, respectivamente.

Extracción asistida por ultrasonido (UAE)

Esta es una técnica bastante utilizada para la extracción de componentes bioactivos como: polifenoles, polisacáridos, carotenoides y más de muestras vegetales en medio de un solvente adecuado (p. ej., etanol, acetona, agua, etc.). Consiste en emitir ondas ultrasónicas de alta frecuencia convirtiendo en energía mecánica al colisionar con las estructuras vegetales, generando alteraciones y rompimiento de la membrana celular (Kumar et al., 2021).

Frente a técnicas de extracción tradicionales tiene grandes ventajas en cuanto a la cantidad de energía y solvente, menor tiempo y temperatura, dando como resultado mayor rendimiento y eficacia (Kumar et al., 2021).

Métodos para caracterización de nanopartículas

Son aquellas técnicas y procesos que mediante equipos sofisticados permiten determinar la presencia de nanopartículas, así también, se pueden identificar el tipo, tamaño y forma, teniendo en cuenta que existen diferentes tipos de nanopartículas lo cual les confiere características y propiedades químicas, físicas y biológicas distintas a la que tienen en forma a granel.

Espectroscopia UV-visible

Este método se basa en la interacción de luz con la materia en la que se genera procesos como reflexión, absorbancia, fluorescencia e incluso reacciones fotoquímicas, por tanto, cuando se realiza una medición de espectroscopia UV-visible generalmente se mide absorbancia, es decir, se mide la luz que absorben ciertos compuestos químicos generando diferentes espectros característicos para cada muestra de estudio debido a la excitación y desexcitación de las moléculas, el rango de medida de las longitudes de onda que se presentan en el ultravioleta visible, generalmente va de 200 a 800 (Fathima & Mujeeb, 2021).

Debido a las propiedades ópticas únicas y la reducida escala de tamaño en las nanopartículas, el UV-visible es fiable, sencillo y económico para su caracterización esto se

debe a las nanopartículas presentan resonancia plasmónica superficial que se convierte en resonancia óptica, es decir, que los electrones se excitan ante una incidencia de luz y se refleja la absorbancia a determinadas longitudes de onda (Fathima & Mujeeb, 2021).

Espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia de infrarrojo es uno de los métodos recientes de gran uso científicos para el reconocimiento de grupos funcionales, en moléculas orgánicas. El principio de funcionamiento se da por la interacción de la materia “muestra” con la radiación infrarroja emitida por el espectrómetro, lo que se representa en vibraciones de alargamiento o estiramiento, de manera que indica la absorción característica de cada grupo funcional (Mondragón Cortez, 2017), así también, una región de huella digital característica de cada compuesto.

Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS) es una técnica no invasiva, precisa y rápida en la que se puede medir características de partículas en solución de tamaño en un intervalo de 10 a 100 nm. Se basa en el movimiento browniano para medir el tamaño de una partícula, es decir, en el movimiento que generan las partículas al ser iluminadas mediante un láser de manera que las partículas de menor tamaño se moverán más rápido y con mayor facilidad, la velocidad de este movimiento está directamente relacionado con el tamaño (Carnino & Lee, 2022).

Esta técnica no es aplicable a partículas que experimentan movimientos aleatorios como el direccional, cuando experimenta una dirección incierta (Carnino & Lee, 2022).

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Este es un microscopio electrónico de barrido (SEM) que se basa en la utilización de electrones de elevada energía con la que se genera una diversidad de señales en la superficie de una muestra preferentemente sólida. La interacción que se da electrón-muestra, revela información de textura, estructura cristalina y composición química de la muestra (Vladár & Hodoroaba, 2020).

Generalmente los datos técnicos se recopilan sobre un área determinada en la muestra y se genera una imagen bidimensional en la que se presentan las propiedades, estas imágenes varían en áreas de aproximadamente 1 cm a 5 micrones, con ampliaciones que oscilan entre 20x a 30000x, de resolución espacial entre 50 a 100nm (Vladár & Hodoroba, 2020).

Microscopia electrónica de trasmisión (TEM)

La microscopia electrónica de trasmisión (TEM) es aquella técnica utilizada para observar características de especímenes muy pequeños a escala de micro y nanopartículas. Su principio de funcionamiento se basa en la emisión de un haz de electrones a gran velocidad a través de un cañón, de esta manera atraviesan la fina muestra permitiendo observar algunas características como morfología, estructura, cristalización y la tensión que presenta una sustancia (Fields, 2019).

TEM permite observar partículas con mayor resolución en comparación de un microscopio óptico puesto la que longitud de onda que presenta un electrón es menor a la de un fotón, pudiendo visualizar muestras a nivel atómico (Fields, 2019).

Nanopartículas como antioxidante

Con el avance de la nanotecnología se han logrado determinar materiales de origen biológico o inorgánico que en forma de nanopartículas presentan capacidad antioxidante, siendo óptimos para contrarrestar los ROS producidos por la actividad celular, de acuerdo a estudios se han identificado varias nanopartículas con esta propiedad, tales como: Nanopartículas de selenio, curcumina (NC), resveratrol, vitamina C, Vitamina E.

En la cúrcuma se encuentra como principal componente la curcumina, la cual tiene la propiedad antioxidante permitiendo neutralizar, radicales libres, ROS y estrés oxidativo (Vázquez Mazariego, 2023).

Aplicaciones de nanocurcumina

Debido a las múltiples propiedades mejoradas de la nanocurcumina como la solubilidad, biodisponibilidad, absorción, recientemente las investigaciones respaldan los beneficios ante diferentes enfermedades humanas, entre ellos; el cáncer, diabetes, trastornos neurológicos, problemas hepáticos, enfermedades renales, pulmonares, digestivas, cardiovasculares y otras (Karthikeyan et al., 2020).

Las nano formulaciones de nanocurcumina es una solución prometedora para mejorar la aplicación en estudios in vitro e in vivo, en combinación con polímeros, liposomas, conjugados, ciclodextrinas, nanopartículas, dendrímeros, entre otros (Ghalandarlaki et al., 2014). En la crioconservación de células también se han aplicado tales como; crioconservación de esperma de conejo (Abdelnour et al., 2020), bovinos, embriones de pollo (Rodríguez Santillán et al., 2022).

Crioconservación de ovocitos bovinos

Ovocitos bovinos

Son aquellas células que se forman durante el proceso de embriogénesis dentro de los folículos individuales en la parte de la corteza del ovario, estos folículos se activan y tienen un desarrollo progresivo en tiempos regulares, desarrollando fases de primario, secundario y maduro, cada etapa se relaciona con la estructura. Cuando los folículos se activan, los ovocitos tienen a crecer hasta la maduración y posterior la ovulación o en algunos casos sufren atresia (degeneración), se calcula que entre la maduración del folículo y su respectivo ovocito se toman 100 días hasta alcanzar la fase de ovulación (Britt, 2008).

Crioconservación

La actividad de reacciones químicas y biológicas de las células vivas se reduce de manera drástica a bajas temperaturas, lo que da el principio a la crioconservación a largo plazo de células y tejidos (Jang et al., 2017). Esta técnica permite que se puedan conservar las células y también la genética de animales e incluso plantas, con las condiciones

adecuadas y los procesos correctos se pueden mantener durante varios años, células viables.

Técnicas de crioconservación de ovocitos (CO)

Son métodos de laboratorio que permiten conservar los ovocitos a bajas temperaturas, manteniéndolos inalterados y viables para posteriores aplicaciones procesos de reproducción asistida o investigación, así también, han evolucionado para tener mayores tasas de éxito y viabilidad, con modificaciones en la velocidad de congelamiento, adición de crioprotectores y/o antioxidantes.

Congelación lenta. Esta es una técnica convencional usada para la crioconservación de células vivas (ovocitos bovinos), requiere de un equipo programable con el que se controla y regula el tiempo y velocidad de congelación, de forma gradual. Sin embargo, la reducción de temperatura tiende a formar hielo en las zonas intra y extracelular generando daños, lesiones e incluso la apoptosis para las células, además, deshidratación celular es otro de los factores que se han visto en la congelación lenta, de tal manera esta técnica tiene muchas limitaciones en cuanto a su proceso y la viabilidad de las células (Hayashi et al., 2020).

Vitrificación. Esta es una técnica actualizada para la conservación de células, tejidos e incluso órganos que consiste en la conservación a bajas temperaturas sin pasar por congelación, sino únicamente las células entran en una solución crioprotectora y se ponen en contacto directo con el nitrógeno líquido, esto evita la formación de cristales de hielo y los CPA se solidifican permitiendo que las células se congelen y no sufran daños en sus componentes (Köroğlu & Aydın, 2023). Los ovocitos se mantienen en nitrógeno líquido a -196°C.

Nanocurcumina en crioconservación

Algunos antioxidantes por su baja solubilidad, biodisponibilidad, estabilidad y más propiedades, han limitado el uso en la crioconservación, en base a eso se ha dirigido a la nanotecnología para mejorar las propiedades de un agente antioxidante (Asadi et al., 2023). Las nanopartículas de curcumina por su propiedad antioxidante tienen la capacidad de proteger las células del daño generado en la crioconservación, contrarrestando los efectos negativos que pueden provocar los ROS.

Según (Santonastaso et al., 2021) en la crioconservación de semen humano se han observado buenos resultados en la motilidad progresiva y no progresiva, esto debido a que la curcumina protege las células en los procesos de congelación y descongelación.

Capítulo III

Metodología

Ubicación del lugar de investigación

Ubicación geográfica, política y ecológica

El presente trabajo fue desarrollado en algunas instalaciones las cuales se mencionan a continuación: La síntesis de nanopartículas de curcumina (NC) mediante el método de ultrasonido con solventes orgánicos se realizó en el Laboratorio de Ciencias Químicas, perteneciente al departamento de ciencias exactas en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo. Av. Quevedo Km 24, Hacienda Zoila Luz, Parroquia luz de América.

Altitud: 299 metros (981 pies)

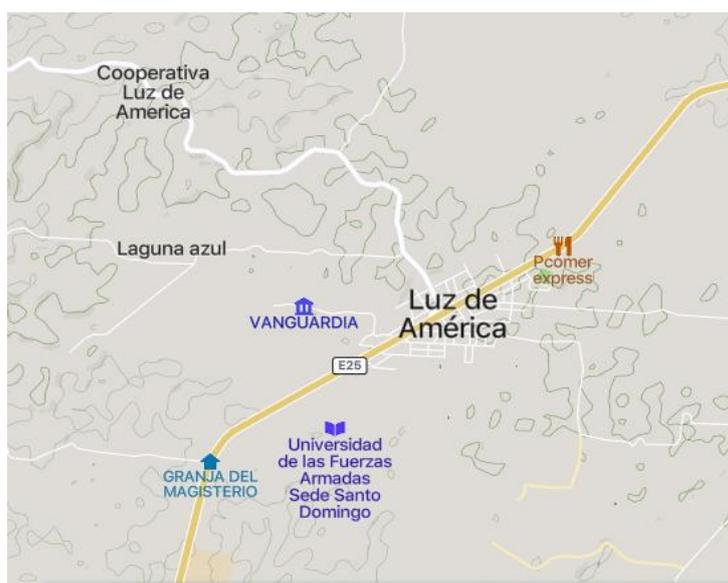
Latitud: -0.40562° 0 0° 24' 20" sur

Longitud: -79,30201° o 79° 18' 7" oeste

Temperatura promedio: 23 a 26 ° C

Figura 3

Ubicación geográfica del laboratorio de Química.



(Google-maps, 2024)

La determinación de capacidad antioxidante de las nanopartículas de curcumina (NC) se llevó a cabo en la Escuela Politécnica Superior de Chimborazo ESPOCH, en el laboratorio de Química Instrumental, ubicado en la panamericana Sur en el Km 1 ½, Matriz en Riobamba-Chimborazo, en las siguientes coordenadas:

Altitud: 2.750 msnm

Latitud: -1,65441° o 1° 39' 16" sur

Longitud: -78,68021° o 78° 40' 49" oeste

Figura 4

Ubicación geografía del laboratorio de Ciencias Químicas



(Google-maps, 2024)

La aplicación y comprobación de las nanopartículas como antioxidante se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción animal, perteneciente al departamento de Ciencias de la vida en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo. Av. Quevedo Km 24, Hacienda Zoila Luz, Parroquia luz de América.

Altitud: 299 metros (981 pies)

Latitud: -0.40562° o 0° 24' 20" sur

Longitud: -79,30201° o 79° 18' 7" oeste

Temperatura promedio: 23 a 26 ° C

Figura 5

Ubicación geográfica del laboratorio de biotecnología de la Reproducción Animal



(Google-maps, 2024)

Materiales y métodos

A continuación, se detallan los equipos, materiales, insumos y reactivos utilizados en cada una de las fases experimentales llevadas a cabo durante este trabajo.

Tabla 1

Material de laboratorio para la síntesis de NC, determinación de DPPH y crioconservación de ovocitos.

Cantidad	Equipos, Materiales y Reactivos
1	UV-Vis: espectrofotómetro de luz visible
1	Ultrasonido de baño maría
1	Ultrasonido de pincel
1	Centrifuga
1	Rotavapor
1	Balanza analítica
1	Estufa
Cantidad	Materiales
10	Vasos de precipitación
10	Tubos de ensayo
2	Erlenmeyer
4	Vidrio reloj
2	Balón de rotavapor
20	Filtros de 0,2 y 0,45 μm
10	Cajas nunc
1	Micropipeta de 1000 μL

Cantidad	Equipos, Materiales y Reactivos
2	Plato de pesaje
1	Cámara de CO ₂
1	Plancha térmica
1	Estereomicroscopio
1	Tanque criogénico
Concentración y porcentajes	Reactivos
96 %	Etanol
0.1 mM	DPPH
1 L	Agua ultrapura
	Invitrogen, NaCl, KCl KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ MgCl ₂ •6H ₂ O CaCl ₂ •2H ₂ O Glucosa Piruvato de sodio BSA Gentamicina TCM 199 1x MEM 10X Suero de ternera SFB LH, FSH, Glicerol, PBS.

