

ISSN 1810-634X

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 76 N° 3
JULIO - SEPTIEMBRE 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: revsqq@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

JULIO - SETIEMBRE, 2010

N°3

En el Perú: N° suelto S/.15

Suscripción anual: S/. 60.00

En el extranjero: Suscripción anual: \$50.00

CONTENIDO

(Vol 76 N° 3 - 2010)

- Editorial	197
-------------------	-----

Trabajos originales

- Sensores basados en óxido de Fe dopados con Ag para la detección de sulfuro de hidrógeno, por Gino Picasso, María del Rosario Sun Kou, Yennyfert Aguilar, Alcidez López y Manuel Arruebo.	199
- Algunas propiedades cinéticas de una L-aminoácido oxidasa purificada del veneno de la serpiente peruana <i>Bothrops atrox</i> “Jergón”, por Nora Ruiz, Christian Solís, Gustavo A. Sandoval, Fanny Lazo, Edith Rodríguez y Armando Yarlequé.	218
- Efecto de la asistencia del líquido iónico [BMIM][BF ₄] en la cristalinidad y la morfología de nanoestructuras de Sb ₂ S ₃ sintetizadas por ultrasonido, por Juan Pablo Salinas Estevane y Eduardo Maximiano Sánchez Cervantes.	227
- Evaluación del contenido de fitoesteroles, compuestos fenólicos y métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en semilla de sachu inchi (<i>Plukenetia volubilis</i> L), por Ana Muñoz Jáuregui, Fernando Ramos Escudero, Carlos Alvarado Ortiz-Ureta, Benjamín Castañeda Castañeda, Edy Barnett Mendoza, Jaime Yáñez Farfán y Delia Cajaleón Asencios. .	234
- Análisis por espectroscopía UV y FTIR de macerados acuosos y alcohólicos de <i>Aloe vera</i> L. y <i>Aloe barbadensis</i> Miller. Interacción con sales inorgánicas, por Félix Saavedra Nizama, Neptalí Ale Borja, Gloria Gordillo Rocha, Alfonso Apesteuguía Infante, Bertha Jurado Teixeira, y Andrés Revilla Casalino.	242
- Barnetobina: un nuevo principio coagulante purificado del veneno de la serpiente peruana <i>Bothrops barnetti</i> , por Dan Vivas Ruiz, Rosalina Inga Arellano, Julio Mendoza Fernández, Fanny Lazo Manrique y Amando Yarlequé Chocas.	261
- Contenido de alcaloides en corteza de <i>Uncaria tomentosa</i> (Wild.) DC procedente de diferentes hábitats de la región Ucayali – Perú, por Gilberto Domínguez Torrejón, Juan de Jesús García Martín, Deysi Guzmán Loayza y Rosa Alanota.	271
- Cinética de la bioadsorción de iones cadmio (II) y plomo (II) de soluciones acuosas por biomasa residual de café (<i>Coffea arabica</i> L.), por Myriam Eugenia Pacheco Tanaka, Jorge Paúl Pimentel Frisancho y Wilfredo Fernando Roque Villanueva.	279
- Paper electrophoretic technique in the study of beryllium(II) / cobalt(II) – proline binary complexes in solution, por Brij Bhushan Tewari.	293

Historia de la Química en el Perú

- Carlos Chirinos Villanueva: Un impulsor de la Ciencia y Tecnología en el Perú.	302
---	-----

INFORMACIONES

A.- De la Sociedad Química del Perú	
Fallecimiento del Dr. Naldo Balarezo Geinsein, XXV Congreso Peruano de Química "Ing. Quím. Dionisio Ugaz Mont", Conferencia de los "Jueves Científicos" en la Sociedad Química del Perú.	305
B.- Otras informaciones	308

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.

La Revista, en formato impreso o electrónico, está dividida en las siguientes secciones: artículos de investigación, comunicaciones cortas, cartas al editor, artículos de revisión, enseñanza de la química y divulgación.

Los trabajos son recibidos por el Comité Editorial, quien revisará cumplan con las “Instrucciones para los autores”, la ortografía y redacción (incluida la puntuación). A continuación pasa a la Comisión de Publicaciones y Árbitros para que se pronuncien sobre el contenido científico. Si existen observaciones se comunicará al autor corresponsal para que se proceda a levantar dichas observaciones.

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 entre 10 a 15 páginas a espacio y medio.

