

Composición aminoacídica de la Melagenina Plus®

Amino Acid Composition of Melagenin Plus®

Maydelin Trujillo Alfonso^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-9577-7223>

Martha Pupo Peña² <https://orcid.org/0000-0002-0483-8738>

Yanet Támbara Hernández² <https://orcid.org/0000-0002-7463-1206>

¹Centro Histoterapia Placentaria Dr. Carlos Manuel Miyares Cao. La Habana, Cuba.

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana. Cuba

*Autor para la correspondencia: maydelin@miyares-cao.cu

RESUMEN

Introducción: La Melagenina Plus® es un extracto hidroalcohólico de placenta humana empleado con éxito para el tratamiento del vitiligo.

Objetivo: Determinar, de manera independiente, los aminoácidos libres y totales, así como el perfil aminoacídico de la Melagenina Plus®, empleando la técnica de análisis de aminoácidos.

Métodos: Los aminoácidos previa derivatización se separaron y cuantificaron por cromatografía de gases. Se preparó una curva de tres niveles de concentración que contiene una mezcla de los aminoácidos patrones a identificar; la cuantificación se realizó por el método del estándar interno.

Resultados: Se identificaron un total de 15 aminoácidos: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, glicina, serina, treonina, tirosina, ácido aspártico, ácido glutámico, histidina y lisina. Se cuantificaron 2,163 mg/100 mL ± 0,352 de aminoácidos en su forma libre y 4,513 mg/100 mL ± 3,047 de aminoácidos totales.

Conclusiones: El ácido glutámico fue el de mayor representación en el producto. Los otros aminoácidos más abundantes fueron glicina, metionina, serina, prolina y leucina.

Palabras clave: aminoácidos; cromatografía gaseosa; placenta humana; Melagenina Plus®.

ABSTRACT

Introduction: Melagenin Plus® is a hydroalcoholic extract of human placenta successfully employed for the treatment of vitiligo.

Objective: To independently determine the free and total amino acids, as well as the amino acid profile of Melagenin Plus®, using the amino acid analysis technique.

Methods: After derivatization, amino acids were separated and quantified by gas chromatography. A three-level concentration curve was prepared containing a mixture of the standard amino acids to be identified; quantification was performed by the internal standard method.

Results: A total of 15 amino acids were identified: alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, glycine, serine, threonine, tyrosine, aspartic acid, glutamic acid, histidine and lysine. 2,163 mg/100 mL \pm 0.352 of free form amino acids and 4,513 mg/100 mL \pm 3,047 of total amino acids were quantified.

Conclusions: Glutamic acid had the highest representation in the product. The other most abundant amino acids were glycine, methionine, serine, proline and leucine.

Keywords: amino acids; gas chromatography; human placenta; Melagenin Plus®.

Recibido: 23/05/2022

Aceptado: 29/07/2023

Introducción

La Melagenina Plus® es un extracto hidroalcohólico de placenta humana empleado con éxito en el tratamiento del vitiligo.⁽¹⁾ La determinación de los aminoácidos (AA) totales de este producto se realizó como parte de la caracterización del extracto, con el objetivo de completar la información necesaria para la renovación del Registro Sanitario. El proceso tecnológico ha sufrido cambios por lo que con este estudio se realiza una actualización y se identifican, además, los AA libres presentes en el producto.

Los AA se encuentran formando parte de péptidos/proteínas y, en su forma libre, estas sustancias son ingredientes activos de muchas formulaciones cosméticas y medicamentos. Ellos juegan un importante rol como fuente de energía, principales generadores de compuestos de carbono, metabolitos anapleróticos que proveen intermediarios para el ciclo de ácido tricarboxílico y la gluconeogénesis, precursores de hormonas, neurotransmisores y otros metabolitos especializados.⁽²⁾

La técnica de análisis de AA (AAA) se presenta como la más precisa para el cálculo de la concentración absoluta de una solución de péptidos/proteínas. A partir de la determinación de su composición aminoacídica puede conocerse el contenido peptídico/proteico, puede determinarse el coeficiente de extinción molar, entre otras aplicaciones. Este tipo de análisis requiere de varios pasos: hidrólisis química total de los enlaces peptídicos hasta AA libres (paso que se omite cuando solo se analizan los AA libres); derivatización de los AA; separación cromatográfica; detección, identificación y cuantificación.