Nota. Se presentan todos los equipos, materiales, reactivos e insumos utilizados durante el proceso experimental. **Fuente:** Propia.

1. Síntesis por ultrasonido o sonoquímica de nanocurcumina NC

1.1. Preparación de la muestra

Se tomaron 6 gramos como muestra de polvo de cúrcuma y se disolvieron en 150 mL de etanol con pureza del 96% se revolvió durante 5 min y el frasco fue cubierto con papel aluminio para evitar el ingreso de agentes externos.

1.2. Síntesis y purificación de NC

Se colocó la muestra en ultrasonido de baño maría a 55-57°C, durante 45 min. Una vez terminado la sonicación, se dejaron 20 minutos de reposo de la muestra, procediendo a filtrar la suspensión de la muestra usando una jeringa con filtros de 0.45 y 0.2 µm, respectivamente.

Para la eliminación del solvente se colocó en rotavapor durante 120 min, en condiciones de 100 rpm a 46°C. El pellet del rotavapor se separó mediante centrifugación en una centrífuga marca Hettich a 2000 rpm, para finalizar se hicieron lavados en agua ultrapura mediante centrifugación y se dejó secar en estufa durante 2-5 h a 40°C. Se determinó el rendimiento de curcumina extraída mediante la siguiente fórmula:

$$\%Rendimiento = \frac{\text{Curcumina obtenida}}{\text{Curcumina teórica}} * 100 \text{ (E1)}$$

Curcumina obtenida: Cantidad de curcumina obtenida en el experimento.

Curcumina teórica: Cantidad de curcumina que se espera tener, según teoría y/o cálculos.

Según (El-Saadony et al., 2023) la cúrcuma tiene alrededor de 3-8 % de curcumina.

Figura 6

Síntesis y purificación de nanopartículas curcumina (NC)



Nota. Equipos en los que se extrajo (1) y se purificó (2) la curcumina. **Fuente:** Propia.

2. Caracterización de nanopartículas de curcumina (NC)

2.1. Caracterización por Espectroscopia UV-Vis

La identificación se llevó a cabo en dos fases: luego de la filtración (nanopartículas en solución) y luego de la purificación (nanopartículas en polvo). Luego de haber filtrado la muestra, se analizó una pequeña una muestra en relación 1:9 (nanopartículas en solución: etanol) y también se llevó a cabo luego de la purificación y secado de nanopartículas, se

disolvió 1 μg de NC en 1 ml de etanol. La identificación se realizó en espectrofotómetro UV-Vis (UV-VIS71280 Shimadzu) con un escaneo de longitud de onda entre 200 a 800 nm, en celdas de cuarzo. Utilizando etanol se calibró el análisis de muestras de NC considerando el pico máximo de absorción de UV-Vis en un rango de 400 a 450 nm.

Figura 7

Espectrofotometría UV-Vis



Nota. Equipo que permitió determinar el pico más alto de la absorbancia de la muestra para determinar la presencia de nanocurcumina. **Fuente:** Propia.

2.2. Caracterización por espectrometría de infrarrojo

Con 5 minutos de antelación se encendió el equipo de espectrometría de infrarrojo (IR) de la marca Jasco FT/IR-4100, una vez estabilizado el equipo de colocaron 20 mg de muestra, se dejó durante 5 minutos medir la absorbancia de radiación infrarroja. Para la observación de resultados se realizó mediante el programa Espectra Maganer.

Figura 8

Identificación de la nanocurcumina en espectrofotómetro de IR



Nota. Este equipo permitió identificar los grupos funcionales de la curcumina y la huella dactilar del compuesto. **Fuente:** Propia.

3. Capacidad antioxidante de nanocurcumina NC

3.1. Prueba de DPPH para nanocurcumina (NC)

Para la solubilización de la nanocurcumina se realizó en agua destilada a diferentes concentraciones de 1, 5, 10 y 20 mg/mL, para lo cual se utilizó un ultrasonido de pincel (Sonics Vibra-cell) durante 90 segundos. Para determinar la actividad eliminadora de radicales libres (FRSA) o capacidad antioxidante total (CAT) se preparó una solución de DPPH en etanol a 0.1 mM, probando en concentraciones de NC 15, 20, 30, 40, 50, 100 y 150 $\mu\text{g/mL}$ con relación 1:3 (NC: DPPH), se agitó vigorosamente y se dejó depositar las muestras durante 30 min protegido de la luz a temperatura ambiente. Se calibró el UV-Vis (UV-VIS71280 Shimadzu) con agua ultrapura y se leyeron las absorbancias de las diferentes muestras a 517 nm.

Se determinó la FRSA mediante la siguiente ecuación.

$$\%FRSA = \left[\frac{(Absorbancia_{Control} - Absorbancia_{Muestra})}{Absorbancia_{Control}} \right] * 100 \quad (E2)$$

Se evaluaron para cada muestra el porcentaje de FRSA, para evaluar la concentración inhibitoria del 50 % se calculó el IC_{50} .

4. Maduración y crioconservación de ovocitos bovinos

4.1. Transporte y lavado de ovarios

Se colocaron 800 mL de agua ultrapura con 8,5 g de cloruro de sodio (NaCl) y 80 μ l de streptomicina-penicilina en un balón de aforo, se aforaron a 1000 mL posteriormente se dejó reposar a 4°C. Esta solución se calentó a 37°C para el transporte de los ovarios desde el camal municipal de Santo Domingo hasta el laboratorio de biotecnología animal ESPE SD y el lavado para la eliminación de sangre e impurezas de los ovarios.

4.2. Aspiración folicular y selección de ovocitos

Se preparó una solución de Fosfato Buffer Dulbecco (DPBS) en 100 ml de Agua UltraPure™ sin ADNasa/ARNasa de Invitrogen™, se pesaron 8g de NaCl, 200mg de KCl, 200mg de KH₂PO₄, 1135mg de NaH₂PO₄. A continuación, se añadieron en orden 100 mg de cloruro de magnesio hexahidratado y 132mg de cloruro de calcio dihidratado. Además, se incorporaron 1000mg de glucosa y 36mg de piruvato. Posteriormente, se llevó a cabo el aforo hasta alcanzar los 1000ml. Esta formulación sirvió como base para los subsiguientes procedimientos de aspirado y lavado.

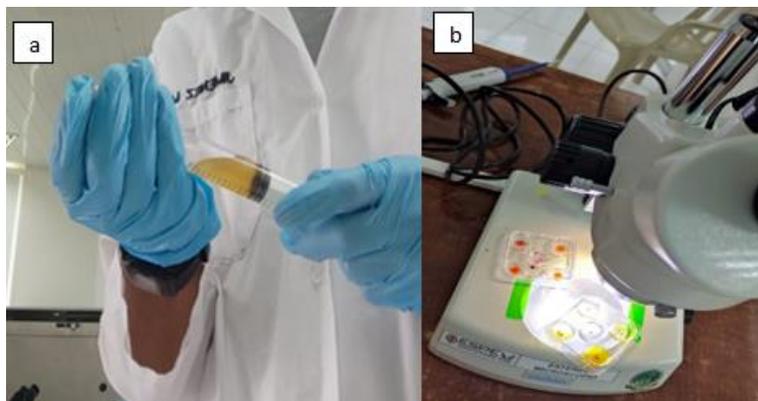
Se tomó una base de 100 ml, a la cual se le enriqueció añadiendo 300mg de BSA (50 mg/ml) de Invitrogen™ UltraPure™. Posteriormente, se incorporaron 100 µl de Gentamicina (50 mg/ml) de Gibco™, y se mantuvo temperada a 37°C.

Se tomaron 3 ml de la solución, en una jeringa con aguja de calibre "18 G". Se perforaron los folículos ováricos de 5-10 mm, aspirando el líquido folicular junto con los ovocitos. Una vez obtenida una cantidad suficiente, se transfirieron a placas Petri con solución DPBS a una temperatura de 37°C.

Bajo la observación en un estereoscopio y el uso de una micropipeta, se identificaron los ovocitos y se transfirieron a placas Petri con solución DPBS para asegurar la limpieza de los ovocitos. Este proceso se llevó a cabo hasta que los ovocitos estuvieron completamente limpios.

Figura 9

Aspiración folicular y estereoscopio de 10X a 40X.



Nota. Aspiración de los ovocitos de folículos entre 5 a 10 mm (a). Selección de ovocitos inmaduros para la maduración a distintas concentraciones de NC. **Fuente:** Propia.

4.3. Maduración de ovocitos

Bajo condiciones higiénicas y estériles, se preparó con 24 horas de antelación la solución de maduración utilizando TCM 199 1x y MEM 10x. Se dispensaron 4 ml de TCM

199-1X y MEM 10X, en tubos falcón individuales, seguido de la adición de 1 ml de Suero Fetal Bovino (SFB). También se incluyeron 10 µl de Gentamicina (50 mg/ml) de Gibco™, 10 µl de piruvato 0.2 mM, 10 µl de LHRH Human (Hormona Leutinizante Humana de ProSpec), 10 µl de FSH (Hormona Folículo Estimulante) y 10 µl de epidermal. Posteriormente, la solución fue dejada en reposo en refrigeración.

Una vez seleccionados los ovocitos, la solución TCM 199 1x y MEM 10x se ajustaron a una temperatura de 37°C, en tubos Eppendorf se prepararon muestras ajustando el antioxidante con concentraciones de 5, 10, 20, 40 µM. En las cajas de cultivo específicas para ovocitos, se dispusieron microgotas de 50µL en cada pocillo TCM 199 1x y MEM 10x con antioxidante, colocando posteriormente los ovocitos. Los pocillos fueron cubiertos con aceite mineral y, finalmente, las placas fueron ubicadas en una incubadora con un ambiente de CO₂ al 5% y un 97% de humedad relativa, manteniendo esta configuración durante un periodo de 24 horas.

4.4. Congelación de ovocitos

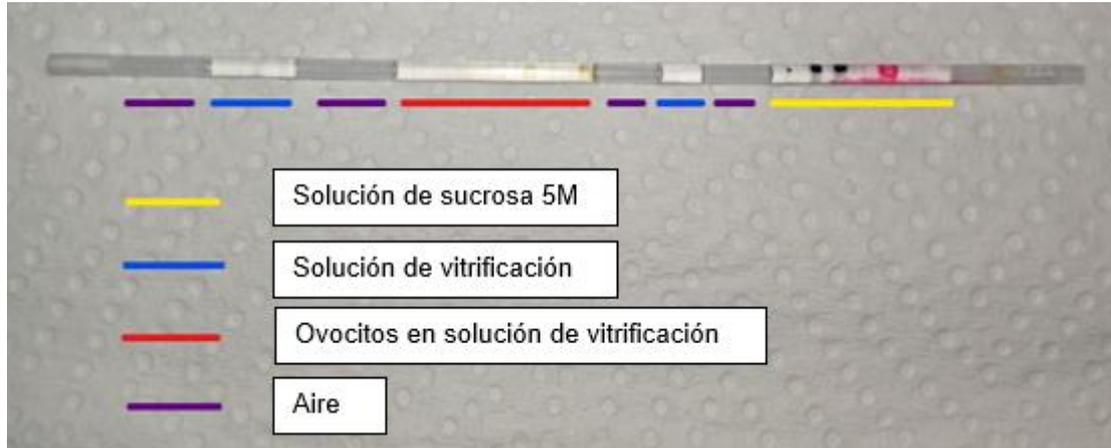
Se preparó una solución de 5ml para proceso de vitrificación basado en el protocolo de (Guerra et al., 2012) con 6.5M de glicerol, 6 % de suero fetal bovino en Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS).

Una vez transcurrido las 24 horas de maduración de los ovocitos se seleccionaron de acuerdo a su grado de maduración, y se trasladaron al medio de vitrificación durante 2-10 minutos aproximadamente.

El envasado de los ovocitos se realizó en pajuelas de 0.25 ml, de la siguiente forma, se tomó una solución de sucrosa de 5 M, aire, solución de vitrificación, aire, los ovocitos en solución de vitrificación, aire, solución de vitrificación, aire y finalmente el sellado de la pajuela se realizó con alcohol polivinílico.

Figura 10

Pajuelas para crioconservación de ovocitos bovinos



Nota. Se muestra la configuración de envasado de los ovocitos en la pajuela de 0.25 ml.

Fuente: Propia.

Una vez envasados los ovocitos se introdujeron las pajuelas directo a nitrógeno líquido N_2 aproximadamente a -196°C , para darse el proceso de vitrificación de los ovocitos.

4.5. Evaluación de viabilidad en post-descongelación

Una vez transcurrido 24 horas del congelamiento se procedió a la descongelación de algunas pajuelas en baño maría a 37°C , los ovocitos fueron transferidos a una solución de sucrosa a 0.3 M, previamente temperada a 37°C . Posteriormente, se evaluaron los ovocitos bajo un estereomicroscopio para determinar la integridad de la célula del cúmulo ooforus y si había la presencia de daños en el núcleo.

Análisis experimental

Para la evaluación de la actuación de nanopartículas de curcumina como antioxidante en la maduración y crioconservación de ovocitos bovinos, se ejecutó mediante un diseño multifactorial de AxB, tomando como Facto A los medios de maduración y como Factor B un Control y diferentes concentraciones de antioxidante "NC".

Planteamiento de Hipótesis

H0: Las nanopartículas no influyen en el desarrollo de células del cúmulo ooforus en ovocitos bovinos.

HA: Las nanopartículas influyen en el desarrollo de células del cúmulo ooforus en ovocitos bovinos.

H0: El medio de maduración no influye en el desarrollo de células del cúmulo ooforus en ovocitos bovinos.

HA: El medio de maduración influye en el desarrollo de células del cúmulo ooforus en ovocitos bovinos.

Tabla 2

Factores y niveles de experimentación.

Factores	Simbología	Niveles
Medio de maduración	a0	TCM 199 1x
	a1	MEM 10x
Nanopartículas de curcumina "NC"	b0	Control
	b1	5 µM
	b2	10 µM
	b3	20 µM
	b4	40 µM

Nota. Se muestran los factores, simbología y los niveles de estudio utilizados en este

experimento. **Fuente:** Propia.

