

ISSN 1810-634X

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 76 N° 2
ABRIL - JUNIO 2010



INSTITUCIÓN CIENTÍFICA FUNDADA EN 1933

LIMA, PERÚ

SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ
CONSEJO DIRECTIVO
(marzo 2009 - marzo 2011)

Presidenta	: Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo
Past-Presidente	: Quím. Farm. Juan José León Cam
Vice-Presidente	: Dr. Emilio Guija Poma
Secretario General	: Ing. Quím. Manuel Otiniano Cáceres
Tesorera	: Ing. Quím. Ana María Osorio Anaya
Secretaria del Consejo	
Directivo	: Quím. María Angélica Best de Rodríguez
Directora de Biblioteca	: Dra. Luz Oyola de Bardales
Director Administrativo	: Quím. Neptalí Ale Borja
Vocales	: Dr. José Amiel Pérez
	: Quím. Lucía Mondragón Hernández
	: Ing. Carlos Velazco Verástigue
	: Dra. María Luisa Castro de Esparza
	: Dra. María del Rosario Sun Kou
	: M. Sc. Jorge Eduardo Loayza Pérez
	: Quím. Farm. Gabriela Soriano Chávez
	: Quím. Lizardo Visitación Figueroa

Comisión de Economía y Finanzas

Presidente: Dr. José Amiel Pérez

Comisión de Publicaciones

Presidente: Dr. Mario Ceroni Galloso

Comisión de Actuaciones Científicas

Presidenta: Dra. Ana María Muñoz Jáuregui

INSTITUCIONES Y EMPRESAS PROTECTORAS DE LA
SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

CORPORACIÓN INFARMASA S.A.

LABORATORIO DANIEL ALCIDES CARRIÓN S.A.

MERCK PERUANA S.A.

UNIÓN DE CERVECERÍAS PERUANAS BACKUS & JHONSTON S.A.

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA - UNMSM

UNIVERSIDAD NORBERT WIENER

REVISTA
de la
SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ
(Rev Soc Quím Perú)
ISSN 1810 - 634X
Revista Trimestral

DIRECTOR:
Mario Ceroni Galloso

EDITOR:
Luis Valles Fernández

EDITOR ASOCIADO:
Naldo Balarezo Genstein

Comisión Revisora (árbitros)

Beyer, Lothar	Angulo Cornejo, Jorge
Universidad de Leipzig - Alemania	Univ. Nac. Mayor de San Marcos - Perú
Calvo Buendía, Eduardo	Korswagen Ederi, Richard
Univ. Nac. Mayor de San Marcos - Perú	Pontificia Universidad Católica del Perú
Chávez Orellana, Haydee	Picasso, Gino
Univ. Nac. San Luis Gonzaga - Perú	Universidad Nacional de Ingeniería - Perú
García Herbosa, Gabriel	Rueda Sánchez, Juan Carlos
Universidad Burgos - España	Pontificia Universidad Católica del Perú
Gamboa Fuentes, Nadia	Rabinovich Jaitin, Daniel
Pontificia Universidad Católica del Perú	University of N. Carolina, USA
Guija Poma, Emilio	Gorriti, Carlos
Universidad Científica del Sur - Perú	Universidad Privada Antenor Orrego - Perú
Muñoz Jáuregui, Ana María	Troncoso Corzo, Luzmila
Universidad San Martín de Porres	Facultad de Medicina UNMSM - Perú
Lock Sing, Olga	Gutiérrez Correa, Marcel
Pontificia Universidad Católica del Perú	Universidad Nacional Agraria La Molina - Perú

Revista indizada en el Chemical Abstracts, SciELO y Latindex
Licenciada en EBSCO

Sede: Av. Nicolás de Araníbar 696 Santa Beatriz – Lima 01

Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú

Teléfono (511) 472-3925 Fax: (511) 265-9049

e-mail: revsqp@gmail.com / sqperu@gmail.com

Portal web: www.sqperu.org.pe

Ley 26905 – Hecho el depósito legal a la Biblioteca Nacional del Perú
Certificado N° 95-1567

Vol 76

ABRIL - JUNIO, 2010

N°2

En el Perú: N° suelto S/.15

Suscripción anual: S/. 60.00

En el extranjero: Suscripción anual: \$50.00

CONTENIDO

(Vol 76 N° 2 - 2010)

- *Editorial* 119

Trabajos originales

- Relevancia del pH en la adsorción de iones metálicos mediante algas pardas, por Norma A. Cuizano, Úrsula F. Reyes, Susana Domínguez, Bertha P. Llanos y Abel E. Navarro. 123
- Evaluación preliminar de la actividad coagulante del veneno de la serpiente peruana *Bothrops bilineatus*, “loro machaco”, por Edith Rodríguez, Gladys Cahuana, Gustavo A. Sandoval, Mirtha Yarlequé y Armando Yarlequé*. 131
- Cuantificación de taninos condensados en *Triplaris americana* L. (tangarana colorada), por Miguel Ángel Inocente Camones, César Fuertes Ruitón, Bertha Jurado Teixeira, Iris Giovana Mondragón Tarrillo, Evelyn Del Rosario Taype Espinoza. 138
- Ozonización del antibiótico trimetoprim: Evolución de la toxicidad durante la degradación, por Cristina Quispe, Luis Astudillo, Jorge Villaseñor, Álvaro Delgadillo. 149
- Aislamiento y caracterización parcial de una enzima similar a trombina del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*, “jergón”, por Gustavo A. Sandoval, Nora Ruiz, Fanny Lazo, Edith Rodríguez, Armando Yarlequé, Russolina B. Zingali. 156
- Adsorción de plomo de efluentes industriales usando carbones activados con H_3PO_4 , por Carmencita Lavado Meza, María del Rosario Sun Kou, Salvador Bendezú. 165
- Evaluación de metales pesados en el tóner usado en fotocopiadoras. Su relación con los trabajadores y medidas de mitigación, por María Elena Talavera Núñez, María Ofelia Guillén Zevallos. 179

Enseñanza de la Química

- Caracterización de bases de Schiff derivadas de 2-aminofenol, usando RMN 1D y 2D, por Sergio Zamorano, Juan Camus, Andrea Orellana, Maribel Osorio. 187

Informaciones

A. De la Sociedad Química del Perú

- Jueves Científicos (Conferencias). Nuevo director de Investigación de IQ en la Facultad de QIQ de la UNMSM. Premio al mérito científico 2009 en la UNMSM. 194

- B. Otras informaciones 196

Revista Arbitrada

Derechos Reservados : Prohibido el uso total o parcial del material de esta revista sin indicar la fuente de origen.

Nota: Las referencias comerciales que aparecen en los trabajos no constituyen una recomendación de la Sociedad Química del Perú.

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

La Revista de la Sociedad Química del Perú publica trabajos originales e inéditos de carácter científico, tecnológico y técnico en el campo de las ciencias químicas. La Revista acepta, preferentemente, los trabajos que expresen resultados valiosos, producto de las investigaciones científicas básicas o aplicadas, así como los de divulgación que, por su importancia y la claridad de su exposición, constituyan un material valioso para la comunidad científica y tecnológica. Busca también promover la investigación entre los jóvenes profesionales, publicando resúmenes de las mejores tesis de graduados universitarios o futuros profesionales.

Está dirigida a los investigadores y público interesado en la especialidad de las ciencias químicas. Se pone énfasis para su difusión en los centros académicos superiores.

La Revista, en formato impreso o electrónico, está dividida en las siguientes secciones: artículos de investigación, comunicaciones cortas, cartas al editor, artículos de revisión, educación química y de divulgación. Adicionalmente, la sección de informaciones está reservada a la SQP. Todos los artículos son revisados por la Comisión de Publicaciones, el corrector de estilo y por los árbitros que se designen.

Los artículos de investigación son el resultado de un trabajo experimental o teórico, producto de una investigación científica o tecnológica, que aporta un nuevo conocimiento. Se recomienda una extensión cercana a las 12 páginas a espacio simple.

Las comunicaciones cortas son trabajos cuya extensión no debe ser mayor a 4 páginas a espacio simple, escritas bajo las mismas características que un artículo de investigación. Están referidas a trabajos cortos concluidos, pero en los que hay urgencia en su publicación.

Las cartas al editor son comunicaciones que brindan la oportunidad para discutir, criticar o ampliar algunos puntos sobre los trabajos publicados en la Revista. Su extensión no debe exceder una hoja a espacio simple.

Los trabajos de revisión se basan en recopilaciones bibliográficas de temas en los que el autor tiene amplia experiencia. Se recomienda una extensión cercana a las 16 páginas a espacio simple. La Comisión de Publicaciones encomendará estos trabajos a especialistas en la materia.

Los artículos de enseñanza de la química son aquellos que proporcionan, en especial a los profesores y alumnos, una nueva visión, interpretación o aclaran los conceptos, teorías o experimentos químicos. Los requisitos que deben tener son: originalidad, importancia pedagógica, relevancia y claridad. Se recomienda una extensión cercana a las 12 páginas a espacio simple.

Las notas informativas corresponden a temas que no están relacionados a una investigación, pero son artículos que merecen ser divulgados, por ser de gran interés para la comunidad química. Se recomienda una extensión cercana a las 10 páginas a espacio simple.

Los autores de los trabajos publicados son los únicos responsables de la autenticidad y opiniones expresadas en los mismos. Todos los autores de un artículo deberán firmar una carta de presentación del trabajo como garantía de haber participado activamente en la investigación y redacción del artículo. Todas las comunicaciones entre la Comisión de Publicaciones y el autor principal se realizarán vía correo electrónico. El autor principal deberá responder los correos electrónicos en un plazo que no exceda los cinco días.

Los autores enviarán sus artículos impresos y en formato electrónico (diskette, disco compacto o al correo electrónico revsqp@gmail.com) a la Comisión de Publicaciones, junto con una carta dirigida al editor y abonarán 10 dólares por concepto de gastos administrativos, como adelanto del pago de la publicación, no reembolsables.

La publicación de cada trabajo está sujeta al pago siguiente: Cuando todos los autores son socios, S/. 90,00; cuando todos los autores no son socios, S/. 180,00; si entre los autores hay socios y no socios, S/. 135,00; cuando los autores residen en el extranjero, US \$ 100,00. Cuando el número de autores es superior a 3 se pagará, además, US \$ 10 por cada autor en exceso.

Formato para los artículos

1. El texto completo debe ser escrito en formato Microsoft Word, tamaño de página A4. Márgenes: izquierdo 3 cm, derecho 3 cm, superior 3 cm, inferior 3 cm. Espacio 2, fuente Times New Roman, estilo de fuente regular (salvo indicación contraria), color de fuente negro (texto y gráficos) y tamaño de fuente 12. Se imprimirá de manera vertical. Todo el texto, excepto el título, debe estar alineado a la derecha y a la izquierda (usar la opción "justificar").
2. Los idiomas de publicación son español e inglés.
3. El título del trabajo, que debe ser **breve y claro**, en español e inglés (este último antes del abstract) se escribe con tamaño de fuente 16, centrado y en negrita. Los nombres completos de los autores aparecerán a continuación con tamaño de fuente 12; el autor principal se identificará con un asterisco. Las instituciones de las que proceden los autores se escriben con tamaño de fuente 10 e irán a pie de página, donde también sólo el autor principal se identificará con un asterisco y colocará su correo electrónico, justo después de la dirección postal completa de su institución.
4. Se presentarán dos resúmenes, uno en español y otro en inglés (abstract), con una extensión aproximada entre 50 y 200 palabras. Las palabras Resumen y Abstract se escriben con tamaño de fuente 14, centrado y en negrita. Además, después del Resumen se deberá incluir entre 3 y 6 palabras clave, en español y en inglés. Tanto palabras clave como key words se escriben a la izquierda del texto, con el tamaño de fuente 12 y en negrita.
5. Deberá respetarse las normas internacionales referentes a la nomenclatura, símbolos y sistemas de medida. Los nombres científicos van en cursiva (italica).
6. En caso de artículos originales y comunicaciones cortas, el texto debe contener las siguientes secciones: Introducción, Parte Experimental, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos y Referencias. Estos títulos se escriben con tamaño de fuente 14, en negrita y centrados. Las cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y notas informativas, tendrán las secciones que el autor crea más conveniente.
7. Las tablas, figuras y esquemas, que no deben ser mayores a una página A4, tienen numeración arábiga seguido de punto y se escriben en negrita. A continuación se coloca la leyenda que explique su significado. La numeración y leyenda de una tabla, cuyo formato debe ser básico 1, se colocan en la parte superior, a diferencia de las figuras y los esquemas en los que se ubican en la parte inferior.
8. Las tablas, fotos, figuras y esquemas deben estar incluidos en el documento de Microsoft Word.

Las referencias se citan en el texto correlativamente como superíndice. El número de estas referencias no debe ser excesivo, fluctúan entre 7 y 15. La sección Referencias se escribe con tamaño de fuente 14, centrado y en negrita. Las abreviaturas de la revista se escribirán según el Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) y **Lis or Journals Indexed in Index Medicus**. Las referencias citadas se escribirán con el tamaño de fuente 10 y se seguirá el estilo de Vancouver. Se pueden descargar ayudas para escribir artículos del portal www.sqperu.org.pe

Editorial

Ing. Quím. Dionisio Ugaz Mont **Recordando su obra a los diez años de su partida** (01 de julio 1932 - 6 de mayo 2000)

Este seis de mayo se cumplieron diez años del sensible fallecimiento del Magíster Ing. Quím. Dionisio Ugaz Mont.

Nace en Chocope, La Libertad, Perú, el 1° de julio de 1932. Sus estudios de secundaria los realiza en Trujillo, capital de La Libertad. En la Universidad Nacional de la misma ciudad inicia los estudios de Ingeniería Química, terminándolos en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, UNMSM, Lima, donde se titula como Ingeniero Químico,

Durante sus estudios en San Marcos conoce a una joven, estudiante también en Ingeniería Química, dos años por detrás de él. Esa jovencita era Olga Lock. Terminados los estudios y estando ambos titulados, contrajeron matrimonio en enero de 1964.

A mediados de 1966 el Ingeniero Ugaz viaja a Monterrey, México, con una beca de la Fundación Ford, para estudiar una Maestría en Química en el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores, ITESM. Para entonces ya habían nacido sus dos primeros hijos: Alberto y Liliana. Un mes después le seguirían su esposa con sus hijos. Durante los últimos meses de ese año Olga consigue una beca de la OEA para estudiar una Maestría, también en Química, en el mismo Instituto. Dionisio lo hacía en la especialidad de Físico - Química y Olga en Química Orgánica.

Graduado con honores, el Ing. Ugaz recibió una oferta para trabajar como profesor e investigador en el Instituto, oferta que no fue aceptada, pues tenía un compromiso de regresar a trabajar a San Marcos, y así, la familia Ugaz - Lock vuelve al Perú en julio de 1968.

Incorporado a la Facultad de Química sufre una gran desilusión, pues el ambiente político en su alma máter no favorecía unas condiciones adecuadas para la docencia y la investigación. Es por eso que se ve obligado a dejar de pertenecer a San Marcos; y así, es llamado a laborar, por horas, en las universidades Villarreal, en la del Callao y en la Cantuta. A raíz de la revolución de Velasco, parecía que la situación en San Marcos iba a cambiar y acepta regresar al Programa de Estudios Generales.

En la Universidad Católica se había creado la especialidad de química unos meses antes, y el Ing. Ugaz es invitado a formar parte del grupo selecto de profesores en el Departamento de Ciencias. Se trataba de preparar un buen plan de estudio y de acondicionar la infraestructura, especialmente el equipamiento de los laboratorios. En 1972 su esposa Olga se incorporaría también a la PUCP, en el área de Química Orgánica. Pocos años después, los dos dejarían San Marcos, -Olga también había ingresado a la plana docente de ella- para dedicarse a tiempo completo a la Universidad Católica.

El Ing. Dionisio Ugaz se reveló, desde los inicios de su vida profesional como un profesor de alta calidad. Era un químico de corazón y veía en cada uno de sus discípulos a los propulsores de una ciencia tan ligada al desarrollo de la humanidad, y de la que el Perú estaba muy poco beneficiado.

Su sapiencia y el buen trato dado a sus alumnos, a pesar de su aparente rigidez y seriedad, le hicieron ganar un gran ascendiente moral. El sentir general queda plasmado en expresiones como las siguientes:

“Dionisio Ugaz fue un profesor nato; pero si revisamos su trayectoria profesional, también veremos que fue bastante más... Nuestra primera impresión del Ing. Ugaz fue la de un profesor serio, estricto, meticulado y un poco alejado de sus estudiantes ¡Qué fácilmente nos equivocamos los jóvenes! Al poco tiempo descubrimos que era, sí, todo lo serio y meticulado que esperábamos, pero tenía un fino sentido del humor y no era nada alejado de sus alumnos...” Liliana Eguren y Richard Korswagen, PUCP, Revista de Química vol. 14 - N°1, 2000.

“Su liderazgo y sus dotes de concertador complementadas con su visión y un inacabable y contagiante entusiasmo, hicieron posible, además, que generara y condujera importantes proyectos destinados a la difusión y fortalecimiento de la Química y sus aplicaciones en el Perú”, Isabel Díaz Tang, publicado en el portal de la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la PUCP.

El nivel académico de cualquier institución de educación lo marca el profesorado. El Ing. Dionisio Ugaz era muy consciente de ello. Como profesor de Físico-Química y coordinador de la especialidad en la Facultad de Ciencias e Ingeniería, veía cómo de año en año los conocimientos en química de los postulantes disminuían cada vez más. Es cierto que este hecho se observaba también en otros cursos de ciencias, pero en química era más notorio. La Química tiene su propio lenguaje y requiere de experimentos que ayuden a las mentes de los jóvenes en la asimilación de los conceptos. Los planes de estudio de la Secundaria dejan a la Química muy mal parada, especialmente por el número reducido de horas que le dedican, y ello sumado a la escasez de profesores con una preparación adecuada, están entre las causas principales que llevaron a esta situación. Tal es así, que la mayoría de las universidades eliminan las preguntas sobre química en los exámenes de admisión, o las reducen a un mínimo, con el objeto de no perder postulantes. La gravedad del problema llevó al Ing. Ugaz a emprender acciones para corregirlo.

Tomando como centro de acción el Departamento de Química de La Católica y la Sociedad Química del Perú, de la que era socio, aprovechaba las actividades científicas organizadas por ésta, como los congresos de química, jornadas simposios,... para plasmar sus ideas y proyectar sus actividades a nivel local y nacional.

En enero de 1985 se lleva a cabo la primera reunión de Decanos de las Facultades de Química e Ingeniería Química, durante el V-Simposio Peruano de Educación Química, organizado por la SQP, y en octubre del mismo año la segunda reunión, durante el XVI Congreso Peruano de Química. Estas reuniones, coordinadas por nuestro ingeniero continuarían en años posteriores. Entre sus objetivos estaba la organización de cursos de química para profesores de la Secundaria.

De estas reuniones de Decanos se llega a la creación de la Asociación Peruana de Facultades y Escuelas de Química e Ingeniería Química (APFEIQ), a principios de la década de los 90, siendo el Ing. Ugaz su primer presidente, y reelegido varias veces. Los cursos de Química para los profesores de los colegios estatales se unificaron a través de esta Asociación. En el verano de 1992 se dicta el primero, a nivel nacional, gracias a un convenio con el Ministerio de

Educación. Estos cursos duraban unas 4 semanas, durante las vacaciones del verano, de lunes a viernes, con unas 8 h diarias; incluían horas de exposición teórica, prácticas de aula y experimentos en el laboratorio. Llegaron a participar 18 universidades de Lima y provincias que tuvieran una o las dos especialidades: Química y/o Ingeniería Química. Al cortarse el presupuesto para estos cursos en el Ministerio de Educación, dejaron de darse a partir de 1997. Como presidente de la APFEIQ, el Ing. Dionisio Ugaz viaja con frecuencia a provincias: Cusco, Arequipa, Trujillo, Huancayo, Ayacucho... para coordinar las actividades programadas. Además, es invitado por algunas universidades, para asesorar en la creación de un post-gradado, instalación de laboratorios, o para dictar algún curso, dar conferencias,...Las universidades de Arequipa, (UNSA), Ayacucho, (UNSCH), e Ica, (UNSLG), lo nombraron Profesor Honorario. En 1999 fue nombrado Ingeniero del Año por la Sociedad Nacional de Ingenieros.

Es admirable la gran actividad profesional desarrollada por el Ing. Ugaz. Además de su recargada labor académica y administrativa en la PUCP, colaboró estrechamente con CONCYTEC, el Colegio de Ingenieros del Perú, del que fue Secretario General por dos periodos, la APFEIQ y la SQP.

En palabras de su viuda Olga, “Dionisio hizo también mucha labor institucional, y siempre era presidente de algo. Presidente de la cooperativa del Colegio Abraham Lincoln -donde estudiaban sus hijos-, Presidente de la SQP, Presidente de la APFEIQ, y hasta Presidente de la Asociación de Propietarios de la Urbanización Los Laureles. Además, presidía muchas comisiones en la PUCP, CONCYTEC, la SQP, el CIP”.

Una de las instituciones con la que colaboró mucho el Ing. Ugaz, al igual que su esposa Olga, fue CONCYTEC. He aquí el testimonio de dos ex presidentes del mismo.

“Conocí a Dionisio por más de 20 años. Amigo en toda la amplitud de la palabra, generoso, muy comprometido con el accionar institucional y confiable en grado exponencial. Se identificó con los propósitos de una vida ejemplar y en los de servir con profunda entrega”. Ing. Carlos del Río Cabrera.

“Dionisio Ugaz Mont supo ser un verdadero maestro universitario, nobilísimo amigo, prestigioso profesional e incansable institucionalista”. Ing. Carlos Chirinos Villanueva.

En la Sociedad Química del Perú (SQP) el Ing. Dionisio Ugaz desarrolló también una gran actividad. Como miembro de la misma, desempeñaba siempre con suma eficiencia los cargos que se le encomendaban; formó parte del Comité Organizador de los Congresos Peruanos de Química 9° (1971); 12° (1980) y 13° (1982). Presidente del Comité Organizador de los Congresos 18° (1993) y presidente de las II Jornadas Peruanas de Físico - Química (1992).

Fue elegido Presidente por cuatro años (dos periodos consecutivos, 1984 - 1988). Al iniciar su primer periodo esbozó el programa a desarrollar, terminando con estas palabras: “Hago un llamado a la comunidad química a que ayude con su experiencia a plasmar al profesional de la química que el Perú necesita para hoy y para mañana”.

Durante esos cuatro años se organizaron en la SQP importantes eventos científicos: Las VI Jornadas Peruanas de Bromatología y Nutrición en la ciudad de Huacho (1984); el V Simposio Peruano de Educación Química y la 1° Reunión de Decanos de las Facultades de Química e Ingeniería Química (enero 1985). El XIV Congreso Peruano de Química y la 2° Reunión de Decanos (octubre 1985); las VII Jornadas Peruanas de Bromatología y Nutrición en el Cusco

(octubre 1986); el XV Congreso Peruano de Química, las III Jornadas Peruanas de Fitoquímica y el VI Simposio Peruano de Educación Química (1987), en Lima. Durante esos años se dictan cursos a nivel universitario, y también para profesores de Química de los Colegios, lo mismo que conferencias a cargo de distinguidos profesionales peruanos y extranjeros. El local de la Sociedad Química fue remodelado y ampliado.

Una faceta muy importante en la vida del Ing. Ugaz ha sido su profundo sentido de familia. Como hijo y hermano supo siempre ayudar a los suyos; tal es así que, estudiante en la Universidad de Trujillo se sintió obligado a dejar los estudios por un tiempo, para trabajar y así ayudar a sus padres.

Dionisio y Olga formaron una familia numerosa, siempre muy unida. Sus seis hijos -3 varones: Alberto, Carlos y Jorge, y 3 mujercitas: Liliana, Patricia y Susann-, todos profesionales, formados en la Universidad Católica y varios con post-grado en el extranjero. Su padre estaba siempre al tanto de sus estudios y cuando alguien pasaba por alguna dificultad, lo sabía orientar hasta solucionarla. A pesar de su aparente austeridad y la exigencia de un trato de respeto hacia los padres, el ambiente era siempre muy cordial en la familia, y ¡no se diga nada cuando empezaron a llegar los nietos!; los cuatro que conoció el Ing. Ugaz, de un total de diez.

Dionisio y Olga formaron una interesante dupla. Estudiaron juntos Ingeniería Química en San Marcos, aunque Olga estaba dos años por atrás. Se casaron y ambos estudiaron una Maestría en Química, en Monterrey, México, favorecidos los dos con una beca. Ambos esposos coinciden, como profesores de Química en San Marcos. En 1972, Olga se incorporó a la sección de Química de la Universidad Católica donde ya trabajaba Dionisio hacía unos dos años; los dos se hicieron socios en la SQP, donde realizaron una labor muy importante, especialmente cuando ejercieron la Presidencia de la Sociedad Química, durante dos periodos (4 años), cada uno. De seguro que tanto Dionisio como Olga figurarán entre los grandes Presidentes de la SQP. Los Congresos de Química, nacionales o internacionales organizados durante ambas presidencias, o de los que fueron presidentes del comité organizador, figuran entre los más exitosos.

Sin duda alguna, la PUCP fue el crisol de sus grandes virtudes como docente y la fragua de donde salieron tantos excelentes profesionales químicos que formó el Ing. Dionisio Ugaz Mont a lo largo de 30 años; profesionales que le recuerdan con gratitud y admiración.

La Sociedad Química, por otra parte, le ofreció el campo propicio para proyectar su accionar a nivel nacional. Aquí tuvo como maestro y modelo al Dr. Juan de Dios Guevara, Secretario General vitalicio de la Sociedad Química, otro extraordinario profesor de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de San Marcos.

Ambos se fueron juntos al seno del Señor el 6 de mayo del 2000.

¡Dionisio Ugaz, Juan de Dios Guevara, os recordamos con cariño!

Lima, junio de 2010

Luis Valles F.
Editor

RELEVANCIA DEL pH EN LA ADSORCIÓN DE IONES METÁLICOS MEDIANTE ALGAS PARDAS

Norma A. Cuizano^a, Úrsula F. Reyes^a, Susana Domínguez^a, Bertha P. Llanos^{*a},
Abel E. Navarro^b

RESUMEN

El efecto del pH en el proceso de biosorción de metales pesados es evaluado considerando la química del ion metálico mediante experimentos discontinuos a temperatura ambiente. Se evaluó la adsorción de los iones metálicos de plomo, zinc, cobre, cadmio y oro con las algas marinas pardas *Lessonia nigrescens* Bory (L13) y *Macrocystis integrifolia* Bory (S12). Los resultados muestran un fuerte efecto del pH en la química acuosa del ion metálico dominada por aquo e hidroxio-complejos, la cual es condicionada por la propia acidez del catión. Experimentalmente se comprueba la preferencia de ambas algas por el ion Pb (II) y Cd (II). La afinidad de las algas con los iones estudiados sigue la tendencia: Pb>Cd>Zn≈Cu. El ion AuCl₄⁻ mostró una lenta cinética de formación de cloro e hidroxio complejos que depende fuertemente del pH, lo que sugiere un peculiar mecanismo por intercambio de ligandos en comparación del conocido intercambio iónico que fue observado para los cationes divalentes estudiados.

Palabras clave: biosorción, pH, metales pesados, algas pardas, especiación química.

RELEVANCE OF THE pH ON THE ADSORPTION OF METALLIC IONS BY BROWN SEaweEDS

ABSTRACT

The effect of the pH on the biosorption process of heavy metals is evaluated by considering the chemistry of the metal ions by means of batch experiments at room temperature. The adsorption of the metal ions of lead, zinc, copper, cadmium and gold were evaluated on the brown seaweeds *Lessonia nigrescens* Bory and *Macrocystis integrifolia* Bory. The results show a strong pH effect on the aqueous chemistry of the metal ions dominated by aquo and hydroxo complexes. This aqueous chemistry is conditioned by the own acidity of the cation. The preference of both algae towards the Pb (II) ion was experimentally confirmed. The affinity of the algae towards the studied metal ions followed the trend: Pb>Cd>Zn≈Cu. The AuCl₄⁻ ion showed a slow kinetics in the formation of chloro and hydroxyl complexes. These complexes strongly depended on the pH. This suggests a unique mechanism by ligands exchange rather than the well-known ionic exchange that was observed for the studied divalent cations.

Key words: biosorption, pH, heavy metals, brown seaweed, chemical speciation.

^a Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú.

^b Graduate School of Arts and Science, New York University, 100 Washington Square East, New York, NY, 10003, US. * bllanos@upch.edu.pe

INTRODUCCIÓN

La contaminación es un cambio perjudicial en las características físicas, químicas o biológicas del aire, tierra o agua que pueden afectar nocivamente al medio ambiente. Es decir, la contaminación se define como la presencia de concentraciones elevadas por encima de valores concretos, de ciertas sustancias, sedimentos u organismos en el agua o en la atmósfera¹. Para fines prácticos, en este trabajo, se utilizó la palabra contaminación para referirnos a cualquier cambio en la calidad natural del agua causada por factores químicos ya sean de origen natural o antropogénico².