En ocasiones se requiere conocer las cantidades de AA libres y totales (provenientes de la suma de los libres y los que se encontraban formando parte de proteínas o péptidos) de una muestra, por separado. En este caso hay que hacer primero una separación de las proteínas presentes, la que se realiza comúnmente por precipitación. Posteriormente, se analizan de manera independiente el sobrenadante (AA libres) y el precipitado, donde se encuentran las proteínas; la suma de ambos brindará la información de los AA totales de la muestra.

Los métodos que tradicionalmente se han empleado para el análisis de AA utilizan equipos dedicados a este fin, conocidos como “analizadores de AA”. Estos emplean la cromatografía líquida de fase reversa o de intercambio iónico para la separación cromatográfica. Existen dos metodologías de trabajo: la derivatización precolumna/separación por fase reversa y la derivatización poscolumna/separación por intercambio iónico.

La detección de los AA se realiza con detectores de luz ultravioleta (UV) o de fluorescencia (F), esta última es más sensible. En dependencia del tipo de cromatografía usada, se utilizan varios agentes derivatizantes tanto para la derivatización precolumna como para la poscolumna. Entre ellos están el fenilisotiocianato/PITC(UV), el fluorenilmetiloxicarbonilclorhídrico/FMOC-Cl(UV), el orto-ftalaldehído/OPA-2 mercaptoetanol/2ME,^(3,4)(F) cloruro de dansilo,⁽⁵⁾ la ninhidrina (UV), entre otros.

La cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) se presenta como un método alternativo para la identificación y cuantificación de AA.⁽⁶⁾ La muestra debe ser derivatizada para que se volatilice sin destruir, al inyectarla en la columna cromatográfica, esto implica que el derivado obtenido debe ser termoestable. La elución es producida por el flujo de un gas que funciona como fase móvil como: helio, nitrógeno, hidrógeno; aunque de acuerdo con el tipo de detector es necesario usar gases específicos.⁽⁷⁾

El empleo del juego de reactivos EZ: faast™ (Phenomenex, EE.UU.)⁽⁸⁾ nos permite extraer y derivatizar los AA, los cuales se separan por GC con detectores de ionización por llama, nitrógeno-fósforo o selectivo de masas (FID; NPD y MSD por sus siglas en inglés, respectivamente).

El objetivo de este trabajo fue determinar, de manera independiente, los aminoácidos libres y totales, así como el perfil aminoacídico de la Melagenina Plus®, empleando la técnica de análisis de aminoácidos.

Métodos

En el estudio se emplearon tres lotes de Melagenina Plus® a escala industrial, los cuales cumplieron con las especificaciones de calidad establecidas para este producto.

Eliminación de lípidos en la muestra

Se tomaron 0,5 ml de muestra original, la cual se encuentra en alcohol al 84 %, se llevaron a sequedad para eliminar el solvente y se redisolvió en 0,5 mL de agua libre de AA (Water BPC Sigma). Se realizó una extracción con cloroformo/metanol (método de Folch) con el objetivo de eliminar los componentes lipídicos en las muestras a analizar. Se separó la fase metanol/agua conteniendo los AA libres y la fase clorofórmica conteniendo los lípidos se conservó para análisis posteriores. En esta extracción, las proteínas precipitan en la interfase; para el análisis de los AA totales se tomó la proteína precipitada y la fase metanol/agua.

Hidrólisis de la muestra para cuantificación de AA totales

Los volúmenes correspondientes a la cantidad de muestra a hidrolizar, se colocaron en viales de derivatización suministrados en el juego de reactivos. Las muestras se llevaron a sequedad en una centrífuga de evaporación rotatoria (Savant, EE.UU.). Cada uno de los viales de derivatización con la muestra seca se colocó, a su vez, en viales de reacción de 5 mL, a los cuales previamente se le adicionaron 500 µL de HCL 6M, y se les hizo vacío. Las muestras se sometieron durante 24 horas a un proceso de hidrólisis ácida fuerte (HCl 6N) en fase gaseosa, a 110 °C en un horno termostático (Mettler, Alemania). Pasado este tiempo los viales se extrajeron del horno con la muestra hidrolizada, se dejaron refrescar unos minutos y se llevaron a sequedad en una centrífuga de evaporación rotatoria con el objetivo de secar en su totalidad el ácido que haya condensado.