Tabla 3

Tratamientos a analizar en la prueba experimental

N° de tratamiento	Interacciones	Unidades experimentales
T1	a0b0	TCM 199 1x + Control
T2	a0b1	TCM 199 1x + 5 µM
T3	a0b2	TCM 199 1x + 10 µM
T4	a0b3	TCM 199 1x + 20 µM
T5	a0b4	TCM 199 1x + 40 µM
T6	a1b0	MEM 10x + Control
T7	a1b1	MEM 10x + 5 µM
T8	a1b2	MEM 10x + 10 µM
T9	a1b3	MEM 10x + 20 µM
T10	a1b4	MEM 10x + 40 µM

Nota. Se muestran los tratamientos e interacciones de los medios de maduración vs las

concentraciones de antioxidante. **Fuente:** Propia.

Réplicas

El experimento se realizó por triplicado para cada tratamiento, teniendo como total 30 unidades experimentales

Análisis funcional

Para evaluar los resultados con diferencia significativa de las variables analizadas en el estudio se realizó una prueba post-hoc, Tukey ($p < 0,05$).

Capítulo IV

Resultados y discusión

1. Síntesis por ultrasonido o sonoquímica de nanocurcumina NC

Tabla 4

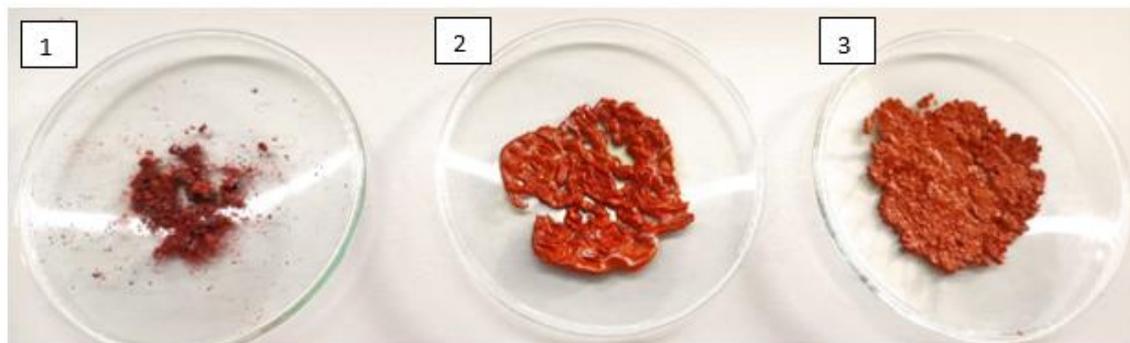
Cantidad de nanopartículas de curcumina y su porcentaje de rendimiento

Réplicas	Cantidad obtenida (mg)	% de rendimiento
1	81.7	27.2
2	206.6	68.87
3	276.4	92.13

Nota. Se revela un paulatino aumento del rendimiento de nanocurcumina de acuerdo a cada réplica. **Fuente:** Propia.

Figura 11

Nanopartículas de curcumina purificadas



Nota. Nanocurcumina purificada en diferentes estadios de deshidratado final. **Fuente:** Propia

De los 6 gramos de muestra de cúrcuma, se ha obtenido la cantidad de curcumina pura según se detalla en la Tabla 4, revelando aumento en el rendimiento por cada réplica. Según (El-Saadony et al., 2023) el contenido de curcumina pura por cada gramo de cúrcuma en polvo oscila entre el 2% y el 8%.

En base a los resultados obtenidos en cada réplica y el cálculo teórico como muestra la (E1), se ha determinado que la cúrcuma de este estudio contiene un 5% de curcumina. De esta manera, el rendimiento más alto alcanza el 92,13%, equivalente a 276,4 mg de

curcumina por la muestra inicial. Destaca la tercera réplica, donde se logró estandarizar el protocolo de manera correcta, evidenciando un rendimiento satisfactorio.

Según el estudio de Shirsath et al. (2017), se observa un rendimiento del 72%. Es importante destacar que existen variaciones en las condiciones experimentales, como la temperatura, el tiempo de sonicación y otras condiciones. Notablemente, el rendimiento obtenido en esta experimentación es significativamente superior. Esto podría atribuirse a la agitación de la muestra, ya que la cúrcuma tiende a precipitarse fácilmente, lo que de alguna manera impide que alcance las ondas electromagnéticas del ultrasonido.

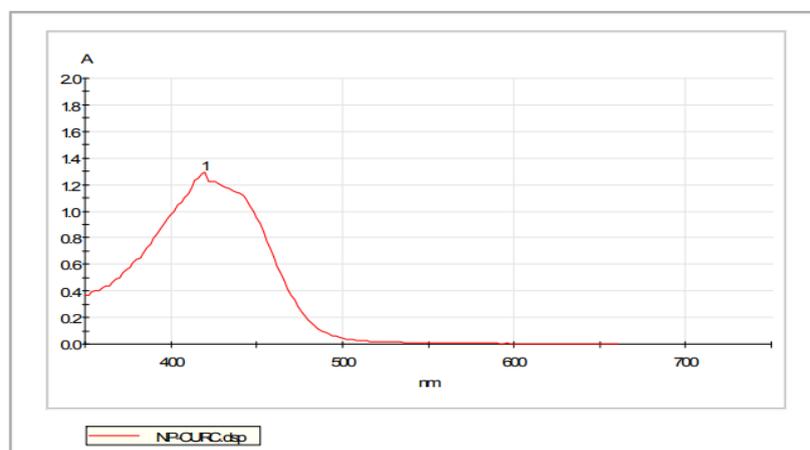
En este sentido, la agitación suspende el soluto, permitiendo que las ondas ultrasónicas actúen de manera más eficiente. Es plausible inferir que este proceso de agitación contribuye a maximizar la interacción de la cúrcuma con las ondas ultrasónicas, resultando en un rendimiento mejorado en comparación con las condiciones donde la precipitación podría afectar negativamente la eficacia del ultrasonido.

2. Identificación de las nanopartículas de curcumina

Identificación de NC mediante espectrometría de UV-Vis

Figura 12

Pico de absorbancia de nanopartículas de curcumina

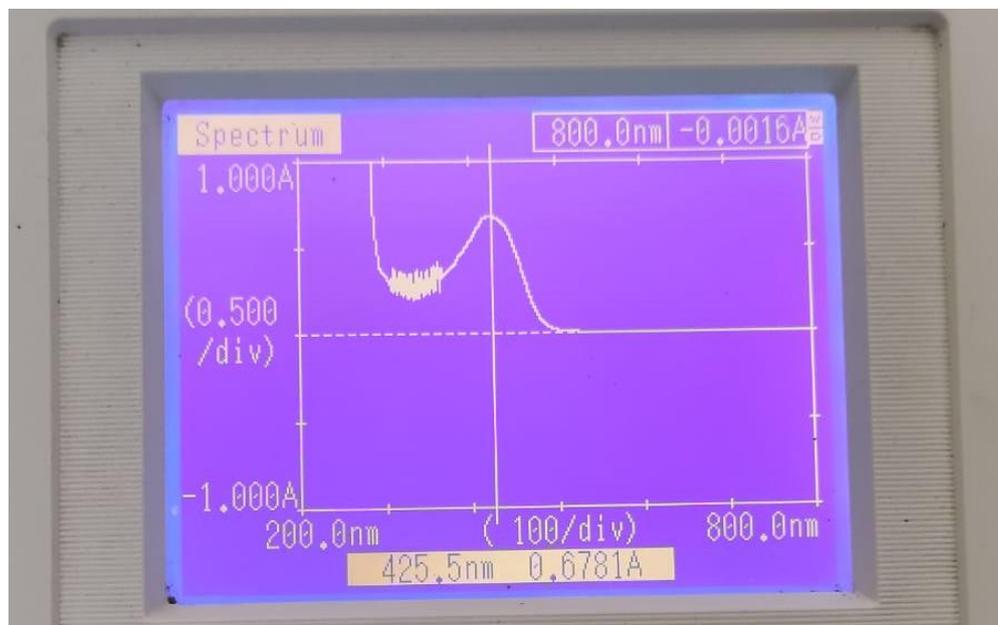


NP-CURC.dsp
 Picos Umbral: 0,01 A
 1 420 nm; 1,296 A

Nota: Espectro Uv-Vis de nanopartículas de curcumina sintetizadas por el método de ultrasonido. **Fuente.** Propia.

Figura 13

Mayor valor de absorbancia en nanopartículas de curcumina



Nota: Espectro Uv-Vis de nanopartículas de curcumina sintetizadas por el método de ultrasonido. **Fuente.** Propia.

Esta técnica permitió establecer la obtención de las nanopartículas de curcumina, basándose en múltiples pruebas con rango de absorbancia de 200 a 800 nm, se estimó la presencia de nanocurcumina oscila entre los 420 nm (fig.12), hasta los 425.5 nm (fig. 13). De acuerdo con (Pandit et al., 2015) estimó que las nanopartículas de curcumina tienen un pico de absorbancia de 419 nm, determinando que es un pico de absorbancia relativamente característico de este nanomaterial.

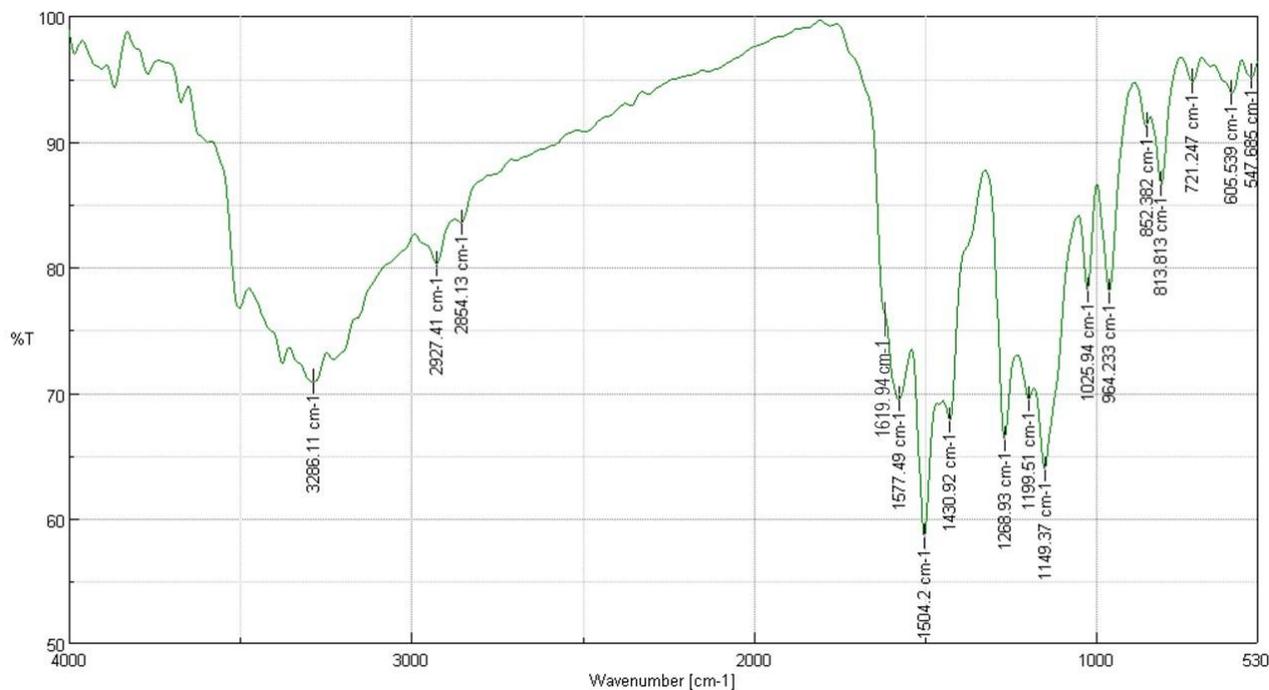
Chin et al. (2014) determinaron en su estudio que el pico más alto de absorbancia de nanocurcumina en Uv-Vis tiene alrededor de 422 nm, por otra parte, en el estudio de (Kumar et al., 2021) se demostró que el pico de absorbancia más alto corresponde a 435 nm.

En base a los estudios analizados se demuestra que el rango de absorbancia con los picos mas altos, leídos en Uv-Vis, se trata de nanopartículas de curcumina. Estableciendo que la muestra analizada en equipos diferentes se atribuye a que se dio un proceso eficiente y estabilidad, puesto que a diferentes lecturas el rango de absorbancia de la presencia de NC es evidente.

Caracterización por espectrofometría de infrarrojo

Figura 14

Caracterización de nanocurcumina en espectroscopia de infrarrojo



Nota. Caracterización de nanocurcumina mediante IR. **Fuente.** Propia.

En el análisis de infrarrojo para nanopartículas de curcumina se determinaron vibraciones de los siguientes grupos funcionales: (O-H) una vibración de 3266.11 cm⁻¹, enlaces (C=O) una vibración en 1619.94 cm⁻¹, para enlace (C-H) se muestra una vibración en 1149.37 cm⁻¹.

De acuerdo al estudio de (Srivatsan et al., 2015) las vibraciones en los grupos funcionales de la nanocurcumina con respecto a la cúrcuma tienen a ser más leves. Esto puede estar definido por el método de síntesis, puesto que al reducir el tamaño las propiedades físico-químicas tienen a influir, alterando la estructura molecular o la dispersión de las moléculas.

En el caso de los enlaces (C=O) se observa la vibración poco insinuada, al influir el tamaño de la partícula en sus propiedades físico-químicas (Gatoo et al., 2014) se prevé que pudo influir contraponiendo el grupo funcional (C=C) que se estima está en un rango de transmitancia alrededor de 1550-1650 cm⁻¹.