Los constituyentes químicos de las aguas residuales son con frecuencia clasificados en inorgánicos y orgánicos; dentro de los diferentes tipos de contaminantes inorgánicos, no sólo en el agua, sino en el medio ambiente en general, los metales pesados han sido identificados como los contaminantes más peligrosos. Los metales pesados son aquellas sustancias que tienen una densidad superior a los cinco gramos por centímetro cúbico (cinco veces la densidad del agua)³; en cierto grado estos metales son solubles en agua, pero son más solubles a pH ácidos⁴. El rasgo distintivo de la fisiología de los metales pesados, es que muchos de ellos, y otros, son esenciales para el crecimiento como el Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo; éstos se utilizan en pigmentos respiratorios (hierro, cobre, vanadio), enzimas (zinc), vitaminas (cobalto) y otros procesos metabólicos. Los metales pesados resultan tóxicos cuando exceden las concentraciones normales; tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas⁵.

Entre los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad de los metales pesados se encuentran: 1) el desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales; 2) la modificación de la conformación activa de las biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos; 3) la ruptura de la integridad de las biomoléculas, y 4) la modificación de otros agentes biológicamente activos⁶. Los metales tóxicos están presentes sólo en pequeñas cantidades en casi todas las aguas naturales.

Desafortunadamente, los metales pesados forman parte de los residuos de actividades mineras, comerciales e industriales, debiendo ser removidos para evitar que se descarguen directamente al ambiente y provoquen alteraciones al mismo. Las actividades industriales generan una contaminación a gran escala con metales pesados; organismos tales como la Agencia de Protección Ambiental (EPA), han regulado los parámetros de descargas de aguas residuales; sin embargo, cuando las descargas industriales exceden los parámetros, muchas industrias diluyen sus descargas de materiales peligrosos.

Los metales son especies químicas no degradables ni biológica ni químicamente en la naturaleza; por tal motivo, una vez vertidos al medio ambiente, sólo pueden distribuirse entre los entornos: aire, agua y suelo, a veces cambiando su estado de oxidación, o incorporándose en los seres vivos. Los compuestos que contienen otros metales pueden alterarse, pero los metales pesados aún permanecen en las formas más tóxicas del metal. Debido a su movilidad en los ecosistemas acuáticos naturales y a su toxicidad para las formas superiores de vida, a los iones de metales pesados presentes en los abastecimientos de aguas superficiales y subterráneos se les ha dado prioridad como los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente⁷.

Bajo ciertas circunstancias estos elementos pueden almacenarse en concentraciones tóxicas y causar daños ecológicos. En la minería existe una exposición superficial con una alta concentración de los elementos tóxicos, dando por resultado la contaminación del suelo, de la biota y del agua². El término bioacumulación hace referencia a la acumulación neta, con el paso del tiempo de metales (u otras sustancias persistentes) en un organismo a partir de fuentes tanto bióticas como abióticas. El término biomagnificación significa la acumulación progresiva de ciertos metales pesados (y otras sustancias persistentes) de uno a otro nivel trófico sucesivo; está relacionada con el coeficiente de concentración en los tejidos de un organismo depredador en comparación con el de su presa.

En respuesta a este problema, durante la década pasada, la biorremediación ha sido vista como una solución tentativa, debida a su bajo costo y selectividad por metales pesados a bajas concentraciones. La eliminación de metales por biomasa muerta (biosorción) es más atractiva comparada al uso de células vivas (bioacumulación) debido a varias razones: el crecimiento y propagación de la biomasa pueden ser alteradas por la misma toxicidad del contaminante; a los cuidados que el crecimiento celular requiere y a la multiplicidad de mecanismos posibles^{8,9}; es por ello que la biosorción constituye una vía tecnológica útil para la biorremoción de metales tóxicos de aguas de desechos. En el presente trabajo se enfatiza en el uso de algas marinas para la eliminación de metales pesados de efluentes industriales debido a su abundancia en el litoral peruano, a su gran diversidad que las hace aplicables a distintos fines biotecnológicos y a su irrisorio costo en el mercado.

El rol del pH ha sido ampliamente estudiado para varios sistemas, reconociendo su fuerte influencia en el proceso de biosorción^{10,11}; lamentablemente, la información aún no es suficiente, quedando remanentes numerosas interrogantes sobre la relación de un mismo adsorbente frente a varios metales pesados; para tal efecto, se propuso como objetivo de este estudio, el evaluar diversos metales pesados (tóxicos y preciosos) ante dos algas marinas del litoral peruano, para analizar la contribución del pH que condiciona la eficiente interacción entre el ion metálico y la superficie del adsorbente.

PARTE EXPERIMENTAL

Soluciones: Se usó nitrato de cadmio II tetrahidratado, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, cloruro de oro III, AuCl_3 , y sulfato de zinc heptahidratado, $\text{Zn}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, de Sigma-Aldrich, nitrato de plomo II, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, y sulfato de cobre II de Merck, todos de grado analítico. Las soluciones stock fueron preparadas con agua desionizada, purificada por ósmosis reversa mediante el equipo Barnstead/Thermolyne (Dubuque, IA) D2714, el cual proporciona agua con una conductividad de 18 m Ω . Se prepararon diferentes soluciones de cada uno de los iones metálicos, mediante dilución de su respectivo stock hasta alcanzar la concentración deseada del ion metálico en cuestión.

El pH de las soluciones fue ajustado entre los valores de pH de 2 y 6 para Pb, Cd y Cu; entre 2 y 7 para Zn, y entre 2 y 5 para Au. Esto se llevó a cabo usando soluciones diluidas de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio. El pH fue controlado por un pH-metro Thermo Electron Corporativo Modelo: Orion 525 At. El rango estudiado de pH depende de la solubilidad del ion metálico en solución acuosa. Las soluciones de oro presentaron diferentes especies químicas que cambiaban con el tiempo, por lo que los valores de pH iniciales son aproximados.

Biomasa: Las algas marinas pardas *Lessonia nigrescens* Bory (L13) y *Macrocystis integrifolia* Bory (S12) fueron recolectadas de las playas de Tacna y Marcona en Perú, respectivamente, a una distancia aproximada de 200 m de la orilla. Las algas fueron lavadas con abundante agua potable, llevadas al laboratorio para su identificación taxonómica y mantenidas bajo refrigeración. Con el fin de descartar la presencia de otros iones metálicos en los adsorbentes, las algas fueron agitadas a 250 rpm durante 3h en una solución 3M de HCl. Luego se lavó las algas con agua tipo I hasta que el sobrenadante dio neutro al papel de tornasol. Finalmente, los adsorbentes fueron secados a temperatura ambiente, molidos y tamizados hasta alcanzar un diámetro de partícula entre 106 y 150 μm . Los biosorbentes se almacenaron en un desecador con sílica gel hasta su uso.

Pruebas de biosorción: Se llevaron a cabo experimentos discontinuos con los iones metálicos de plomo, zinc, cobre, cadmio y oro, bajo sus formas químicas: Pb(II), Zn(II), Cu(II), Cd(II) y AuCl_4^- , respectivamente. Estos iones metálicos fueron puestos en contacto con los mismos adsorbentes L13 y S12 a diferentes valores de pH, dependiendo de la precipitación de los metales. Para todos los metales (excepto oro) se mezcló 20mg de adsorbente con 100mL de solución del metal de concentración inicial de 100 ppm; para el oro, se mezcló 10mg del adsorbente con 50mL de solución de una concentración de 30 ppm. La diferencia de estos parámetros iniciales no afecta el equilibrio ya que la relación masa/volumen del adsorbente y solución se mantienen en una relación 1:5.

Las muestras por duplicado fueron sometidas bajo agitación orbital de 200 rpm durante 20 horas a temperatura ambiente. Luego de alcanzar el equilibrio (estudios preliminares), se filtró la mezcla en papel Whatman N°42 y se midió el contenido del ion metálico en el filtrado mediante un espectrofotómetro de absorción atómica a la llama (Perkin Elmer 3110).

Análisis de los datos: La cantidad de metal adsorbido fue calculado mediante:

$$q = (C_i - C_f) V / m$$

donde q es la capacidad de adsorción (mg de metal/ g de biosorbente), V es el volumen de la solución (mL), C_i es la concentración inicial de metal en solución ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), C_f es la concentración en el equilibrio de la solución ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), y m es la cantidad de biosorbente seco (g).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La adsorción de metales pesados por biopolímeros es fuertemente influenciada por el pH del medio. Dicho efecto es (i) a nivel de la disponibilidad de los iones metálicos en su forma adsorbible en solución acuosa y (ii) a nivel de la activación de grupos funcionales (potenciales centros de adsorción) en la superficie del adsorbente. Se evaluó (i) sometiendo diferentes iones metálicos (aniónico y catiónicos) con los mismos adsorbentes L13 y S12.

La formación de aquo e hidroxocomplejos de metales en solución acuosa, condiciona la especiación química en la cual el ion se encuentra presente¹²; dicho comportamiento es regulado por el pH, entendido como el equilibrio de los iones hidronio y oxhidrilo en solución; de tal forma que proporciona los ligandos a los que estará unido el ion metálico.

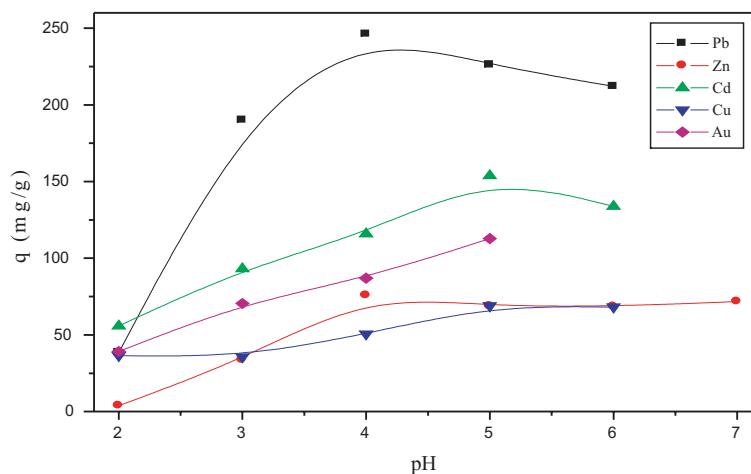


Figura 1. Efecto del pH en la biosorción de diferentes iones metálicos con el alga marina L13

Para el presente estudio se seleccionaron cuatro cationes divalentes (Pb, Zn, Cd y Cu); por ser de importancia biológica (cobre y zinc) y por su impacto en la contaminación de efluentes mineros e industriales (Pb y Cd) y un anión monovalente AuCl_4^- , representando a los metales preciosos. Las figuras 1 y 2 muestran los resultados del efecto del pH ante los citados iones metálicos, los cuales pueden analizarse desde tres puntos de vista: i) superioridad del ion Pb (II) frente a todos los demás iones como adsorbatos; ii) la adsorción de todos los iones metálicos entre valores de pH de 4 y 5; y iii) efecto del pH y la química acuosa de los iones metálicos.

- i) La superioridad del ion Pb (II) frente a otros metales pesados ha sido demostrada anteriormente¹³⁻¹⁵. Dicha superioridad es explicable en base al concepto de la acidez de Lewis, definida como la relación masa/carga de determinado catión. Poseer una gran masa involucra tener un volumen adecuado que genera una eficiente separación de cargas dentro del ion metálico, permitiendo una alta polarización dentro del ion que minimiza las repulsiones electrón-electrón entre el adsorbente y adsorbato. Es decir, si tenemos cationes isovalentes, el ion de mayor peso atómico será mejor y más eficientemente adsorbido en comparación de los demás, debido a su acidez y su interacción con pares de electrones libres del adsorbente será favorecida. Esta hipótesis ha sido corroborada anteriormente¹². Según los resultados obtenidos; esta hipótesis se cumple ya que se observa la siguiente tendencia en capacidades de adsorción para los iones divalentes: $\text{Pb} > \text{Cd} > \text{Zn} \approx \text{Cu}$, en total acuerdo con la relación masa/carga.

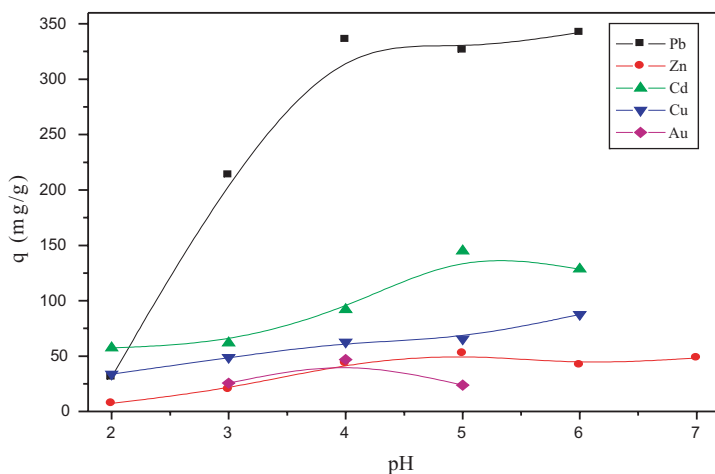


Figura 2. Efecto del pH en la biosorción de diferentes iones metálicos con el alga marina S12

- ii) El ion oro (III), bajo la forma AuCl_4^- , presente un efecto del pH en su adsorción en las algas marinas limitada por su solubilidad. Su relación masa/carga debería permitir altos valores de capacidad de adsorción (comparables al plomo), sin embargo, ese comportamiento no es observado. La baja adsorción de oro podría atribuirse a la constante asociación y disociación de complejos de oro con iones hidroxilo y cloruro que están presentes en la solución y que constituyen fuerte competidores frente a los centros de adsorción de las algas marinas.

Si pensamos acerca de un mecanismo tentativo de iones Au (III), podríamos descartar completamente la presencia de interacciones electrostáticas, ya que todos los complejos posibles de Au (III) están cargados negativamente y, por ende, se repelen en la superficie negativa del adsorbente debido a los alginatos. Por otro lado, si descartamos una interacción electrostática, cabría la posibilidad de otros dos tipos de interacciones: dipolo-dipolo y de dispersión. Las interacciones dipolo-dipolo también estarían dejadas de lado, ya que AuCl_4^- es una especie negativa y la superficie de las algas poseen una alta densidad electrónica debido a la presencia de polialginatos, hidroxilos y fucoidanos¹⁶. La repulsión de polaridades negativas tendría un costo energético muy alto para que la adsorción se lleve a cabo. Finalmente, las fuerzas de dispersión, son interacciones muy débiles, presentes en todos los compuestos y elementos. La pequeña contribución de las fuerzas de dispersión produciría una adsorción casi despreciable o muy reducida. Sin embargo, los resultados muestran capacidades de adsorción alrededor de 115 mg/g para el alga L13, que está muy por encima de la adsorción de iones Zn y Cu. Incluso para S12, que reporta una menor capacidad de adsorción de Au, la adsorción de AuCl_4^- es comparable con la adsorción de Zn (II). Si bien, se necesitan más estudios al respecto, podríamos sugerir un intercambio de ligandos para Au (III). Es decir, el ion áurico está unido a 4 ligandos cloruro o hidroxilo, pero en contacto con los pares de electrones libres

de los adsorbentes, un ligando cloruro es substituido por un centro de adsorción, que pasaría a ser un nuevo ligando. Este tentativo mecanismo de adsorción, estaría de acuerdo con la capacidad de adsorción, ya que este nuevo complejo sería poco estable debido al impedimento estérico generado por el nuevo ligando provenientes de los adsorbentes y los tres ligandos cloruros o hidroxilo que rodean al ion áurico. Dado que el mecanismo sería un simple intercambio de ligandos, la carga de la superficie del adsorbente pasa a segundo plano y el efecto del pH residiría especialmente en la formación de iones complejos de Au (III).

- iii) La química acuosa del ion metálico es el rol más importante que desempeña el pH en la adsorción de iones metálicos¹². Los metales de transición, entre los cuales se encuentran la mayoría de los metales pesados, se caracterizan por su habilidad en la formación de complejos de coordinación con ligandos que poseen pares de electrones libres, en busca de la estabilización de sus orbitales *d* vacantes o parcialmente llenos. La molécula de agua es un excelente ligando y la formación de aquo-complejos es inevitable. A mayor número de ligandos rodeando un catión metálico, mayor será su radio iónico y su volumen, convirtiéndolo al catión en una especie estéricamente impedida para una eficiente interacción con la superficie del adsorbente. La formación de complejos con el agua es regulada por el pH, ya que a altos valores de pH, la concentración de iones oxhidrilo aumenta en la solución y es capaz de formar hidroxocomplejos, los cuales no sólo aumentan el volumen del catión sino que disminuyen su carga neta, disminuyendo también su afinidad con el adsorbente.

Mediante estudios de especiación química en soluciones acuosas, ha sido demostrado que el ion Pb (II) se mantiene en su forma Pb (II) como especie predominante hasta pH 4, pH al cual la especie Pb(OH)⁺ aparece como nueva especie emergente. Los iones Cd (II)¹⁸ y Zn (II)¹⁹ tienen un comportamiento muy similar teniendo a las especies Cd (II) y Zn (II) como iones predominantes por debajo de pH 5,5 y presentado a los iones Cd(OH)⁺ y Zn(OH)⁺ como iones emergentes a valores de pH más altos. El ion Cu (II) tienen una química acuosa un poco más complicada²⁰, pero la especie predominante en todo el rango de pH es Cu(II); otras especies que se pueden encontrar son Cu(OH)⁺ en muy bajas concentraciones. Todos estos valores de pH concuerdan perfectamente con el pH óptimo para los iones metálicos estudiados; por ejemplo para Pb (II) y Zn (II) la máxima capacidad de adsorción se observó alrededor de 4 -5 para ambas algas, mientras que para Cd (II) fue de alrededor de 5 para ambas algas L13 y S12. En el caso de cobre, ya que la especiación química no es el factor más importante, la adsorción dependería básicamente del adsorbente; por lo tanto mientras más negativo se encuentre el adsorbente, mayor será la adsorción de ion cobre II. Dado que a pH mayores de 3,0, la superficie del adsorbente está negativamente cargado¹⁶, es de esperarse que valores de pH altos, producirán una mayor adsorción para el ion Cu (II).

CONCLUSIONES

El material propuesto es una excelente herramienta, útil para el entendimiento del efecto del pH en el proceso de adsorción de metales tóxicos y preciosos y promueve el uso coherente de biopolímeros naturales presentes en biomasa de desecho para la adsorción selectiva de los mismos. La evaluación del efecto del pH con respecto al adsorbato, por medio de distintos iones metálicos elucida la gran complejidad de la química acuosa de los iones metálicos, cuya

especie química predominante depende fuertemente de la acidez del medio, sin dejar de lado la importancia de la acidez del catión, necesaria para competir con otros iones por los sitios activos en la superficie del adsorbente.

De los resultados experimentales se concluye la preferencia de los biosorbentes por el ion plomo divalente sobre los demás iones (cationes y aniones) a iguales condiciones experimentales, siendo la acidez de Lewis del ion plomo (II) la responsable de esta diferencia.

La afinidad de las algas estudiadas sigue la tendencia: $Pb > Cd > Zn \approx Cu$. Asimismo, las algas marinas poseen una alta afinidad hacia metales pesados gracias a la alta concentración de grupos carboxilo de polialginatos, los cuales se cargan negativamente a pH mayores de 3,0.

Finalmente, queda demostrado que la adsorción de cationes divalentes como Pb, Zn, Cd y Cu se da principalmente por vía electrostática (intercambio iónico), mientras que para la adsorción de Au se propone un mecanismo peculiar que involucra un intercambio de ligandos. Esto confirma la lenta cinética en la formación de iones complejos condicionada por el pH.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresamos nuestra sincera gratitud al Fondo Concursable de Apoyo a la Investigación de la UPCH y al Departamento Académico de Química por el apoyo brindado para la realización de esta investigación. También hacemos extensivo nuestro agradecimiento a las señoritas Ivonne Chión y Ángela Manrique por su colaboración en el proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Horsfall M., Abia A., *Water Res.*, 2003; 37, 4913-4923.
2. Guibal E., Roulph C., Le Cloriec P., *Environ. Sci. Technol.*, 1995; 29, 2496-2503.
3. Cotton F., Wilkinson G., *Química Analítica Avanzada*. México: Ed. Limusa; 1976.
4. http://es.wikipedia.org/wiki/Metal_pesado
5. Baran EJ., *Química Bioinorgánica*. Madrid: Ed. McGraw-Hill; 1995.
6. Jain C., Singhal D., Sharma M., *J. Hazard. Mater.*, 2004; B114, 231-239.
7. Volesky B., *Biosorption and Biosorbents*. Florida: CRC Press; 1990.
8. Bishop P., *Pollution prevention: fundamentals and practice*. Beijing: Tsinghua University Press; 2002.
9. Volesky B., *Hydrometallurgy*, 2001; 59, 203-219.
10. Schiewer S., Volesky B., *Environ. Sci. Technol.*, 1997; 31, 1863-1871.
11. Mohapatra H., Gupta R., *Bioresour. Technol.*, 2005; 96, 1387-1398.
12. Pagnanelli F., Esposito A., Toro L., Veglio F., *Water Res.*, 2003; 37, 627-633.
13. Sheng P., Ting Y., Chen J., Hong L., *J. Colloid Interface Sci.*, 2004; 275, 131-141.
14. Suzuki Y., Kametani T., Maruyama T., *Water Res.*, 2005; 39, 1803-1808.
15. Chojnacka K., Chojnacki A., Gorecka H., *Chemosphere*, 2005; 59, 75-84.
16. Navarro A., Portales R., Sun-Kou R., Llanos B., *J. Hazard. Mater.*, 2008; 156, 405-411.
17. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/825>
18. The World Health Organization "Cadmium, Environmental Aspects". Finlandia: WHO, 1992.
19. Campos K. Selección del mejor biosorbente para la Biosorción de ion Zinc (II): Modelamiento y Cinética, Tesis para optar el título de Licenciado en Química, UPCH, Perú, 2004.
20. <http://www.cec.uchile.cl/~cabierta/revista/15/articulos/pdf/paper4.pdf>

EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops bilineatus* “LORO MACHACO”

Edith Rodríguez¹, Gladys Cahuana¹, Gustavo A. Sandoval¹,
Mirtha Yarleque¹ y Armando Yarleque^{1*}

RESUMEN

Bothrops bilineatus es una serpiente arborícola causante de numerosos accidentes humanos en la amazonía peruana. A partir del veneno completo se ha realizado una exploración de la actividad coagulante empleando plasma citratado y fibrinógeno comercial, así como diversos sustratos cromogénicos. Para ello, se han realizado ensayos de tiempo de coagulación con plasma humano citratado y fibrinógeno bovino 5 mg/ml en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4, midiéndose también la actividad amidolítica sobre BApNA y esterásica sobre TAME y BAEE. Adicionalmente, el veneno fue fraccionado en una columna de filtración molecular de Sephadex G-100 con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 6,0, analizando la actividad enzimática en cada una de las fracciones. Además, se ha obtenido el perfil electroforético mediante análisis de PAGE-SDS. Como resultado de este estudio se ha determinado que el veneno total de *B. bilineatus* posee una actividad de 0,59 U/mg sobre plasma y 0,17 U/mg sobre fibrinógeno, siendo estos valores 60% menores en comparación con el veneno ofídico más coagulante estudiado en el Perú (*Lachesis muta*). Así también, las fracciones con actividad coagulante están asociadas a la actividad amidolítica y esterásica. El perfil cromatográfico obtenido corresponde a tres picos proteicos eluidos con valores de Ve/Vo de 1,1, 1,5 y 2,4, mientras que los electroferogramas obtenidos muestran al menos 10 bandas proteicas entre los 15 y 70 kDa.

Palabras clave: *Bothrops bilineatus*, veneno, coagulación.

PRELIMINAR EVALUATION OF COAGULANT ACTIVITY OF *Bothrops bilineatus* PERUVIAN SNAKE VENOM “LORO MACHACO”

ABSTRACT

Bothrops bilineatus is a tree snake whose bite causes many accidents in peruvian jungle. Using whole venom, we made an exploration of its coagulant activity using citrated plasma and commercial fibrinogen, as well as different chromogenic substrates. In this way, we assayed coagulation time on human citrated plasma and bovine fibrinogen 5 mg/ml in Tris-HCl buffer 0,05 M pH 7,4, and also amidolytic and esterasic activities on BApNA, TAME y BAEE, respectively. On the other hand, this venom was fractionated in a size exclusion chromatography using Sephadex G-100 in ammonium acetate buffer 0,05 M pH 6,0, measuring coagulant and amidolytic activities on each fraction. Furthermore, we obtained electrophoretic profiles using SDS-PAGE gels. As a result of this study, we found *B. bilineatus*

¹ Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú

* e-mail: ayarlequec@unmsm.edu.pe

venom has activity on plasma (0,59 U/mg) and fibrinogen (0,17 U/mg), being these values 60% lower in compare with the most coagulant venom studied in Peru (*Lachesis muta*). Also, fractions obtained with coagulant activity were associated with amidolytic and esterase activities. Chromatographic profiles showed three main peaks eluted with V_e/V_o of 1,1, 1,5 and 2,4, respectively, while electropherograms obtained, at least 10 protein bands between 15 and 70 kDa.

Key word: *Bothrops bilineatus*, venom, coagulation.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los componentes de venenos de serpientes que afectan el sistema hemostático no sólo implica el conocimiento de sus características químicas y de sus efectos biológicos sino también de otras características bioquímicas, farmacológicas, fisiológicas e inmunológicas¹. Entre los principales procesos afectados por la acción de estas ponzoñas, se encuentra la coagulación sanguínea, la cual es el resultado de un complicado proceso cuya etapa final es la transformación del fibrinógeno a fibrina por acción de la trombina².

En nuestro país, se han realizado investigaciones sobre la capacidad coagulante de los venenos ofídicos^{3,4}, incluyendo diversas especies del género *Bothrops* y el veneno de la serpiente *Lachesis muta*, determinándose que este último presente la mayor actividad coagulante tanto sobre plasma humano como sobre fibrinógeno comercial⁵. Sin embargo, existen pocos estudios utilizando el veneno de las serpientes arborícolas, los cuales presentan marcadas diferencias en su acción biológica, con respecto a las demás serpientes⁶. Dentro de las serpientes arborícolas presentes en el Perú, se encuentra *Bothrops bilineatus*, comúnmente llamada “loro machaco”; es una serpiente venenosa cuyo color verde intenso suele ser motivo para confundirla con la boa *Corallus caninus*, especie que no posee veneno y por esta razón los pobladores nativos suelen destruir a esta última temiendo recibir una mordedura. Morfológicamente *B. bilineata* tiene las siguientes características: su tamaño varía entre 60 a 80 cm, su cabeza es triangular con pequeñas escamas de color verde, las cuales muestran un tramado a manera de puntos oscuros; todo el dorso hasta la cola es de color verde turquesa y el vientre crema con estriaciones transversales⁷. Aunque su distribución es amplia en la selva peruana, se le encuentra con mayor frecuencia en los departamentos de Amazonas, Loreto, San Martín y Junín.

Nuestro interés en el estudio del veneno de *Bothrops bilineatus* tiene como origen el conocimiento de la acción de esta serpiente sobre presas que no sólo pueden trepar árboles, como los roedores u otros pequeños mamíferos, sino también sobre las aves de las que eventualmente pueden alimentarse, ya que el hecho de que la serpiente venenosa es arborícola indica que las principales proteínas bioactivas de este veneno estarían dirigidas a inmovilizar aves y mamíferos trepadores considerados como sus presas predilectas, las cuales por su movilidad podrían escapar muy fácilmente al ataque de estas serpientes a no ser que su veneno produjera un severo e inmediato cuadro de intoxicación⁸. Por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo realizar una evaluación preliminar del veneno de *B. bilineatus* relacionada principalmente con su actividad coagulante sobre sustratos naturales como el plasma y el fibrinógeno, así como sobre sustratos sintéticos.

PARTE EXPERIMENTAL

Veneno

Se empleó veneno de la serpiente peruana *Bothrops bilineatus* obtenido a partir de ejemplares procedentes de la región de Pucallpa, departamento de Ucayali y mantenidos en cautiverio en

el serpentario "Oswaldo Meneses" del Museo de Historia Natural (UNMSM). La extracción de la ponzoña se realizó por presión manual de las glándulas, siendo este fluido liofilizado y conservado a 4 °C hasta su utilización.