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 referidos 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. 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.

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.

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 corresponsal se realizarán vía correo electrónico. El autor corresponsal deberá responder los correos electrónicos en el plazo que se señale.

Los autores enviarán sus artículos impresos y en formato electrónico (disco compacto o al correo electrónico sqperu@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 de las siguientes sumas:

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

Si los autores residen en el extranjero US \$ 100.

Cuando el número de autores es superior a 3 se añadirá, además, US\$ 10 por cada autor en exceso.

The publication of each work is subject to payment of the following ones:

When all the authors are partners of the Peruvian Chemical Society: S/. 90.00

When all the authors are not partners: S/. 180.00

If among the authors there are partners and non partners: S/. 135.00

If the authors reside abroad US \$ 100.

When the number of authors is superior to 3 it will be paid, also, US \$ 10 for each author in excess.

Formato para los artículos

Baje la plantilla de artículo. Los autores pueden solicitar la plantilla de artículo al correo electrónico sqperu@gmail.com

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”). Los decimales deben llevar coma.
2. Los idiomas de publicación son español e inglés.
3. El título del trabajo, que debe ser **breve y claro**, en español y en inglés (éste último antes del abstract) se escribe con tamaño de fuente 16, centrado y en negritas. Los nombres completos de los autores aparecerán a continuación con tamaño de fuente 12, el autor corresponsal se identificará con un asterisco. Las instituciones de la cual proceden los autores se escriben con tamaño de fuente 10 e irán a pie de página, donde también sólo el autor corresponsal colocará su correo electrónico 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. Tanto Palabras clave como Key words se escriben a la izquierda del texto, con 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 de género y especie van en cursiva (itálica).
6. El caso de artículos originales y comunicaciones cortas, el texto debe contener las siguientes secciones: Introducción, Parte Experimental, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias. Éstas se escriben con tamaño de fuente 14, en negritas y centradas. 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 que una página A4, tienen numeración arábica seguido de punto. A continuación se coloca la leyenda que explique su significado. La numeración y leyenda en una tabla, cuyo formato debe ser básico 1, se colocan en la parte superior a diferencia de las figuras y los esquemas que se ubican en la parte inferior.
8. Las tablas, fotos, figuras y esquemas deben estar incluidos en el documento de Microsoft Word.
9. Las referencias, se citan en el texto correlativamente como superíndice. El número de estas referencias no debe ser excesivo. Deberán fluctuar entre 7 y 15. La sección Referencias se escribe con tamaño de fuente 14, centrado y **en negrita**. Las abreviaturas de las revistas se escribirán según el Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) y [List of Journals Indexed in Index Medicus](http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html). (<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html>) Las referencias citadas se escribirán con el tamaño de fuente 10 y se seguirá el estilo de Vancouver.

Editorial

2011 Año Internacional de la Química

En su Asamblea General en Turín, Italia, en agosto del 2007, de manera unánime la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, en sus siglas en inglés) aprobó una resolución a favor de la proclamación del 2011 como el Año Internacional de la Química. Poco menos de un año después, el Comité Ejecutivo de la UNESCO, recomendó la adopción de tal resolución, presentada por Etiopía, lo que subsecuentemente llevó a la declaración el 31 de diciembre del 2008, por la Asamblea General de las Naciones Unidas, a señalar el 2011 como el Año Internacional de la Química. Así, se han planeado toda una serie de actividades para celebrar ese año. La IUPAC y la UNESCO creen fuertemente que es el *momento para celebrar los logros de la química y sus contribuciones para el bienestar de la humanidad*. Se espera que el año Internacional de la Química:

- Mejore la comprensión y la apreciación de la química por parte del público.
- Estimule la cooperación internacional al servir como un punto focal o fuente de información para las actividades de las sociedades químicas nacionales, las instituciones educacionales, la industria, el gobierno y las organizaciones no gubernamentales.
- Promueva el papel de la química en su contribución a solucionar los retos globales.
- Cimente la capacidad de involucrar a la gente joven con las disciplinas científicas, especialmente, el método científico de análisis desarrollados mediante hipótesis, experimento, análisis y conclusiones.

El año 2011 coincide, además, con el centenario del Premio Nobel otorgado a Marie Curie por sus aportes a la química; y, con la fundación de la Asociación Internacional de Sociedades Químicas.