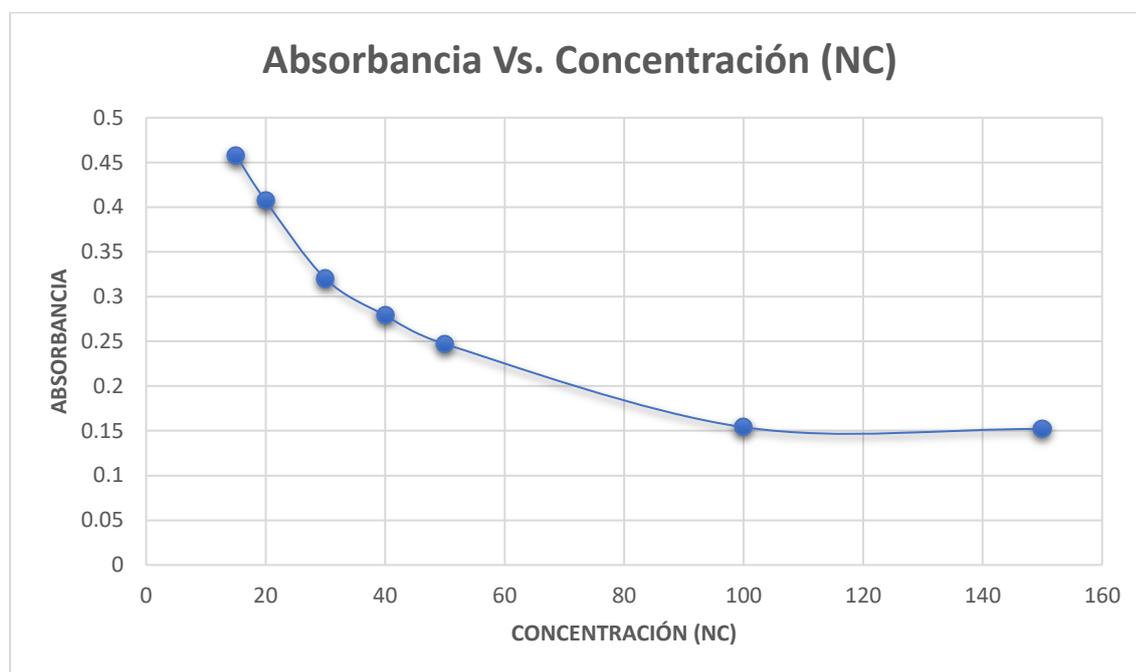
3. Capacidad antioxidante de nanocurcumina

Prueba de DPPH

Mediante la prueba DPPH y las diferentes concentraciones de muestra de NC utilizadas se determinaron los siguientes picos de absorbancia leídos a 417 nm.

Figura 15

Lectura del porcentaje de actividad eliminadora de radicales libres (FRSA)

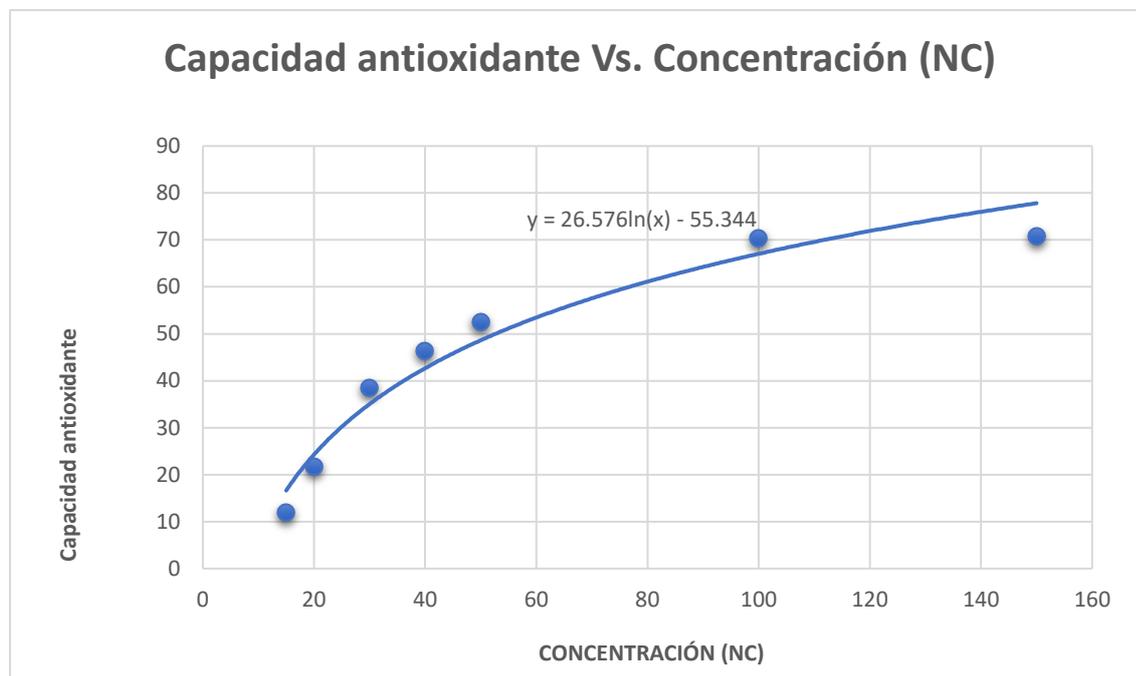


NC [µg/ml]	Absorbancia (nm)	%FRSA	IC 50 (µg)
15	0.458	11.9231	
20	0.407	21.7308	
30	0.32	38.4615	
40	0.279	46.3462	
50	0.247	52.5000	52.6611
100	0.154	70.3846	
150	0.152	70.7692	

Nota. En esta figura compuesta, se muestran las absorbancias obtenidas a una lectura de 517nm, así también el porcentaje de FRSA obtenido en cada concentración de NC utilizada y el valor obtenido de IC 50. **Fuente:** Propia.

Figura 16

Capacidad antioxidante de nanocurcumina frente a su concentración



Nota. Se evidencia el aumento gradual en el porcentaje de capacidad antioxidante, con el aumento de concentración de "NC". **Fuente:** Propia.

Se empleó la prueba de DPPH para determinar el potencial antioxidante de la nanocurcumina, evidenciando su eficacia en la eliminación de radicales libres. Se observó una reducción gradual en la absorbancia de la muestra con nanocurcumina en dosis de 15 a 150 $\mu\text{g/ml}$, lo que sugiere su capacidad para interactuar con los radicales libres del DPPH (fig.15). En otras palabras, la nanocurcumina actuó como donante de electrones, reduciendo la carga de radicales libres y, por ende, disminuyendo la absorbancia.

La capacidad de reducir los radicales libres o aumento en la capacidad antioxidante se debe al aumento de la concentración de nanopartículas hasta llegar al límite de saturación en la (fig. 15) se observa que al aumentar la concentración de nanocurcumina en solución la capacidad antioxidante es mayor viéndose que a concentraciones de 100 y 150 $\mu\text{g/ml}$ se muestra una mayor capacidad antioxidante frente a 15 $\mu\text{g/ml}$. También se ha determinado el IC 50 revelando una concentración adecuada de 52.6611 $\mu\text{g/ml}$ indicando el

volumen necesario de antioxidante para reducir los radicales libres del DPPH en su 50% (fig. 16).

En el estudio de (Kanwal et al., 2023) determinaron la capacidad de eliminación de radicales libres de la curcumina en distintas concentraciones de 15 hasta 75 $\mu\text{g/ml}$, esta curcumina fue obtenida mediante diferentes mecanismos, de tal manera mediante el método de ultrasonido demuestran un potencial de $(47,33 \pm 1,38\%)$ en la concentración más alta de 75 $\mu\text{g/ml}$.

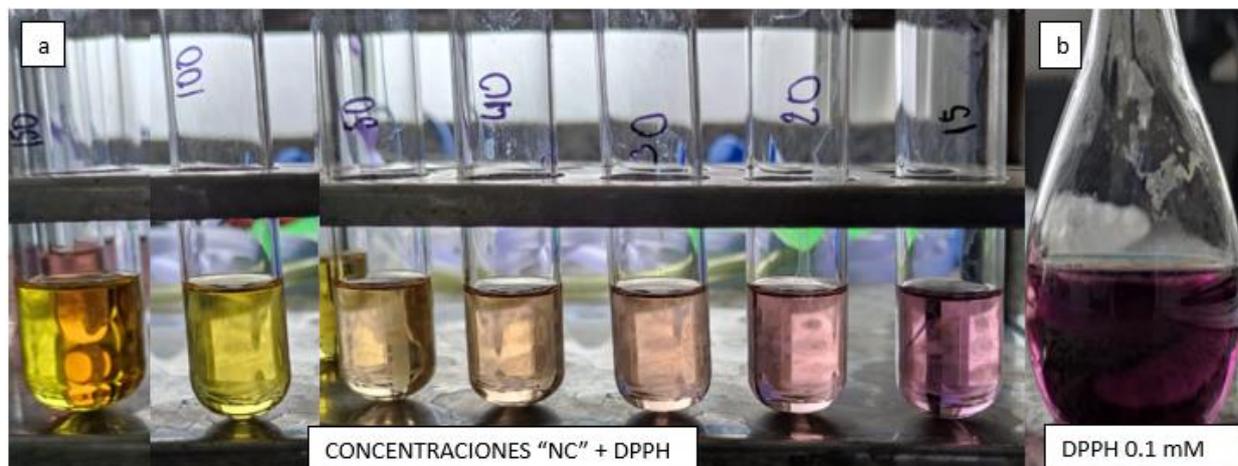
El DPPH es un radical libre de nitrógeno cuya solución de color púrpura oscuro se vuelve amarilla cuando interactúa con antioxidantes, en este estudio se determinó que a mayor concentración de nanocurcumina la solución DPPH se torna transparente y luego de color amarillo (fig. 16) en las muestras de 100 y 150 $\mu\text{g/ml}$ se estima una absorbancia similar, esto se debe a fenómenos como saturación de los sitios de unión y/o interferencia de la nanocurcumina.

Los componentes bioactivos de la nanocurcumina interactúan con los radicales libres del DPPH, de tal manera al aumentar la concentración de la muestra, llega a un punto en el que los radicales del DPPH han sido completamente controlados y queda muestra de antioxidante, de tal manera que al leer la absorbancia hay nanopartículas presentes y la lectura muestra un resultado erróneo (Torrenegra, 2014).

Otro de los aspectos que se atribuye al tener una elevada concentración de muestra antioxidante en solución con DPPH, es la interferencia en la lectura por la formación de agregados de nanocurcumina (López, 2020), es decir, una vez que los radicales libres del DPPH hayan sido neutralizados en su totalidad en solución aún queda muestra de nanocurcumina y se forman agregados los cuales son leídos por los rayos electromagnéticos del Uv-Vis, dando un aumento en la lectura de la absorbancia.

Figura 17

Reacción de DPPH en diferentes concentraciones de nanocurcumina



Nota. Se observa cambio en la coloración de la solución DPPH con el aumento gradual en la concentración de nanocurcumina (a), solución de DPPH 0.1mM (b). **Fuente:** Propia.

4. Maduración y crioconservación de ovocitos bovinos

Maduración de ovocitos bovinos *in vitro*

Para el análisis experimental se tomó en cuenta el número de ovarios y ovocitos obtenidos para realizar cada uno de los parámetros requeridos por el diseño experimental véase (tabla 6) y (tabla 7).

Se utilizaron 250 ovarios de vacas de matadero de los cuales se obtuvieron 257 ovocitos viables inmaduros. Se registró una maduración del 52,92 % para ovocitos de Grado I y II, mientras un 47,08% de ovocitos de Grado III. La recuperación de ovocitos por ovario es de un promedio de 1.028.

La categorización se realizó definiendo en tres grados de maduración:

Grado I. Son ovocitos que tienen buen desarrollo de complejo cúmulo-ovocito, es decir, al menos están rodeados de al menos cinco capas de células del cúmulo, con características de citoplasma transparente, brillante y de forma homogénea (Cavusoglu et al., 2023).

Grado II. Son ovocitos que sus células del cumulus oophurus poseen 3 o menos capas, el citoplasma presenta homogeneidad, pero existen partes oscuras (Abdel-Halim & Helmy, 2017).

Grado III. Son ovocitos que poseen un cumulus oophurus básicamente denudado, es decir, casi no hay presencia de células y su citoplasma es de forma irregular y algo vacuolado (Abdel-Halim & Helmy, 2017).

Tabla 5

Ovocitos experimentados en medio TCM 199 1x

Medio de maduración + Antioxidante	N° Réplicas	N° Ovarios	N° Ovocitos seleccionados	R1			R2			R3		
				I	II	III	I	II	III	I	II	III
TCM 199 1x + Control	1	35	31	2	2	2	3	3	3	3	2	3
TCM 199 1x + 5 µM	2	40	48	4	2	1	6	3	1	6	3	2
TCM 199 1x + 10 µM	3	50	47	3	3	1	5	3	2	5	2	2
TCM 199 1x + 20 µM				1	1	4	2	2	5	0	2	6
TCM 199 1x + 40 µM				0	1	4	0	1	9	0	1	10
Sub Total				10	9	12	16	12	20	14	10	23
Total		125	126	31			48			47		

Nota. En esta tabla se registra la cantidad de ovocitos utilizados en cada réplica, y la cantidad de ovocitos maduros en sus distintas categorías con la aplicación de múltiples concentraciones de NC en medio de maduración TCM 199 1x. **Fuente:** Propia.