Contenido proteico

La cantidad de proteína fue calculada midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm⁹ en un espectrofotómetro Shimadzu UV 120-02. Además, se empleó el método de Lowry¹⁰ modificado en nuestro laboratorio³ utilizando un fotocolorímetro Spectronic Bausch & Lomb, y empleando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

Actividad coagulante

Se midió la capacidad de coagulación del veneno crudo sobre el plasma humano citratado, en comparación con el fibrinógeno bovino comercial. Para ello se extrajo sangre venosa de personas voluntarias, la cual fue mezclada con citrato de sodio al 3,8% y centrifugada por 20 minutos a 1000 rpm, obteniéndose la fracción sobrenadante correspondiente. Para los ensayos se tomaron 0,2 ml de plasma citratado y 0,1 ml de veneno crudo a diversas concentraciones, incubándose las muestras a 37 °C hasta la obtención del coágulo total y registrándose los tiempos en segundos⁴. Asimismo se probó la actividad del veneno sobre una solución de fibrinógeno bovino 5 mg/ml. en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. Una unidad de actividad (U) se define como la inversa del tiempo de coagulación en segundos.

Actividad amidolítica

Se determinó según el método de Erlanger et al.¹¹, para lo cual se preparó una mezcla que contenía 2 ml de sustrato BApNA (benzoyl arginil *p*-nitroanilida) 9×10^{-4} M, 0,6 ml de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,1 y 0,1 ml del veneno crudo. Las mezclas fueron incubadas a 37 °C por 10 minutos deteniéndose la reacción con 0,6 ml de ácido acético al 60% para luego medir su absorbancia a 405 nm. Una unidad de actividad (U) es expresada como μ moles de *p*-nitroanilida liberados por minuto.

Actividad esterásica

Esta actividad fue ensayada siguiendo el método de Devi et al.¹² utilizando 1 ml del sustrato TAME (tosil arginil etil éster) o BAEE (benzoyl arginil etil éster) 2 mM y 1,9 ml de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,5. La mezcla se incubó por 3 min a 37 °C adicionándose a continuación 0,1 ml del veneno crudo y registrándose los incrementos de absorbancia a 247 nm hasta 10 minutos. Una unidad de actividad (U) corresponde a la cantidad de μ moles de TAME o BAEE hidrolizados por minuto.

Fraccionamiento cromatográfico

El veneno liofilizado (60 mg) fue resuspendido en solución buffer acetato de amonio 0,05 M pH 6,0, eliminándose los restos insolubles por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue aplicado a una columna de filtración molecular de Sephadex G-100 SF (1,5 x 46,5 cm) equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 6,0. La elución se realizó a temperatura ambiente colectándose fracciones de 2 ml en un colector automático Pharmacia 121 LKB. La elución de las proteínas de la columna se realizó con el mismo buffer y se estimó la actividad enzimática de cada fracción obtenida sobre BApNA.

Análisis electroforético

Se empleó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes con SDS (PAGE-SDS)¹³. La corrida electroforética se realizó aplicando 100 V constantes durante 1 h. Luego el gel fue teñido con azul brillante de Coomassie 0,1% por 10 min, para luego ser decolorado hasta evidenciar las bandas proteicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad enzimática del veneno de *B. bilineatus*

El veneno completo de *Bothrops bilineatus* fue capaz de coagular el plasma humano citratado y el fibrinógeno bovino, donde se encontraron actividades específicas de 0,59 y 0,17 U/mg, respectivamente (tabla 1). Dicha ponzoña también mostró capacidad para hidrolizar sustratos sintéticos como el BApNA con una actividad específica de 0,018 U/mg, mientras que sobre ésteres sintéticos de arginina como el TAME y el BAEE mostró una actividad de 1,04 U/mg y 0,85 U/mg, respectivamente.

Tabla 1. Actividad enzimática del veneno total de *Bothrops bilineatus* sobre diferentes sustratos en comparación con el veneno de *Lachesis muta*

Sustrato	pH	Actividad específica (U/mg proteína)	
		<i>B. bilineatus</i>	<i>L. muta</i>
Plasma citratado	7,4	0,59	1,60
Fibrinógeno bovino	7,4	0,17	1,73
BApNA	8,1	0,018	0,078
TAME	7,5	1,04	7,16
BAEE	7,5	0,85	3,95

Separación cromatográfica del veneno de *B. bilineatus*

Empleando una cromatografía en Sephadex G-100 SF (figura 1), el veneno fue fraccionado en tres picos de proteína con valores de V_e/V_o correspondientes a 1,1, 1,5 y 2,4, respectivamente. Además, se encontró que las fracciones correspondientes al primer pico presentaron actividad enzimática sobre BApNA.

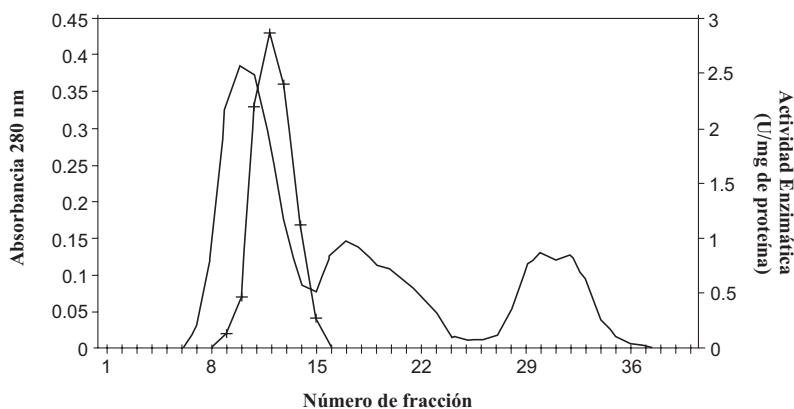


Figura 1. Cromatografía de filtración molecular del veneno de *Bothrops bilineatus* empleando Sephadex G-100 SF. Absorbancia a 280 nm (---) y actividad amidolítica sobre BApNA (++++)

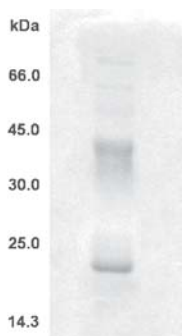


Figura 2. Perfil electroforético del veneno de *Bothrops bilineatus* empleando PAGE-SDS (10%)

Perfil electroforético

La figura 2 muestra el patrón proteico obtenido para el veneno de *B. bilineatus* mediante PAGE-SDS en condiciones no reductoras empleando geles de poliacrilamida al 10%. Del análisis respectivo se pudieron detectar al menos 10 bandas proteicas, comprendidas en el rango de peso molecular de 14 a 70 kDa. Además, el mayor número de bandas se agrupó alrededor de los 40 kDa.

El mecanismo de coagulación sanguínea es un proceso complicado que tiene como finalidad la conversión del fibrinógeno plasmático (factor I) en fibrina por acción de una proteasa específica, la trombina, que hidroliza los enlaces arginil-glicil del fibrinógeno. La molécula del fibrinógeno presenta una estructura trinodular; está formada por tres pares de cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro; tales cadenas son 2 A α , 2 B β y 2 γ . La propiedad coagulante de la trombina radica en la liberación de dos pares de pequeños péptidos polares, los fibrinopéptidos A y B de las cadenas A α y B β , respectivamente, convirtiendo al resto de la molécula en el monómero de fibrina. Estos monómeros, a su vez, se polimerizan espontáneamente mediante dos diferentes clases de interacciones moleculares, “extremo a extremo” y lateral, para formar el coágulo insoluble de fibrina.

Actividad enzimática del veneno de *B. bilineatus* sobre diferentes sustratos

En el presente estudio se evaluó la capacidad coagulante del veneno de *B. bilineatus* utilizando en primer lugar sustratos naturales como el plasma citratado y el fibrinógeno comercial¹⁴. Por un lado la acción coagulante sobre el plasma indica la presencia de compuestos activadores de la cascada de coagulación sanguínea, los cuales varían tanto en su concentración, así como en su actividad y especificidad. Por otro lado, el veneno de *B. bilineatus* pudo coagular el fibrinógeno bovino, indicando que presenta dentro de su composición al menos una enzima con actividad similar a trombina.

La evaluación de las propiedades cinéticas de enzimas coagulantes presentes en los venenos y que estén relacionados con la coagulación sanguínea es complicada por dos hechos: 1) la naturaleza del sustrato: una proteína y 2) la especificidad de la enzima. Si bien se puede establecer la naturaleza coagulante de un veneno utilizando sustratos naturales, como el plasma citratado o fibrinógeno bovino, se requiere de sustratos sintéticos que imiten las estructuras involucradas en el enlace peptídico del sustrato original y que faciliten su detección en un ensayo *in vitro*¹⁵. Este tipo de compuestos posee en su extremo carboxilo terminal, un grupo cromógeno como la *p*-nitroanilida, el cual es liberado como parte de la hidrólisis y es detectado espectrofotométricamente a 405 nm.

De los ensayos con sustratos sintéticos, se encontró que el veneno de *B. bilineatus* presentó actividad amidolítica sobre BApNA y esterásica sobre TAME y BAEE. En el caso del BApNA, este tipo de sustrato permite la caracterización de enzimas del grupo de las serinoproteasas como la tripsina y quimiotripsina y al cual pertenecen diversas enzimas coagulantes como las enzimas similares a trombina y los activadores de diversos factores de coagulación, entre ellos la protrombina y el factor X¹⁶. Por otro lado, el empleo del TAME y el BAEE, por su estructura molecular, permite la caracterización de enzimas que hidrolizan el enlace éster entre la arginina y el grupo metilo. La capacidad del veneno completo para hidrolizar este tipo de sustratos nos indica que están presentes enzimas que pertenecen al gran grupo de proteasas esterásicas¹². Este análisis también fue realizado utilizando el veneno completo de *Lachesis muta*, empleando tanto sustratos naturales como cromogénicos para su caracterización⁴.

El análisis comparativo de la actividad coagulante de los venenos de *B. bilineatus* y de *Lachesis muta* (tabla 1), señala claramente que el primero de ellos sólo registra un 40% de la actividad coagulante registrada en su homóloga, lo que en apariencia puede significar una pobre acción coagulante del veneno en estudio. Habiendo determinado que el veneno crudo es capaz de coagular el fibrinógeno y el plasma citratado, resulta necesario explorar la existencia de proteínas que participen en esta acción, entre ellas la enzima similar a trombina y algunos de los factores procoagulantes². Así, tenemos que la serpiente arborícola *Agkistrodon acutus*, llamada víbora de cinco pasos y que habita en el sudeste asiático, tiene una potente acción cardiotoxica. Del mismo modo, en la selva del noreste y en la región central del África habitan las especies arborícolas del género *Dendroaspis*, conocidas como “mambas”, las cuales son temidas por su agresividad, velocidad de desplazamiento y por su potente veneno neurotóxico. Por ello, asumimos que el veneno de *B. bilineatus* podría contener otros principios activos que afectaran directamente el sistema circulatorio produciendo severos desórdenes responsables de una rápida y masiva coagulación y por tanto, de la falta de oxigenación tisular.

Patrón electroforético del veneno de *B. bilineatus*

Los venenos de serpientes son consideradas mezclas complejas de diversos componentes proteicos, comprendiendo tanto enzimas como toxinas¹⁷. Una de las técnicas más empleadas para su estudio es la electroforesis en geles de poliacrilamida¹³, la cual se basa en la migración de proteínas a través de un campo eléctrico. Esta técnica es útil como un método analítico, ya que las proteínas pueden ser separadas y visualizadas, sean analizadas en su conformación nativa como denaturada.

A fin de realizar un análisis inicial de los componentes proteicos del veneno de *B. bilineatus*, se realizaron electroforesis mediante la técnica de PAGE-SDS¹³ (figura 2). Los resultados muestran un patrón característico distinto para el contenido proteico de este veneno comparado con otros venenos de serpientes descritos previamente por nuestro laboratorio⁵. Se pudieron observar bandas notorias concentradas entre los 20 y 40 kDa, además de bandas proteicas alrededor de los 50 y 70 kDa. Estos pesos moleculares indicarían la presencia de compuestos como las miotoxinas (20-25 kDa), hemorraginas (19-20 kDa), proteínas coagulantes (30-40 kDa), así como L-aminoácido oxidasas (60 kDa). Es claro notar que la diversidad de compuestos proteicos así como la abundancia y posición relativa de las bandas electroforéticas permite hacer una clara distinción entre este veneno con otros descritos previamente¹⁸.

CONCLUSIONES

La presente investigación ha permitido de forma preliminar que el veneno de la serpiente arborícola peruana *Bothrops bilineatus* actúa sobre diversos componentes de la cascada de coagulación, entre ellos el fibrinógeno, activando esta importante vía y permitiendo una

rápida inmovilización de sus presas. Además, el veneno de esta serpiente presenta un patrón particular de proteínas lo cual permitirá su rápida identificación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo agradecen a la International Foundation for Science (IFS) de Suecia, por su importante y valiosa ayuda financiera para la ejecución de investigaciones sobre principios coagulantes de venenos de serpientes peruanas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Braud S., Bon C., Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. 2000;82(9-10):851-9.
2. Stocker K. Snake venom proteins affecting hemostasis and fibrinolysis. In: Stocker K (ed): *Medical Use of Snake Venom Proteins*. Boca Raton, CRC Press, 1990, pp 97-160.
3. Loayza S., Morante Y., Campos S., Yarlequé A. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Bol Soc Quím Perú*. 1985;52(3):151-63.
4. Yarlequé A., Campos S., Escobar E., Lazo F., Sánchez N., Hyslop S. *et al*. Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta muta* (peruvian bushmaster). *Toxicon*. 1989;27(11):1189-97.
5. Yarlequé A. Las serpientes peruanas y sus venenos. Lima: Fondo Editorial - UNMSM; 2000.
6. Campbell JA., Lamarck WW. The venomous reptiles of Latin America. Cornell University Press, Ithaca, New York, 1989.
7. Carrillo N., Icochea J. Lista taxonómica de los reptiles vivientes del Perú. Lima: Publicaciones del Museo de Historia Natural-UNMSM. Serie A, N° 49; 1995.
8. Instituto Nacional de Salud. Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos. Lima: El Instituto; 2004.
9. Warburg O., Christian W. Isolierung and Kristallisation der Garungs ferments enolase. *Biochem Z*. 1941;310:384-421.
10. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
11. Erlanger BF., Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 1961;95:271-8.
12. Devi A., Banerjee S., Copley AL. Coagulant and esterase activities of thrombin and *Bothrops atrox* venom. *Toxicon*. 1972;10(6):563-73.
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
14. Lu Q., Clemetson JM., Clemetson KJ. Snake venoms and hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1791-9.
15. Friberger P. Chromogenic peptide substrates. Their use for the assay of factors in the fibrinolytic and the plasma kallikrein-kinin systems. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1982;162:1-298.
16. Kini RM. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2005;34(4-5):200-4.
17. Chippaux JP., Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. 1998;36(6):823-46.
18. Boquet P. History of snake venom research. In: Lee C-Y (Ed). *Snake venoms (Handbook of experimental pharmacology: New Series; v. 52)*. Germany: Springer-Verlag; 1979. p. 3-14.

CUANTIFICACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS EN *Triplaris americana* L. (TANGARANA COLORADA)

Miguel Ángel Inocente Camones^{*a}, César Fuertes Ruitón^b, Bertha Jurado Teixeira^a,
Iris Giovana Mondragón Tarrillo^a, Evelyng Del Rosario Taype Espinoza^a.

RESUMEN

Se desarrolló y validó la cuantificación de taninos del extracto hidroalcohólico, mediante espectrofotometría ultravioleta-visible, donde el método resultó ser selectivo, lineal, preciso (repetible y reproducible) y exacto; se obtuvo como resultado para compuestos fenólicos totales: 13,5158 0,1825 g de ácido tánico/100 g de corteza; para taninos: 11,8590 0,5453 g de ácido tánico/ 100 g de corteza; y para taninos condensados: 1,62368 0,0784 g de ácido tánico/ 100 g de corteza.

Palabras clave: *Triplaris americana* L., cuantificación, taninos condensados, validación.

QUANTIFICATION OF CONDENSED TANNINS IN *Triplaris americana* L. (TANGARANA COLORADA)

ABSTRACT

It was developed and validated the quantification of tannins of the hydroalcoholic extract, by means of ultraviolet-visible spectrophotometry, where the method turned out to be selective, linear, precise (repeat and reproduce) and exact; they were obtained as a result for compound total phenolic: 13,5158 0,1825 g of tannic acid/ 100 g of bark; for tannins: 11,8590 0,5453 g of tannic acid/ 100 g of bark, and for condensed tannins: 1,62368 0,0784 g of tannic acid/ 100 g of bark.

Key words: *Triplaris americana* L., quantification, tannins condensed, validation.

INTRODUCCIÓN

Triplaris americana L., conocida vulgarmente como tangarana colorada, santo palo, cumbi, palo de hormiga, árbol de hormiga, es un árbol mirmecófilo de casi 16 metros de altura. *Triplaris americana* L. es una especie endémica de América; crece a los 350 msnm, en los departamentos de San Martín, Amazonas, Lima, Pasco, Junín, Huánuco, Loreto y Madre de Dios; también crece en países como Panamá, Guyana, Guyana Francesa, Surinam, Venezuela, Brasil, Bolivia, Colombia y Ecuador¹.

^{*a} Laboratorio de Farmacognosia y Medicina Tradicional. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Jr. Puno 1002. Jardín Botánico. Lima. Perú.
minocente@farmaceuticos.com ayrucosmetic@empresarios.com

^b Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Jr. Puno 1002. Jardín Botánico. Lima. Perú

En la medicina tradicional peruana se utiliza la decocción o infusión de su corteza por vía oral para curar infecciones intestinales, fiebre, diarrea, dolor de muelas². El PRODAPP (Programa de Desarrollo Alternativo en las Áreas de Pozuzo y Pacalzú) para la atención primaria de la salud (APS) recomienda el uso de esta planta para el tratamiento de la malaria, en la región Huánuco³.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar la presencia de taninos condensados y para realizar la cuantificación de fenoles totales, taninos y validación del método de cuantificación se utilizó el método de Lastra, H., 2000⁴, y para taninos condensados, el método de Waterman, P.⁵

PARTE EXPERIMENTAL

Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Farmacognosia y Medicina Tradicional, Bioquímica y Botánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Materiales y reactivos

Muestra

El material objeto de nuestro estudio estuvo constituido por la corteza de la especie *Triplaris americana* L. (polygonaceae), planta femenina, recolectada en el pueblo de Chazuta, provincia de Tarapoto, departamento de San Martín, en época de verano (etapa de floración). La recolección se realizó con GPS de 900 a 1000 metros y coordenadas: 06°50'S 076° 60' W.

Reactivos

Cloruro de hierro (III), tungstato de sodio dihidratado (Merck), gelatina (Aldrich Chemical Co.), carbonato de sodio, ácido fosfomolibdico hidratado (Merck), caolín, cloruro de sodio, ácido clorhídrico qp. (Merck), ácido fosfórico 85% (Merck), sulfato ferroso heptahidratado. Se utilizó agua desionizada pasteurizada para todos los experimentos.

Equipos

Espectrofotómetro UV-visible (Spectroquant Pharo 300 Merck), estufa (Memmert), microscopio óptico, balanza analítica de capacidad de 1 mg - 200 g (Ohaus Pioneer).

Métodos de análisis

Elaboración de extracto

Mil cuatrocientos gramos (1400 g) de la corteza seca y molida de la planta fueron macerados en aproximadamente 5 L de alcohol etílico 70° durante 10 días; la solución resultante se filtró y se llevó a sequedad total, obteniéndose 400 gramos de extracto seco.

Análisis histoquímico

En el estudio micromorfológico de la corteza, se realizaron cortes transversales a mano libre, en los cuales se observaron los caracteres anatómicos internos. El análisis fue realizado en colaboración del laboratorio de Botánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UNMSM; se empleó para el análisis un microscopio óptico.

Con el objeto de determinar la localización de las proantocianidinas, se efectuaron cortes sobre partes de la corteza de tangarana colorada. Posteriormente se efectuó sobre ellos la reacción de la vainillina-HCl. Las células que contienen proantocianidinas tomaron un intenso color rojizo⁶.

Ensayos de caracterización para taninos⁷

Para determinar la presencia de taninos en el extracto hidroalcohólico desecado, se realizaron las siguientes reacciones características:

Cloruro de fierro (III) 5%	Gelatina 1%
Bicromato de potasio 5%	Polvo de piel
Acetato de plomo 5%	Prueba de catequina
Formol clorhídrico	Acetato de zinc
Agua de bromo saturado	Ferrocianuro de potasio y amonio
Solución atropina 1% en agua desionizada.	Amonio

Caracterización y conversión de proantocianidinas en antocianidinas

La conversión de proantocianidinas en antocianidinas se efectuó mediante tratamiento ácido. Se tomó 1 gramo del extracto hidroalcohólico desecado en un tubo de ensayo y se disolvió en 50 mL de HCl 2N. Luego se colocó el tubo con la solución en baño María a 100°C durante una hora. Las proantocianidinas se transformaron así en antocianidinas, y fueron extraídas en alcohol amílico⁸.

Cuantificación de compuestos fenólicos mediante método espectrofotométrico

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico desecado de la corteza de tangerana colorada, se utilizó el método de Lastra, H., 2000⁴; el extracto hidroalcohólico desecado fue diluido en agua desionizada pasteurizada (30 mg %). El método consta de dos etapas: la etapa A donde se cuantifican los polifenoles totales en el extracto hidroalcohólico desecado, y la etapa B donde se cuantifican los polifenoles residuales después del secuestro de los taninos con gelatina.

- Ensayo A: Cuantificación de polifenoles totales

Se midieron exactamente 4 mL del extracto y fueron transferidos a un matraz aforado de 250 mL, diluyendo con agua desionizada pasteurizada hasta enrase. De la solución anterior se tomaron porciones de 1, 2, 3, 4 y 5 mL y se llevaron a matraces aforados de 25 mL.

- Ensayo B: Cuantificación de polifenoles residuales

Se midieron exactamente 20 mL del extracto y fueron transferidos a un matraz aforado de 250 mL con tapa, adicionándole posteriormente 60 mL de agua desionizada pasteurizada, 50 mL de solución de gelatina al 25 %, 100 mL de solución saturada de cloruro de sodio acidificado y 10 g de caolín; la mezcla se enrasó con agua desionizada pasteurizada. Se tapó y agitó durante 1 hora, dejándose reposar para posteriormente filtrar. Del filtrado se toman 10 mL y se transfirieron a un matraz aforado de 50 mL completando con agua desionizada pasteurizada. Luego se tomaron 1, 2, 3, 4 y 5 mL y se llevaron a matraces aforados de 25 mL.

- Sustancia de referencia

Se pesó 25 mg de ácido tánico, se transfirieron a un matraz aforado de 100 mL y se completó el volumen con agua desionizada pasteurizada. Posteriormente se midieron exactamente 20 mL

y se pasaron a un matraz aforado de 100 mL, la mezcla se enrasó con agua desionizada pasteurizada. De la solución anterior se transfirieron 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 y 10 mL a matraces aforados de 25 mL.

- Blanco (método A)

Se añaden 1, 2, 3, 4 y 5 mL de agua desionizada pasteurizada a matraces aforados de 25 mL.

- Blanco (método B)

Se adicionaron 80 mL de agua desionizada pasteurizada, 50 mL de solución de gelatina al 25%, 100 mL de solución saturada de cloruro de sodio acidificada y 10 g de caolín, la mezcla se enrasó con agua en un matraz aforado de 250 mL con tapa. Se tapó y agitó durante 1 hora, se dejó reposar y posteriormente se filtró. Del filtrado se tomaron 10 mL y se transfirieron a un matraz aforado de 50 mL, la mezcla se enrasó con agua desionizada pasteurizada, del que se tomaron 1, 2, 3, 4 y 5 mL y se llevaron a matraces aforados de 25 mL.

Solución tungstato-fosfomolibdico

Se disolvieron 10 g de tungstato de sodio dihidratado, 0,2 g de ácido fosfomolibdico hidratado y 5,0 mL de ácido fosfórico al 85% en 75 mL de agua desionizada pasteurizada. La solución se llevó a reflujo por 2 horas (hasta aparición de color amarillo; no verde, ni azul) y se completó con agua desionizada pasteurizada a 100 mL.

Desarrollo de color

A cada matraz, se agregó 2 mL de solución tungstato-fosfomolibdico, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. Luego se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20%, se agitó, enrasó con agua desionizada pasteurizada y homogenizó. La absorbancia de las soluciones se leyeron a 700 nm después de transcurridos 2 minutos de la reacción.

Validación del método analítico

Para la validación del método propuesto se siguieron normativas reconocidas de validación⁹⁻¹³.

Especificidad

La especificidad del método está basada en la especificidad de la gelatina por los taninos¹², por lo cual los taninos son determinados por la diferencia del contenido total de fenoles y fenoles residuales luego del secuestro por gelatina.

Con el objetivo de corroborar la eficacia del secuestro de los taninos por la gelatina, se realizó un análisis por cromatografía en capa fina. Se aplicaron microlitros del extracto hidroalcohólico, el extracto tratado con gelatina 5% y el ácido tánico, como el patrón tratado con gelatina 5% en cromatofolios con silicagel GF₂₅₄, para luego realizar la separación de sustancias por la fase móvil: acetato de etilo: metanol: agua (100: 13.5: 10 v/v). Luego fueron evaluados con reveladores como el cloruro de hierro (III) 1%, ácido fosfomolibdico 5% y el reactivo de Folin, el cual se emplea en el desarrollo de color del presente método.

Linealidad

Para comprobar la linealidad del método analítico se probó la linealidad de la sustancia de referencia (ácido tánico) en un rango de concentraciones de 1 a 20 ppm, calculándose la recta de regresión, el coeficiente de correlación, el coeficiente de variación de los factores respuestas, y los tests de linealidad y proporcionalidad. Los resultados fueron procesados por el programa microsoft excel 2007 y stat plus 2008.

La linealidad para las etapas A y B del método fueron analizadas realizándole las mismas evaluaciones.

Precisión

Este parámetro incluye la repetibilidad y reproducibilidad.

- Repetibilidad

La repetibilidad se comprobó con 15 réplicas de ensayo, evaluándose el coeficiente de variación.

- Reproducibilidad

Para el análisis de la reproducibilidad se realizaron 6 réplicas por analista, en 2 días de análisis; realizándose 12 determinaciones en total, a las cuales se les determinó el coeficiente de variación y las pruebas estadísticas de *Fisher* y *Student*.

Exactitud

Para el estudio de la exactitud se empleó el método de adición de patrón a diferentes niveles: 2,0; 2,5 y 3,0 ppm (80, 100 y 120%). Aplicándose las pruebas "t" de Student y la "G" de Cochran para determinar si existen diferencias significativas entre la recuperación media y el 100% y si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados.

Cuantificación de taninos condensados**- Determinación de taninos condensados (método de la proantocianidina)**

Se siguió el método de Waterman, P.^{5,14}

- Solución reactivo para taninos condensados

Se prepara agregando 0,7 gramos de sulfato ferroso heptahidratado a 50 mL de ácido clorhídrico concentrado, llevando a 1000 mL con butanol.

- Obtención de muestra y estándar para análisis

Se preparó una solución de extracto hidroalcohólico desecado en agua desionizada pasteurizada (100 mg %). Se colocan 100, 250, 500 L del extracto diluido en tubos con tapa rosca. Se pesó 15 mg de ácido tánico, se transfirieron a un matraz aforado de 100 mL; la mezcla se enrasó con agua desionizada pasteurizada. Posteriormente se midieron exactamente 10 mL y se pasaron a un matraz aforado de 100 mL, la mezcla se enrasó con agua desionizada pasteurizada. De la solución anterior se transfirieron 100, 200, 300, 400 y 500 L, en tubos con tapa rosca.

- Tratamiento de la muestra y estándar

Luego se agregaron 7 mL del reactivo a cada tubo (estándar y extracto) y se llevó a ebullición en baño de agua por 40 minutos. Se enfrió y midió la absorbancia a 550 nm.

Análisis estadístico

Los resultados fueron procesados usando los programas microsoft excel 2007 (windows office) y Minitab statistical software english (versión 15.00 para windows XP). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados expresados como valores promedios \pm desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN**Del análisis histoquímico**

En el estudio micromorfológico se visualizó en el corte transversal de la corteza: parénquima cortical, parénquima medular, xilema, floema, colénquima y epidermis.

En el floema se observó una coloración rojiza, debido a la reacción de vainillina con las células que almacenan taninos; se demuestra la presencia de proantocianidinas.

Del ensayo para caracterizar taninos

En el extracto seco se analizó la presencia de taninos con reacciones cromogénicas y de precipitación (tabla 1)

Tabla 1. Resultados de la determinación de taninos del extracto hidroalcohólico desecado

Ensayo	Reacción	Ensayo	Reacción
FeCl ₃ 5%	+++	Agua de bromo	+++
R. Gelatina	+++	Piel de venza	+++
Bicromato de potasio 5%	+++	Prueba de catequina	+++
Acetato de plomo 5%	+++	Acetato de zinc	+++
Formol clorhídrico	+++	Ferrocianuro de potasio y amonio	+++

Leyenda: +++ Abundante ++ Moderado + Leve (-) Ausencia

Del análisis de las antocianidinas

El color rojo en la fase amilca sugiere la presencia de antocianidinas.