Derivatización de los AA libres y totales

Los AA se derivatizaron mediante el juego de reactivos (EZ: faast Amino Acid Analysis of Protein Hydrolysates by GC-FID, Phenomenex, EE.UU.).⁽⁸⁾ Este se basa en un primer paso de extracción en fase sólida para capturar los aminoácidos libres y/o liberados, por la matriz depositada en una punta de pipeta. La matriz se lava para eliminar otros reactivos y contaminantes; posteriormente, se eluye la matriz y se preparan los derivados volátiles (alquilcloroformiato) de los AA. Finalmente, mediante una extracción líquido-líquido se extraen los AA derivatizados, los cuales se separaron por GC.

Para la cuantificación de AA libres y totales se derivatizaron 0,1 mL; se añadieron como estándar interno de la hidrólisis, 15 nmoles (1,7 μ L) del aminoácido norleucina (NLeu), que no se encuentra formando parte de los péptidos/proteínas de manera natural; en el caso de los AA totales. La derivatización de los AA liberados y los que estaban libres se realizó según lo descrito utilizando el aminoácido norvalina (NVal), como estándar interno para la derivatización y la medición. Este AA tampoco forma parte de las proteínas y se añaden 100 μ L a cada muestra antes de derivatizar.

Condiciones cromatográficas y cuantificación

Se preparó una curva de tres niveles de concentración, que contiene una mezcla de los aminoácidos patrones a identificar y cuantificar. El cálculo se realizó por el método del estándar interno.

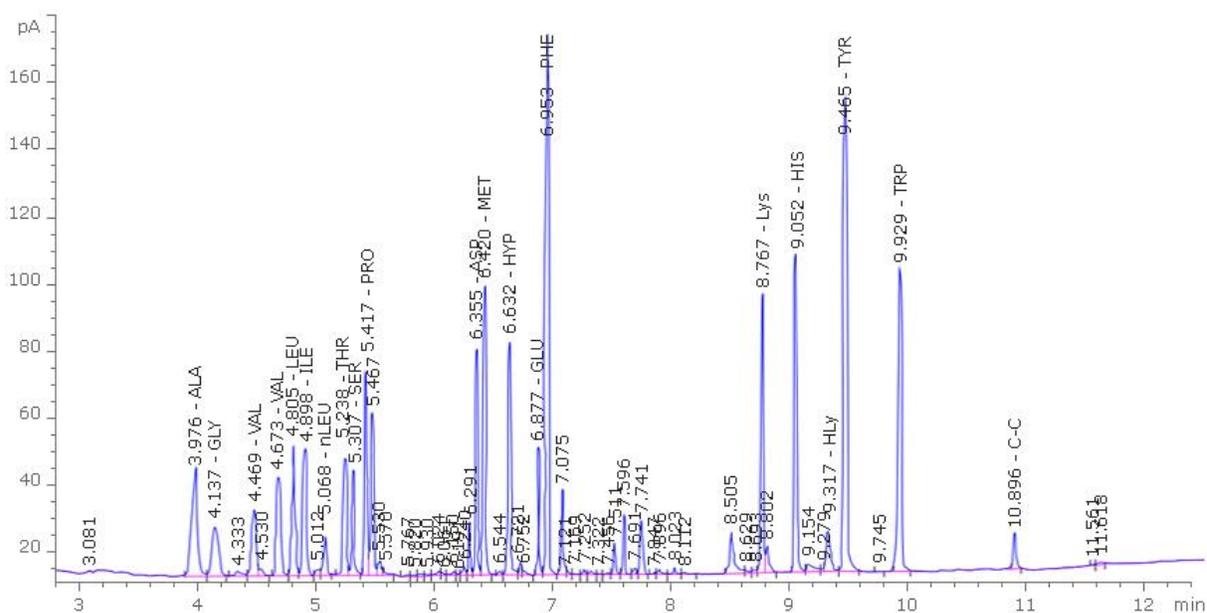
Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A. Se realizó la inyección por triplicado después de haber confeccionado una curva de calibración al inicio de las mediciones; mediante un inyector automático Agilent Technologies 7683. Todos estos módulos son controlados por el programa Agilent MSD Productivity Chem Station versión B.02.02.