Por su parte, la Sociedad Química del Perú estará inmersa en la realización de sus conferencias de los Jueves Científicos, cursos, jornadas y los fórums; además, está organizando la Agenda de actividades que van a tener lugar en nuestro país para conmemorar este Año Internacional de la Química orientada a concienciar al público y aumentar el interés de los jóvenes por la ciencia y generar un futuro de creatividad relacionada con la química, enmarcadas dentro del contexto de señalar las contribuciones de esa ciencia al bienestar de la humanidad.

La Química es uno de los pilares del desarrollo tecnológico de nuestro tiempo y su reconocimiento durante el próximo año significará un nuevo reto, el cual compartiremos todos en un trabajo conjunto para alcanzar este objetivo.

Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo
Presidenta de la Sociedad Química del Perú

SENSORES BASADOS EN ÓXIDO DE Fe DOPADOS CON Ag PARA LA DETECCIÓN DE SULFURO DE HIDRÓGENO

Gino Picasso^a, María del Rosario Sun Kou^{b*}, Yennyfert Aguilar^a, Alcídez López^a, Manuel Arruebo^c

RESUMEN

En este trabajo se han estudiado sensores basados en nanopartículas de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, puros y dopados con Ag (con cargas del 0,5 al 5% Wt), preparados por el método de co-precipitación para la detección de sulfuro de hidrógeno. Se usó alúmina como material soporte de los sensores y **formvar** (poliviniloformal) como material ligante. Los difractogramas XRD revelaron la presencia mayoritaria de la fase α -hematita en todos los sensores. El tamaño promedio de las nanopartículas, determinado mediante micrografías TEM, estuvo entre 30 y 50 nm con presencia de aglomeraciones de diversos tamaños. Las isoterms BET mostraron que los sensores presentaban una superficie mesoporosa con un área promedio entre 66 y 88 m^2/g . En los ensayos, se observó que los sensores dopados con plata presentaban mayor sensibilidad que las muestras no dopadas, revelando el efecto catalítico de la plata en la reacción superficial. Para encontrar las condiciones óptimas de trabajo (temperatura y concentración), para cada sensor se realizaron dos grupos de ensayos: un grupo, realizado en un intervalo de temperatura de 159°C a 388°C a un nivel medio de concentración de 90 ppm, y otro grupo, en un intervalo de concentraciones de 30 a 90 ppm a temperaturas medias de 159, 205 y 251°C. La muestra dopada con 0,5% de Ag presentó la mayor sensibilidad a las temperaturas de operación de este trabajo y a una concentración de 90 ppm de sulfuro de hidrógeno, atribuyéndose estos resultados a la presencia de la estructura α -hematita y a la estabilidad térmica del sensor.

Palabras clave: sensores, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, sulfuro de hidrógeno

SENSORS BASED ON Ag-DOPED $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ FOR THE DETECTION OF HYDROGEN SULFIDE

ABSTRACT

In this work, sensors based on undoped $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ and doped with Ag (metal loading ranging from 0,5 to 5% Wt) prepared by coprecipitation method for the detection of H_2S have been studied. Alumina has been used as material support of sensors and **formvar** (polyvinyl formal) as binder material. XRD patterns of all samples showed typical peaks of α -hematite. Mean particle size of nanoparticles evaluated by TEM was between 30 and 50 nm. BET isotherms showed that sensors presented mesoporous surface with mean surface area between

^a Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Rímac, Lima - Perú, gpicasso@uni.pe

^{b*} Pontificia Universidad Católica del Perú, Av. Universitaria 1801, San-Miguel, Lima-Perú, msun@pucep.edu.pe

^c Universidad de Zaragoza, Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente, c/ Pedro Cerbuna 12, 50009, Zaragoza-España

66 and 88 m²/g. Sample tests of doped sensors with Ag showed higher sensibility than their undoped counterparts revealing catalytic effect of Ag on the surface reaction. In order to find optimal operating conditions (temperature and concentration), two groups of tests have been performed: first one were at constant propane concentration of 90 ppm in a temperature range from 159 °C to 388 °C and the second one were at constant temperatures of 159, 205 and 251 °C in a concentration range of 30 to 90 ppm. Doped sensor with 0,5 % Ag presented higher sensibility at all operating temperatures and 90 ppm as hydrogen sulfide concentration and this behavior was attributable to the presence of α -hematite morphology and higher thermal stability of sensor.