De la cuantificación de compuestos fenólicos

Se obtuvieron 13,5158 0,1825 g de ácido tánico/ 100 g de corteza para compuestos fenólicos totales; y 11,8590 0,5453 g de ácido tánico/ 100 g de corteza para taninos.

-De la especificidad

En el caso de ambos secuestros (ácido tánico y extracto hidroalcohólico), se obtuvo leve coloración para el ácido tánico mas no para el extracto, con los reactivos empleados.

-De la linealidad

La curva de calibración del ácido tánico en el rango de concentraciones estudiadas responde a la ecuación $y = 0,0432 x + 0,0163$ y un coeficiente de correlación igual a 0,9993. Al realizar la significación estadística de la varianza de la pendiente se rechazó la hipótesis $H_0: (b=0)$ y el cero quedó incluido en el intervalo de confianza del término independiente. Los factores respuestas fueron similares entre sí y cercanos al valor de la pendiente y su coeficiente de variación fue de 4,67% (tabla 2). De igual modo, en el gráfico absorbancia versus ácido tánico, se muestra la linealidad del ácido tánico. (figura 1)

Tabla 2. Test de linealidad para el ácido tánico

x (ppm)	y (abs)	F (y/x)	
1	0,050	0,0500	
2	0,097	0,0485	
4	0,182	0,0455	Desviación estándar: 0,0021
6	0,278	0,0463	Promedio: 0,0459
8	0,383	0,0479	Coefficiente de correlación: 0,9993
10	0,464	0,0464	Ecuación de recta: $y = 0,0432 x + 0,0163$
12	0,533	0,0444	c.v.f. = 4,67 %
14	0,617	0,0441	Criterio c.v.f. < 5%
16	0,702	0,0439	
18	0,798	0,0443	
20	0,870	0,0435	

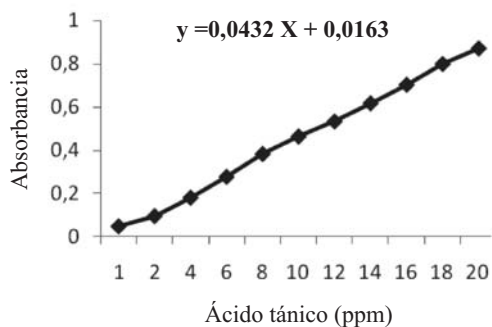


Figura 1. Linealidad para el ácido tánico.

La curva de calibración para la etapa A en el rango de concentraciones estudiadas responde a la ecuación $y = 0,1254 x + 0,019$ y a un coeficiente de correlación igual a 0,9994. Al realizar la significación estadística de la varianza de la pendiente se rechazó la hipótesis $H_0: (b = 0)$ y el cero quedó incluido en el intervalo de confianza del término independiente.

Los factores respuestas fueron similares entre sí y cercanos al valor de la pendiente y su coeficiente de variación fue de 4,29% (tabla 3). De igual modo en el gráfico absorbancia versus extracto, se muestra la linealidad del extracto, en la etapa A. (figura 2)

Tabla 3. Test de linealidad para el extracto, etapa A

x (mL)	y (abs)	f (y/x)	Desviación estándar: 0,0058
1	0,143	0,143	Promedio: 0,1339
2	0,270	0,135	Coeficiente de correlación: 0,9994
3	0,392	0,131	Ecuación de recta: $y = 0,1254 x + 0,019$
4	0,532	0,133	c.v.f. = 4,29 %
5	0,639	0,128	Criterio c.v.f. < 5%

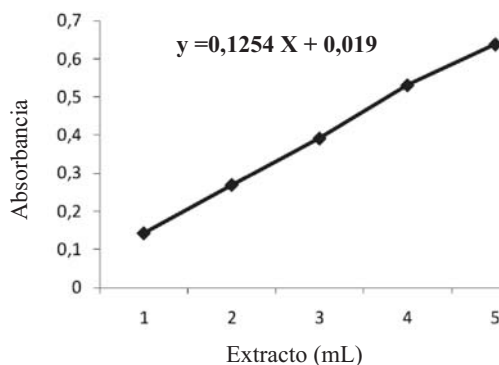


Figura 2. Linealidad para método A (polifenoles totales)

La curva de calibración para la etapa B en el rango de concentraciones estudiadas responde a la ecuación $y = 0,0222 x + 0,0014$ y a un coeficiente de correlación igual a 0,9950. Al realizar la significación estadística de la varianza de la pendiente se rechazó la hipótesis $H_0: (b = 0)$ y el cero quedó incluido en el intervalo de confianza del término independiente.

Los factores respuestas fueron similares entre sí y cercanos al valor de la pendiente y su coeficiente de variación fue de 4,77% (tabla 4). De igual modo en el gráfico absorbancia versus extracto, se muestra la linealidad del extracto, en la etapa B. (figura 3)

Tabla 4. Test de linealidad para el extracto, etapa B

x (mL)	y (abs)	f (y/x)	Desviación estándar: 0,0011
1	0,024	0,024	Promedio: 0,0228
2	0,044	0,022	Coefficiente de correlación: 0,995
3	0,067	0,022	Ecuación de la recta: $y = 0,0222 x + 0,0014$
4	0,096	0,024	c.v.f. = 4,77 %
5	0,109	0,022	Criterio c.v.f. < 5%

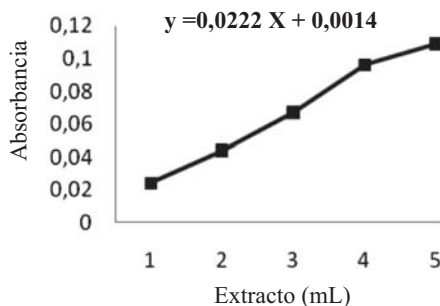


Figura 3. Linealidad para método B (polifenoles residuales)

- De la precisión

El coeficiente de variación de las 15 réplicas de ensayo para el estudio de repetibilidad fue de 2,48 % (tabla 5) y 1,52 % (tabla 6) en el caso de la reproducibilidad; realizándose en este último los tests de *Fisher* y *Student* de los cuales se obtuvieron los valores 0,55 y 1,81, respectivamente.

Tabla 5. Estudio de repetibilidad

Número de réplica	% Taninos (t/c)*	Número de réplica	% Taninos
1	53,289	9	54,736
2	54,012	10	56,665
3	51,842	11	55,218
4	54,977	12	53,530
5	56,665	13	53,771
6	53,771	14	53,289
7	52,566	15	54,253
8	54,977		

Número de réplicas: n = 15 Desviación estándar de réplicas: 1,3471
 Promedio de réplicas: 54,2374 Coeficiente de variación: 2,48% criterio c.v.f < 3%

* g ácido tánico/ 100 g extracto seco tal cual (t/c)

Tabla 6. Estudio de reproducibilidad

Día	% Taninos (t/c)*		
	Analista 1	Analista 2	
1	53,2890	53,2890	Número de réplicas: 6 por analista Desviación estándar: 0,8297 Promedio: 54,4343 c.v.f. = 1,52 % Criterio c.v.f. < 5%
	55,9414	53,7712	
	54,4946	54,7357	
2	55,4591	54,0123	
	54,2535	55,2180	
	54,0123	54,7357	

Prueba t de *Student*: 0,55 < 1,81 (t calculada < t tabulada) (GL = 10; p = 0,05)
 H₀ aceptada: No existen diferencias estadísticas significativas
 Prueba F de *Fisher*: 1,81 < 5,05 (F calculada < F tabulada) (GL = 5/5; p = 0,05)
 H₀ aceptada: No existen diferencias estadísticas significativas

* g ácido tánico/ 100 g extracto tal cual (t/c)

- De la exactitud

De los resultados de recuperación en porcentaje se obtuvo una "t" de *Student* igual a 1,72. Al aplicar la prueba de *Cochran* el valor de la "G" experimental resultó 0,14 (tabla 7).

Tabla 7. Estudio de exactitud por el método de adición de patrón

Concentración (ppm)	% de recuperación			Varianza
2,0	107,6389	100,9259	97,9938	0,4465
2,5	108,7963	101,8519	99,5370	6,0014
3,0	107,6389	97,2222	101,0802	2,3815
				8,8294

% recuperación media (n = 9): 102.5206
 Prueba t de Student: $1,72 < 1,86$ (t calculada < t tabulada) (GL = 8; p = 0,05)
 H₀ aceptada: No existen diferencias estadísticas significativas
 Prueba Q de Cochran: $0,14 < 0,87$ (t calculada < t tabulada) (k=3; n=3; p = 0,05)
 H₀ aceptada: No existen diferencias estadísticas significativas

De la cuantificación de compuestos fenólicos

Como resultado de la cuantificación de los compuestos fenólicos, taninos y taninos condensados, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 8 y figura 4.

Tabla 8. Fenoles totales, fracción de polifenoles que precipitan proteínas y taninos condensados de corteza de *Triplaris americana* L.

Determinación	Corteza de tangarana colorada
Fenoles totales (g ácido tánico/100 g corteza) (700 nm)	13,5158 ± 0,1825
Fracción de polifenoles que precipitan proteínas (taninos: g ácido tánico/100 g corteza) (700 nm)	11,8590 ± 0,5453
Taninos condensados (método de la proantocianidina. (550 nm)	1,62368 ± 0,0784

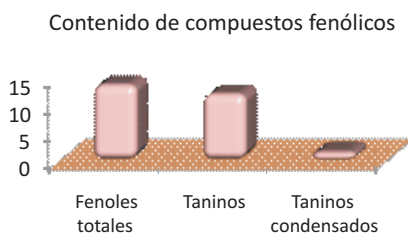


Figura 4. Análisis dimensional del contenido de compuestos fenólicos.

CONCLUSIONES

La cuantificación del extracto hidroalcohólico dio como resultado: para compuestos fenólicos totales: 13,5158 0,1825 g de ácido tánico/ 100 g de corteza; para taninos: 11,8590 0,5453 g de ácido tánico/ 100 g de corteza; y la determinación de taninos condensados: 1,62368 0,0784 g de ácido tánico/ 100 g de corteza.

AGRADECIMIENTOS

Mi profundo agradecimiento a las siguientes personas: Ing. Quím. Violeta León, QF. Gloria Gordillo y QF. Andrés Revilla, docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, por la asesoría y orientación brindada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mostacero, L.; Mejía, F.; Gamarra, O. Taxonomía de las Fanerógamas útiles del Perú. CONCYTEC. Volumen I. Editorial Normas Legales S.A.C. Trujillo. 2002.
2. Desmarchelier, C.; Alonso, J. Plantas medicinales para la atención primaria en la salud. Vademécum de Fitoterapia. PRODAPP. Lima. 2005.
3. Desmarchelier, C; Witting, F. Sixty Medicinal Plants from the Peruvian Amazon: Ecology, Ethnomedicine and Bioactivity. Primera edición. Ediciones PROTERRA. Lima. 2000.
4. Lastra, H.; Rodríguez, E.; Ponce, H.; *et al.* Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. *Revista Cubana de Plantas Medicinales.* 2000; 5(1): 17-22.
5. Waterman, P.; Mole, S. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications. Ed. Cambridge, MA. USA. 1994: 67-133.
6. Ricco, R.; Vai, M.; Sena, G.; Wagner, M.; Gurni, A. Taninos condensados de *Ephedra ochreata* Miers (Ephedraceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense.* 2003; 22 (1): 33-7.
7. Gorriti, A.; Jurado, B.; Quispe, F. Manual de Laboratorio I y II. UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Farmacognosia y Medicina Tradicional. Lima. 2004.
8. Ricco, R.; Sena, G.; Vai, V.; Wagner, M.; Gurni, A. Taninos condensados de *Ephedra chilensis* K. Presl (=E. andina Poepp. Ex May.) –Ephedraceae-. Cátedra de Farmacobotánica. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Buenos Aires. 2002.
9. Gutiérrez, Y.; Miranda, M.; Varona, N.; Rodríguez, A. Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajaba* L. *Revista Cubana de Farmacia.* 2000; 34 (1): 50-5.
10. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos. Segunda edición. Barcelona. AEFI. 2001.
11. ICH International Conference on Harmonisation (ICH): Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology
Note: In November 2005, the ICH incorporated Q2B on methodology with the parent guidance Q2A and retitled the combined Q2 document. The contents of the two guidances were not revised. Disponible en: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/ichq2bmeth.pdf>
12. Ministerio de Salud. Guía de validación de métodos analíticos. Disponible en: <http://www.ministeriodesalud.go.cr/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>
13. Makkor, H. Protein precipitation methods for quantitation of tannins. *J. Agric Food Chem.* 1989; 37(4):197-202.
14. Nitao, J.; Birr, B.; Nair, M.; Herms, D.; Mattson, W. Rapid quantification of proanthocyanidins (condensed tannins) with a continuous flow analyzer. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 2207-14.

OZONIZACIÓN DEL ANTIBIÓTICO TRIMETOPRIM: EVOLUCIÓN DE LA TOXICIDAD DURANTE LA DEGRADACIÓN

Cristina Quispe^{*a}, Luis Astudillo^a, Jorge Villaseñor^a, Álvaro Delgadillo^{*b}

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta la degradación del compuesto farmacéutico Trimetoprim (TMP) por ozonización en medio acuoso. Este proceso presentó una cinética de pseudo-primer orden y los productos de degradación fueron identificados usando espectrometría de masas acoplado a cromatógrafo de gases (GC-MS) y cromatografía líquida (HPLC). En base a los compuestos detectados se propone una ruta de degradación. La evolución de la toxicidad durante las reacciones de ozonización se siguió midiendo la toxicidad aguda con *Daphnia magna*. Interesantemente, se observó un aumento de la toxicidad en la solución después de los 60 minutos de reacción, probablemente debido a la generación de productos tóxicos durante la degradación.

Palabras clave: ozonización, toxicidad, antibiótico, *Daphnia magna*.

OZONATION OF THE ANTIBIOTIC TRIMETHOPRIM: TOXICITY EVOLUTION DURING THE DEGRADATION REACTIONS

ABSTRACT

Herein we report the degradation of the pharmaceutical compound trimethoprim (TMP) in water using ozonation. This process was described by a pseudo first order reaction kinetics and the main degradation products were identified using Gas Chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS) and HPLC. Based in the detected compounds, a degradation pathway was proposed. The evolution of the toxicity along with the ozonation reaction was followed measuring acute toxicity with *Daphnia magna*. An increase in the toxicity of the solutions was observed after 60 minutes of reaction time, probably due to the generation of the toxic degradation products.

Key words: ozonation, pharmaceuticals compounds, degradation, toxicity.

INTRODUCCIÓN

La presencia de compuestos farmacéuticos en el medio ambiente acuoso ha atraído la atención de muchos investigadores en los últimos años¹⁻⁶. Esta clase de compuestos se ha encontrado en plantas de tratamiento (STP) de efluentes, producto de la eliminación o excreción del consumo humano⁷⁻⁹, y en aguas naturales debido al uso en la crianza de animales¹⁰. Entre los medicamentos los antibióticos generan gran preocupación debido a la posibilidad de inducir resistencia en las cepas bacterianas¹¹. Diversos estudios han demostrado que las bacterias en las aguas residuales son más resistentes a los antibióticos que las bacterias encontradas en otros

^a Instituto de Química de Recursos Naturales, Universidad de Talca,
Av. Las Lircay s/n, Casilla 747, Talca, Chile, equispe@utalca.cl

^b Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
adelgadillo@userena.cl

lugares¹². Además, muchos antibióticos son perjudiciales para los organismos acuáticos, como las algas y crustáceos de agua dulce y marinos¹³. La presencia de este tipo de compuesto en efluentes de aguas residuales y aguas superficiales, son un claro indicio de la ineficiencia de las tecnologías de tratamiento convencionales.

El proceso de ozonización es una poderosa herramienta para degradar contaminantes recalcitrantes en el agua¹⁴. El ozono puede degradar los contaminantes por una vía directa e indirecta. El primero implica la reacción del ozono molecular con grupos funcionales de la molécula a degradar^{15,16}, mientras que en el segundo caso se involucra la descomposición del ozono en el agua para producir radicales hidroxilo¹⁷, uno de los oxidantes¹⁸ conocidos más poderosos. La eficiencia del radical hidroxilo ha sido demostrada en la degradación de diferentes xenobióticos, como los pesticidas¹⁹, colorantes²¹ y diversos compuestos orgánicos persistentes²².

Si bien la mayoría de los estudios de ozonización se han centrado en la cinética de degradación, menos atención se ha dado a los productos de degradación y su toxicidad relativa. En general, la velocidad de oxidación de los compuestos orgánicos es calculada siguiendo la desaparición del compuesto a degradar en función del tiempo. Este enfoque puede proporcionar valiosa información acerca del proceso de oxidación; sin embargo, debido a la posibilidad de formación de especies intermediarias persistentes, la degradación total del compuesto de partida no siempre corresponde a la mineralización total de los compuestos orgánicos a CO₂ y H₂O. Por lo tanto, es importante investigar en detalle el mecanismo de oxidación e identificar los posibles compuestos intermediarios.

El principal objetivo de nuestra investigación fue observar la ozonización del antibiótico trimetoprim (TMP) (utilizado en la acuicultura y en seres humanos para el tratamiento de infecciones del tracto urinario, FDA²³), identificar posibles especies transitorias generadas durante su destrucción y proponer una vía de degradación.

Ensayos de toxicidad aguda, de las muestras recogidas en diferentes intervalos de tiempo durante el proceso de ozonización, se llevaron a cabo mediante la medición de inmovilización del microcrustáceo *Daphnia magna*. Los resultados obtenidos son discutidos, teniendo en cuenta que, en determinadas circunstancias, el proceso de oxidación de los compuestos orgánicos puede producir compuestos mucho más tóxicos que el compuesto de partida.

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos

El compuesto farmacéutico trimetoprim (98%) (TMP) fue provisto por Aldrich. Todos los solventes usados fueron grado HPLC, el alcohol terbutílico fue provisto por Merck. Las soluciones de reacción fueron preparadas con agua destilada-desionizada.

Reacciones de ozonización

Las reacciones de ozonización fueron realizadas en un reactor tipo Batch provisto de una doble cámara con circulación externa de agua, a 25 °C, con un sistema de toma de muestras para líquidos. El reactor fue cargado en cada reacción con 90 mL de solución acuosa de TMP a una concentración de 50 mg/L ± 2 mg/L y alimentado con ozono a una concentración de 16 ± 1 mg L⁻¹ a un flujo de 50 ± 2 mL min⁻¹. La concentración de ozono fue monitoreada espectroscópicamente a una absorbancia de 254 nm con un coeficiente de extinción molar (ε) de 2900 M⁻¹ cm⁻¹. El tiempo de reacción total fue de 60 min. durante el cual se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo, para posteriormente ser analizadas de acuerdo a la metodología analítica establecida.

Métodos analíticos

La concentración de TMP durante el proceso de ozonización fue monitoreada por HPLC Perkin Elmer 200 autosampler, a λ 220 nm UV-Vis, columna MERCK Chromolith Performance RP-18e 100-4.6 mm, con una fase móvil $H_2O:MeOH$, 70:30 a un flujo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. El agua fue previamente acidificada a pH 3 usando H_3PO_4 .

Los ácidos orgánicos fueron cuantificados usando una columna específica para ácidos TRANSGENOMIC ORH-801 (6,5 mm x 300 mm), H_2SO_4 0,01 N como fase móvil a un flujo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Los intermediarios fueron identificados utilizando un cromatógrafo de gases (GC) Perkin Elmer con una columna capilar Quadrex acoplado a un espectrómetro de masas de impacto electrónico (EI). El carbono orgánico total (TOC) fue determinado en un equipo Shimadzu 5000.

Ensayo de ecotoxicidad

Los ensayos de toxicidad se realizaron de acuerdo a normas internacionales ISO 6341 para la determinación de inhibición de la movilidad del microcrustáceo *Daphnia magna*²⁴. Para ello se utilizan los neonatos (menos de 24 h de edad) los cuales son expuestos bajo condiciones de laboratorio a diluciones de las muestras, en un tiempo determinado (24 h), al término del cual se cuentan el número de dáfidos muertos. Se reporta la inmovilización como EC_{50-24h} expresando en porcentaje de mortandad de los organismos expuestos, asumiendo dicha respuesta fisiológica, como equivalente a mortalidad o muerte ecológica de los ejemplares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La degradación de la solución acuosa de TMP ($50 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$) se logró con ozono a un flujo constante de $16 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ a pH 7. La figura 1 muestra la disminución de la concentración de TMP versus el tiempo de reacción, así como la cantidad de carbono orgánico total (TOC) durante la reacción de degradación. La degradación completa del antibiótico se logró durante la primera hora de ozonización (90% de TMP se degradó después de 30 minutos). Debido a que el flujo de ozono se mantuvo constante, la disminución de la concentración correspondió a un modelo de pseudo-primer orden, con una constante de $8,6 \times 10^{-2}$ calculada a partir de los datos experimentales.

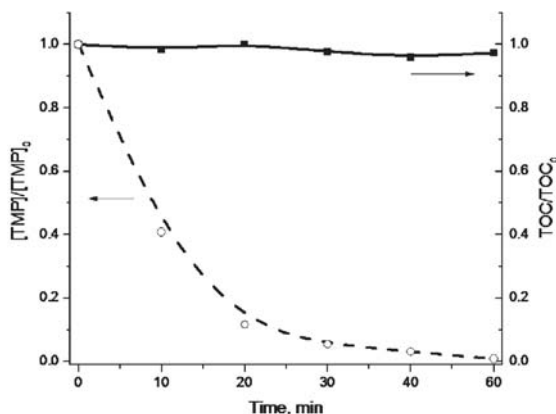


Figura 1. Evolución de TMP/TMP_0 y TOC/TOC_0 en presencia de O_3 durante 60 min. de reacción.

El mecanismo de degradación del ozono puede ocurrir por dos vías: una vía directa y una vía indirecta a las condiciones empleadas en estos experimentos. Con el objetivo de investigar la contribución de los dos mecanismos posibles durante la degradación se realizaron experimentos en presencia de un atrapador de radicales libres, como lo es el alcohol terbutílico. Este atrapador reacciona lentamente con el ozono a una velocidad constante de $< 3 \times 10^{-6} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y rápidamente con los radicales hidroxilos a una velocidad de $< 7,6 \times 10^5 \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-127}$.

En los experimentos de degradación de TMP, en presencia y ausencia del alcohol terbutílico, la constante de reacción observada estuvo dentro de los errores experimentales. Los resultados anteriores sugieren que la degradación de TMP con ozono ocurre principalmente por la vía directa. La figura 1 también indica el TOC medido a diferentes tiempos de reacción, observando que éste se mantiene prácticamente constante durante todo el proceso de ozonización. Estos resultados indican que la mineralización del antibiótico, es decir la completa conversión del TMP a CO_2 y H_2O , no se llevó a cabo, durante el tiempo de reacción estudiada. Existen referencias bibliográficas que indican que en algunos casos la mineralización completa de algunos contaminantes no se consigue²⁵. Algunos compuestos, como el ácido fórmico y el ácido oxálico, conocidos como compuestos recalcitrantes, son muy resistentes a la degradación y permanecen en la solución²⁵.

Ruta de degradación

El análisis cromatográfico de la solución de degradación, a diferentes intervalos de tiempo, muestra una mezcla compleja de productos de degradación. La caracterización completa de estas soluciones requiere un detallado análisis químico y es complejo identificar a cada una de ellas. Sin embargo, en el presente estudio se ha podido detectar los principales productos de degradación usando GC-MS y HPLC. La estructura química del TMP posee grupos funcionales capaces de reaccionar directamente con el ozono molecular. Se sabe que el ozono reacciona con grupos amino, anillos aromáticos y grupos éter que están presentes en la molécula de TMP. La reacción del ozono con los grupos amino es más rápido que con los grupos aromáticos o éter. Por lo tanto, el sitio más probable para el ataque del ozono sería sobre el anillo de pirimidina. Oxidaciones sucesivas del anillo conducen a la formación del 3,4,5-trimetoxibenzaldehído, productos de degradación de éste y la formación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, como los ácidos fórmico, oxálico y glioxílico. El ataque del ozono a la molécula orgánica con grupos amino es similar al reportado en la degradación de la cafeína²⁶ (figura 2).

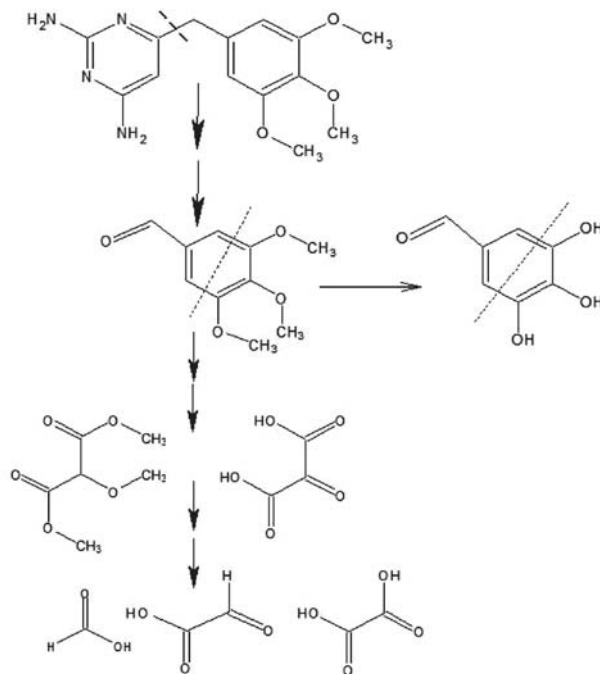


Figura 2. Ruta de degradación propuesta para el trimetoprim (TMP) en presencia de ozono.

Ensayo de ecotoxicidad

Con el objetivo de conocer la toxicidad relativa del TMP en solución durante el proceso de degradación se realizaron experimentos utilizando el bioindicador *Daphnia magna* a diferentes intervalos de tiempo. En el presente estudio se encontró que la toxicidad del TMP fue $> 100 \text{ mg L}^{-1}$. Nuestros resultados fueron similares a los encontrados por Kim y colaboradores¹⁷ donde reportaron un $EC_{50-24h} = 176,7 \text{ mg L}^{-1}$. En el presente estudio la figura 3 muestra la evolución de la toxicidad relativa de la solución de TMP (expresado como porcentaje de sobrevivencia de los dáfidos) durante el proceso de ozonización. La solución inicial de TMP a una concentración de 50 mg L^{-1} no provoca muerte de los dáfidos a las condiciones de trabajo. A medida que ocurre la reacción de degradación la solución generada provoca una disminución en el porcentaje de sobrevivencia de los dáfidos, observándose la muerte completa de la población en estudio a los 20 minutos de reacción. El EC_{50-24h} , expresado como el porcentaje de la dilución de la muestra a los 60 minutos de reacción, es de 11%. Un mayor tiempo de ozonización de la reacción, en las mismas condiciones no muestra una mejora sustancial en la toxicidad de la solución ($EC_{50-24h} = 9\%$) así como en la evolución del TOC. El incremento de la toxicidad de estas soluciones podría atribuirse a la degradación del antibiótico en moléculas más pequeñas y más tóxicas, como 3,4,5-trimetoxibenzaldehído y sus correspondientes derivados fenólicos.

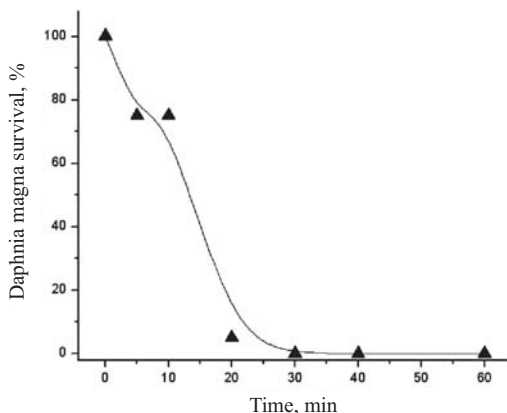


Figura 3. Evolución de la toxicidad durante el proceso de ozonización.