Las condiciones de análisis fueron: columna EZ: Faast de 9,8 m de largo, diámetro interno de 250 μ m con un espesor de película de 250 μ m y un flujo de gas portador (H_2) de 1,2 mL/min, la temperatura del inyector fue de 250 °C con un volumen de inyección de 2 μ L en modo *splitless* (sin división de caudal). La temperatura inicial

del horno fue 110 °C, se utilizó una pendiente de 20 °C/min hasta una temperatura final de 320 °C. La corrida tuvo un tiempo de duración de 10,5 minutos. La temperatura del detector fue de 320 °C, trabajando con flujos de 35 y 350 mL/min para el H₂ y el aire, respectivamente.

Resultados

En la figura 1 se muestra el cromatograma de la mezcla estándar de calibración al nivel 3 de concentración (20 nmoles de cada AA). Los aminoácidos nVAL y nLEU se utilizaron como estándares internos de la derivatización e hidrólisis a concentraciones de 20 nmoles y 25 nmoles, respectivamente. Encima de cada pico aparece el tiempo de retención y el aminoácido correspondiente en código de tres letras.



RetTime [min]	ISTD used	Area (pA*s)	Amount (pMol)	Name
3,976	1	117,927	396,79101	ALA
4,137	1	53,861	399,66161	GLY
4,469	1	53,269	397,66684	VAL
4,673	1	68,009	400,00000	nVAL
4,805	1	77,488	404,15545	LEU
4,898	1	73,014	405,02615	ILEU
5,068	1	21,545	139,69410	nLEU
5,238	1	66,231	404,20604	THR
5,307	1	54,374	396,16499	SER
5,417	1	88,977	402,98528	PRO
6,355	1	98,054	397,75658	ASP
6,42	1	116,63	403,67078	MET
6,632	1	112,57	410,67850	HYP
6,877	1	45,143	389,75427	GLU
6,953	1	223,79	406,46116	PHE
8,767	1	120,567	418,50194	LYS
9,052	1	134,929	411,60865	HIS
9,317	1	26,798	393,50477	HLy
9,465	1	223,669	428,68196	TYR
9,929	1	145,918	407,97851	TRP
10,896	1	15,106	249,01993	C-C

Fig. 1 - Cromatograma de la mezcla estándar de calibracional nivel 3 (20 nmoles de cada AA).

En la tabla 1 se observan los valores en masa (mg) de AA libres y totales cuantificados con base en 100 ml de muestra; se identificaron un total de 15 AA. El aminoácido dentro del extracto que se encuentra en mayor concentración es el ácido glutámico, que se cuantifica conjuntamente con la glutamina, tanto en su forma libre como formando parte de los péptidos/proteínas en el producto. Los otros AA más abundantes en forma libre fueron leucina, glicina y serina; mientras que como AA totales fueron: glicina, metionina y serina, en ese orden. Cumpliéndose además que el contenido de AA totales es superior a los libres, para cada aminoácido, para la misma cantidad de muestra analizada.

Tabla 1 - Cuantificación de aminoácidos libres y totales en Melagenina Plus® (mg/100 ml), los valores son expresados como la media de tres lotes \pm DE

Aminoácido	Abreviatura	(mg AA libres/ 100 ml muestra)	(mg AA totales/ 100 ml muestra)
Alanina	Ala	0,059 \pm 0,004	0,133 \pm 0,091
Glicina	Gly	0,170 \pm 0,028	0,477 \pm 0,267
Valina	Val	0,129 \pm 0,016	0,220 \pm 0,144
Leucina	Leu	0,175 \pm 0,021	0,277 \pm 0,165
Isoleucina	Ile	0,076 \pm 0,009	0,117 \pm 0,067
Treonina	Thr	0,146 \pm 0,029	0,200 \pm 0,121
Serina	Ser	0,159 \pm 0,033	0,317 \pm 0,198
Prolina	Pro	0,129 \pm 0,016	0,288 \pm 0,157
Ac. Aspártico + asparagina	Asp	0,071 \pm 0,012	0,132 \pm 0,038
Metionina	Met	0,142 \pm 0,027	0,370 \pm 0,223
Ac. Glutámico + glutamina	Glu	0,555 \pm 0,106	1,417 \pm 1,263
Fenilalanina	Phe	0,115 \pm 0,014	0,147 \pm 0,076
Lisina	Lys	0,076 \pm 0,014	0,177 \pm 0,127
Histidina	His	0,068 \pm 0,010	0,087 \pm 0,050
Tirosina	Tyr	0,092 \pm 0,013	0,147 \pm 0,076
Total	-	2,163 \pm 0,352	4,513 \pm 3,047

En la figura 2 se muestran los valores de la composición de AA libres y totales obtenidos como fracción o porcentaje (%) de cada AA en la mezcla con relación al total de AA cuantificados.