Key words: sensors, α -Fe₂O₃, hydrogen sulfide

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es una ciencia que permite la manipulación de la estructura de la materia a escala nanométrica (30-50 nm), generando así materiales y estructuras con características diferentes de aquéllos empleados corrientemente. Existen varias técnicas utilizadas para la síntesis de nanopartículas como sol-gel, precipitación, abrasión con láser, entre otras. Todas ellas persiguen la obtención de nanopartículas con un tamaño predefinido y con una estructura estable, partiendo de una solución de sal metálica o un compuesto organometálico.

El óxido de hierro en su forma más estable, la α -hematita, posee propiedades conductoras y magnéticas específicas, por las cuales ha recibido gran aplicación científica y tecnológica en calidad de: catalizador¹, intercambiador iónico² y como material aditivo en baterías iónicas de litio³.

La aplicación del óxido de hierro como sensor de gas en estado sólido es reciente⁴⁻⁶. Las altas temperaturas de operación y su baja sensibilidad, han limitado su uso comercial como sensor⁶. Algunas investigaciones han mostrado que el dopaje con algunos metales nobles como Au, Pt, Pd mejora las propiedades como sensor del óxido de Fe por la influencia cooperativa del metal dopante con la α -hematita por efectos químicos y electrónicos, que se refleja en una mejora de la sensibilidad obtenida y reducción de las temperaturas de operación⁷⁻¹². El óxido de Fe ha sido frecuentemente usado para la detección de algunas sustancias de naturaleza orgánica como alcoholes y aminas¹³⁻¹⁵. En este trabajo se ha seleccionado trabajar con óxido de Fe, empleando Ag como material dopante, por ser un material noble y más económico que sus análogos (Au, Pt).

Adicionalmente, el sulfuro de hidrógeno (H₂S) es un gas incoloro, inflamable, extremadamente tóxico y corrosivo que se produce en minas de carbón, refinerías de gas natural e industrias de lubricantes¹⁶. Este gas produce severos efectos en el sistema nervioso humano incluso por debajo del valor límite de exposición ocupacional (10 ppm por 8 h); sin embargo, ha sido poco estudiado como gas de detección en sensores. El objetivo de este trabajo fue potenciar las propiedades químicas y electrónicas del óxido de hierro mediante su dopaje con Ag formando nanopartículas de Ag/ α -Fe₂O₃ por coprecipitación, para su uso como sensor de H₂S en fase gas.

PARTE EXPERIMENTAL

I.- Preparación de los sensores

Material de partida

Los materiales de partida para la preparación de los sensores fueron los siguientes: nitrato de hierro III, Fe(NO₃)₃·9H₂O (MERCK, PF=404,00 g/mol); cloruro de hierro III, FeCl₃·6H₂O (MERCK, PF=270,33 g/mol); nitrato de plata, Ag(NO₃)·4H₂O (MERCK, PF=169,87 g/mol); carbonato de sodio, Na₂CO₃ anhydrous, (RIEDEL-DE-HAEN, PF=105,99 g/mol);

polietilenglicol, $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH})_n$ PEG 20000 (MERCK); etilenglicol, $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, (MERCK, $\text{PF}=62,07 \text{ g/mol}$); formal de polivinilo (formvar-ALDRICH); 1,2-dicloroetano (MERCK, 99,5%, $\text{PF}=98,96 \text{ g/mol}$); soporte de alúmina con electrodos de Au y resistencia de Pt.