Tabla 6

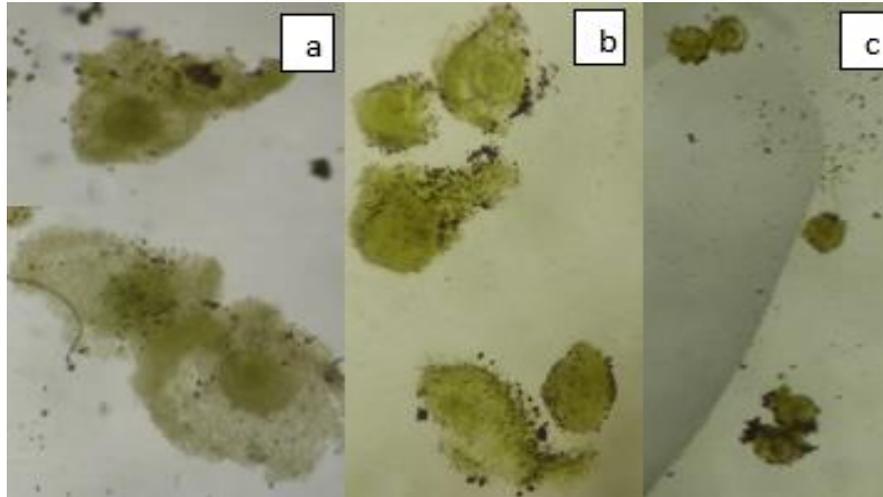
Ovocitos experimentados en medio de maduración MEM 10x

Medio de maduración + Antioxidante	N° Repeticiones	N° Ovarios	N° Ovocitos seleccionados	R1			R2			R3		
				I	II	III	I	II	III	I	II	III
MEM 10x + Control	1	35	35	2	3	2	2	3	4	3	2	4
MEM 10x + 5 µM	2	40	48	4	3	1	5	4	1	6	3	1
MEM 10x + 10 µM	3	50	48	3	2	2	4	4	2	4	4	2
MEM 10x + 20 µM				0	1	6	0	1	8	1	0	8
MEM 10x + 40 µM				0	1	5	0	0	10	0	0	10
Sub Total				9	10	16	11	12	25	14	9	25
Total		125	131	35			48			48		

Nota. En esta tabla se registra la cantidad de ovocitos utilizados en cada réplica, y la cantidad de ovocitos maduros en sus distintas categorías con la aplicación de variadas concentraciones de NC en medio de maduración MEM 10x. **Fuente:** Propia.

Figura 18

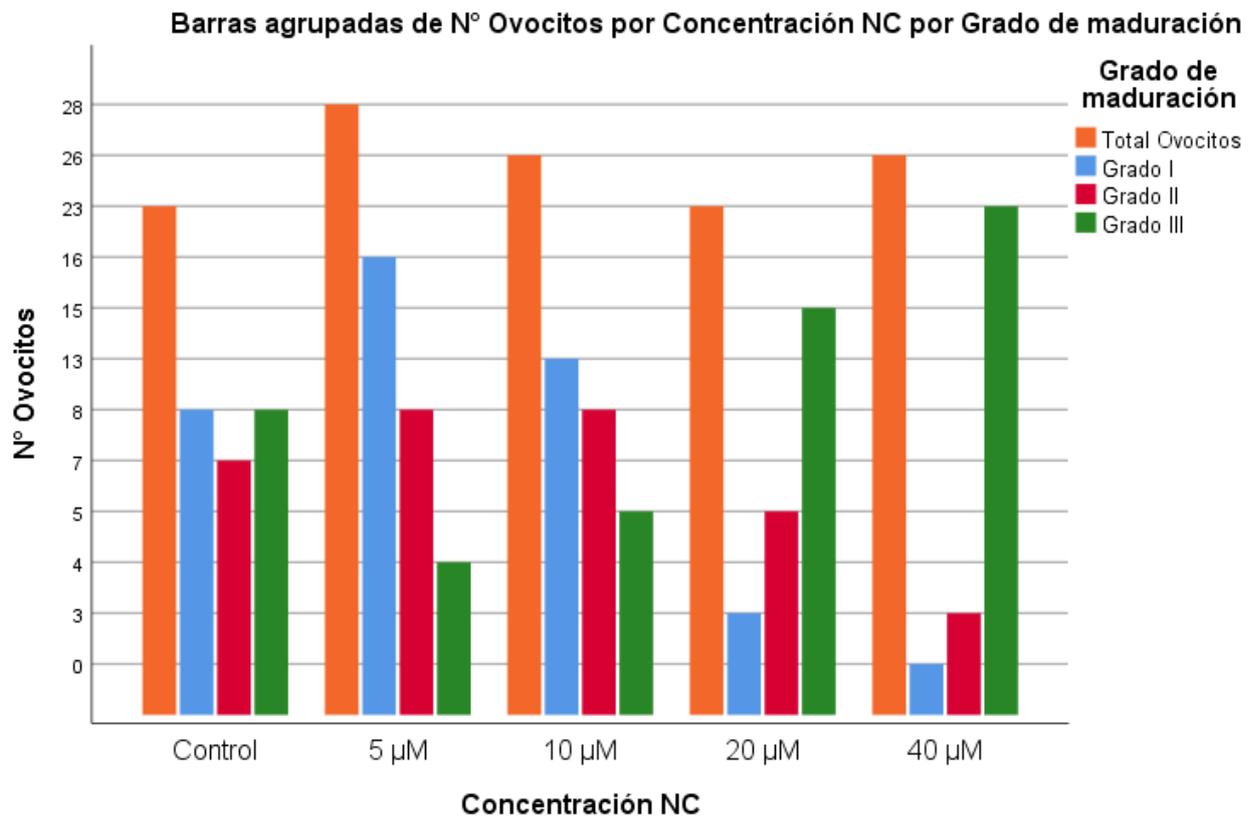
Clasificación de ovocitos maduros



Nota. Ovocitos con buen desarrollo de células cumulus oophorus “grado I” (a), se observan ovocitos con un regular crecimiento de cumulus oophorus “grado II” (b) y, ovocitos con baja cantidad de cumulus oophorus o desnudos “grado III” (c). **Fuente:** Propia.

Figura 19

Cantidad de ovocitos en el estudio con medio de maduración TCM 199 1x



Nota. Se muestra la cantidad de ovocitos totales en cada grado de maduración en base a las concentraciones de NC utilizadas. **Fuente:** Propia.

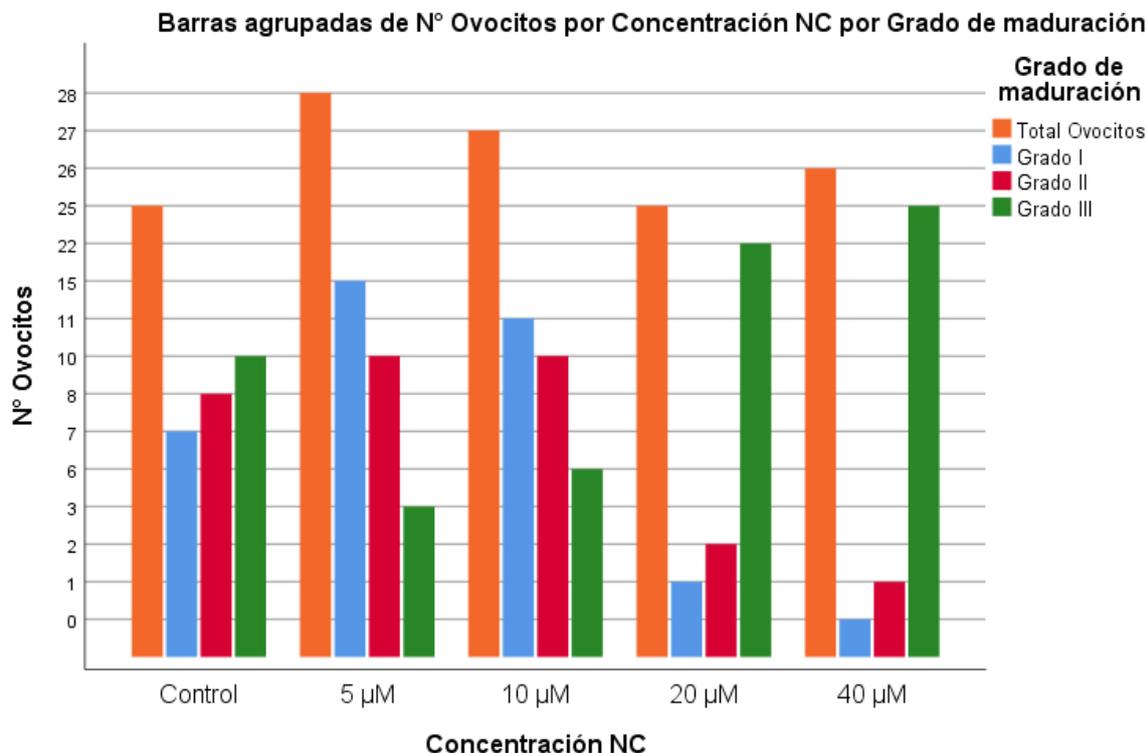
En la Figura 19 muestra la cantidad total de ovocitos estudiados y madurados en sus diferentes categorías en las réplicas indicadas en la Tabla 6. Para el grupo control se han estudiado en total 23 ovocitos viables, de los cuales se presentaron 8 en grado de maduración I (34.7826 %), 7 en grado de maduración II (30.4348%) y 8 en grado de maduración III (34.7826%). En el grupo de estudio aplicando 5 μ M se han estudiado en total 28 ovocitos viables, de los cuales se presentaron 16 en grado de maduración I (57.1429%), 8 en grado de maduración II (28.5714%) y 4 en grado de maduración III (14.2857%).

En el grupo de estudio aplicando 10 μ M se han estudiado en total 26 ovocitos viables, de los cuales se presentaron 13 en grado de maduración I (50%), 8 en grado de maduración II (30.7692%) y 4 en grado de maduración III (15.3846%). En el grupo de estudio aplicando 20 μ M se han estudiado en total 23 ovocitos viables, de los cuales se presentaron 3 en grado de maduración I (13.0435%), 5 en grado de maduración II (25.7391%) y 15 en grado de maduración III (65.2174%).

En el grupo de estudio aplicando 40 μ M se han estudiado en total 26 ovocitos viables, de los cuales se presentaron 0 en grado de maduración I (0%), 3 en grado de maduración II (11.5385%) y 23 en grado de maduración III (88.4615%).

Figura 20

Cantidad de ovocitos en el estudio con medio de maduración MEM 10x



Nota. Se muestra la cantidad de ovocitos totales en cada grado de maduración en base a las concentraciones de NC utilizadas. **Fuente:** Propia.

Se muestra la cantidad total de ovocitos estudiados y madurados en sus diferentes categorías (fig. 20) en las réplicas indicadas en la Tabla 7. Para el grupo control se han estudiado en total 25 ovocitos viables, de los cuales se presentaron 7 en grado de maduración I (28%), 8 en grado de maduración II (32%) y 10 en grado de maduración III (40%).

En el grupo de estudio aplicando 5 µM se han estudiado en total 28 ovocitos viables, de los cuales se presentaron 15 en grado de maduración I (53.5714%), 10 en grado de maduración II (35.7143%) y 3 en grado de maduración III (10.7143%).

En el grupo de estudio aplicando 10 µM se han estudiado en total 27 ovocitos viables, de los cuales se presentaron 11 en grado de maduración I (40.7407%), 10 en grado de maduración II (37.0370%) y 6 en grado de maduración III (22.2222%). En el grupo de estudio aplicando 20 µM se han estudiado en total 25 ovocitos viables, de los cuales se

presentaron 1 en grado de maduración I (4%), 2 en grado de maduración II (8%) y 22 en grado de maduración III (88%).

En el grupo de estudio aplicando 40 μ M se han estudiado en total 26 ovocitos viables, de los cuales se presentaron 0 en grado de maduración I (0%), 1 en grado de maduración II (3.8462%) y 25 en grado de maduración III (96.1538%).

Tabla 7

Análisis de varianza para ovocitos en grado de maduración I

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Medio de maduración	1.2	1	1.2	2.00	0.1727
B: Concentración de NC	113.8	4	28.45	47.42	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.466667	4	0.116667	0.19	0.9384
RESIDUOS	12.0	20	0.6		
TOTAL (CORREGIDO)	127.467	29			

Nota. En esta tabla se muestran los resultados del ANOVA para los ovocitos maduros en

Grado I, encontrando diferencia significativa en las concentraciones de NC aplicadas. **Fuente:**

Propia.

En el análisis de varianza para la maduración de ovocitos bovinos en dos medios de maduración con diferentes concentraciones de nanopartículas de curcumina, se muestra diferencia significativa ($p > 0,05$) en el factor B “Concentración de NC” por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa (Tabla 7), mientras en el Factor A “Medio de maduración” y la interacción de los factores A*B no existe diferencia significativa.

Tabla 8*Análisis de varianza para ovocitos en grado de maduración II*

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Medio de maduración	0	1	0	0.00	1.0000
B: Concentración de NC	28.2	4	7.05	17.63	0.0000
INTERACCIONES					
AB	3.66667	4	0.916667	2.29	0.0952
RESIDUOS	8.0	20	0.4		
TOTAL (CORREGIDO)	39.8667	29			

Nota. En esta tabla se muestran los resultados del ANOVA para los ovocitos maduros en Grado II, encontrando diferencia significativa en las concentraciones de NC aplicadas. **Fuente:** Propia.

En el análisis de varianza para la maduración de ovocitos bovinos en dos medios de maduración con diferentes concentraciones de nanopartículas de curcumina, se muestra diferencia significativa ($p > 0,05$) en el factor B “Concentración de NC” por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa (Tabla 8), mientras en el Factor A “Medio de maduración” y la interacción de los factores A*B no hay diferencia significativa.