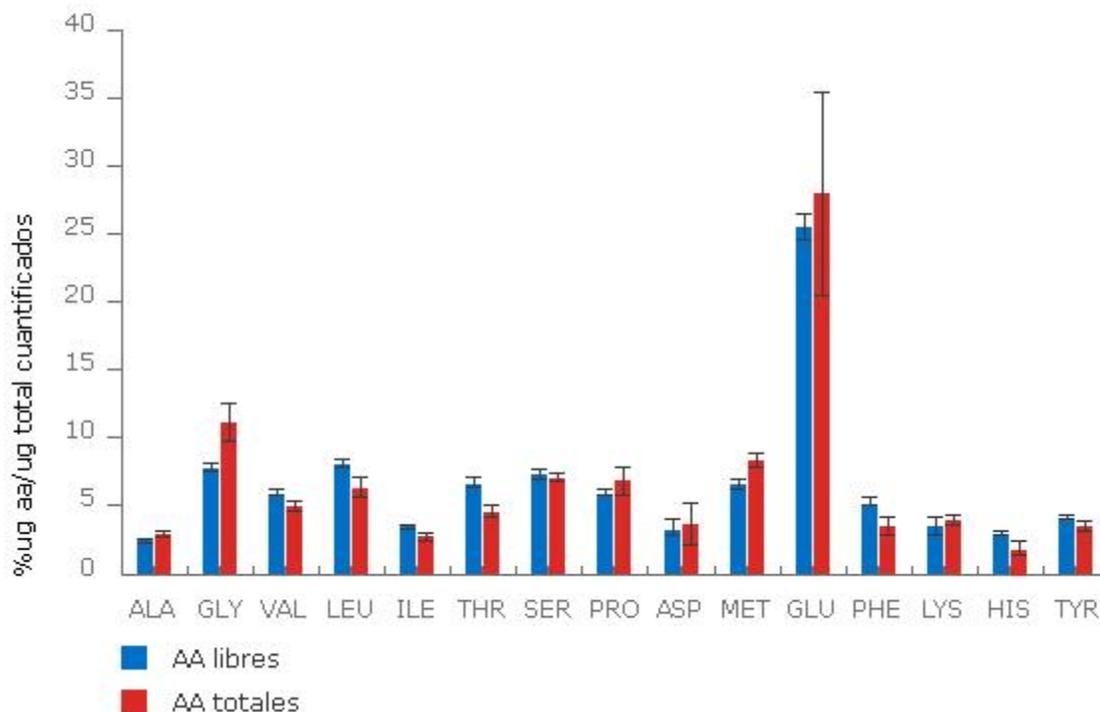


Fig. 2 - Perfil aminoacídico de Melagenina Plus® obtenido por AAA. Los valores son expresados como la media de tres lotes \pm DE.

Los AA totales esenciales en el producto Melagenina Plus® tienen la siguiente distribución: metionina (8,447 % \pm 0,569), leucina (6,383 % \pm 0,726) y valina (5,027 % \pm 0,315), que son los más abundantes. Los AA treonina (4,627 % \pm 0,389), lisina (3,973 % \pm 0,355) y fenilalanina (3,497 % \pm 0,657) tienen valores por debajo del 5 %. Por último, los de menor proporción son la isoleucina (2,770 % \pm 0,409) y la histidina (1,852 % \pm 0,586).

Los AA totales no esenciales están mejor representados en el extracto con mayores concentraciones como el ácido glutámico + glutamina (28,047 % \pm 7,500), glicina (11,173 % \pm 1,337), serina (7,123 % \pm 0,317), prolina (6,847 % \pm 1,040). El ácido

aspártico + asparagina (3,593 % \pm 1,501), tirosina (3,477 % \pm 0,455) y alanina (2,963 % \pm 0,241) están por debajo del 5 %.

Los AA en su forma libre: valina (5,983 % \pm 0,178), leucina (8,137 % \pm 0,280), isoleucina (3,560 % \pm 0,173), treonina (6,757 % \pm 0,276), serina (7,340 % \pm 0,456), fenilalanina (5,353 % \pm 0,237), histidina (3,150 % \pm 0,213) y tirosina (4,280 \pm 6,061) tienen mayor % en relación a los AA totales cuantificados en el producto.