CONCLUSIONES

- El TMP es degradado eficientemente por el ozono a estas condiciones de trabajo, con un grado de mineralización escaso, observándose una mezcla compleja de productos de degradación.
- La solución con los productos de degradación muestra una mayor toxicidad que la solución inicial de TMP, para el bioindicador *Daphnia magna*.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Proyecto Bicentenario de Ciencia y Tecnología PSD-16. Se agradece al Dr. Héctor Mansilla por las mediciones del TOC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Heberer, T. *Toxicol. Lett.*, **2002**, 131, 5-17.
2. Andreozzi, R., Raffaele, M., Nicklas, P. *Chemosphere*, **2003**, 50, 1319-1330.
3. ones, O.A.H., Voulvoulis, N., Lester, J.N. *Crit. Rev. Toxicol.*, **2004**, 34, 335-350.
4. Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D. *Aquat. Toxicol.*, **2006**, **76**, 122-159.
5. Martínez, M.J., Hernando, M.D., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R. *Talanta*, **2009**, **77**, 1518-1527.
6. Vermeirssen, E.L.M., Eggen, R.I.L., Escher, B.I., Suter, M.J. *Chimia*, **2008**, 62, 389-394.
7. Khetan, S.K., Collins, T.J. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 2319-2364.
8. Vieno, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L. *Water Research*, **2007**, 41, 1001-1012.
9. Choi, K., Kim, Y., Jung, J., Kim, M.H., Kim, C.S., Kim, N.H., Park, J. *Environ. Toxicol. Chem.*, **2008**, 27, 711-719.
10. Andreozzi, R., Canterino, M., Marotta, R., Paxeus, N. *J. Hazard. Mater.*, **2005**, 122, 243-250.
11. Kemper, N. *Ecol. Indic.*, **2008**, 8, 1-13.
12. Alanis, A.J. *Arch. Med. Res.*, **2005**, 36, 697-705.

13. Le, T.X., Munekage, Y. *Mar. Pollut. Bull.*, **2004**, 49, 922-929.
14. Ternes, T.A., Stüber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., Teiser, B. *Water Research*, **2003**, 37, 1976-1982.
15. Staehelin, S., Hoigne, J. *Environ. Sci. Technol.*, **1985**, 19, 1206-1212.
16. Staehelin, S., Hoigne, J. *Environ. Sci. Technol.*, **1982**, 16, 676-681.
17. Kim, Y., Choi, K., Jung, J.Y., Park, S., Kim, P.G., Park, J. *Environ. Int.*, **2007**, 33, 370-375.
18. von Gunten, U. *Water Research*, **2003**, 37, 1443-1467.
19. Ikehata, K., El-Din, M.G. *Ozone-Sci. Eng.*, **2005**, 27, 83-114.
20. Khare, U.K., Bose, P., Vankar, P.S. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2007**, 82, 1012-1022.
21. Franco, D.V., Jardim, W.F., Boodts, J.F.C., Da Silva, L.M. *Clean*, **2008**, 36, 34-44.
22. Ning, B., Graham, N.J.D., Zhang, Y.P. *Chemosphere*, **2007**, 68, 1173-1179.
23. FDA. Food and Drug Administration. www.fda.gov/cvm/FOI/106-965s042606.pdf.
24. International Organization for Standardization (I.S.O.) 6341. British Standards Institute, London, **1996**.
25. Quispe, C., Villaseñor, J., Pecchi, G., Reyes, P. *J. Chil. Chem. Soc.*, **2006**, 51, 1049-1052.
26. Dalmazio, I., Santos, L.S., Lopes, R.P., Eberlin, M.N., Augusti, R. *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 5982-5988.
27. Hoigné, J., Bader, H. *Water Research*, **1983**, 17, 173-183.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA ENZIMA SIMILAR A TROMBINA DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops atrox* “JERGÓN”

Gustavo A. Sandoval^{1*}, Nora Ruiz¹, Fanny Lazo¹, Edith Rodríguez¹, Armando Yarlequé¹, Russolina B. Zingali²

RESUMEN

Se ha determinado algunas propiedades bioquímicas de la enzima similar a trombina (EST) de la serpiente peruana *Bothrops atrox* “jergón”. Para este fin, la enzima fue purificada utilizando tres pasos cromatográficos: Sephadex G-75, CM-Sephadex C-50 y Agarosa-PAB. Asimismo, se determinó el peso molecular por PAGE-SDS y el porcentaje de carbohidratos asociados mediante hidrólisis y análisis de hexosas, hexosaminas y ácido siálico. Se ensayaron las actividades fibrinocoagulante, amidolítica y esterásica, sobre fibrinógeno bovino, BApNA y BAEE, respectivamente. Como resultado del análisis se determinó que la enzima constituye el 1,7% del veneno completo, siendo purificada 25,5 veces y con un rendimiento del 43,3% utilizando BApNA como sustrato. La enzima presenta un peso molecular de 29,6 kDa, del cual el 14,2% lo constituyen los carbohidratos asociados. La EST de *B. atrox* produjo coagulación del fibrinógeno bovino y presentó actividad sobre BAEE y BApNA. De esta manera se ha logrado purificar y caracterizar al principal componente del veneno de *B. atrox* relacionado con su actividad coagulante.

Palabras clave: *Bothrops atrox*, enzima similar a trombina, veneno, coagulación.

ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A THROMBIN-LIKE ENZYME FROM *Bothrops atrox* PERUVIAN SNAKE VENOM “JERGÓN”

ABSTRACT

We have determined some biochemical properties of a thrombin-like enzyme (TLE) isolated from *Bothrops atrox* peruvian snake venom “jergón”. In this concern, TLE was purified until homogeneity using three chromatographical steps: on Sephadex G-75, CM-Sephadex C-50 and Agarose-PAB. Furthermore, molecular weight was determinate by PAGE-SDS and associated carbohydrates by hydrolysis and analysis of hexoses, hexosamines and sialic acid. Then, fibrinocoagulant, amidolytic and steric activities were measured on bovine fibrinogen, BApNA and BAEE, respectively. As a result of these analyses, we determined that this enzyme represents 1,7% of total venom and was 25,5-fold purified with a 43,3% yield, using BApNA as substrate. This enzyme had 29,6 kDa, where 14,2% was associated carbohydrates. The TLE of *B. atrox* produced coagulation of bovine fibrinogen and had enzymatic activity on BAEE and BApNA. In conclusion, we have purified and characterized the main component of *B. atrox* venom related to its coagulant activity.

Key words: *Bothrops atrox*, thrombin-like enzyme, venom, coagulation.

¹ Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima – Perú

² Laboratorio de Hemostasia y Venenos. Departamento de Bioquímica Médica. Universidad Federal de Rio de Janeiro. Rio de Janeiro - Brasil.

* E-mail: gsandoval@peru.com

INTRODUCCIÓN

Las serpientes del género *Bothrops* habitan una extensa región de América y en el Perú presenta hasta 17 especies, siendo *Bothrops atrox* “jergón” la más abundante y peligrosa, por ser causante del 90% de los accidentes ofídicos en el país^{1,2}. Como consecuencia de la mordedura se presenta, dolor intenso en la zona afectada, edema, hemorragia y un severo descenso de la presión arterial que ocasiona la muerte; en otros casos una masiva necrosis que lleva a la amputación del miembro afectado³.

En estudios previos realizados con el veneno de esta serpiente, se ha determinado que posee una acción marcada sobre la coagulación sanguínea^{4,5}, determinándose las siguientes actividades: esterásica, fibrinolítica y kininogenásica, las cuales se encuentran relacionadas con esta acción biológica. Dentro de los componentes enzimáticos relacionados con este fenómeno se encuentran principalmente las enzimas similares a trombina (ESTs) las cuales producen coágulos que bloquean parcialmente la circulación sanguínea⁵, la cual ha sido detectada en varios venenos botrópicos, incluido *B. atrox*, utilizando como sustratos tanto plasma bovino como fibrinógeno bovino y canino⁶. Cuando estos compuestos son aplicados en animales o humanos, producen un descenso en los niveles de fibrinógeno resultando en un estado benigno de hipofibrinogenemia, razón por la cual es empleada en el campo clínico para el tratamiento de oclusiones vasculares y terapias defibrinogénicas⁷. Por esta razón se hace necesario continuar y profundizar los estudios bioquímicos de los principios activos de venenos de las especies de serpientes peruanas.

En este contexto, en el presente trabajo se describe la purificación de la enzima similar a trombina del veneno de *B. atrox* mediante técnicas cromatográficas, así como su caracterización bioquímica parcial.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Se utilizó el veneno de ejemplares adultos de *Bothrops atrox* procedentes de Pucallpa (Ucayali) y mantenidos en cautiverio en el serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural de la UNMSM. El veneno fue extraído por presión manual de las glándulas venenosas, siendo luego liofilizado y conservado a 4 °C hasta su utilización en las pruebas experimentales correspondientes.

Cuantificación de proteínas

La cantidad de proteína fue calculada midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm⁸ en un espectrofotómetro Shimadzu UV 120-02. Además, se empleó el método de Lowry⁹ modificado en nuestro laboratorio⁴, utilizando un fotocolorímetro Spectronic Bausch & Lomb, empleando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

Purificación de la enzima similar a trombina

La metodología de purificación utilizada se basó en el procedimiento reportado previamente para el aislamiento de la EST de *Lachesis muta*¹⁰. Como primer paso, se aplicaron 200 mg de veneno crudo disueltos en 2 mL de buffer acetato de amonio 0,05 M, pH 6,0 a una columna de Sephadex G-75 (1,2 x 45,2 cm). La muestra fue eluída con el mismo buffer a un flujo de 13 mL por hora, colectándose fracciones de 1 mL en un colector automático de fracciones Pharmacia-LKB. Las fracciones con mayor actividad sobre BApNA fueron juntadas, concentradas y aplicadas a una segunda columna de CM Sephadex C-50 (1,2 x 35 cm), usándose como eluyente buffer acetato de amonio 0,05 M, pH 6,0. Las fracciones retenidas en el sistema cromatográfico fueron eluídas utilizando el mismo buffer conteniendo NaCl 0,4 M.

Luego, las fracciones con mayor actividad amidolítica fueron juntas, dializadas contra agua destilada y liofilizadas. Para el tercer paso cromatográfico, las fracciones anteriores, resuspendidas previamente en buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 7,5, fueron aplicadas a una columna de agarosa-PAB (0,8 x 6,0 cm). Las fracciones retenidas por afinidad fueron eluidas empleando buffer Tris-HCl 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 3,0 y neutralizadas usando Tris 1 M. Finalmente, las fracciones con mayor actividad sobre BApNA fueron concentradas y mantenidas en congelación para su posterior caracterización.

Actividades enzimáticas

Actividad fibrinocoagulante

Esta actividad se evaluó por el tiempo de formación del coágulo originado por la acción de la enzima sobre el fibrinógeno bovino¹¹. Una unidad de actividad (U) se define como la inversa del tiempo de coagulación en segundos.

Actividad amidolítica

Fue determinada empleando BApNA como sustrato, midiéndose la liberación de *p*-nitroanilida a 405 nm¹². Una unidad de actividad (U) es expresada como μ moles de *p*-nitroanilida liberados por minuto.

Actividad esterásica

Se determinó midiendo la hidrólisis del sustrato BAEE y registrándose la absorbancia a 253 nm¹³. Una unidad de actividad (U) corresponde a la cantidad de μ moles de BAEE hidrolizados por minuto.

Evaluación de la pureza y determinación del peso molecular

Se empleó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes con SDS (PAGE-SDS)¹⁴, en un equipo Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad Laboratories). La corrida electroforética se realizó aplicando 100 V constantes durante 1 h. Luego el gel fue teñido con azul brillante de Coomassie 0,1% por 10 min, para luego ser decolorado hasta evidenciar las bandas proteicas.

Determinación de azúcares asociados

Para la determinación de carbohidratos asociados se emplearon las técnicas descritas por Winzler¹⁵ para hexosas y hexosaminas, y por Warren¹⁶ para ácido siálico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación de la enzima y estimación del peso molecular

En el primer paso de purificación en Sephadex G-75 (figura 1A), el veneno fue fraccionado en tres picos de proteína, encontrándose la actividad enzimática en las fracciones correspondientes al primer pico con un V_e/V_o de 1,50. La actividad amidolítica estuvo presente en estas fracciones, las cuales, después de ser juntas y concentradas, fueron pasadas a través de una columna de CM Sephadex C-50. En el segundo paso de purificación (figura 1B) la actividad amidolítica fue ubicada en las fracciones que se separaron de la matriz empleando NaCl 0,4 M, y en el tercer paso de purificación (figura 1C) usando una columna de agarosa-PAB se consiguió la separación completa de la enzima luego de aplicar buffer Tris-HCl 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 3,0. Se logró una purificación de 25,5 veces, un rendimiento de 43,3% y 1,7% de proteína activa recuperada (tabla 1). El ensayo electroforético en PAGE-SDS mostró que la enzima purificada corresponde a una única banda homogénea con un peso molecular aproximado de 29,6 kDa (figura 2).

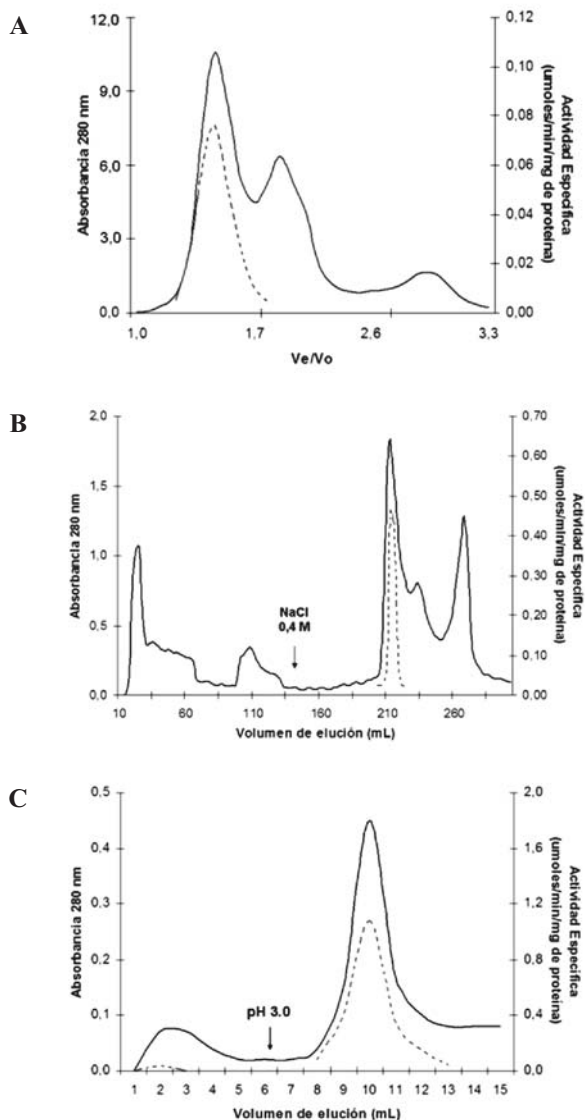


Figura 1. Esquema de purificación de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops atrox*.

- (A) Fraccionamiento del veneno crudo en Sephadex G-75 empleando buffer acetato de amonio pH 6,0.
 (B) Separación de las fracciones previas en una columna de CM Sephadex C-50. Las fracciones eluidas con NaCl 0,4 M fueron desaladas, concentradas y aplicadas a un tercer paso cromatográfico.
 (C) Cromatografía en agarosa-PAB. Las fracciones se separaron empleando buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 7,5. Las fracciones retenidas fueron eluidas empleando buffer Tris-HCl 1 mM, NaCl 0,5 M, pH 3,0. La línea continua (—) indica la absorbancia a 280 nm, mientras que la línea punteada (---) la actividad específica sobre BApNA en µmoles de *p*-nitroanilina liberados por minuto y por mg de proteína.

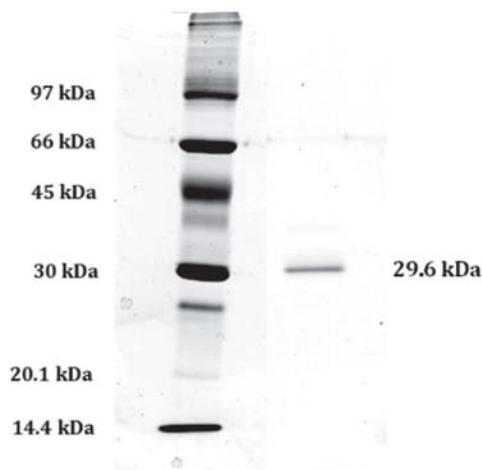


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) bajo condiciones no reductoras de la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox*.

Actividad sobre diferentes sustratos

La enzima similar a trombina purificada fue capaz de coagular el fibrinógeno bovino; comparando los tiempos de coagulación obtenidos con el veneno crudo y la enzima purificada se encontraron actividades específicas de 1,26 y 5,50 U/mg de proteína, respectivamente, siendo la actividad de la enzima purificada 4,37 veces más que la actividad del veneno crudo (tabla 2). La enzima purificada también muestra una gran capacidad para hidrolizar sustratos sintéticos como el BApNA con una actividad específica de 0,874 U/mg de proteína, mientras que sobre ésteres sintéticos de arginina como el BAEE, mostró una actividad de 45,83 U/mg de proteína, siendo la actividad purificada 25,5 y 23,4 veces, respectivamente, con respecto a la actividad mostrada por el veneno crudo (tabla 2).

Tabla 1. Cuadro resumen de purificación de la enzima similar a trombina del veneno de *Bothrops atrox*.

Procedimiento	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg de proteína)	Actividad (U)*	Rend. (%)	Purificación (veces)
1° veneno crudo	200,0	0,034	6,86	100,0	1,0
2° sephadex g - 75	51,6	0,081	4,20	61,2	2,4
3° cm sephadex c - 50	7,0	0,542	3,79	55,3	15,8
4° agarosa - pab	3,4	0,874	2,97	43,3	25,5

* La actividad específica fue determinada empleando benzoil DL arginina *p*-nitroanilina como sustrato. Una unidad de actividad corresponde a la cantidad de μ moles de *p*-nitroanilina liberados por minuto

Tabla 2. Actividad del veneno total y de la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox* sobre diferentes sustratos.

Substrato	pH	Actividad específica (U/mg de proteína)		Incremento de la actividad (veces)
		Veneno crudo	Enzima	
Fibrinógeno bovino	7,4	1,26	5,50	4,4
BAPNA	8,1	0,034	0,874	25,5
BAEE	7,4	1,96	45,8	23,4

Tabla 3. Contenido de carbohidratos del veneno crudo y de la enzima similar a trombina de *Bothrops atrox*

Componente	Porcentaje (%)	
	Veneno Crudo	Enzima
Hexosas	1,83	12,1
Hexosamina	0,61	1,36
Ácido siálico	0,19	0,75
Total de carbohidratos asociados	2,63	14,21

Contenido de carbohidratos

El análisis de carbohidratos para el veneno crudo determinó un 1,83% de hexosas, 0,61% de hexosaminas y 0,19% de ácido siálico; haciendo un total de 2,63% de carbohidratos asociados. En cambio la enzima purificada registró 12,1% de hexosas, 1,36% de hexosaminas y 0,75% de ácido siálico, con un total de 14,21% de carbohidratos, lo que demuestra que se trata de una glicoproteína (tabla 3).

Los venenos de los vipéridos presentan cantidades significativas de enzimas similares a trombina y el mecanismo de formación del coágulo de fibrinógeno por acción de éstas es diferente al provocado por trombina. Estos componentes preferentemente liberan sólo fibrinopéptidos A o B, mientras que la trombina produce la liberación de ambos fibrinopéptidos de la molécula del fibrinógeno. La mayor parte de las enzimas similares a trombina son serinoproteasas y no sólo son similares a la trombina en sus propiedades físicas y químicas sino que contienen residuos reactivos de serina, ácido aspártico e histidina, como la trombina. Un hecho importante es que las actividades coagulante y esterásica de estas enzimas son inhibidas simultáneamente por agentes específicos que modifican la proteína, siendo éste un indicativo que dichas actividades parecen residir en el mismo sitio activo.

En el presente trabajo se purificó la enzima similar a trombina del veneno de *B. atrox* utilizando una combinación de cromatografía en Sephadex G-75, CM Sephadex C-50 y agarosa-PAB. El primer sistema que permitió la separación del extracto proteico que constituye el veneno se diferenció en tres picos principales de proteína, correspondiendo la enzima al primer pico. Esto nos indica que la proteína coagulante que hemos aislado se encuentra en torno a la fracción proteica de alto peso molecular que eluye con un volumen de elución (V_e) cercano al volumen vacío o muerto (V_0). En el segundo paso se logró la separación de dos picos de proteína eluida con el buffer inicial mientras que la enzima similar a trombina eluye al adicionarse al buffer NaCl 0,4 M y el hecho de que aparezca en el primer pico indica claramente que se encontraba atrapada por el intercambiador lo que significa que se trata de una proteína cargada positivamente a pH 6,0, es decir, que su pI estaría en el rango de neutro o ligeramente alcalino. Como tercer paso cromatográfico (figura 1C) se empleó una columna de agarosa - *p*-aminobenzamida (PAB). Esta molécula es un inhibidor competitivo específico de serinoproteasas, mediante la cual se pudo retener a las fracciones con afinidad a ésta para su posterior separación mediante un cambio en el valor de pH de 7,5 a 3,0. Con esta metodología se consiguió separar la enzima similar a trombina mientras que las fracciones que no se ligaron a la columna correspondían a proteínas contaminantes. Del análisis electroforético de la fracción obtenida (figura 2) se demostró la existencia de una sola banda proteica y por tanto podemos afirmar que el método desarrollado es apropiado y sencillo para purificar esta enzima logrando un factor de purificación de 25,5 veces y un rendimiento de 43,3%.

Las enzimas similares a trombina purificadas de otros venenos han sido obtenidas mediante combinaciones de técnicas cromatográficas. Así tenemos que para la purificación de la balterobina, enzima coagulante aislada del veneno de *Bothrops alternatus*, se emplearon métodos cromatográficos sobre Sephadex G-75, Heparina-Sepharosa y HPLC¹⁷. Del mismo modo Jin *et al.* purificaron la enzima jerdonobina-II del veneno de *Trimeresurus jerdonii*, aplicando la muestra en primer lugar a un intercambiador catiónico de CM Sephadex C-25, posteriormente a una columna de filtración en Sephadex G-100 super fino y finalmente a una columna C_8 de HPLC en fase reversa¹⁸. Finalmente, la enzima similar a trombina del veneno de *Lachesis muta* fue aislada por Yarlequé *et al.*, a través de tres pasos cromatográficos, los dos primeros en Sephadex G-100 y el último en una columna de intercambio iónico de DEAE-Celulosa, lográndose una purificación de 28,92 veces y un rendimiento de 44,76%¹⁰.

El análisis electroforético con SDS en condiciones no reductoras (figura 2) demostró que la enzima purificada presenta una sola cadena polipeptídica, con un peso molecular aproximado de 29,6 kDa. Esta enzima tiene un mediano peso molecular pero se encuentra dentro del rango de pesos moleculares reportados para varias enzimas similares a trombina aisladas de venenos de serpientes¹⁹.

La enzima similar a trombina aislada de *B. atrox* mostró la capacidad de hidrolizar diversos sustratos sintéticos que contienen como grupo cromogénico a la *p*-nitroanilida. Durante los diversos pasos de purificación se empleó el sustrato BApNA, el cual permite la caracterización de enzimas del grupo de las serinoproteasas como la tripsina y quimiotripsina y al cual pertenecen las enzimas similares a trombina de venenos de serpientes¹⁹. Las fracciones que mostraron más actividad sobre este sustrato fueron ensayadas en su capacidad para coagular el fibrinógeno bovino obteniéndose resultados positivos indicando que ambas actividades están presentes en la enzima en estudio. En el caso del BAEE, por su estructura molecular permite la caracterización de enzimas que hidrolizan el enlace éster entre la arginina y el grupo metilo. La capacidad de la enzima para hidrolizar este sustrato nos indica que ésta pertenece al gran grupo de proteasas esterásicas²⁰.

Otro de los aspectos que se abarcó en esta investigación fue la asociación de carbohidratos a la estructura proteica de la enzima similar a trombina purificada. La enzima purificada mostró ser una glicoproteína, conteniendo 12,1% de hexosas, 1,36% de hexosaminas y 0,75% de ácido siálico (tabla 3). Estos valores se encuentran dentro del rango reportado para diferentes enzimas similares a trombina aisladas de venenos de serpientes¹⁹. Un posible rol de los oligosacáridos en las glicoproteínas es el de modular sus propiedades fisicoquímicas, tales como la solubilidad, viscosidad, estabilidad de carga. Respecto a este último punto, al tratar la enzima similar a trombina del *Lachesis muta* con una *N*-glicosidasa F (PNGasa F) y proceder a la electroforesis mediante PAGE-SDS, se observó un aumento en la movilidad electroforética de la proteína tratada en comparación con la proteína no tratada²¹. Otro rol probable de los carbohidratos sería el de proteger a la enzima de la proteólisis, teniendo en cuenta el entorno fuertemente proteolítico del veneno.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha logrado purificar y caracterizar al principal componente del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* relacionado con su actividad coagulante. Las características bioquímicas de esta enzima descritas en el presente artículo servirán de base para el estudio de sus propiedades inmunogénicas a fin de desarrollar estrategias para neutralizar su actividad tóxica.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue iniciado en el Laboratorio de Biología Molecular de la UNMSM y finalizado gracias al financiamiento otorgado al Blgo. Gustavo Sandoval por la Red de Macrouniversidades de América Latina y el Caribe a través de una beca de investigación en la Universidad Federal de Río de Janeiro como parte del desarrollo de su tesis de maestría en Biología Molecular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Loja D, Avilés R, Necochea Y, Vilca M, Castro J. Ofidismo por *Bothrops atrox*: Estudio clínico-epidemiológico. *Diagnóstico*. 2000;38(5):261-5.
2. Yarlequé A. Las serpientes peruanas y sus venenos. Lima: Fondo Editorial-UNMSM; 2000.
3. Instituto Nacional de Salud. Diagnóstico y tratamiento de los accidentes por animales ponzoñosos. Lima: El Instituto; 2004.
4. Loayza S, Morante Y, Campos S, Yarlequé A. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Bol Soc Quím Perú*. 1985;52(3):151-63.
5. Lu Q, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venoms and hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1791-9.
6. Orejuela P, Zavaleta A, Salas M, Marsh N. Thrombin-like activity in snake venoms from Peruvian *Bothrops* and *Lachesis* genera. *Toxicon*. 1991;29(2):1151-4.
7. Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom proteins acting on hemostasis. *Biochimie*. 2000;82(9-10):851-9.
8. Warburg O, Christian W. Isolierung and Kristallisation der Garungs ferments enolase. *Biochem Z*. 1941;310:384-421.
9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.

10. Yarleque A, Campos S, Escobar E, Lazo F, Sánchez N, Hyslop S, *et al.* Isolation and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from venom of the snake *Lachesis muta muta* (peruvian bushmaster). *Toxicon*. 1989;27(11):1189-97.
11. Devi A, Banerjee S, Copley AL. Coagulant and esterase activities of thrombin and *Bothrops atrox* venom. *Toxicon*. 1972;10(6):563-73.
12. Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys*. 1961;95:271-8.
13. Schwert GW, Takenaka Y. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim Biophys Acta*. 1955;16(4):570-5.
14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
15. Winzler RJ. Determination of serum glycoproteins. *Methods Biochemical Anal*. 1955;2:279-311.
16. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem*. 1959;234(8):1971-5.
17. Smolka MB, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*. 1998;36(7):1059-63.
18. Jin Y, Lu QM, Chen RQ, Wu JB, Xiong YL. Molecular characterization of a weak fibrinogen-clotting enzyme from *Trimeresurus jerdonii* venom. *Toxicon*. 2005;45(3):353-60.
19. Castro HC, Zingali RB, Albuquerque MG, Pujol-Luz M, Rodrigues CR. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(7-8):843-56.
20. Castro HC, Silva DM, Craik C, Zingali RB. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochim Biophys Acta*. 2001;1547(2):183-95.
21. Magalhaes A, Ferreira RN, Richardson M, Gontijo S, Yarleque A, Magalhaes HP, *et al.* Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2003;136(2):255-66.

ADSORCIÓN DE PLOMO DE EFLUENTES INDUSTRIALES USANDO CARBONES ACTIVADOS CON H_3PO_4

Carmencita Lavado Meza^{a*}, María del Rosario Sun Kou^a, Salvador Bendezú^b

RESUMEN

Se prepararon carbones activados a partir de astillas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill), mediante activación química usando como agente activante al ácido fosfórico. Se estudió la influencia de los siguientes parámetros de activación sobre la adsorción de plomo: razón de impregnación (agente activante(g)/precursor(g)) y temperatura de activación. Los materiales obtenidos se caracterizaron mediante adsorción de N_2 a $-196\text{ }^\circ\text{C}$, SEM y FTIR. Se estudiaron los parámetros que afectan el proceso de adsorción de plomo: tiempo de contacto, razón masa de carbón/volumen de la solución, temperatura y pH, lográndose obtener capacidades de adsorción de hasta 142,1 mg Pb/g. Se logró remover el 99,9% del plomo contenido en un efluente industrial.

Palabras clave: adsorción, carbón activado, activación química con H_3PO_4 , plomo, tratamiento de aguas.