Tabla 9*Análisis de varianza para ovocitos en grado de maduración III*

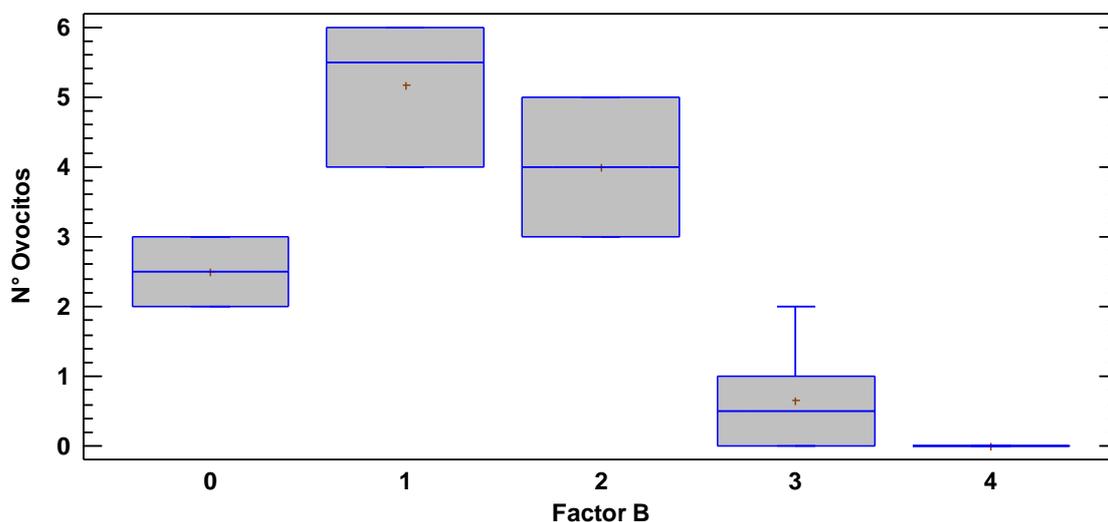
Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Medio de maduración	4.03333	1	4.03333	1.73	0.2035
B: Concentración de NC	206.467	4	51.6167	22.12	0.0000
INTERACCIONES					
AB	5.8	4	1.45	0.62	0.6525
RESIDUOS	46.6667	20	2.33333		
TOTAL (CORREGIDO)	262.967	29			

Nota. En esta tabla se muestran los resultados del ANOVA para los ovocitos maduros en Grado III, encontrando diferencia significativa en las concentraciones de NC aplicadas. **Fuente:** Propia.

En el análisis de varianza para la maduración de ovocitos bovinos en dos medios de maduración con diferentes concentraciones de nanopartículas de curcumina, se muestra diferencia significativa ($p > 0,05$) en el factor B “Concentración de NC” por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa (Tabla 9), mientras en el Factor A “Medio de maduración” y la interacción de los factores A*B no hay diferencia significativa.

Figura 21

Diagrama compuesto por análisis en cajas de bigotes y asociación de grupos homogéneos en ovocitos de Grado I



Factor B	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
4	6	0	0.200693	A
3	6	0.666667	0.200693	A
0	6	2.5	0.200693	B
2	6	4.0	0.200693	C
1	6	5.16667	0.200693	C

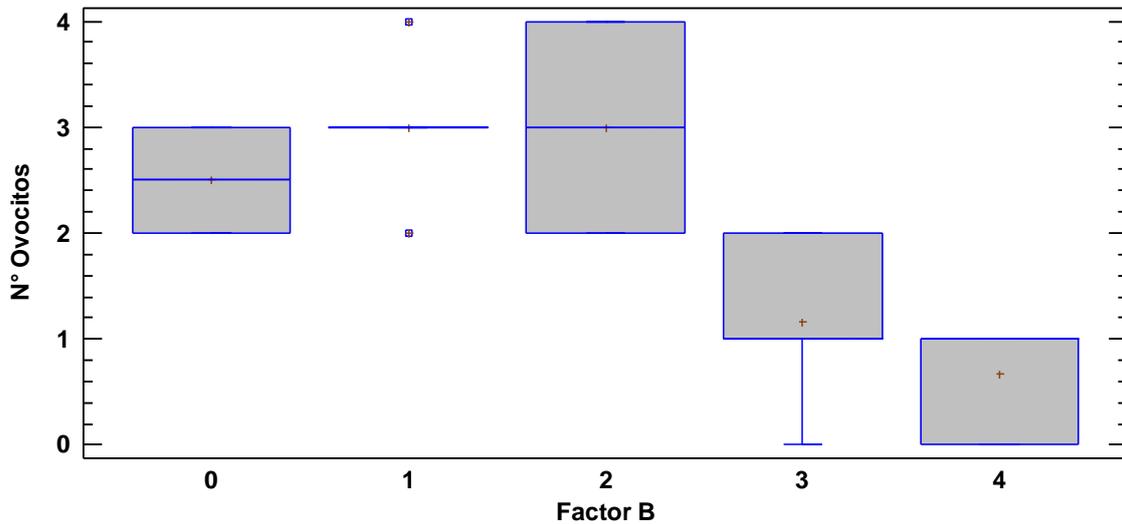
Nota. En esta tabla se muestra el aumento gradual de la cantidad de ovocitos maduros en grado I. **Fuente:** Propia.

En la Figura 21 se muestra la diferencia significativa encontrada en las concentraciones de NC y se establecieron tres grupos, de los cuales en el grupo A se encuentran los de menor media y el grupo C de mayor media, estableciendo que para la concentración de (b4=40

μM) existe 0 ovocitos maduros de Grado I, mientras para ($b_1=5 \mu\text{M}$) se estima 5.16667 ovocitos.

Figura 22

Diagrama compuesto por análisis en cajas de bigotes y asociación de grupos homogéneos en ovocitos de Grado II



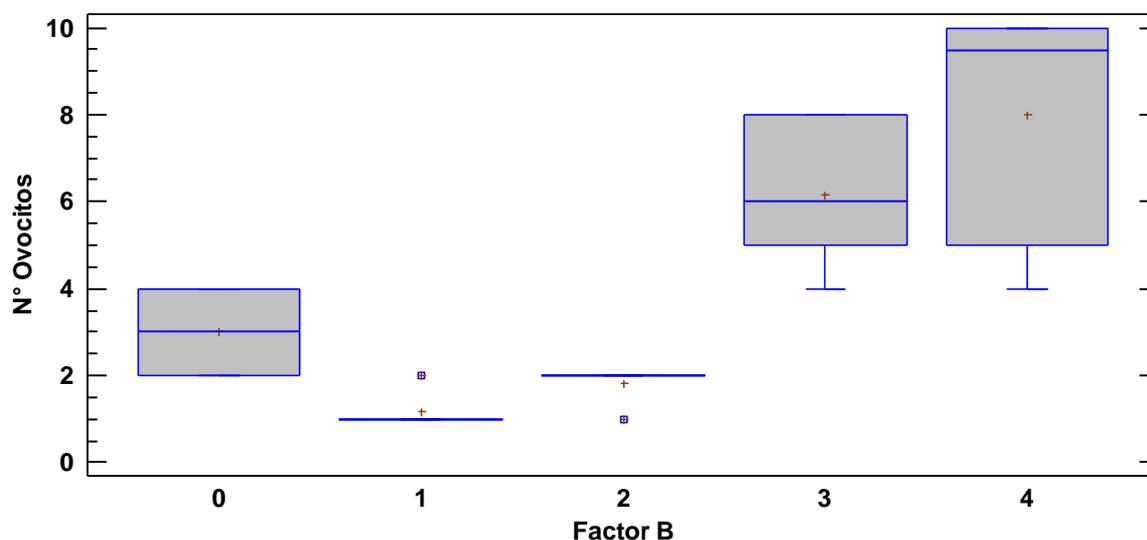
Factor B	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
4	6	0.666667	0.258199	A
3	6	1.16667	0.258199	A
0	6	2.5	0.258199	B
2	6	3.0	0.258199	B
1	6	3.0	0.258199	B

Nota. En esta tabla se muestra el aumento gradual de la cantidad de ovocitos maduros en grado II. **Fuente:** Propia.

En la Figura 22 se muestra la diferencia significativa encontrada en las concentraciones de NC y se establecieron dos grupos, de los cuales en el grupo A se encuentran los de menor media y el grupo B de mayor media, estableciendo que para la concentración de ($b_4=40 \mu\text{M}$) existe 0.666667 ovocitos maduros de Grado II, mientras para ($b_1= 5 \mu\text{M}$) y ($b_0= 10 \mu\text{M}$) se tiene un estimado de 3 ovocitos.

Figura 23

Diagrama compuesto por análisis en cajas de bigotes y asociación de grupos homogéneos en ovocitos de Grado III



Factor B	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	6	1.16667	0.62361	A
2	6	1.83333	0.62361	A
0	6	3.0	0.62361	A
3	6	6.16667	0.62361	B
4	6	8.0	0.62361	B

Nota. En esta tabla se muestra el aumento gradual de la cantidad de ovocitos maduros en grado III. **Fuente:** Propia.

En la Figura 23 se muestra la diferencia significativa encontrada en las concentraciones de NC y se establecieron tres grupos, de los cuales en el grupo A se encuentran los de menor media y el grupo C de mayor media, estableciendo que para la concentración de ($b_1 = 5 \mu\text{M}$) existe 1.16667 ovocitos maduros de Grado II, mientras para ($b_4 = 40 \mu\text{M}$) se tiene un estimado de 8 ovocitos.

En las Figuras 21 y 22, es evidente un mayor número de ovocitos maduros en los Grados I y II en concentraciones de NC de $5 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$, y un menor número de ovocitos de grado III frente al grupo control, por el contrario, en las concentraciones de $20 \mu\text{M}$ y $40 \mu\text{M}$ se observa un menor de ovocitos maduros en grado I y II en relación al control y las concentraciones bajas de NC, pero se evidencia un elevado número de ovocitos en grado III.

En ambos casos con los medios de maduración TCM 199 1x y MEM 10X se evidencia un fenómeno similar en la cantidad de ovocitos en los Grados I, II y III. (Chen & Chan , 2012) en su estudio con nanopartículas de curcumina en la maduración, fertilización y desarrollo embrionario *in vitro* de ovocitos de ratón, evidencian un aumento gradual de maduración y fertilización en concentraciones de 5 μM y 10 μM , y también una disminución significativa en las concentraciones de 20 μM y 40 μM .

En la maduración, fertilización y desarrollo de ovocitos porcinos se encontró que la suplementación de nanopartículas de curcumina con 5 μM , 10 μM y 20 μM produce una mayor tasa de la formación de blastocistos en comparación a un grupo no tratado con NC, por el contrario, el tratamiento con 40 μM muestra efectos negativos, encontrándose que la concentración de 10 μM de NC es potencialmente ideal para el cultivo de ovocitos (Namula et al., 2020).

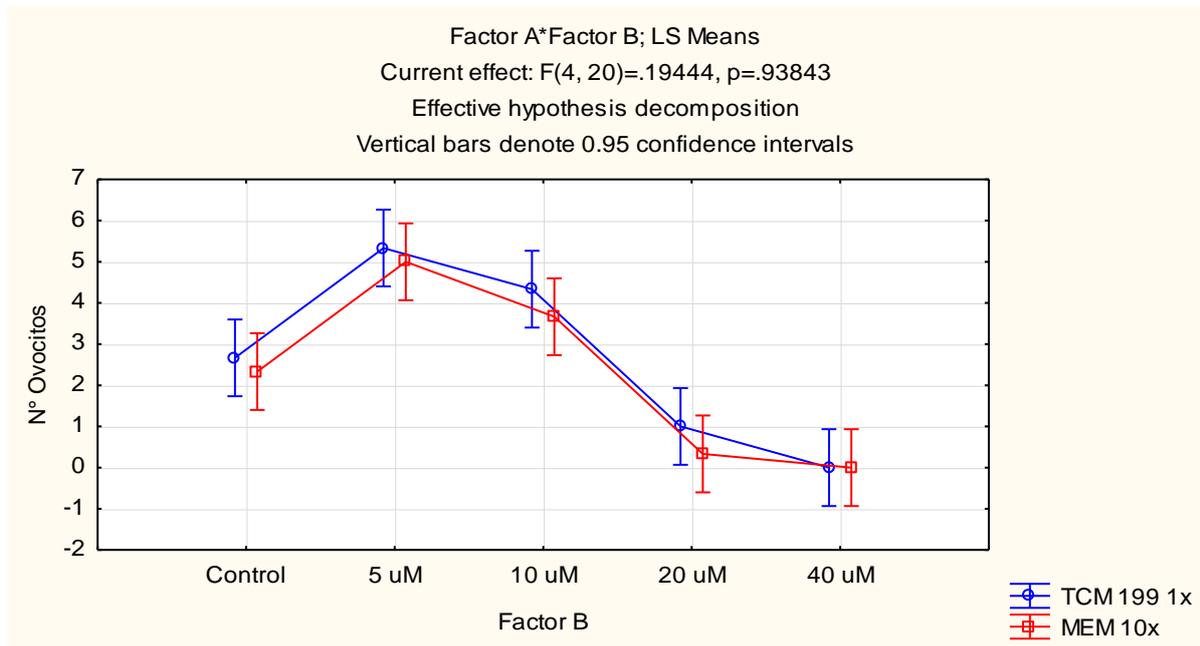
El evidente aumento de ovocitos maduros en los Grados I y II, mostrados en las concentraciones de NC 5 μM y 10 μM , frente al grupo control se prevé que se debe a la protección celular que proporciona el antioxidante y a la vez la neutralización de los radicales libres y otros ROS formados en la maduración de los ovocitos, permite que haya un controlado y bajo estrés oxidativo evitando el daño celular.

Por otra parte, se observó un alto índice de ovocitos de Grado III en las concentraciones de 20 μM y 40 μM de NC, frente al control y las dosis bajas de NC, un exceso de antioxidante en el medio de maduración de ovocitos se da un desequilibrio en el ambiente redox celular, causando un efecto de estrés reductivo (García-Díaz et al., 2013). De tal manera, las altas concentraciones de un antioxidante pueden incrementar la demanda metabólica desencadenando en desequilibrio en los NADH y NADPH, en los ovocitos (Pollard et al., 2022).

Según (García-Díaz et al., 2013) es importante mantener un equilibrio adecuado entre el antioxidante y los ROS para conseguir una correcta homeostasis en la célula, puesto que el elevado nivel de antioxidantes puede incluso desencadenar en efectos adversos como daño o muerte celular.