Discusión

La placenta humana es un gran reservorio de nutrientes⁽⁹⁾ y sustancias biológicamente activas, dentro de ellas, los AA.⁽¹⁰⁾ La Melagenina Plus® es un extracto hidroalcohólico de origen placentario. Mediante la técnica de AAA se demostró la presencia en este producto de AA apolares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y glicina), AA polares (serina, treonina y tirosina), AA ácidos (ácido aspártico y ácido glutámico) y AA básicos (histidina y lisina).

Las determinaciones realizadas al producto en sus inicios con el analizador de AA "AAA-881-Mikrotechna" demostraron en la fracción alcohólica la presencia de lisina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, glicina, alanina, valina, isoleucina, tirosina y fenilalanina.⁽¹¹⁾ Posteriormente, durante su registro, se informa la presencia de los aminoácidos histidina, arginina y triptófano.⁽¹⁾ Este último aminoácido no se identificó por el método empleado en este estudio, debido a su destrucción durante la hidrólisis ácida. Hay coincidencias en los AA reportados inicialmente en el extracto placentario y los obtenidos durante esta investigación; a excepción de la arginina, que pudiera estar presente en el producto, pero no se identifica porque no forma parte del patrón de AA empleado.

Durante la caracterización de un extracto hidroalcohólico de placenta humana para el tratamiento del vitíligo en la India, se reporta la presencia de asparagina, treonina, valina, triptófano y fenilalanina mediante la cromatografía de papel de su fracción soluble en acetona.⁽¹²⁾

Togashi y otros identificaron uracilo, tirosina, fenilalanina y triptófano en un hidrolizado de placenta humana (PLx) con actividad antioxidante, empleando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa como método de separación.⁽¹³⁾ Más tarde, en otras de sus fracciones, identificaron a los AA glicina, prolina e hidroxiprolina; péptidos del colágeno y le atribuyen igual actividad biológica.⁽¹⁴⁾

En el hidrolizado de origen placentario Laennec se han identificado a los AA y péptidos como sustancias bioactivas.^(15,16) Mediante la técnica de AAA y el empleo de la cromatografía líquida acoplada a masas LC-MS/MS, se cuantificaron en orden decreciente un total de 15 AA en 14 lotes estudiados: glicina, alanina, ácido aspártico, leucina, serina, prolina, ácido glutámico, lisina, treonina, arginina, valina, fenilalanina, metionina, isoleucina y tirosina.⁽¹⁷⁾

En el producto Melagenina Plus® se identificó la misma cantidad de AA reportados en el hidrolizado Laennec. El sistema de solventes empleados durante el proceso de extracción garantiza una alta representación de los AA en este medicamento. No hubo coincidencias en las concentraciones de AA reportadas para el hidrolizado y las obtenidas en el extracto placentario; resultado esperado por ser productos obtenidos por vías diferentes; hidrólisis enzimática y extracción alcohólica, respectivamente. La glicina es el más abundante en el hidrolizado y ocupa el segundo lugar en el extracto de placenta como AA totales.

En conclusión, el ácido glutámico fue el de mayor representación en el producto. Los otros aminoácidos más abundantes fueron glicina, metionina, serina, prolina y leucina.