ADSORPTION OF LEAD FROM INDUSTRIAL WASTEWATER USING ACTIVATED CARBONS WITH H_3PO_4

ABSTRACT

Activated carbons were prepared from chips of *Eucalyptus globulus* Labill, as by chemical activation using phosphoric acid activating agent. The influence of activation parameters was studied on the adsorption of lead: impregnation ratio (activating agent (g)/precursor (g)) and activation temperature. The materials obtained were characterized by N_2 adsorption at $-196\text{ }^\circ\text{C}$, SEM and FTIR. The parameters affecting the adsorption process of lead was studied: contact time, ratio mass carbon/volume of solution, temperature and pH, obtained adsorption capacities of up to 142,1 mg Pb/g. Achieved 99,9% removal of lead on industrial effluent.

Key words: adsorption, activated carbon, chemical activation with H_3PO_4 , lead, water treatment.

INTRODUCCIÓN

Estudios realizados han mostrado que el incremento en los niveles de contaminación del agua, debido a la presencia de metales pesados provenientes de efluentes industriales, pone en riesgo la salud humana¹. Los metales pesados como el plomo, cadmio y mercurio están considerados como uno de los grupos más peligrosos debido a que no son biodegradables, su alta toxicidad a bajas concentraciones y su capacidad de bioacumularse en los organismos que los ingieren. La contaminación del agua por plomo se debe a los efluentes industriales no tratados, generados por las fábricas de tetraetilo de plomo, pinturas, baterías, municiones,

^a Dpto. de Ciencias - Sección Química, Pontificia Universidad Católica del Perú.
Av. Universitaria 1801-San Miguel – Lima 32, e-mail: carmencita.lavado@pucp.edu.pe

^b Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Centro del Perú,
Av. Mariscal Castilla km 5, El Tambo, Huancayo.

cerámicas de vidrio, minería, entre otros. El plomo es un metal pesado tóxico y, debido al daño que puede producir su ingesta, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) lo ha clasificado entre las 20 sustancias químicas más peligrosas para la salud humana; asimismo, estableció el límite máximo permisible de plomo en agua potable de 0,001 ppm.

Los métodos de mayor aplicación en el tratamiento de efluentes que contienen metales pesados son los siguientes: precipitación, intercambio iónico, ósmosis inversa y adsorción. Comparando dichos tratamientos, la adsorción presenta la ventaja de poseer las siguientes características: fácil operación, retención del metal en presencia de otros cationes y la posibilidad de recuperar los metales pesados².

El proceso de adsorción se realiza con diversos materiales, generalmente microporosos, como las arcillas pilareadas, alúminas y carbones activados. Los carbones activados pueden obtenerse utilizando como materia prima a materiales ricos en carbono, básicamente provenientes de fuentes renovables como los materiales lignocelulósicos y desechos agrícolas³. Generalmente, se busca materiales económicos y disponibles en la región, con la finalidad de reducir los costos de producción, requisito que las astillas de eucalipto cumplen. Para la activación del material se usan dos métodos: activación química y activación física. La activación química consiste en poner en contacto la materia prima con un agente impregnante, tal como: KOH, H₃PO₄, Cl₂Zn, NaOH, etc., el cual actúa como agente deshidratante. Los carbones activados químicamente, en comparación con los activados físicamente, presentan la ventaja de tener mayores rendimientos, así como un buen desarrollo de la porosidad a temperaturas relativamente bajas⁴. Las propiedades adsorbentes del carbón activado son atribuidas a su alta área superficial, porosidad (micro y mesoporos) y grupos superficiales⁵; sin embargo estas propiedades varían de acuerdo al material de partida, así como el método de activación usado. En la actualidad, el carbón activado es muy utilizado en el tratamiento del agua potable y aguas residuales, removiendo sustancias orgánicas como fenoles⁶, pesticidas, aminas o nitratos de los compuestos que causan olores y sabores no deseados y metales pesados⁷⁻¹⁰. El presente estudio tuvo por objetivos dar a conocer la preparación de carbones activados con H₃PO₄, utilizando como material de partida las astillas de eucalipto, que es un desecho abundante en el valle del Mantaro, departamento de Junín (Perú), por lo que su empleo como materia prima en la preparación de carbones activados se constituye como un material de bajo costo y le otorga un mayor valor agregado, así como los ensayos de adsorción de Pb(II) presente en soluciones acuosas estándar y su aplicación en el tratamiento de un efluente industrial.

PARTE EXPERIMENTAL

Preparación del material adsorbente

La materia prima (astillas de eucalipto) fue secada e impregnada por vía húmeda con una solución de H₃PO₄, usando una razón de impregnación [masa de agente activante (g)/masa de precursor (g)] igual a 0,5; 1,0; 1,5; 3,0 seguido de un proceso de carbonización, que se realizó en un reactor de lecho fijo, a temperaturas de: 400, 500, 600 y 700 °C, durante una hora, con flujo continuo de N₂ de 100cm³/min. Finalmente, los carbones obtenidos fueron lavados con abundante agua destilada y secados en una estufa por 24 horas a 80°C. Para la identificación de los carbones activos obtenidos se utilizó la siguiente nomenclatura: PX,X/YYY, donde: P se refiere al agente activante usado (H₃PO₄), X,X la razón agente activante/precursor, YYY la temperatura de activación.

Caracterización de los materiales

El área superficial y la distribución de poros de los carbones activados se obtuvieron por adsorción de N₂ a -196°C, en un equipo de adsorción modelo Micromeritics GIQ-UPV. Para la

determinación del área superficial y volumen de microporos se utilizaron las ecuaciones de Brunauer-Emmett-Teller (BET) y de Dubinin-Radushkevich (D-R). El estudio de los grupos funcionales presentes en la materia prima y carbones activados se realizó por espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR). El equipo instrumental utilizado fue un espectrofotómetro Perkin Elmer FTIR- 1600. Para ello se prepararon pastillas de carbón activado mezclado con KBr; las muestras fueron analizadas en un rango espectral de 4000 - 400 cm^{-1} . El análisis morfológico de la materia prima y de los carbones activados se llevó a cabo por Microscopía Electrónica de Barrido en un equipo ASPEx LLC.

Adsorción de plomo:

Todos los ensayos de adsorción de plomo fueron realizados en un sistema batch, en cada caso se utilizó 50 mg del adsorbente y se pusieron en contacto por 3 horas con 50 mL de una solución de Pb(II) a diferentes concentraciones iniciales, en un agitador múltiple a una velocidad de 500 rpm, a temperatura ambiente y pH inicial igual a 5. Finalizada la etapa de adsorción, las fases fueron separadas por filtración y se evaluó la concentración de plomo en las soluciones remanentes por adsorción atómica en un equipo Perkin Elmer AAS 3100. Para la elaboración de las isothermas de adsorción las concentraciones iniciales se variaron en el rango de 50 a 500 mg/L. El estudio de la influencia del pH se realizó variando el pH de la solución inicial en un rango de 2-9 utilizando soluciones de HNO_3 0,1 M y NaOH 0,1 M.

Para determinar la capacidad de adsorción (q_e) de los carbones activos se utilizó la siguiente ecuación:

$$q_e = \frac{(C_o - C_e)V}{M}$$

Donde, q_e es la capacidad de adsorción en el equilibrio (mg Pb/g carbón activado), C_o es la concentración inicial (mg/L) en una solución de volumen (L), C_e es la concentración en el equilibrio (mg/L) luego de la adsorción y M es la masa del adsorbente (g).

Cinética de adsorción

El estudio de la cinética de adsorción se realizó con los parámetros de adsorción óptimos obtenidos a diferentes concentraciones iniciales, con una relación de masa de carbón/volumen de solución de 50mg/50mL. Durante el proceso de adsorción a diferentes intervalos de tiempo se separaron pequeñas alícuotas a las cuales después se determinó el contenido de plomo.

Muestreo del efluente industrial

Se tomaron muestras de aguas residuales provenientes de una fábrica dedicada a la producción de sulfato tribásico de plomo ($3PbO \cdot PbSO_4 \cdot H_2O$), compuesto utilizado en la industria plástica como estabilizante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los carbones activados:

Análisis textural de los carbones activados. Para la determinación del área superficial y la distribución de poros de las muestras se evaluaron las isothermas de adsorción - desorción en el sistema sólido - gas, donde en este caso el adsorbato es el N_2 medido a $-196^\circ C$ y el adsorbente son las muestras de carbones activados con H_3PO_4 con una razón de impregnación igual a 1,0 y activadas a diferentes temperaturas en el rango de 400 hasta $600^\circ C$. Para la determinación de las isothermas se graficaron el volumen de N_2 adsorbido (cm^3/g) en condiciones estándar (STP) en función de la presión relativa (P/P_o) (figura 1).

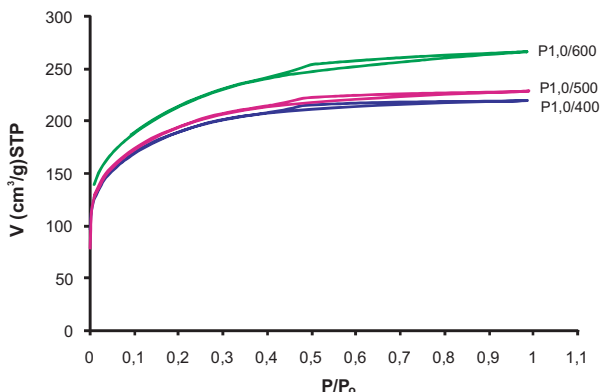


Figura 1. Isotermas de adsorción-desorción de los carbones activados a una razón de impregnación de 1,0 a diferentes temperaturas de activación.

Se puede observar que las formas de las isotermas de los carbones activados son muy similares y presentan características asociadas a la isoterma del tipo IV, de acuerdo a la clasificación de IUPAC, lo que indica una estructura micro y mesoporosa. Como puede apreciarse, la adsorción de N_2 se incrementa inicialmente debido al llenado de los microporos ($P/P_0 = 0$); posteriormente la pendiente de la isoterma se incrementa paulatinamente con el aumento de las presiones relativas, lo que se asocia a la adsorción en multicapas debido al llenado de los mesoporos. Los resultados del análisis de las isotermas de adsorción de N_2 , con las ecuaciones BET y DR se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros texturales de los carbones activados

Muestra	Temperatura de activación (°C)	Parámetros texturales			
		S_{BET} (m ² /g)	V_{micro} (cm ³ /g)	V_{meso} (cm ³ /g)	V_T (cm ³ /g)
P1,0/400	400	667,7	0,31	0,027	0,34
P1,0/500	500	688,8	0,32	0,033	0,35
P1,0/600	600	761,1	0,37	0,063	0,41

Se puede observar que la temperatura de activación tiene más influencia en el desarrollo de los mesoporos que en la de los microporos; se nota también que a una temperatura de activación mayor a 500°C, la influencia es mayor en el desarrollo de los mesoporos.

El área superficial específica también se incrementa con el aumento de la temperatura de carbonización, obteniéndose una mayor área superficial a 600°C de 761,1 m²/g.

Análisis morfológico. Las figura 2A y 2B muestran las micrografías realizadas a la materia prima y al carbón activado con H_3PO_4 , respectivamente.

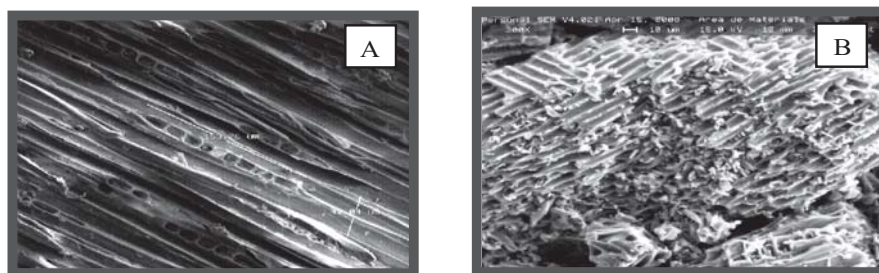


Figura 2. (A) Materia prima (B) carbón activado P1,0/600.

Se aprecia una clara diferencia morfológica entre la materia prima y el carbón activado, lo que hace evidente la acción del agente activante y la temperatura de activación sobre la estructura de la materia prima. Esta última presenta una morfología característica con fibras alargadas, en tanto que la muestra activada presenta una morfología porosa conformada por agregados ubicados en forma desordenada con generación de poros heterogéneos entre ellos, lo cual fue confirmada por su alta área superficial que fue determinada por adsorción de N_2 .

Identificación de los grupos funcionales por FTIR. Los grupos funcionales presentes en la superficie de los carbones activados desempeñan un rol importante en la adsorción de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Ellos le confieren al carbón propiedades hidrofílicas porque incrementan la interacción específica ion-dipolo y dipolo-dipolo¹¹. En la figura 3 se muestra los espectros FTIR del precursor (astillas de eucalipto) y del carbón activado P1,0/600.

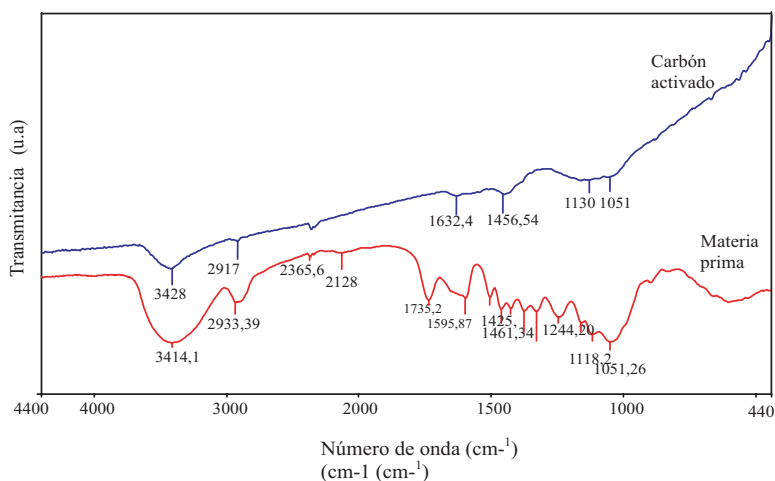


Figura 3. Espectros FTIR del precursor y del carbón activado P1,0/600.

Así, en el espectro FTIR del precursor se reconocen los principales grupos funcionales presentes: la banda ancha a $3414,16\text{ cm}^{-1}$ es atribuida a grupos hidroxílicos (O-H), los picos intensos a $2933,39$ y $1244,20\text{ cm}^{-1}$ son debidos a la vibración de tensión y flexión en el plano de los grupos $-\text{CH}_2-$ y C-O en ésteres ($=\text{C-O-C}$); estos grupos son característicos en la celulosa¹¹. La flexión en el plano a $1461,34\text{ cm}^{-1}$ y la flexión simétrica a 1374 cm^{-1} indican la presencia de grupos C-H y CH_3 , respectivamente. También se localizaron bandas atribuidas a las vibraciones de tensión a $1595,87$; $1504,94$ y $1425,21\text{ cm}^{-1}$ propias de C=C. La señal a $1735,28\text{ cm}^{-1}$ se atribuye a la presencia de C=O en aldehídos y lactonas. La señal a $1051,26\text{ cm}^{-1}$ le corresponde con C-O en fenoles (C-OH, primarios), la señal a $1118,27\text{ cm}^{-1}$ es debida al C-O en fenoles (C-OH secundarios), y a $1159,43\text{ cm}^{-1}$ le corresponde con C-O-C, estos grupos funcionales identificados en la materia prima son susceptibles a reacción con ácidos y bases¹². Luego de la activación se puede observar que muchas bandas características desaparecen manteniéndose las señales de los grupos hidroxílicos ($3428,97\text{ cm}^{-1}$), C=C ($1632,48$ y $1456,54\text{ cm}^{-1}$) y C-O en R-OH primarios (1051 cm^{-1}) y $-\text{CH}_2$ ($2917,64\text{ cm}^{-1}$) aunque en menor intensidad con respecto a la materia prima. Se observa, además, una banda en 1130 cm^{-1} , según Puizy et al.¹³, ésta correspondería a la presencia de especies fosforadas provenientes del agente impregnante. De acuerdo a los resultados del estudio de FTIR se puede establecer que el H_3PO_4 induce a cambios químicos importantes en la estructura del precursor (astillas de eucalipto) durante la descomposición pirolítica, promoviendo la deshidratación y redistribución de los constituyentes de la madera: lignina, celulosa y hemicelulosa, favoreciendo la conversión de los compuestos alifáticos a aromáticos, obteniéndose carbones activados de carácter principalmente poliaromático, donde el grupo funcional principal es el OH.

Efecto de la razón de impregnación y de la temperatura de activación en la remoción de Pb(II)

En las figuras 4A y 4B se muestran las isotermas que representan las capacidades de adsorción de Pb(II) (q_e) expresado en mg de plomo retenido por gramo de carbón activado, variando: la razón de impregnación (A) y la temperatura de activación (B); los otros parámetros (pH y temperatura) se mantuvieron constantes.

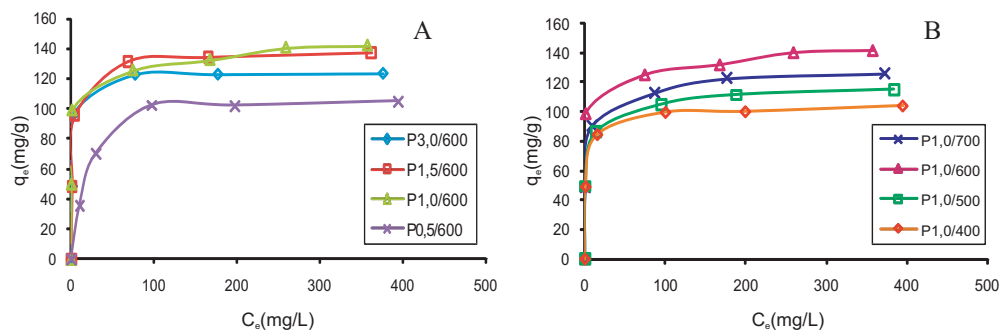


Figura 4. Isotermas de adsorción Pb(II) en carbones activados. Efecto de la variación de: la razón de impregnación (A) y la temperatura de activación (B).

En ambas figuras se puede observar que el valor de q_e muestra un comportamiento ascendente muy rápido hasta lograr condiciones estacionarias a partir de $C_e = 100\text{mg/L}$. Con respecto a la variación de la razón de impregnación, los valores de las isothermas se incrementaron cuando la razón de impregnación varió de 0,5 a 1,0; aparentemente no existe mucha diferencia en los valores de q_e a razones de impregnación de 1,0 y 1,5, pero cuando la razón de impregnación se incrementó a 3,0 los valores de q_e disminuyeron, manteniendo la misma tendencia.

Considerando el efecto de la temperatura de calcinación, se aprecia que a medida que se incrementó la temperatura de 400 a 600 °C, la capacidad de adsorción (q_e) aumentó. Sin embargo, a la temperatura de 700°C, el proceso se revirtió, disminuyendo la capacidad de adsorción en forma proporcional (la tendencia de la curva no cambia), por lo que se puede decir que este efecto se produce debido a los cambios en la porosidad, posiblemente por la reducción o contracción de los poros por el efecto térmico, lo que afectaría la difusión en el proceso de adsorción del plomo. Del análisis de las isothermas mostradas en todas las figuras 4A y 4B, se concluyó que el carbón que proporciona una mayor capacidad de adsorción fue la muestra P1,0/600 exhibiendo un valor de $q_e = 142,1\text{ mg Pb/g}$ de carbón activado.

Correlación de los datos experimentales con los modelos de isothermas de adsorción

Los modelos de Langmuir y Freundlich son los más usados para describir la relación entre la cantidad de adsorbato retenido y su concentración en el equilibrio en los sistemas de adsorción sólido-líquido. En el modelo de Langmuir se asume que la adsorción ocurre uniformemente en los sitios activados de la superficie del adsorbente, con la formación de una monocapa en donde el calor de adsorción es constante para todos los sitios y que no existe interacción entre las moléculas adsorbidas¹⁴. La representación lineal del modelo de Langmuir es expresada del siguiente modo:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q_o b} + \frac{C_e}{Q_o}$$

Donde, C_e es la concentración en el equilibrio (mg/L), q_e la capacidad de adsorción en el equilibrio (mg Pb/g), Q_o máxima cantidad de metal que puede ser adsorbido en la monocapa, b constante relacionada a la energía de adsorción (L/mg). Los valores de Q_o y b se hallaron luego de graficar C_e/q_e versus C_e . En el modelo de la isoterma de Freundlich se hace uso de una ecuación empírica, considerando que las energías de adsorción son heterogéneas y varían de acuerdo a la superficie cubierta. La forma lineal del modelo de Freundlich es la siguiente:

$$\log q_e = \log K_F + (1/n)\log C_e$$

Las constantes K_F y n representan a los factores que afectan la capacidad de adsorción e intensidad de adsorción, respectivamente, y son indicativos de la retención favorable del metal sobre la superficie del adsorbente. Estos valores se hallaron luego de graficar $\log q_e$ vs $\log C_e$. En la tabla 2, se resume las constantes y coeficientes de correlación de los modelos de Langmuir y Freundlich hallados de las ecuaciones linealizadas de las isothermas de la figura 4.

Tabla 2. Constantes de los modelos de Langmuir y Freundlich.

Carbón activado	Constantes de Langmuir			Constantes de Freundlich		
	Q_o (mg/g)	b (L/mg)	R^2	K_F	n	R^2
P1,0/600	142,8571	0,2244	0,9986	99,11	10,42	0,9867

Se observa que los datos experimentales de la isoterma se ajustaron más al modelo de Langmuir ($R = 0,9986$), lo que indicó que la adsorción se lleva a cabo en monocapa, sin interacciones laterales entre las moléculas del adsorbato y el calor de adsorción es constante en toda la superficie del carbón activado. Adicionalmente, se aprecia que el carbón P1,0/600 presenta un alto valor de Q_0 (124,86 mg/g) en comparación con los reportados por Goel *et al.*¹⁵ (34,72 mg/g), Issabayeva *et al.*¹⁶ (95,2mg/g) y Lavado *et al.*¹⁷ (78,74 mg/g).

Efecto del pH

La figura 5 muestra la influencia del pH inicial de la solución sobre la remoción de plomo, en el carbón activado P1,0/600, a diferentes concentraciones iniciales. Como se puede observar la cantidad adsorbida de plomo, q_e , se incrementó con el aumento de los valores del pH, y este valor fue mayor cuanto más alta fue la concentración de Pb, obteniéndose máximas adsorciones en un rango de pH entre 4 y 5, para pH mayores a 5 la adsorción decreció suavemente, manteniéndose la misma tendencia para todas las concentraciones de plomo. A partir de un pH de 5,7 el plomo empezó a precipitar como $Pb(OH)_2$ por lo que, sobre este valor de pH se estaría frente a dos fenómenos: precipitación y adsorción.

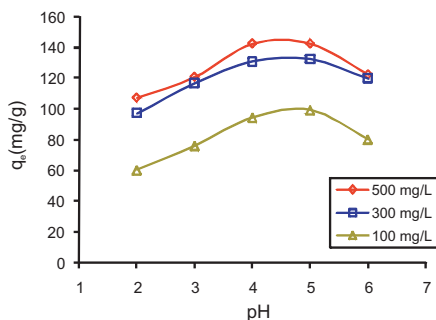


Figura 5. Efecto del pH en la remoción de Pb(II)

Para entender el mecanismo de adsorción de los iones metálicos sobre la superficie del carbón se graficó la variación del pH final (pH_f) luego de la adsorción versus pH inicial (pH_i) con diferentes concentraciones iniciales de plomo (300 y 500 mg/L). Para fines de comparación también se realizó una prueba en blanco. Los resultados de esta evaluación se observan en la figura 6.

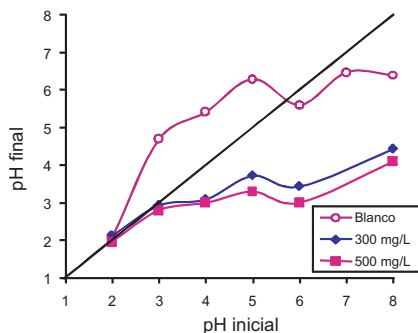
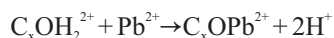
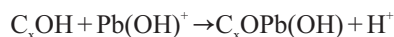
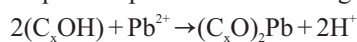


Figura 6. Efecto del pH_i de la solución sobre el pH_f en la adsorción de Pb(II)

El análisis de la curva de la muestra en blanco en un rango de pH entre 2-5 indica que el $pH_r > pH_i$. Esto se debería a que en este rango de pH_i , la reacción entre el agua y la superficie del carbón produce la liberación de iones OH^- incrementándose de esta manera el valor del pH_r . La liberación de OH^- produciría la protonación de la superficie del carbón, quedando la superficie cargada positivamente. En las curvas a concentraciones iniciales de Pb de 300 y 500 mg/L se observa que a pH_i mayor a 5 el $pH_r < pH_i$, lo que implica que en la interfase agua-superficie carbón activado, se produciría la liberación de iones H^+ , disminuyendo el valor del pH_r con respecto al pH_i , y por lo tanto se produce la desprotonación de la superficie del carbón, quedando ésta cargada negativamente.

Los iones Pb(II) en solución acuosa se encuentran solvatados e hidrolizados a $pH > 5$ donde la especie dominante es $Pb(OH)_2$ y a $pH < 5,0$ las especies existentes son: Pb^{2+} y $PbOH^+$. La influencia del pH en la adsorción del plomo sobre los carbones activados se podría explicar en base a la interacción electrostática, a bajos valores de pH (< 3) la superficie del adsorbente se encuentra protonada de manera que las especies: Pb^{2+} , $PbOH^+$ producirían una repulsión electrostática. Adicionalmente, existiría un efecto competitivo por los sitios de adsorción entre los iones Pb^{2+} y los protones H^+ presentes en la solución, lo que se reflejaría en el bajo valor de q_e . Al incrementarse el pH (> 3), los sitios cargados negativamente en la superficie del carbón van incrementándose, favoreciendo la atracción electrostática de las especies de plomo existentes aumentando el valor de q_e . Adicionalmente, es posible la existencia de un intercambio iónico entre las especies Pb^{2+} y $PbOH^+$ y los iones H^+ de la superficie del carbón^{14,15} lo que se explica mediante las siguientes reacciones:



Donde: C_x representa la superficie del carbón.

Este mecanismo de intercambio iónico propuesto se puede confirmar en la figura 6 donde se observa que los valores del pH_r con respecto a la muestra en blanco, decrecen, lo que evidencia la mayor liberación de los protones H^+ produciendo el decrecimiento del pH_r .

Efecto de la temperatura

La dependencia de la adsorción de la temperatura está asociada con varios parámetros termodinámicos. Este estudio se llevó a cabo a 20, 25, 35 y 45°C, manteniendo constantes los demás parámetros de adsorción. La energía estándar de Gibbs fue evaluada por:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_c$$

La constante de equilibrio (K_c) fue evaluada para cada temperatura, siguiendo la siguiente relación:

$$K_c = \frac{C_{Be}}{C_{Ae}}$$

Donde, C_{Be} es la concentración en el equilibrio en el adsorbente; C_{Ae} la concentración en el equilibrio en la solución. La entalpía de adsorción (ΔH°) y entropía (ΔS°) estándar fueron determinadas de la ecuación de Van't Hoff²:

$$\ln K_c = \frac{\Delta S^\circ}{R} - \frac{\Delta H^\circ}{RT}$$

ΔH° y ΔS° fueron obtenidos del intercepto y pendiente de la gráfica de $\ln K_c$ versus $1/T$. Los valores termodinámicos calculados se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros termodinámicos en la adsorción de Pb(II) sobre el carbón activado P1,0/600

T K	ΔG° kJ/mol	ΔH° kJ/mol	ΔS° J/Kmol
293	-14,590		
298	-15,368	1,176	157,077
308	-17,220		
318	-18,425		

Los valores negativos de ΔG° indicaron que el proceso es termodinámicamente factible y espontáneo. El valor positivo de ΔH° refleja que la interacción entre adsorbato-adsorbente es endotérmico y el valor ΔS° , indica que hay un incremento de la aleatoriedad en la interfase sólido-líquido.

Cinética de adsorción

En el proceso de adsorción, los parámetros cinéticos son útiles para predecir el grado de adsorción y proporciona importante información para el diseño y modelamiento del proceso¹⁴. La figura 7 muestra la influencia de la concentración de la solución y el tiempo de contacto en la adsorción de plomo sobre el carbón activado P1,0/600.

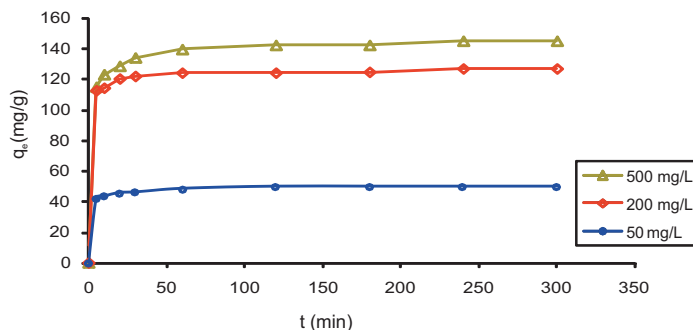


Figura 7. Efecto del tiempo de contacto y la concentración inicial en la adsorción de Pb(II) en el carbón P1,0/600.