Gráfico 1

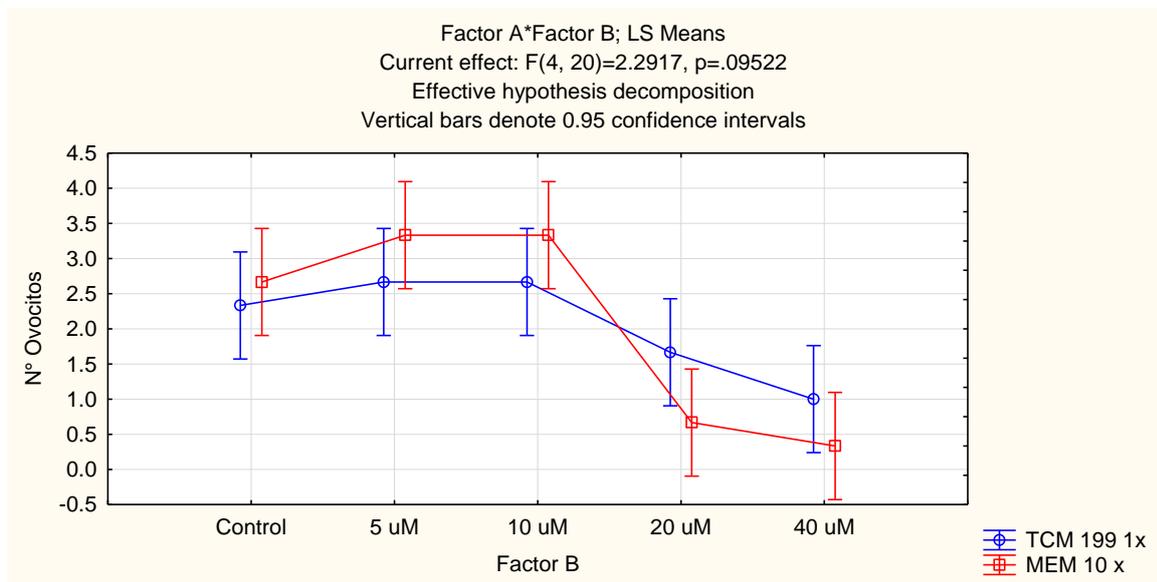
Medias en la cantidad de ovocitos maduros de Grado I



Nota. En este gráfico se muestra la cantidad de ovocitos maduros en Grado I, teniendo en cuenta la interacción de los Factores A y B. Fuente: Propia.

Gráfico 2

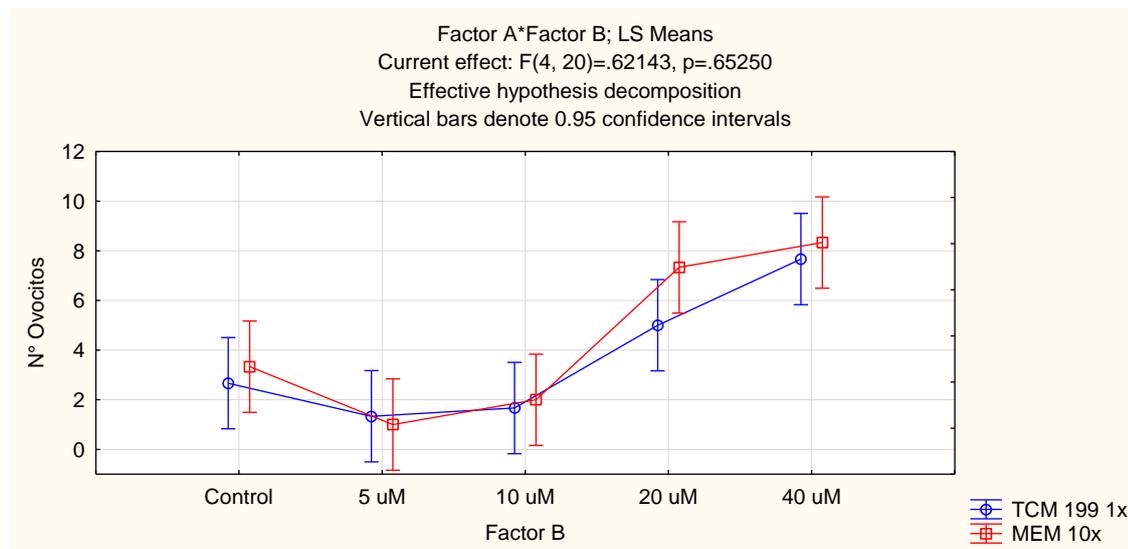
Medias en la cantidad de ovocitos maduros de Grado II



Nota. En este gráfico se muestra la cantidad de ovocitos maduros en Grado II, teniendo en cuenta la interacción de los Factores A y B. Fuente: Propia.

Gráfico 3

Medias en la cantidad de ovocitos maduros de Grado III



Nota. En este gráfico se muestra la cantidad de ovocitos maduros en Grado II, teniendo en cuenta la interacción de los Factores A y B. **Fuente:** Propia.

Es evidente en las gráficas 1, 2 y 3 que no hay diferencia extrema en la cantidad de ovocitos maduros en cada categoría con respecto al medio de maduración utilizado, sin embargo, las concentraciones del antioxidante marca diferencia notable.

Crioconservación de ovocitos bovinos

En la crioconservación de ovocitos es un proceso con alta probabilidad en la formación de ROS, es decir, la formación de radicales libres que tienen la capacidad de reaccionar con las células, así también, en la crioconservación se pueden atribuir al estrés oxidativo, apoptosis y daños en el ADN (Keane & Ealy, 2024), mitocondrias y retículo endoplasmático (Cao et al., 2022).

Se logró determinar un 90% de éxito en la crioconservación de ovocitos con nanopartículas, y un 70 % en el grupo control “sin antioxidante”, análisis de viabilidad y/o supervivencia ovocitaria basado por la integridad de las células del cumulus oophorus y la completitud nuclear.

Se atribuye el éxito de crioconservación en los ovocitos al proceso de vitrificación de las nanopartículas como antioxidante, puesto que según (Cao et al., 2022) para tener mayor

éxito en procesos de vitrificación, calentamiento o cultivo de ovocitos reduciendo el estrés oxidativo el uso de antioxidantes no enzimáticos aporta con alta protección.

Un antioxidante de tipo no enzimático es aquel que actúa mediante la neutralización de radicales libres y otras ROS, pero estos no actúan en alguna a través de una actividad enzimática en específico. Los antioxidantes no enzimáticos están divididos en grupos como: vitaminas, carotenoides, minerales, polifenoles y otros (Rudenko et al., 2023).

La nanocurcumina se caracteriza por su capacidad antioxidante dada por ser un fenol (Alvis et al., 2011), atribuyendo a que es un antioxidante no enzimático por lo cual la actuación sobre el proceso de crioconservación aporta en la neutralización de radicales libres y otras ROS.

Capítulo V

Conclusiones

En base al análisis y experimentación se concluye que el método de ultrasonido para la obtención de nanopartículas de curcumina (NC) fue exitoso, puesto que se comprobó mediante las técnicas de identificación y se estableció que la NC está dentro de los parámetros establecidos en otros estudios. Se comprobó mediante el método establecido de DPPH que las nanopartículas de curcumina tienen propiedades antioxidantes determinando que el porcentaje más alto de CAT se dio a 100 µg y 150 µg con 70.3846% y 70.7692%, respectivamente. Además, el IC 50 calculado se da en los 52.6611 µg, es decir, el 50% de inhibición de radicales libres del DPPH.

La aspiración folicular de ovocitos bovinos se observó con éxito en los folículos de 5 a 10 mm, teniendo en cuenta que el promedio en la obtención de ovocitos por ovario es de 1.028, por lo que se concluye que la técnica y proceso fueron satisfactorios.

En cuanto a la crioconservación de los ovocitos bovinos el uso de nanopartículas contribuyó a tener una mayor tasa de éxito (20% más) frente al grupo control, para lo cual también se analizó las diferentes concentraciones de NC en la maduración por lo que se determinó 52,92 % para ovocitos de Grado I y II, mientras un 47,08% de ovocitos de Grado III. Se pudo concluir, que las concentraciones altas de antioxidante contribuyen a un efecto de estrés reductivo, evitando el desarrollo normal de maduración. Además, se observó una alta tasa de éxito en la crioconservación de los ovocitos ya que las nanopartículas de curcumina ayudan en la neutralización de radicales libres formados en el congelamiento.

Recomendaciones

Probar más concentraciones cercanas a las indicadas con mayor tasa de maduración de ovocitos, hasta llegar a una concentración adecuada.

Evaluar la efectividad de las nanopartículas en etapas posteriores como fecundación de ovocitos, para la producción *in vitro* de embriones.

Comparar con otros antioxidantes de uso comercial, para evaluar la efectividad de los antioxidantes en la maduración de ovocitos y etapas posteriores.

Bibliografía

- Alvis, A., Arrazola, G., & Martinez, W. (2011). Evaluación de la Actividad y el Potencial Antioxidante de Extractos Hidro-Alcohólicos de Cúrcuma (*Cúrcuma longa*) . *SciELO*.
<https://doi.org/https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v23n2/art03.pdf>
- Basnet, P., & Skalko-Basnet, N. (2011). Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(6), 4567–4598. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules16064567>
- Cavusoglu, T., Gokhan, A., Sirin, C., Tomruk, C., Kilic, K. D., Olmez, E., Er, O., & Gullu, M. K. (2023). Classification of Bovine Cumulus-Oocyte Complexes with Convolutional Neural Networks. *MEDICAL RECORDS-International Medical Journal* , 5(3), 489-95.
<https://doi.org/10.37990/medr.1292782>
- Ciuca, M. D., & Racovita, R. C. (2023). Curcumin: Overview of Extraction Methods, Health Benefits, and Encapsulation and Delivery Using Microemulsions and Nanoemulsions. *MDPI*, 24(10). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms24108874>
- Fathima, R., & Mujeeb, A. (2021). Plasmon enhanced linear and nonlinear optical properties of natural curcumin dye with silver nanoparticles. *ELSEIVER*, 189.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.109256>
- Fields, D. (25 de Junio de 2019). *What is Transmission Electron Microscopy?* NEWS MEDICAL & SCIENCES: <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Transmission-Electron-Microscopy.aspx>
- Gómez, I., Valerio, C., & González, V. (2018). Obtención de nanopartículas de curcumina, a partir del extracto de cúrcuma longa. *Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Químicas*, 8(2), 2-9.
<https://doi.org/https://doi.org/10.29105/qh8.2-229>
- Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., Choi, C. W., Lee, S. R., & Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *PubMed*, 6(1), 12–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001>

- Karthikeyan, A., Senthil, N., & Min, T. (2020). Nanocurcumin: A Promising Candidate for Therapeutic Applications. *frontiers*, 11.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00487>
- Köroğlu, N., & Aydın, T. (2023). Oocyte vitrification for oncological and social reasons. *PubMed*, 20(1), 53-63.
https://doi.org/https://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_58880/TJOG-20-59-En.pdf
- Kumar, V., Kumar, R., Jain, V., & Nagpal, S. (2021). Preparation and characterization of nanocurcumin based hybrid virosomes as a drug delivery vehicle with enhanced anticancerous activity and reduced toxicity. *Sci Rep*, 368.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-020-79631-1>
- Kurmudle, N., Kagliwal, L. D., Bankar, S. B., & Singhal, R. D. (2013). Enzyme-assisted extraction for enhanced yields of turmeric oleoresin and its constituents. *ELSEIVER*, 3, 36-41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.06.001>
- Lee, W. H., Loo, C. Y., Bebawy, M., Luk, F., Mason, R., & Rohanizadeh, R. (2013). Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Current neuropharmacology*, 11(4), 338–378.
<https://doi.org/https://doi.org/10.2174/1570159X11311040002>
- López-Bascón, M. A., & Luque de Castro, M. D. (2020). Chapter 11 - Soxhlet Extraction. *ELSEIVER*, 327-354. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00011-6>
- Łubek-Nguyen, A., Ziemichód, W., & Olech, M. (2022). Application of Enzyme-Assisted Extraction for the Recovery of Natural Bioactive Compounds for Nutraceutical and Pharmaceutical Applications. *MDPI*, 12(7), 3232.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/app12073232>
- Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2008). Microwave assisted extraction of curcumin by sample–solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design. *ELSEIVER*, 46(2), 322-327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.10.020>

- Olexiková, L., Dujíčková, L., Makarevich, A., Bezdíček, J., Sekaninová, J., Nesvadbová, A., & Chrenek, P. (Diciembre de 2022). *MDPI*. Glutathione during Post-Thaw Recovery Culture Can Mitigate Deleterious Impact of Vitrification on Bovine Oocytes: <https://doi.org/10.3390/antiox12010035>
- Prasad, S., & Aggarwal, B. (2011). *Turmeric, the Golden Spice: From Traditional Medicine to Modern Medicine*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92773/>
- Rai, M., Pandit, R., Gaikwad, S., Yadav, A., & Gade, A. (2015). Potential applications of curcumin and curcumin nanoparticles: from traditional therapeutics to modern nanomedicine. *Nanotechnology Reviews*, 4(2), 161-172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1515/ntrev-2015-0001>
- Rios-Aguirre, S., & Gil-Garzón, M. A. (2021). Microencapsulation of Bioactive Compounds in Diverse Matrices by Spray Drying: A Literature Review. *TecnoLógicas*, 24(51). <https://doi.org/https://doi.org/10.22430/22565337.1836>
- Santonastaso, M., Mottola, F., Lovine, C., Colacurci, N., & Rocco, L. (2021). Protective Effects of Curcumin on the Outcome of Cryopreservation in Human Sperm. *SpringerLink*, 28, 2895-2905. <https://doi.org/https://link.springer.com/article/10.1007/s43032-021-00572-9>
- Abdel-Halim, B. R., & Helmy, N. A. (2017). Effect of nano-selenium and nano-zinc particles during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes. *Animal Production Science*, 58(11), 2021-2028. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/AN17057>
- Abdelnour, S., Hassan, M., Mohammed, A., Alhimaidi, A., Al-Gabri, N., Al-Khldi, K., & Swelum, A. (26 de Agosto de 2020). The Effect of Adding Different Levels of Curcumin and Its Nanoparticles to Extender on Post-Thaw Quality of Cryopreserved Rabbit Sperm. *PubMed*, 10(9), 1508. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani10091508>