Referencias bibliográficas

1. CECMED. Registro Sanitario de MELAGENINA PLUS® Loción. No. 0985. La Habana: CECMED; 2020.

2. Bröer S, Bröer A. Amino acid homeostasis and signaling in mammalian cells and organisms. *Biochem J.* 2017;474:1935-63. DOI: <https://doi.org/10.1042/BCJ20160822>
3. De Jong C, Hughes GJ, Wieringen E, Wilson KJ. Amino acid analyses by high-performance liquid chromatography: an evaluation of the usefulness of pre-column Dens derivatization. *J. Chromatogr.* 1982;241:345-59. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)81759-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)81759-8)
4. Wiedmeier VT, Porterfield SJ, Hendrich CE. Quantitation of Dns-amino acids from body tissues and fluids using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1982;231:410-17. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)81865-4](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)81865-4)
5. Turnell DC, Cooper JD. Rapid assay for amino acids in serum or urine by pre-column derivatization and reversed-phase liquid chromatography. *Clin. Chem.* 1982;28:527-531. PMID: 7067099
6. Šimek P, Hušek P, Zahradníčková H. Heptafluorobutyl Chloroformate-Based Sample Preparation Protocol for Nonchiral and Chiral Amino Acid Analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2019;2030:237-51. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9639-1_18
7. Harold Mc. GC (basic theory). Virginia, USA: Virginia Tech; 2017 [acceso 06/12/2021]. Disponible en: <http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=xqegzCsHiemBpdmBIIcCzB>
8. EZ:faast. Amino Acid Analysis of Protein Hydrolysates by GC-FIDor GC-NPD. User's Manual. Phenomenex. Sf/ [acceso 06/12/2021]. Disponible en <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/9be51389-4fa4-4289-9af2-7f4ea883f91d.pdf>
9. Chang S, Lodico L, Williams Z. Nutritional composition and heavy metal content of the human placenta. *Placenta.* 2017;60:100-02. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.07.013>

10. Pan SY, Chan KS, Wong BF, Klocol D, Chernykh V. Placental therapy: An insight to their biological and therapeutic properties. *J Med Therap.* 2017;(3):1-6. DOI: <https://doi.org/10.15761/JMT.1000118>
11. Miyares Cao C, Taboas M, García J, Gonzalez E. Experimental and clinical study on epidermicpigmental effect of human placental extract. *Rev Cu Med.* 1981;20(6):533-8.
12. Prajnamoy P. Hydroalcoholic Human Placental Extract: Skin Pigmenting Activity and Gross Chemical Composition. *Int J Dermatol.* 1995;34:61-6. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1995.tb04383.x>
13. Togashi S, Takahashi N, Kubo Y, Shigihara A, Higashiyama K, Watanabe S, *et al.* Purification and identification of antioxidant substances in human-placenta extracts. *J Health Sci.* 2000;46:117-25. DOI: <https://doi.org/10.1248/jhs.46.117>
14. Togashi SI, Takahashia N, Iwama M, Watanabe S, Tamagawa K, Fukui T. Antioxidative Collagen-Derived Peptides In Human-Placenta Extract. *Placenta.* 2002;23:497-502. DOI: <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0833>
15. Shin EU, Kim M, Hada B, Taek ChO, Jang JM, Kim JY, *et al.* Effects of Human Placenta Extract (Laennec) on Ligament Healing in Rodent Model. *Biol Pharm Bull.* 2019;42:1988-95. DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00349>
16. Park HJ, Shim HS, Lee S, Hahm DH, Lee H, Oh CT, *et al.* Anti-stress effects of human placenta extract: possible involvement of the oxidative stress system in rats. *BMC Complement. Altern. Med.* 2018;18(1):149. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2193-x>
17. No YA, Kwon TR, Park HM, Han HJ, Ji HJ. A Hair Growth-Enhancing Component of Hydrolysate of Human Placenta: In vitro and In vivo Assessments. *J Clin Investigat Dermatol.* 2015;3(1):5. DOI: <https://doi.org/10.13188/2373-1044.1000016>

Conflicto de intereses

Las autoras declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Maydelin Trujillo Alfonso, Yanet Támbara Hernández.

Curación de datos: Maydelin Trujillo Alfonso, Yanet Támbara Hernández.

Análisis formal: Maydelin Trujillo Alfonso, Yanet Támbara Hernández.

Adquisición de fondos: Yanet Támbara Hernández.

Investigación: Maydelin Trujillo Alfonso, Yanet Támbara Hernández, Martha Pupo Peña.

Metodología: Maydelin Trujillo Alfonso, Yanet Támbara Hernández, Martha Pupo Peña.

Administración del proyecto: Maydelin Trujillo Alfonso.

Recursos: Yanet Támbara Hernández, Martha Pupo Peña, Maydelin Trujillo Alfonso.

Software: Yanet Támbara Hernández.

Supervisión: Yanet Támbara Hernández, Maydelin Trujillo Alfonso.

Validación: Yanet Támbara Hernández, Maydelin Trujillo Alfonso.

Visualización: Maydelin Trujillo Alfonso, Yanet Támbara Hernández.

Redacción-borrador original: Maydelin Trujillo Alfonso, Yanet Támbara Hernández.

Redacción-revisión y edición: Maydelin Trujillo Alfonso, Yanet Támbara Hernández.