Se observó que el proceso de adsorción es muy rápido en los primeros 6 min. La capacidad de adsorción (q_t) a un tiempo t , se estabiliza y se mantiene constante después de 50 min. Estos valores de q_t se incrementan a medida que la concentración de la solución de plomo es mayor. Los datos experimentales obtenidos de q_t y el tiempo de contacto fueron correlacionados en base a dos modelos diferentes: el modelo de Lagergren, o modelo de seudo primer orden y el modelo de seudo segundo orden, detallados a continuación:

Ecuación de Lagergren o modelo de seudo primer orden:

$$\log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2,303} t$$

Ecuación de seudo segundo orden:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t$$

Donde k_1 (min^{-1}) y k_2 ($\text{g}/\text{mg min}$) son las constantes de velocidad de seudo primer y segundo orden, respectivamente, q_e y q_t son las capacidades de adsorción (mg/g) en el equilibrio y a un tiempo t , respectivamente. Las constantes k_1 (min^{-1}) y k_2 ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) fueron halladas de los interceptos de las ecuaciones linealizadas de los gráficos de $\log(q_e - q_t)$ versus $\log q_e$ y t/q_t versus t , respectivamente. Los valores de k_2 se utilizan para calcular la velocidad inicial (h) determinada por:

$$h = k_2 q_e^2$$

Los valores de las constantes de velocidad de los modelos cinéticos a diferentes concentraciones se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Constantes de los modelos de pseudo primer y segundo orden

C_o (mg/L)	Seudo primer orden		Seudo segundo orden		
	k_1 (min^{-1})	R^2	k_2 g/mg min	h mg/g min	R^2
50	0,0297	0,9814	0,11964	30,211	1
200	0,0097	0,6991	0,00557	89,286	0,9999
500	0,0136	0,8456	0,00285	59,880	0,9999

Al analizar los valores de R^2 se puede concluir que el modelo que mejor se ajusta a los datos experimentales es el de seudo segundo orden, lo que demuestra que este modelo puede ser aplicado para todo el proceso de adsorción y establece que el plomo se quimisorbe sobre la superficie del carbón P1,0/600. Estos resultados concuerdan con otros trabajos realizados por Anoop *et al.* y Sekar *et al.*^{14,1}. Ellos adsorbieron plomo sobre carbones activados donde los datos experimentales se correlacionaron mejor con el modelo de seudo segundo orden. Asimismo, para una concentración de plomo de 500 mg/L, al comparar las velocidades iniciales en el proceso de adsorción de plomo (h) sobre el carbón preparado en el presente estudio con el mismo carbón activado con KOH ($h = 40,32 \text{ mg Pb/g carbón activado} \cdot \text{min}$)¹⁷, resultó que el carbón activado P1,0/600 presentó valores mayores de h (59,88 mg/g min).

Tratamiento del efluente:

El análisis químico que se realizó a un efluente industrial mostró que además de contener Pb^{2+} (6 mg/L), también contenía los siguientes iones en forma mayoritaria: Ca^{2+} (131 mg/L), K^+ (45,51 mg/L), Na^+ (44,85 mg/L) los cuales podrían ejercer un efecto selectivo o competitivo que podría influir en la adsorción de plomo. Por lo que se realizaron pruebas de adsorción en forma separada con soluciones estándar que contenían plomo y uno de los iones competitivos, en concentraciones similares a las presentes en el efluente industrial, para finalmente realizar

ensayos de adsorción con una solución que contenía plomo y los tres iones competitivos. En la tabla 5 se muestra los resultados de estas pruebas.

Se puede observar que el ión que ejerce mayor influencia en el proceso de adsorción de plomo es el Ca^{2+} . Esto podría deberse a que el ion Ca^{2+} al poseer la misma carga que el Pb^{2+} , y al estar en mayor concentración, estaría compitiendo en mayor proporción con el plomo, sobre todo en el proceso de intercambio iónico en la superficie del carbón activado. El efecto combinado de todos los iones se aprecia en el decrecimiento del porcentaje de remoción de 99,7% hasta 78,41%.

Tabla 5. Influencia de los iones competitivos en la remoción de Pb(II) sobre el carbón P1,0/600. Relación masa de carbón/volumen de solución = 10mg/50 mL, pH=5.

Iones	q_e (mg/g)	%R
Pb^{2+}	29,88	99,70
Pb^{2+} y K^+	29,62	98,73
Pb^{2+} y Na^+	27,86	92,87
Pb^{2+} y Ca^{2+}	26,61	88,70
Pb^{2+} , Ca^{2+} , K^+	23,52	78,41

Para evaluar la capacidad de adsorción de Pb(II) presente en el efluente, se pusieron en contacto diferentes cantidades del carbón con 50 mL del efluente industrial. La figura 8 muestra los resultados de estas pruebas.

Se puede apreciar que con una cantidad mínima (30 mg) se logró remover hasta 99,9% del plomo presente en el efluente industrial, aun a pesar de la presencia de otros cationes (Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+}).

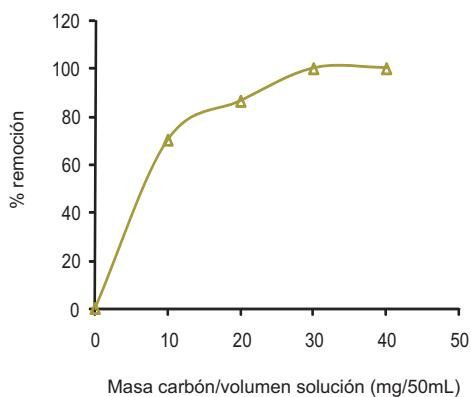


Figura 8. Efecto de la relación masa carbón/volumen de la solución sobre la remoción de Pb(II) contenido en el efluente industrial.

CONCLUSIONES

- Se logró obtener carbones activados con buenas capacidades adsorbentes de Pb(II), a partir de astillas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) mediante activación química con H_3PO_4 .
- Las condiciones de preparación empleadas en la activación ejercen una marcada influencia sobre la capacidad de adsorción de Pb(II); dichas condiciones fueron: razón agente activante/precursor = 1,0 y temperatura de activación = 600 °C (P1,0/600). La máxima cantidad de plomo adsorbido por gramo de carbón fue de 142,1 mg/g. Los resultados obtenidos indicaron que con un control de los parámetros de activación se puede lograr obtener carbones activados con buenas propiedades adsorbentes.
- Los resultados de la caracterización indicaron que se obtuvo carbones activados con micro y mesoporosidad y con altas áreas superficiales (hasta 761 m²/g). Se identificó la presencia de los grupos funcionales hidróxilos en la superficie del carbón activo (P1,0/600), que fueron los que favorecieron la adsorción de Pb(II).
- Se obtuvieron máximas remociones a un pH igual a 5, el proceso de adsorción se dio por interacción electrostática e intercambio iónico. El modelo cinético que describe mejor el proceso de adsorción fue el de pseudo segundo orden, lo que indica que se produce una quimisorción del plomo sobre el carbón activado. En tanto que, los datos experimentales de las isotermas se ajustaron mejor al modelo propuesto por Langmuir, el cual representa una adsorción en monocapa. El estudio termodinámico indicó que el proceso de adsorción de plomo es factible y espontáneo.
- Con la muestra P1,0/600 se logró adsorber un 99,9% de plomo contenido en efluente industrial lo que lo hace muy atractivo para su utilización en la remoción de plomo de efluentes industriales contaminados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la ayuda financiera proporcionada a través del Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC), y el apoyo brindado por el Departamento de Ciencias - Sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú, en la realización de este trabajo de investigación. Asimismo, al Dr. Javier Herguido, Dra. Pilar Pina y Gemma Gómez de la Universidad de Zaragoza.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sekar M., Sakthi V., Rengaraj S. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004: 279; 307-313.
2. Kalavathy M.H., Karthikeyan T., Rajgopal S., Miranda L.R. *Journal of Colloid and Interface Science* 2005: 292; 354-362.
3. Sudaryanto Y., Hartono S.B., Irawaty W., Hindarso H., Ismajji S. *Bioresource Technology* 2006: 97; 734-739.
4. Maciá Agullo J.A., Moore B.C., Cazorla Amorós D., Linares Solano A. *Carbon* 2004:42;1367-1370.
5. Carrot P.J.M., Ribeiro Carrott M.M.L., Mourao P.A.M. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 2006:75; 120-127.
6. Mohanty K., Jha M., Meikap B.C., Biswas M.N. *Industrial Engineering Chemistry Research* 2005:44; 4128-4138.
7. Kadiverlu K., Thamaraiselvi C., Namasivayam C. *Bioresource Technology* 2001:76; 2001, 63-65.

8. Lavado C., Recuay N., Bendezú S., García R., Muñoz Y., Escalona N. *Boletín de la Sociedad Química del Perú* 2002:3; 150-167.
9. Bendezú S., Oyague J, Romero A., García. R, Muñoz Y., Escalona N. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 2005:4; 677-684.
10. Peralta J., Sun M., Bendezú S. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 2008:74; 219-232.
11. Khezami L., Chetouani L, B., Taouk B., Capart R. *Powder Technology* 2005: 157; 48-56.
12. Youssef A.M., El-Nabarawy Th., Samra S.E. *Colloids and surface A: Physicochem. Eng. Aspects* 2004:235;153-163.
13. Puziy A., Poddubnaya O., Martínez A., Suárez F, Tascon J. *Carbon* 2002: 40; 1493-1505.
14. Anoop K., Airuddhan T.S. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 2002: 41; 5085-5093.
15. Goel J., Kadirvelu K., Rajagopal C., Garg V.K. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 2005: 44; 1987-1994.
16. Issabayeva G., Kheireddine M., Nik M. *Bioresource Technology* 2006: 97; 2350 -2355.
17. Lavado C., Sun M., Bendezú S. *Revista Virtualpro* 2009: 86, 21.

EVALUACIÓN DE METALES PESADOS EN EL TÓNER USADO EN FOTOCOPIADORAS. SU RELACIÓN CON LOS TRABAJADORES Y MEDIDAS DE MITIGACIÓN

María Elena Talavera Núñez¹, María Ofelia Guillén Zevallos²

RESUMEN

Los contaminantes ambientales constituyen un factor de riesgo para desarrollar enfermedades en salud ocupacional; la exposición y los efectos de la contaminación por metales pesados como el plomo y cromo, son situaciones que tienen varios antecedentes.

En el presente trabajo se cuantifican los metales pesados presentes en el tóner, por espectrofotometría de absorción atómica; luego teniendo en cuenta estos resultados, se estudió el efecto del plomo y cromo en los trabajadores de fotocopiadoras, evaluando a personas expuestas de ambos sexos (n=39) y en un grupo de personas de ambos sexos no expuestas ocupacionalmente (n=38), mediante las siguientes determinaciones: hemoglobina por el método de la formación de cianometahemoglobina, haciendo las lecturas por espectrofotometría visible; hematocrito por el método del tubo capilar; plomo y cromo en sangre por espectrofotometría de absorción atómica.

Los resultados obtenidos nos permitieron concluir que el tóner contiene los siguientes metales pesados: Pb, Cr, Fe, Zn, Cd, Cu. La presencia de estos metales afecta la hemoglobina de los trabajadores, ya que haciendo la medición se encuentra un valor bajo: 13,53 g/dl, siendo el valor normal entre 14,3 a 17,0 g/dl; el valor de hemoglobina del grupo control se encuentra más alto: 14,42g/dl. Asimismo, los datos obtenidos de plomo y cromo en sangre de los trabajadores superan el nivel máximo admitido para trabajadores expuestos que son de 30ug/dl para el plomo y de cromo que es 5 ug/dl. Al realizar el Sistema de Gestión Ambiental se encuentra que en la evaluación del impacto ambiental producido por este proceso, de acuerdo a la Matriz de Leopold, existen los siguientes factores impactados negativamente en orden de importancia: alteración de la salud y seguridad, calidad del aire, alteración de la capa superficial del suelo, alteración de las áreas antrópicas. Por lo cual se ha propuesto un programa de gestión ambiental que incluye medidas de mitigación para el primer factor impactado que es alteración de la salud y seguridad, proponiendo que use las medidas de seguridad como: uso de mandil, mascarillas, guantes, etc. Y que el trabajador se exponga como máximo un año a esta actividad.

Palabras clave: tóner, metales pesados, usuarios.

EVALUATION OF HEAVY METALS IN THE TONER USED IN PHOTOCOPIERS IN THE CITY OF AREQUIPA

ABSTRACT

Environmental contaminants are a risk factor for developing diseases, occupational health; exposure and the effects of pollution by heavy metals such as lead and chromium are several situations that have a history.

¹ Universidad Nacional San Agustín de Arequipa. Facultad de Ciencias Naturales y Formales. Unidad de Postgrado. Departamento Académico de Química. Martal7@hotmail.com. Mariaogz@yahoo.es

In this paper, it quantifies the heavy metals present in the toner, by atomic absorption spectrometry, after taking into account these results, the effect of lead and chromium in workers of photocopiers, assessing people exposed to both sexes (n = 39) and in a group of persons of both sexes not exposed occupationally (n = 38), through the following determinations: hemoglobin by the method of forming cyanmethaemoglobin, with readings by visible spectrophotometry, hematocrit by the method of capillary tube, lead and chromium in blood by atomic absorption spectrometry. The results enabled us to conclude that the toner contains the following heavy metals: Pb, Cr, Fe, Zn, Cd, Cu. The presence of these metals affects the hemoglobin of workers since making the measurement is a low value: 13.53 g / dl, being the normal value between 14.3 to 17.0 g / dl; the value of hemoglobin control group is higher: 14.42 g / dl. Also the data obtained from lead and chromium in the blood of workers exceed the maximum allowable level for workers who are exposed to 30ug/dl for lead and chromium that is 5 ug / dl. In conducting the environmental management system is that the environmental impact assessment produced by this process, according to Matrix of Leopold, the following factors negatively impacted in order of importance: a change in the health and safety, air quality, alteration of the surface layer of soil, alteration of the areas. It has been proposed an Environmental Management Program that includes mitigation measures for the first factor is that change impacted the health and safety, by proposing to use safety measures such as: use of apron, masks, gloves, etc. And the employee is maximum one year to expose this activity.

Key words: toner, heavy metals, users.

INTRODUCCIÓN

Los contaminantes ambientales constituyen un factor de riesgo para desarrollar enfermedades; muchos de ellos contribuyen a afecciones multifactoriales. El plomo es considerado, desde hace décadas, uno de los contaminantes ambientales más importantes; es un tóxico acumulativo, por lo que se le vincula con enfermedades crónicas^{1,2}.

Los principales mecanismos de acción tóxica del plomo se vinculan a la inhibición de enzimas sulfhídricas cuya manifestación más importante es la alteración de la síntesis del grupo hemo³. Esta alteración afecta no solamente la síntesis de la hemoglobina sino otras hemoproteínas, como los citocromos que influyen en la función renal y neurológica. La alteración cardiovascular: hipertensión arterial, se vincula al incremento de la reactividad vascular causada por el plomo mediante el aumento de la concentración de calcio intracelular y la estimulación de la calmodulina⁴.

El avance de la tecnología nos trae beneficios y también problemas, uno de estos sería la contaminación del ambiente por el uso indiscriminado de fotocopiadoras, las cuales emplean un pigmento llamado tóner, que contiene metales pesados. El trabajador de las fotocopiadoras está expuesto a este tipo de contaminación, que se produce por la manipulación o en el mantenimiento de la fotocopiadora. La cual se puede dar a través de la piel, por inhalación al respirar el aire con material particulado, también al ingerir los alimentos cerca del equipo⁵.

Para determinar los efectos producidos en la salud de los trabajadores, se consideraron los siguientes indicadores: medición de hemoglobina, de hematocrito y la determinación de metales pesados en sangre⁶. En el caso del plomo su presencia en el flujo sanguíneo va a influir en la hematopoyesis y en la síntesis del grupo hemo, por lo que disminuye la cantidad de hemoglobina⁷.

PARTE EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se planteó como objetivo determinar el contenido de metales pesados en el tóner y evaluar la influencia de éstos en la salud de los trabajadores en fotocopiadoras mediante indicadores biológicos y proponer un sistema de gestión ambiental.

El trabajo se realizó en la ciudad de Arequipa, durante los años 2003 al 2005, en los Laboratorios del Departamento Académico de Química de la UNSA ubicados en la Avenida Independencia de la ciudad. Se realizó un estudio transversal, descriptivo y analítico. Previa autorización de los trabajadores se les evaluó haciéndoles la determinación de hemoglobina, por espectrofotometría visible; hematocrito por el método del tubo capilar; plomo y cromo en sangre por espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados se contrastaron con un grupo de alumnos de la Escuela Profesional de Química - UNSA, que fueron el grupo control. También se realizaron determinaciones de metales pesados en muestras de tóner. Se efectuó un sistema de gestión ambiental para el proceso de fotocopiado incidiendo en la Evaluación del Impacto Ambiental (EIA) y en las medidas de mitigación; finalmente, se propusieron medidas de mitigación para los impactos más fuertes^{8,9}.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la determinación de metales pesados en el tóner, se encontró los siguientes resultados (tabla 1):

Tabla 1: Contenido de metales pesados en el tóner

Metal	Pb	Fe	Cu	Cr	Zn	Cd
Conc.ppm	36,006	107,464	22,016	60,294	30,728	0,0807

Con relación a la hemoglobina, hematocrito, plomo y cromo en sangre se encontró los siguientes resultados (tabla 2).

Tabla 2: Análisis clínicos de los grupos estudiados

	Hb g/dl	Hto %	Pb ug/dl	Cr ug/dl
Trabajador	13,53 ± 1,12	42,02 ± 2,71	39,74 ± 8,97	33,08 ± 4,99
Control	14,42 ± 1,67	43,60 ± 3,68	25,00 ± 6,96	23,06 ± 4,59
Límites	12,0 - 17,0	37 - 54	30,00	5,00

Como se observa en la tabla 2, para la hemoglobina se detectó que el valor para el grupo de trabajadores es menor, así como los valores del hematocrito del grupo control, lo que nos indica en ambos casos el efecto de la exposición. Respecto al plomo y cromo en sangre se encontró que en los trabajadores el valor es mayor que para el grupo control, sobrepasando el límite permisible de 30ug/dl para el plomo y de 5ug/dl para el cromo, indicándonos el efecto de la exposición. Los grupos denominados como control y expuesto, respectivamente, muestran diferencias altamente significativas que evidencian una exposición directa al plomo y cromo.

La evaluación estadística de los datos para un nivel de confianza del 95% se realizó mediante la prueba t-student de comparación de medias, para lo cual se calculó el estadístico-t y se comparó con el estadístico de tablas^{10, 11}.

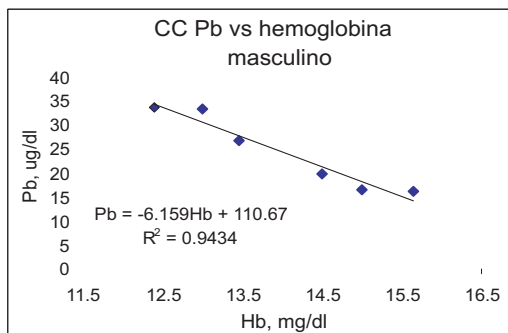


Figura 1. Comportamiento del plomo con la hemoglobina para el sexo masculino.

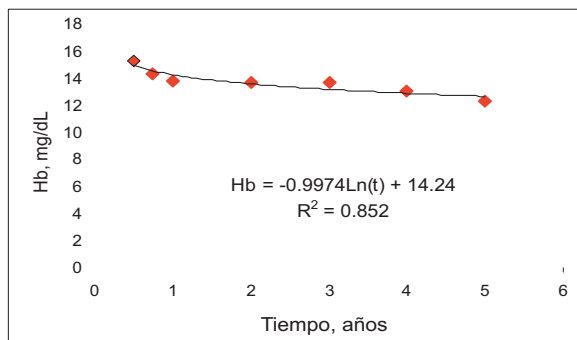


Figura 2. Comportamiento de la hemoglobina con el tiempo.

En la figura 1, el comportamiento de la gráfica es una recta con pendiente negativa, que nos indica que la Hb baja al aumentar la concentración del Pb y en la figura 2 se observa la gráfica de un modelo logarítmico donde el valor que acompaña a la variable independiente es negativo indicando que la Hb de los trabajadores disminuye con el tiempo de exposición laboral en las fotocopiadoras; el tiempo de exposición del trabajador varía de 5 meses a 5 años. Al realizar el Sistema de Gestión Ambiental se encuentra que en la evaluación del impacto ambiental producido por el proceso de fotocopiado, de acuerdo a la Matriz de Leopold, existen los factores impactados que se observan en la tabla 3.

En esa tabla se ha construido una matriz de importancia donde se consideran cuatro impactos que afectan negativamente al ambiente, y se les ha colocado en orden de importancia: alteración de la salud y seguridad con (-28/21), calidad del aire (-20/19), alteración de la capa superficial del suelo con (-20/13), alteración de las áreas antrópicas (-19/14). Proponiendo medidas de mitigación para los principales impactos que van a afectar la salud y seguridad de los trabajadores.

Tabla 3. Matriz de importancia para el proceso de fotocopiado

Actividades			Fase de implementación			Fase de funcionamiento						Fase de cierre		Valores finales								
Acciones antrópicas			Transporte de equipos y materiales	Limpieza de local	Ubicación de equipos y muebles	Ubicación materiales	producción de residuos sólidos	Transporte de materiales	Almacenaje de materiales	Fotocopiado	Embalado y entrega	Mantenimiento de equipos	Limpieza de equipos	Radiación y emisiones	Producción de residuos sólidos	Retiro de equipos	Limpieza de local	Producción de residuos sólidos	Promedios negativos	Promedios positivos	Promedios aritméticos	Magnitud
Medio antrópico	Aspecto sociocultural y económico	Alteración de la salud y seguridad	-2/2	-2/1			-3/2	-2/2	-1/1	-4/4		-2/1	-2/1	-2/2	-3/2		-2/1	-3/2	-28	-28	21	
Medio físico	Aire	Calidad del aire	-3/3		-1/1	-1/1	-2/2	-3/3	-1/1	-2/2	-1/1			-2/2	-1/1	-1/1		-2/1	-19	-20	19	
Medio físico	Suelo	Alteración de la capa superficial	-2/1	-1/1			-3/2	-2/1		-2/1		-1/1	-1/1	-3/2			-1/1	-3/1	-14	-20	13	
Medio biológico	Ecosistema	Alteración de áreas antrópicas	-2/2	-2/1			-2/2	-2/2					-2/1	-2/1	-3/2		-2/1	-3/2	19	-19	14	

En la tabla 4 se proponen las medidas de mitigación para los impactos más afectados, indicando en qué fase del fotocopiado se encuentran, cuál va a ser el indicador, la descripción de la actividad y la relevancia.

Tabla 4. Medidas de mitigación para el proceso de fotocopiado

Componente o factor ambiental	Fase	Indicador	Descripción de la actividad	Descripción del impacto	Relevancia	Medidas de mitigación
Calidad de aire	Implementación, operación y cierre	Polvo, PM ₁₀ , PM _{2.5}	Transporte y ubicación de equipos y materiales, fotocopiado	Material particulado en suspensión, PM ₁₀ , PM _{2.5}	Mediana relevancia	<ul style="list-style-type: none"> Humificación del medio ambiente Uso de GLP (gas licuado de petróleo) Reforestación Programa de monitoreo.
Salud, seguridad e higiene	Implementación, operación y cierre	Análisis clínicos en usuarios	Transporte y ubicación de equipos y materiales, fotocopiado	Usuarios con alteraciones en su salud	Alta relevancia	<ul style="list-style-type: none"> Medidas para disminuir el polvo (humificadores) Buena ventilación en locales. Uso de implementos necesarios (mascarillas, guantes, lentes) Capacitación de los usuarios en medidas de seguridad e higiene. Programa de monitoreo

continúa en la pág. siguiente ...

... viene de la pág. anterior

Alteración de la capa superficial de suelo	Implementación, operación y cierre	Depósito de residuos sólidos en suelos	Transporte y ubicación de equipos y materiales, fotocopiado	Suelos con aumento de residuos sólidos sin tratar	Alta relevancia	<ul style="list-style-type: none"> • Medidas para disminuir los R.S. • Descompactación del suelo • Capacitación de usuarios en buena disposición de R.S. • Planes de contingencia: normas de seguridad. • Programa de monitoreo.
--	------------------------------------	--	---	---	-----------------	---

En la tabla 5 se muestran los programas de monitoreo y medición: que se harán para vigilar la salud, seguridad e higiene de los usuarios.

Tabla 5. Programa de monitoreo para la salud seguridad e higiene de usuarios

Estación de muestreo	Etapas	Frecuencia de muestreo	Parámetro	Método	Unidad de medición
E1: muestras al azar a 10 usuarios	Proceso de fotocopiado	Bimensual	Hemoglobina	Espectrofotómetro	mg/dl
			Hematocrito	Físico	%
			Presión arterial	Físico	mm de Hg
			Pulso	Físico	Pulso/min
			Plomo	Abs. atómica	mg/dl
			Cromo	Abs. atómica	mg/dl
			Mercurio	Abs. atómica	mg/dl
			Revisión médica	Médico	

CONCLUSIONES

- El tóner contiene metales pesados en las siguientes cantidades: plomo (3,6006ppm), cromo (6,0294ppm), hierro (10,7464ppm), cinc (3,0728ppm), cadmio (0,08071ppm), cobre (2,2016ppm).

- La hemoglobina de los trabajadores se encuentra en un valor bajo: 13,53 g/dl, siendo el valor normal entre 14,3 a 17,0 g/dl; el valor de hemoglobina del grupo control es más alto: 14,42g/dl. Al realizar el tratamiento estadístico utilizando la prueba del t student, comparando los valores de los trabajadores y grupo control, hay diferencia significativa ya que $t_{cal} > t_{tablas}$ para un 95% de probabilidad. Lo que nos indica que hay influencia del tóner en la salud de los trabajadores.

- Al realizar un modelo matemático relacionando tiempo de exposición y hemoglobina en los trabajadores, se encontró la ecuación logarítmica: $Hb=0,9974 \ln(t)+14,24$, con una correlación de 85,20%; el valor que acompaña al tiempo es negativo, lo que nos indica que la hemoglobina de los trabajadores disminuye al aumentar el tiempo de exposición. Lo mismo sucede con el hematocrito la ecuación es $Hb= 0,866\ln(t)+ 42,69$, con una correlación de 86,10%.

- Los datos obtenidos de plomo en sangre de los trabajadores, están entre 56,67 y 30,00ug/dl, con un promedio de 39,74ug/dl; estos valores en casi todos los casos sobrepasan los límites biológicos permisibles, que son: 30ug/dl en mujeres y 40ug/dl en varones. Para el grupo control los valores están entre 36,67 y 16,33 ug/dl, siendo el promedio de 25,00ug/dl. Los datos obtenidos de cromo en sangre de los trabajadores, están entre 43,33 y 26,00ug/dl, con un promedio de 33,08ug/dl; estos valores sobrepasan el límite biológico permisible, que es de 5ug/dl. Para el grupo control los valores están entre 30,00 y 16,67ug/dl, siendo el promedio de 25,00ug/dl, que también sobrepasa el límite biológico.

- Al realizar el Sistema de Gestión Ambiental se encuentra que en la evaluación del impacto ambiental producido por el proceso de fotocopiado, de acuerdo a la Matriz de Leopold, existen los siguientes factores impactados negativamente en orden de importancia: alteración de la salud y seguridad con (-28/21), calidad del aire (-20/19), alteración de la capa superficial del suelo (-20/13), alteración de las áreas antrópicas (-19/14). Para los cuales se ha propuesto un programa de gestión ambiental que incluye medidas de mitigación para cada impacto así como un programa de monitoreo.