- Adamczak, A., Ożarowski, M., & Karpiński, T. M. (2020). Curcumin, a Natural Antimicrobial Agent with Strain-Specific Activity. . *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(7), 153. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ph13070153>
- Aggarwal, B., Kumar, A., & Bharti, A. (2003). *Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies*. *Anticancer research*: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12680238/>
- Altamirano, F., & Vásquez, K. (2016). VARIACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CÚRCUMA (*Curcuma longa*), HIERBA LUISA(*Cymbopogon citratus*) Y JENGIBRE (*Zingiber officinale*) EN FUNCIÓN DEL TIPO DE SUELO DE LA ZONA DE CULTIVO DE LAS ESPECIES VEGETALES EN LAS PROVINCIAS DE:
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12136/1/UPS-QT09893.pdf>
- Ammayappan, L., & Moses, J. (2009). Study of antimicrobial activity of aloe vera, chitosan, and curcumin on cotton, wool, and rabbit hair. *Fibers Polym* , 10, 161-166.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12221-009-0161-2>
- Araujo Baptista, L., Vimos Sosa, K., Cruz, R., Falconí Ontaneda, F., Rojas Fermín, L., & González Romero, A. C. (2020). Chemical components and antimicrobial activity of the essential oil of *Lasiocephalus ovatus* (Asteraceae) that grows in Ecuador:
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7455482>
- Asadi, Z., Safari-Faramani, R., & Aghaz , F. (2023). Effects of adding antioxidant nanoparticles on sperm parameters of non-human species after the freezing and thawing process: A systematic review and meta-analysis. *ELSEVIER*, 275.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107323>
- Bayomi, D., El-Kashef, H., El-Ashmawy, M., Nasr, M., El-Sherbeny, M., Abou-zeid,, L., Badria, F., Ghaly , M., & Abdel-Aziz, N. (2013). Synthesis and biological evaluation of new curcumin derivatives as antioxidant and antitumor agents. *Medicinal Chemistry Research*, 22, 1147–1162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00044-012-0116-9>

- Bhullar, K. S. (2013). Curcumin and its carbocyclic analogs: structure-activity in relation to antioxidant and selected biological properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(5), 5389–5404. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules18055389>
- Britt, J. H. (2008). Oocyte development in cattle: physiological and genetic aspects . *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 110-115.
<https://doi.org/https://www.scielo.br/j/rbz/a/b5N5xXmfSdpMgF7KjstDpHq/?format=pdf&lang=en>
- Cao, B. Q. (2022). Oxidative Stress and Oocyte Cryopreservation: Recent Advances in Mitigation Strategies Involving Antioxidants. *Cells*, 11(22), 3573.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cells11223573>
- Cao, B., Qin, J., Pan, B., Hyder Qazi, I., Ye, J., Fang, Y., & Zhou, G. (11 de Noviembre de 2022). Oxidative Stress and Oocyte Cryopreservation: Recent Advances in Mitigation Strategies Involving Antioxidants:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9688603/>
- Carnino, J. M., & Lee, H. (2022). Chapter Four - Extracellular vesicles in respiratory disease. *ELSEVIER*, 105-127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.acc.2021.07.008>
- Chamba, W. (2021). PRODUCCIÓN ACTUAL DE CARNE EN EL ECUADOR:
<https://www.procampo.com.ec/index.php/blog/10-nutricion/220-produccion-carne-ecuador>
- Chen , C. C., & Chan , W. H. (2012). Injurious Effects of Curcumin on Maturation of Mouse Oocytes, Fertilization and Fetal Development via Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(4), 4655-4672.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms13044655>
- Chin, S. F., Mohd Yazid, S. A., & Pang, S. C. (2014). Preparation and Characterization of Starch Nanoparticles for Controlled Release of Curcumin. *International Journal of Polymer Science*, 1687-9422. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2014/340121>

- Ciani, F., Maruccio, L., Cocchia, N., d'Angelo, D., Carotenuto, D., Avallone, L., Namagerdi, A. A., & Tafuri, S. (2021). *Antioxidants in assisted reproductive technologies: An overview on dog, cat, and horse*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33860028/>
- Conde, L. (Agosto de 2021). Los 9 alimentos con más poder antioxidante: <https://www.lavanguardia.com/comer/materia-prima/20210823/7588872/alimentos-mas-antioxidante.html>
- El-Saadony, M. T.-M.-W.-A.-H.-T. (2023). Impacts of turmeric and its principal bioactive curcumin on human health: Pharmaceutical, medicinal, and food applications: A comprehensive review. *Frontiers in nutrition*. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1040259>
- ESPAC. (2022). *INEC*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2022/Bolet%C3%ADn_tecnico_ESPAC_2022.pdf
- García-Díaz, J. R., Romero-Aguirregomezcorta, J., Astiz Blanco, S., & Ruiz López, S. (2013). Adición de sustancias antioxidantes en los medios de cultivo empleados en la producción in vitro de embriones en mamíferos. *35(1)*, 10-19. <https://doi.org/http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v35n1/rsa02113.pdf>
- Gatoo, M. A. (2014). physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed research international*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2014/498420>
- Ghalandarlaki, N., Alizadeh, A. M., & Ashkani-Esfahani, S. (2014). Nanotechnology-Applied Curcumin for Different Diseases Therapy. *BioMed(394264)*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2014/394264>
- González- Albadalejo, J. S. (2015). Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological. *81(4)*, 278-310. https://doi.org/https://www.researchgate.net/profile/Ibon-Alkorta-2/publication/298834950_Curcumin_and_curcuminoids_Chemistry_structural_studie

s_and_biological_properties/links/56f83d6608ae38d710a25dc7/Curcumin-and-curcuminoids-Chemistry-structural-studies-and-biological

- Guerra, R., Solis, A., Sandoya, G., & de Armas, R. (2012). Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos in vivo e in vitro. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(10), 8.
- Gutiérrez Cumbajin, C. A. (2015). EVALUACION DE LA CRIOCONSERVACIÓN DE OVOCITOS EN BOVINO HEMBRA (BOS TAURUS) EN LA UACAREN EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAX: <https://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2847/1/T-UTC-00371.pdf>
- Hayashi , Y., Horiguchi, I., Kino-oka, M., & Sugiyama, H. (2020). Slow freezing process design for human induced pluripotent stem cells by modeling intracontainer variation. *ELSEVIER*, 132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2019.106597>
- Hettiarachchi, S., Dunuweera, S., Dunuweera, A., & Rajapakse, R. G. (2021). Synthesis of Curcumin Nanoparticles from Raw Turmeric Rhizome. *ACS omega*, 6(12), 8246–8252. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acsomega.0c06314>
- Hosseinzadeh, L., Behravan, J., Mosaffa, F., Bahrami, G., Bahrami, A. R., & Karimi, G. (2011). *Effect of curcumin on doxorubicin-induced cytotoxicity in H9c2 cardiomyoblast cells.*
- Kanwal, Q., Ahmed, M., Hamza, M., Ahmad, M., Yousaf, N., Javaid, A., Anwar, A., Khan, I. H., Muddassar, M., & Rehman, AU. (2023). Curcumin nanoparticles: physicochemical fabrication, characterization, antioxidant, enzyme inhibition, molecular docking and simulation studies. *ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY*, 13, 22268-22280. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/D3RA01432K>
- Keane, J., & Ealy, A. D. (2024). An Overview of Reactive Oxygen Species Damage Occurring during In Vitro Bovine Oocyte and Embryo Development and the Efficacy of Antioxidant Use to Limit These Adverse Effects. . *Animals : an open access journal from MDPI*, 14(2), 330. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani14020330>

- Kumar, K., Srivastav, S., & Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 70. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- LA HORA. (11 de Noviembre de 2022). *Fertilización in vitro en Central Genética de Asogan*. https://www.lahora.com.ec/santo-domingo/fertilizacion-in-vitro-en-central-genetica-de-asogan-11-noviembre-2022/#google_vignette
- Liu, X., Xu, Y., Liu, F., Pan, Y., Miao, L., Zhu, Q., & Tan, S. (2021). The Feasibility of Antioxidants Avoiding Oxidative Damages from Reactive Oxygen Species in Cryopreservation: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7952315/>
- López, A. M. (2020). Uso de la nanotecnología para optimizar la biodisponibilidad. <https://doi.org/https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/3435/SSIT016351.pdf?isAllowed=y&sequence=1>
- Manikandan, S., Mabrouk, K. E., & Ballamurugan, A. (2022). Synthesis of Nanocurcumin and Evaluation of its Properties for Biomedical Applications. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 36, 67. <https://doi.org/https://link.gale.com/apps/doc/A697577642/AONE?u=anon~ba7fd3e9&sid=googleScholar&xid=99990170>
- Mansoori, A., & Soelaiman, F. (2005). Nanotecnología: una introducción para la comunidad de estándares : https://www.researchgate.net/profile/G_Ali_Mansoori/publication/309901045_Nanotechnology-an_introduction_for_the_standards/links/5827cff008ae950ace6ce5f3/Nanotechnology-an-introduction-for-the-standards.pdf
- Mata-Miranda, M. M., & Vázquez-Zapién, G. J. (2019). *La fecundación in vitro: Louise Brown, a cuatro décadas de su nacimiento*. Scielo: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-696X2018000400363#:~:text=La%20historia%20de%20la%20FIV,llev%C3%B3%20a%20cabo%20con%20%C3%A9xito.

- Mondragón Cortez, P. (2017). *ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO PARA TODOS*. D.R. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. https://doi.org/https://ciatej.mx/files/divulgacion/divulgacion_5a43b7c09fdc1.pdf
- Mun, S. H. (2013). Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 20(8-9), 714–718.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.02.006>
- Namula, Z. S. (2020). Curcumin supplementation in the maturation medium improves the maturation, fertilisation and developmental competence of porcine oocytes. . *Acta veterinaria Hungarica*, 68(3), 298–304.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1556/004.2020.00041>
- Páez Aguinaga, T. (22 de Febrero de 2022). *Nanotecnología en el Mundo: Marco Regulatorio*.
<https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4603/1/P%C3%A1ez%20Aguinaga%20Tania%20Judith.pdf>
- Pandit, R. S. (2015). Curcumin nanoparticles: physico-chemical fabrication and its in vitro efficacy against human pathogens. *3 Biotech*, 5(6), 991–997.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13205-015-0302-9>
- Pollard, C. L. (2022). NAD⁺, Sirtuins and PARPs: enhancing oocyte developmental competence. *The Journal of reproduction and development*, 68(6), 345–354.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1262/jrd.2022-052>
- Ravichandran , R. (2013). Studies on Dissolution Behaviour of Nanoparticulate Curcumin Formulation. *Scientific Research*, 2(1), 51-59 .
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/anp.2013.21010>
- Rodríguez Santillán , P., Álvarez Gallardo, H., & Romo , S. (2022). Nanotecnología en reproducción asistida: Acción de nanopartículas antioxidantes sobre espermatozoides bovinos. *Ganaderia.com*.
<https://doi.org/https://www.ganaderia.com/destacado/nanotecnologia-en->

reproduccion-asistida-accion-de-nanoparticulas-antioxidantes-sobre-espermatozoides-bovinos

Rudenko, N., Vetoshkina, D., Marenkova, T., & Borisova-Mubarakshina, M. (2023).

Antioxidants of Non-Enzymatic Nature: Their Function in Higher Plant Cells and the Ways of Boosting Their Biosynthesis. *Antioxidants*, 12(11), 2014.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antiox12112014>

Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, S. R., & De, B. (2010). Free radicals,

antioxidants, Diseases and phytomedicines: Current status and Future prospect.

International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 3(1), 91-100.

Shinde, A., Ganu, J., & Naik, P. (2012). Effect of Free Radicals & Antioxidants on Oxidative Stress: A Review. 1(2), 53-66.

Shirsath, S. R. (2017). Intensification of extraction of curcumin from *Curcuma amada* using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters. *Ultrasonics sonochemistry*, 38, 437–445.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.040>

Singh, R. P. (29 de Marzo de 2023). *Latin America Animal Biotechnology Market To Propel During 2023-2028 With The Advent Of Advanced Technology And Increasing Awareness Regarding Animal*. <https://www.linkedin.com/pulse/latin-america-animal-biotechnology-market-propel-during-singh>

Somfai, T., & Hirao, Y. (15 de Septiembre de 2021). *ELSEIVER*. Vitrificación de ovocitos bovinos inmaduros en medios libres de proteínas: el impacto del protocolo de tratamiento crioprotector, el medio base y el almacenamiento del ovario:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X21001953>

Srivatsan, K. V. (2015). Effect of curcumin caged silver nanoparticle on collagen stabilization for biomedical applications. *International journal of biological macromolecules*, 306-315. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.050>

- Tharasanit, T., & Thuwanut, P. (2021). *Criopreservación de ovocitos en animales domésticos y humanos: principios, técnicas y resultados actualizados*. MDPI: <https://doi.org/10.3390/ani11102949>
- Torrenegra, M. (2014). EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL FOLIAR EXTRAIDO DE ESPECIES DE OREGANO (*Origanum vulgare*), OREGANO "BORDE BLANCO" (*Origanum vulgare* ssp) Y OREGANITO (*Lippia alba* mill) CULTIVADO EN LA ZONA NORTE DEL DEPARTAMENTO DE BOLÍVAR (CO. <https://doi.org/https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/75164/45506760.2014.pdf?isAllowed=y&sequence=1>
- Urrego, R., Rodríguez-Osorio, N., & Niemann, H. (1 de Junio de 2014). *Trastornos epigenéticos y expresión genética alterada tras el uso de Tecnologías de Reproducción Asistida en ganado doméstico*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4065177/>
- Vázquez Mazariego, Y. (17 de Noviembre de 2023). *Todo lo que necesitas saber sobre la cúrcuma, un antiinflamatorio y antioxidante natural*. SPORTLIFE: https://www.sportlife.es/blogs/nutricionydeporte/todo-lo-que-necesitas-saber-sobre-la-curcuma-un-antiinflamatorio-y-antioxidante-natural_204074_102.html
- Vladár, A. E., & Hodoroaba, V.-D. (2020). Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy. *ELSEVIER*, 7-27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00002-X>