AGRADECIMIENTOS

- A la Unidad de Postgrado de la Facultad de Ciencias Naturales y Formales de la UNSA.
- A los docentes del Departamento Académico de Química de la UNSA.
- Al personal de Servilab que nos apoyó en la realización de la parte experimental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albiano, Nelson. "Toxicología Laboral: Criterios para la vigilancia de los trabajadores expuestos a sustancias químicas peligrosas". Trabajo Seguro. Centro de información y asesoramiento. *Revista Toxicología Laboral*. Año 1 N° 7. Argentina. 2005.
2. Blanco, A., *et al.* "Anemias nutricionales en mujeres lactantes de Costa Rica". Archivos Latinoamericanos de Nutrición. ISSN 0004-0622. vol. 53. N° 1. Caracas, Venezuela. 2003.
3. Armas, R. C. "Tecnología Ambiental". CONCYTEC. Primera Edición. Trujillo, Perú. 2002.
4. Moreno Sáez, Neus. "Cromo en orina, utilización como índice biológico en la exposición laboral". Centro Nacional Recondiciones de Trabajo Barcelona. N° 2. España. 1997.
5. Cantú Martines, Pedro. "Relación de los niveles de plomo en sangre con la ingesta de calcio y hierro en mujeres potencialmente gestantes". *Revista de Salud Pública y Nutrición*. Vol. 3. N° 3. México. 2002.
6. Codina J. y Pérez A. "Los metales pesados como polucionantes tóxicos". Revista Encuentros en la Biología. Editada en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga. ISSN 1134-8496. España. 1993.
7. Caravaca, Hedy. "Determinación de los valores de concentración de hemoglobina, hematocrito y concentración corpuscular media en una población de adultos sanos". *Revista Calidad en Salud del Colegio de Bioquímicos*. Vol 4-N° 36. Santa Fé. Argentina, Santa Fe. 2005.
8. Fernández-F. *et al.* "Intoxicación crónica por plomo". Anales de Medicina Interna, Departamento de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela. ISSN 0212-7199 vol.19 N°3. Madrid, España. 2002.

9. Stejen I., Susana. “Metales pesados ecotóxicos”. Universidad Católica del Norte. Primera Edición. Antofagasta, Chile. 2004.
10. De la Fuente Francisco. “Toxicología Ambiental”: Universidad Católica del Norte. Primera Edición. Antofagasta, Chile. 2004.
11. Ruiz González, Marlen. “Ferropenia en niños de 6 a 24 meses de edad con hemoglobina normal”. *Revista Cubana de Medicina*. Vol. 18(2) ISSN 0864-2125. Habana, Cuba. 2002.
12. Queirolo P, Fabricio. “Contaminación de aguas”. Universidad Católica del Norte. Primera Edición. Antofagasta, Chile. 2004.

Enseñanza de la Química

CARACTERIZACIÓN DE BASES DE SCHIFF DERIVADAS DE 2-AMINOFENOL, USANDO RMN 1D Y 2D

Sergio Zamorano^{*a}, Juan Camus^a, Andrea Orellana^a, Maribel Osorio^a

RESUMEN

En este trabajo se presenta el resultado de la síntesis de una base de Schiff a partir del 2-aminofenol con benzaldehído y se caracteriza el producto, usando el microanálisis, la espectroscopía infrarroja, la espectroscopía de RMN de H^1 y C^{13} y la RMN en dos dimensiones (COSY y HMBC), para determinar su estructura.

Palabras clave: Bases de Schiff, espectroscopía RMN 1D y 2D

CARACTERIZATION OF SHIFF BASES DERIVATED FROM 2-AMINOPHENOL, USING RMN 1D AND 2D

ABSTRACT

In this work the result of the synthesis of a base of Schiff is presented, starting from the 2-aminophenol with benzaldehyde and the product is characterized, using the microanalysis, the infrared spectroscopy, the spectroscopy of RMN of H^1 and C^{13} and the RMN in two dimensions (COSY and HMBC), to determine its structure.

Key words: Schiff Bases, RMN 1D and 2D spectroscopy

INTRODUCCIÓN

Las técnicas más importantes utilizadas para investigar la estructura de las moléculas actualmente son la RMN y la Difracción de Rayos X, utilizando principalmente monocristales¹. La RMN se puede aplicar no sólo para determinar la estructura de moléculas simples y complejas como las proteínas², sino también para verificar el grado de pureza de drogas y fármacos, control de calidad de productos químicos, análisis de polímeros, etc.^{3,4}.

La utilización de la RMN bidimensional ha alcanzado últimamente una gran importancia para investigar sistemas homonucleares y heteronucleares; los primeros permiten determinar cuáles núcleos se encuentran acoplados entre sí, lo que hace posible determinar el número y tipo de protones que se encuentran a dos o tres enlaces de distancia⁵.

Por ejemplo, el COSY nos indica la correlación entre dos protones que se encuentran acoplados escalarmente entre ellos; como resultado de esta correlación se obtiene un diagrama de contorno, donde las señales que se localizan fuera de la diagonal son las más importantes, porque las coordenadas de ellas son los desplazamientos químicos de los protones que se encuentran acoplados escalarmente a dos o tres enlaces de distancia. Otro experimento RMN interesante es el NOESY, que muestra el llamado “efecto nuclear Overhauser” entre dos protones; este efecto se observa cuando los núcleos se encuentran próximos (a menos de 5 Angstroms de distancia); en este caso se generan señales fuera de la diagonal cuya integral en tres dimensiones es proporcional a la distancia entre núcleos^{5,6}.

^a Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Playa Ancha, Carvallo N°270, Playa Ancha, Valparaíso, Chile.
szamoran@upla.cl

En cambio, los experimentos heteronucleares permiten correlacionar núcleos distintos; por ejemplo el H^1 y el C^{13} . Entre estos experimentos el HMBC permite detectar al núcleo más sensible y muestra la correlación a dos o tres enlaces de distancia entre núcleos distintos, es decir, permite conocer las conectividades entre el H^1 y C^{13} en un rango más amplio (hasta tres enlaces de distancia)^{5,6}.

El objetivo de este trabajo es entregar las herramientas básicas de investigación en el campo de la RMN bidimensional a estudiantes que se inician en el campo de la síntesis orgánica y especialmente con el objeto de preparar ligandos para síntesis de compuestos de coordinación⁷.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Síntesis de la 2-aminofenol con benzaldehído

En un vaso de precipitado de 100 ml se disolvieron 0,5 gramos de 2-aminofenol (Aldrich) en 20 ml de metanol absoluto; se agregaron 0,45 gramos de sulfato de magnesio (Fluka), para eliminar el agua producida en la reacción y 0,465 gramos de benzaldehído (Merck). Se agitó durante 1 hora; se dejó reposar 1 día, bajo refrigeración y luego se mantuvo en el congelador durante 2 semanas a $-5^{\circ}C$. Se obtuvo 430 mg de cristales de color café oscuro que pudieron ser separados de la solución. El rendimiento de la reacción fue de 47,6%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis químico elemental se obtuvieron usando un equipo Fison EA-1108 (CHNS-O): El % de carbono, teórico/experimental 79,2/79,0; el % de hidrógeno 5,6/6,5; y el % de nitrógeno 7,1/7,2%.

Las bandas más importantes del espectro IR para la amina (2-aminofenol), son las señales del grupo amino: dos picos anchos correspondientes a la vibración ν_{N-H} que se presenta entre $3304,6-3375,5\text{ cm}^{-1}$; también se observa la señal del anillo aromático a los $742,5\text{ cm}^{-1}$ y una banda ancha a los $3051,8\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a la vibración del OH. El espectro IR para el benzaldehído presenta dos picos bastante agudos, pero débiles en el intervalo $2737,8-2819,8\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a las señales C-H del aldehído; además, se observan una banda a los $1701,2\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración $C=O$; la absorción aromática para el ν_{C-H} , a los 3063 cm^{-1} y la señal del anillo aromático δ_{C-H} a los $745,9\text{ cm}^{-1}$. El espectro IR de la base de Schiff (BS-BZ) muestra una nueva banda a los $1625,1\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a la vibración de $\nu_{C=N}$, lo cual comprueba la formación del enlace imínico^{7,8}.

El espectro de RMN H^1 , de la amina presenta una señal a los 3,6 ppm correspondiente a la vibración N-H; también se observa una señal a los 4,8 ppm correspondiente a la vibración OH. Los protones del anillo aromático C-H absorben a campo bajo en el intervalo 6,8-6,9 ppm. En el espectro de RMN H^1 del benzaldehído se observa un singulete a campo muy bajo, a los 9,6 ppm, correspondiente a la vibración C-H del aldehído. Las señales del anillo aromático se encuentran en el intervalo de 7,5-7,8 ppm.

En el espectro RMN H^1 de la base de Schiff (BS-BZ) a campo bajo (8,7 ppm) aparece un singulete característico del protón imínico del $-N=CH-$ correspondiente a la formación de la base de Schiff. Se identificaron los 11 átomos de hidrógeno, (asignados como a-k, en la figura 2) que presenta la molécula y que aparecen en el intervalo de 6,8-7,3 ppm.

El espectro de RMN C^{13} , de la amina presenta a campo bajo la señal del carbono unido al grupo hidroxilo a los 145,8 ppm. En cambio, la señal del carbono unido al grupo amino

aparece a los 137,8 ppm. Los carbonos aromáticos presentan los siguientes desplazamientos químicos: δ (ppm) 114,5; 116,5; 119,5; 114,4. En el espectro de RMN C^{13} del benzaldehído se observa a campo bajo el carbono del grupo aldehído que aparece a los 192 ppm. La señal del enlace C-C se observa ligeramente a campo bajo apareciendo a los 136,9 ppm. Los carbonos aromáticos presentan los siguientes desplazamientos químicos δ (ppm): 129,8; 129,2; 134,2; 129,2; 129,8

En el espectro de RMN C^{13} , de la base de Schiff (Bs-Bz) se observa a campo bajo una señal a los 157,2 ppm, asignada al carbón imínico. La señal C-OH tiene un leve desplazamiento hasta 152,4 ppm. Los carbonos aromáticos presentan los siguientes desplazamientos δ (ppm): 115,1; 128,9; 120,4; 115,9; 128,9* (carbono 9 y 9'); 129,0** (carbono 10 y 10'); 131,7. Los carbonos cuaternarios C-C aparecen a los 135,9; C-N a los 135,6 y C-OH a los 152,4 ppm.

En resumen, los espectros RMN correspondientes a la base de Schiff (BS-BZ) de fórmula $C_{13}H_{11}NO$, permitieron asignar los núcleos de hidrógeno y carbono-13 y encontrar sus correlaciones en la estructura. El análisis del espectro de RMN H^1 se inició observando cada señal; se extrajo información básica como el corrimiento químico de los picos (δ), el tipo de pico (doblete, triplete, o multiplete) y la relación de intensidades de los picos. En el espectro se identificaron los 11 hidrógenos que presenta el compuesto, en el intervalo 6,8-7,3 ppm, se observan las señales correspondientes a los hidrógenos de los anillos aromáticos y a campo bajo a los 8,7 ppm se observa una señal correspondiente al protón imino.

Los espectros RMN C^{13} y DEPT 135 permiten identificar los carbonos cuaternarios: 3 señales ubicadas en los desplazamientos químicos $\delta = 152,4; 135,9$ y $135,6$ ppm. La señal de 157,2 ppm es característica del carbono imínico $-N=CH-$ reafirmando la formación de la base de Schiff. Las otras 5 señales corresponden a carbonos aromáticos, que presentan los siguientes desplazamientos químicos: 115,9; 120,1; 128,9; 115,0; 131,7 ppm (figura 1).

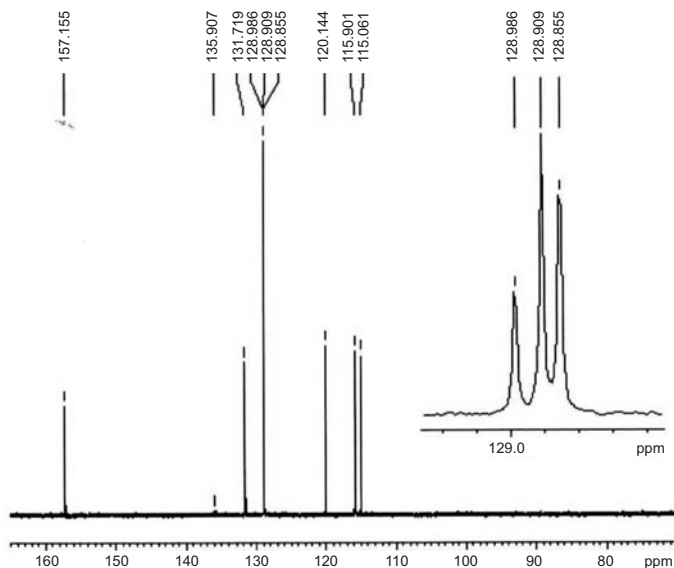


Figura 1. Espectro DEPT 135 del BS-BZ

En el modelo bidimensional propuesto (figura 2) los carbonos se marcaron en forma correlativa del 1 al 11

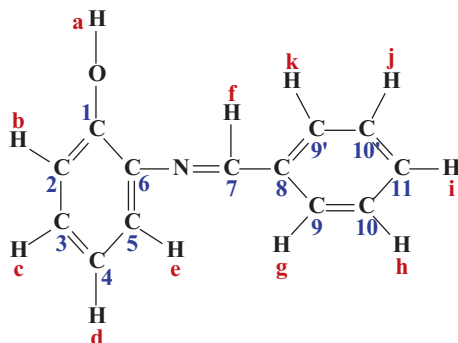


Figura 2. Modelo bidimensional de la base de Schiff de tipo BS-BZ ($C_{13}H_{11}NO$)

Para verificar el modelo estructural propuesto se utilizaron los espectros bidimensionales COSYHH (figura 3) y HMBC (figura 4).

El espectro bidimensional COSY HH del BS-BZ muestra las 11 señales correspondientes a los 11 protones de la molécula, a lo largo de la diagonal. Los picos de intersección permiten observar cuáles protones están acoplados; estos picos aparecen en posiciones simétricas respecto de la diagonal y son 10 en total, correspondientes a los dos anillos aromáticos.

El espectro bidimensional HMBC muestra las conectividades entre el H^1 y el C^{13} . Los carbonos cuaternarios presentan una o varias señales, pero no se observa acoplamiento, debido a que la interacción C-H no es directa, sino que el carbono interacciona con un protón que se encuentra a dos o tres enlaces de distancia. Este espectro proporciona información sobre los carbonos acoplados y no acoplados y además, sobre la conectividad de ellos, con los hidrógenos unidos a través de uno, dos o tres enlaces.

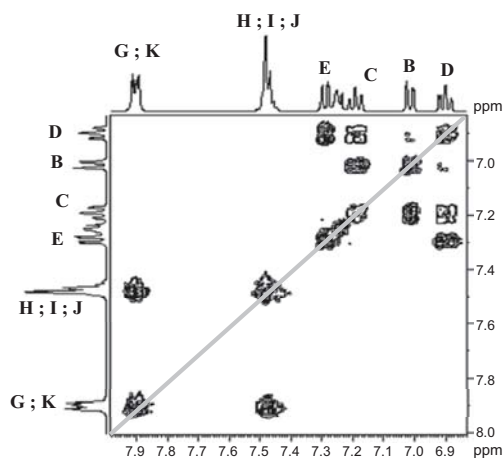


Figura 3. Espectro bidimensional COSYHH de BS-BZ

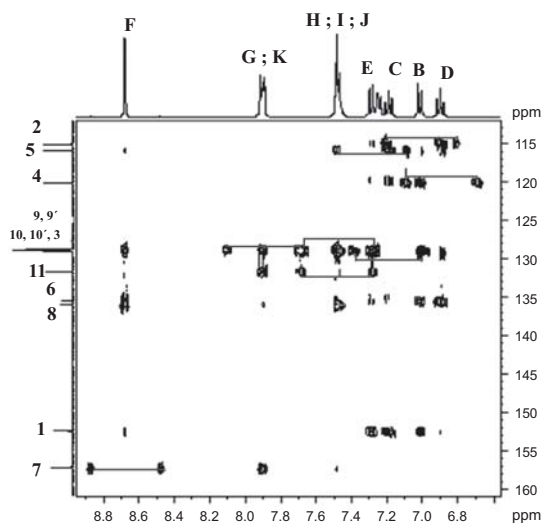


Figura 4. Espectro bidimensional HMBC de Bs-BZ

La interpretación de los espectros RMN bidimensional y HMBC de interacción C - H, a través de 2 o 3 enlaces, para la base de Schiff BS-BZ, considerando la asignación de los núcleos de hidrógeno de la figura 2, es la siguiente:

El carbono N°1 (152,4 ppm) no tiene hidrógeno directamente; interacciona con el hidrógeno b (7,2 ppm) a través de dos enlaces y con el hidrógeno c (7,1 ppm) a través de tres enlaces.

El carbono N°2 (115,1 ppm) tiene el hidrógeno b directamente (7,2 ppm); interacciona con el hidrógeno c (7,1 ppm) a través de dos enlaces y con el hidrógeno d (7,2 ppm) a través de tres enlaces.

El carbono N°3 (128,9 ppm) tiene el hidrógeno c directamente (7,1 ppm); interacciona con el hidrógeno b (7,2 ppm) a través de dos enlaces y con el d (7,2 ppm) a través de dos enlaces y con el e (7,2 ppm) a través de tres enlaces.

El carbono N°4 (120,1 ppm) tiene el hidrógeno d directamente (7,2 ppm); interacciona con el hidrógeno c (7,1 ppm) a través de dos enlaces y con el hidrógeno e (7,2 ppm) a través de dos enlaces y con el b (7,2 ppm) a través de tres enlaces.

El carbono N°5 (115,9 ppm) tiene el hidrógeno e directamente (7,2 ppm); interacciona con el hidrógeno c (7,1 ppm) a través de tres enlaces y con el hidrógeno d (7,2 ppm) a través de dos enlaces.

El carbono N°6 (135,6 ppm) no tiene el hidrógeno directamente; interacciona con el hidrógeno e (7,2 ppm) a través de dos enlaces y con el hidrógeno d (7,2 ppm) a través de tres enlaces y con el f (8,7 ppm) a través de tres enlaces.

El carbono N°7 (157,2 ppm) tiene el hidrógeno f directamente (8,7 ppm); interacciona con el hidrógeno g (7,4 ppm) a través de tres enlaces y con el hidrógeno k (7,4 ppm) a través de tres enlaces.

El carbono N°8(135,9 ppm) no tiene el hidrógeno directamente; interacciona con el hidrógeno f (8,7 ppm) a través de dos enlaces y con el hidrógeno g (7,4 ppm) a través de dos enlaces, con el k (7,4 ppm) a través de dos enlaces, con el h (7,3 ppm) a través de tres enlaces y con el j (7,3 ppm) a través de tres enlaces.

El carbono N°9 y su equivalente 9* (128,9 ppm) tiene el hidrógeno g directamente (7,4 ppm) y k (7,4 ppm) interacciona con el hidrógeno h (7,3 ppm) a través de dos enlaces y con el hidrógeno j (7,3 ppm) a través de dos enlaces, con el f (8,7 ppm) a través de tres enlaces y con el i (7,2 ppm) a través de tres enlaces.

El carbono N°10(129,0 ppm) y su equivalente 10*, tiene el hidrógeno h directamente (7,3 ppm); interacciona con el hidrógeno i (7,2 ppm) a través de dos enlaces, con el hidrógeno k (7,4 ppm) a través de dos enlaces y con el g (7,4 ppm) a través de dos enlaces.

El carbono N°11(131,7 ppm) tiene el hidrógeno i directamente (7,2 ppm); interacciona con el hidrógeno h (7,1 ppm) a través de dos enlaces, con el hidrógeno j (7,3 ppm) a través de dos enlaces, con el k (7,4 ppm) a través de dos enlaces y con el g (7,4 ppm) a través de dos enlaces.

CONCLUSIONES

Se sintetizó una nueva base de Schiff y se caracterizó el compuesto integrando varias técnicas de investigación, como el microanálisis, espectroscopía IR, la RMN de H^1 y de C^{13} y para determinar la estructura propuesta se utilizaron los espectros DEPT, HMBC y COSY que permite, en ambiente magnético de los sistemas de spin, proponer la posible estructura tridimensional de la molécula (figura 5).

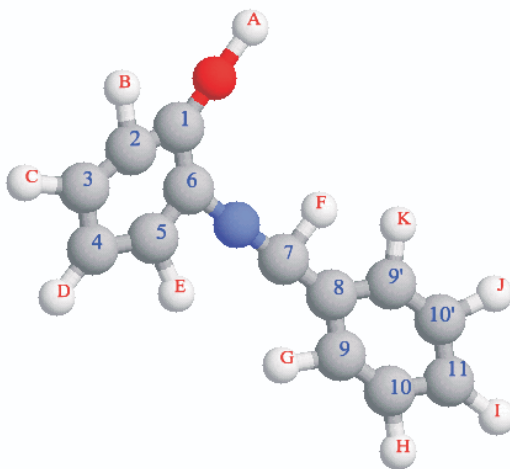


Figura 5. Modelo final de la estructura tridimensional de la base de Schiff BS-BZ

BIBLIOGRAFÍA

1. J. R. Dyer. "Aplicaciones de espectroscopía de absorción en compuestos orgánicos". Editorial Prentice/Hall-Internacional. España.
2. J. Del Río. Determinación de la estructura de proteínas por RMN. Mensaje Bioquímico. Vol 2003 en <http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>.
3. A.E. Derome. The use of NMR Spectroscopy in the Structure determination of Natural Products: Two dimensional methods. *Nat Prod Rep* 1989; 6:111.
4. G.A. Morris. Modern NMR techniques for structure elucidation. *Magn Reson Chem* 1986; 24:371.
5. H. Friebolin. "Basic one-and two-dimensional NMR spectroscopy" Wiley-VCH, 1998.
6. H. Dudderck, W. Dietrich y G. Toth. "Elucidación Estructural por RMN" Ed. Springer. 3ra.ed 2000.
7. A. Orellana y M. Osorio. Seminario de tesis para optar al título de Profesor de Química y al grado de Licenciado en Educación. Universidad de Playa Ancha; 2007. Valparaíso, Chile.
8. S. Prestsch. "Tablas para determinación estructural por métodos Espectroscópicos". 3ª edición, Ed. Springer-Verlog Ibérica, España.

INFORMACIONES

A) De la Sociedad Química del Perú

Conferencias de los “Jueves Científicos” en la SQP

- “Liberación controlada de sustancias con actividad biológica utilizando biopolímeros”, dictada por el Dr. Julio César Santiago Contreras, investigador del grupo de Materiales Funcionales del Instituto Peruano de Energía Nuclear, el día jueves 11 de marzo del 2010.
- “Gestión de las sustancias químicas en el laboratorio químico. Estudio de casos”, dictada por el Ing. Quím. Guillermo Jaramillo Carpio, responsable del Proyecto de la Carrera Profesional de Ingeniería de Procesos Químicos y Metalúrgicos de la Universidad de Ingeniería y Tecnología (UTEC), el día jueves 18 de marzo del 2010.
- “Extracción con fluidos supercríticos (EFS), Tecnología Verde”, dictada por el Dr. Fabián Parada Alfonso, presidente de la Sociedad Colombiana de Ciencias Químicas, el día martes 13 de abril del 2010.
- “Productos naturales: alimentos biofuncionales y fitomedicamentos”, dictada por el Dr. Mario Carhuapoma Yance, profesor de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jueves 15 de abril del 2010.
- “Los mejores resultados en una era de detectores cada vez más sensibles, regulaciones y documentación. Protección sostenible”, dictada por la Phd Inés Haedrich, experta en solventes para cromatografía líquida, de Merck Peruana SA, el día jueves 22 de abril del 2010.
- “Importancia del uso de reactivos inorgánicos clásicos para los ensayos de determinación de trazas por análisis instrumental”, dictada por Patric Klein, Gerente de Producto en el Departamento de Laboratorio (LB) de Merck Peruana SA, el día jueves 22 de abril del 2010.
- “Norma NTP ISO/IEC 17025:2006”, dictada por la Ing. Quím. Elena Virginia Chumpitazi Castillo, representante de la empresa AMCER Group, el día jueves 29 de abril del 2010.
- “Configuración absoluta de moléculas orgánicas por dicroísmo circular vibracional”, dictada por el Dr. Pedro Joseph-Nathan, docente del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) en México, D. F, el día 14 de mayo del 2010.
- “¿Qué se necesita para ser un Químico exitoso?” dictada por el Dr. Mario Ceroni Galloso, Director de la Revista de la Sociedad Química del Perú y Decano Nacional del Colegio de Químicos del Perú, el día jueves 20 de mayo del 2010.

Comisión de captación de nuevos socios

La Sociedad Química, ha designado al Ingeniero Químico Manuel Otiniano Cáceres, Presidente de la Comisión de Captación de Nuevos Socios. Integran esta Comisión, la Ingeniero Químico Luz Genara Castañeda Pérez y la Mg. María Nieves Lino Pacheco.

DEAC-CONEAU

Nuestra institución envió una comunicación al CONEAU, expresando su adhesión a la opinión expresada por el Colegio de Químicos del Perú sobre los estándares de calidad de la carrera profesional de química, presentados por el referido organismo, como resultado de la reunión con los representantes de las escuelas de las UNMSM, UNFV y la UPCH.

Comité de Innovación Tecnológica Industrial

En la reunión mensual del día martes 20 de abril, participó la Dra. Olga Lock Sing, Past-Presidente de la Sociedad Química del Perú, con la exposición: “La Federación Latinoamericana de Asociaciones Químicas, FLAQ, y los Congresos Latinoamericanos de Química”, en calidad de Secretaria Ejecutiva de la FLAQ. Asimismo, realizó una presentación sobre el Instituto Peruano de Productos Naturales - IPPN, como representante del IPPN ante el CINTECIN.

Director del Instituto de Investigación de Ingeniería Química de la Facultad de QIQ de la UNMSM

Felicitamos al Ing. Manuel Otiniano Cáceres, Secretario General de la Sociedad Química, por su reciente elección, en el cargo de director del Instituto de Investigación de Ingeniería Química, de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Premio al mérito científico 2009

Felicitaciones a la Ing. Ana María Osorio Anaya, Tesorera de la SQP, por el “Premio al mérito científico 2009”, recibido el pasado martes 11 de mayo último, en ceremonia convocada por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Autoevaluación en la Facultad de QIQ de la UNMSM

La Oficina Central de Calidad Académica y Acreditación - OCCAA de la UNMSM, otorgó a las Escuelas Profesionales de Química e Ingeniería Química de la Facultad, el “Premio a la Calidad”, por su contribución a la calidad educativa, al haber culminado el proceso de autoevaluación. Nuestras sinceras felicitaciones a nuestros socios miembros de la comisión de calidad académica y acreditación de la Facultad: Ing. Cesario Condorhuamán Ccorimanya, Quím. Neptalí Ale Borja, Ing. Manuel Otiniano Cáceres y Dr. Mario Ceroni Galloso.

Dr. Naldo Balarezo Genstein

Editor Asociado de nuestra Revista, se encuentra algo delicado de salud. Desde estas páginas, la Sociedad Química del Perú le expresa los mejores deseos de una pronta recuperación.

B. Otras informaciones

Falleció el Lic. Óscar Méndez

El pasado mes de abril, falleció el distinguido químico puertorriqueño y Presidente Honorario de la FLAQ, Lic. Óscar Méndez. Expresamos nuestras más sentidas condolencias al Colegio de Químicos de Puerto Rico, por tan irreparable pérdida.

“Boletín Informativo sobre productos y residuos químicos”

En nuestro portal institucional: www:sqperu.org.pe, se viene publicando el “Boletín Informativo sobre productos y residuos químicos”, editado por el M.Sc. Jorge Loayza Pérez, publicación electrónica mensual, que proporciona a sus lectores una visión actualizada sobre el manejo responsable de productos y residuos químicos con la finalidad de proteger la salud y el ambiente.

Presentación del libro “Química de Coordinación”

El día jueves 13 de mayo del presente, en el Colegio de Químicos del Perú se presentó el libro “Química de Coordinación”, del Dr. Lothar Beber, de Alemania, socio honorario de la Sociedad Química del Perú y Dr. Jorge Angulo Cornejo, socio activo de la Sociedad Química del Perú, a quienes felicitamos por este logro profesional.

Edición gráfica:
ESERGRAF
Jr. Huancavelica 293 Of. 412 , Lima
Telfs.: 998-513-545 / 4267147
mig5548@yahoo.com

SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

SOCIOS HONORARIOS

Ing. Quím. Carlos Chirinos Villanueva (Perú)
Dr. Mario J. Molina (México)
Dra. Olga Lock Sing (Perú)
Dr. Antonio Monge Vega (España)
Dr. Lothar Beyer (Alemania)

SOCIOS CORRESPONDIENTES

Dr. Aiache, Jean-Marc (Francia)
Dr. Cea Olivares, Raymundo (México)
Dr. Chifa, Carlos (Argentina)
Dra. Cascales Angosto, María (España)
Dr. Del Castillo García, Benito (España)
Dr. De Simone, Francesco (Italia)
Dr. Garbarino, Juan A. (Chile)
Dr. García-Herbosa, Gabriel (España)
Dr. Infante, Gabriel A. (Puerto Rico)
Dr. Joseph-Nathan, Pedro (México)
Dr. Mors, Walter B. (Brasil)
Dr. San Feliciano, Arturo (España)
Dr. Suwalski, Mario (Chile)
Dr. Vicente Pérez, Santiago (España)

XXV
Congreso Peruano
de Química

"Ing. Quím. M.Sc. Dionisio Ugaz Mont"

Organizado por la SQP

Tendrá lugar en la
ciudad de Lima

Octubre 14, 15 y 16
2010