Preparación de las nanopartículas de óxido de hierro

El método usado para la preparación de los sensores fue el de co-precipitación a partir de soluciones 0,1 M $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ y 0,5 M $\text{Ag}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. La solución mixta de las sales metálicas (en proporción establecida) fue agregado gota a gota (0,5 ml/min) a la solución 0,3 M de Na_2CO_3 en agitación constante a una temperatura de 80 °C, la cual contenía polietilenglicol al 0,2 % usado como surfactante¹⁷. Para estudiar el efecto del tamaño molecular del surfactante algunas muestras fueron preparadas en las mismas condiciones con etilenglicol. Posteriormente, se agregó una cantidad adicional de solución de carbonato de sodio a fin de mantener un pH = 9,72. La mezcla obtenida continuó en agitación por una hora adicional y seguidamente se la sometió a un envejecimiento por una noche a temperatura ambiental. Luego, el precipitado se filtró, se lavó con agua destilada y se secó a 80 °C por una hora. Una vez obtenido el polvo, se calcinó a temperatura de 400°C por una hora con una velocidad de calentamiento de 2°C por minuto. En estas condiciones se obtuvieron las nanopartículas con las características estructurales de cristalinidad adecuada en la fase α -hematita⁹. Adicionalmente, este tratamiento permitió estabilizar el material, evitando cambios en la respuesta de los sensores a las condiciones de operación, y se logró obtener una buena reproducibilidad a temperaturas elevadas. Se han preparado diferentes muestras con el propósito de estudiar el efecto de diferentes variables experimentales en la sensibilidad de los sensores frente a: la presencia del surfactante, el efecto de la sal precursora (preparación de α - Fe_2O_3 a partir de cloruro de Fe III) y la presencia de Ag como material dopante. En la tabla 1 se recoge el total de sensores preparados en este trabajo y las condiciones de preparación.

Tabla 1. Lista de los sensores preparados basados en nanopartículas de óxido de Fe puro y dopadas con Ag

n°	Muestra	%Ag	Tratamiento térmico
1	Fe_2O_3 (ss)-nc	-	no calcinada
2	Fe_2O_3 (ss)-c	-	calcinada
3	Fe_2O_3 (cs)-nc	-	no calcinada
4	Fe_2O_3 (cs)-c	-	calcinada
5	Cl- Fe_2O_3 (cs)-nc	-	no calcinada
6	Cl- Fe_2O_3 (cs)-c	-	calcinada
7	Fe_2O_3 (ss)-1%Ag	1	calcinada
8	Fe_2O_3 (ss)-2%Ag	2	calcinada
9	Fe_2O_3 (ss)-3%Ag	3	calcinada
10	Fe_2O_3 (ss)-5%Ag	5	calcinada
11	Fe_2O_3 (pg)-0,5%Ag	0,5	calcinada
12	Fe_2O_3 (pg)-1%Ag	1	calcinada
13	Fe_2O_3 (pg)-2%Ag	2	calcinada
14	Fe_2O_3 (pg)-3%Ag	3	calcinada
15	Fe_2O_3 (pg)-5%Ag	5	calcinada

SS=sin surfactante, cs=con etilenglicol, pg=con polietilenglicol, nc=no calcinada, c = calcinada

Preparación y acondicionamiento de los soportes de alúmina

Los sensores fueron preparados sobre un soporte de alúmina, el cual es inerte químicamente al óxido de hierro, y posee propiedades refractarias, por lo que resulta ideal para los ensayos a las temperaturas de operación ($T < 400\text{ }^{\circ}\text{C}$). Los soportes, antes de su uso se limpiaron en un baño de acetona y fueron secados al ambiente. Las dimensiones de los soportes fueron ajustadas para ser usados con el equipo experimental especialmente diseñado para el estudio de detección de gases con sensores. Las dimensiones del soporte de alúmina fueron de 9 mm x 6 mm (figura 1) y para su uso se le acoplaron electrodos de Au, empleado como medio electroconductor y de contacto con el material del sensor (cara anterior) y una resistencia de Pt usado como calentador térmico (cara posterior), donados por el laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.

Para la adhesión del material sensor sobre los sustratos de alúmina se utilizó como material ligante una solución de formvar (formal de polivinilo), que fue preparado en una concentración de 25% Wt en 1,2-dicloroetano. Luego, fue introducida las nanopartículas de óxido de Fe en agitación constante en ultrasonido hasta obtener una pasta viscosa homogenizada. La pasta resultante de color marrón fue depositada sobre los electrodos de oro hasta obtener una capa uniforme. Una vez aplicado la pasta sobre los electrodos se realizaron varias pruebas a diferentes temperaturas para encontrar las condiciones óptimas de calcinación que permitieran eliminar los restos de disolvente y resina empleados y fijar de manera estable la capa de las nanopartículas al sustrato de alúmina. Luego de varios ensayos, las condiciones óptimas de calcinación de los sensores se fijaron en $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 8 h. De esta manera se obtuvo una capa con el mayor límite de grano posible, aumentando la capacidad conductora del sensor. Adicionalmente, la evaporación de la resina permitió obtener una superficie muy porosa y rugosa, adecuada para la adsorción preferencial del gas de detección, lo que mejoró la capacidad receptora del sensor.

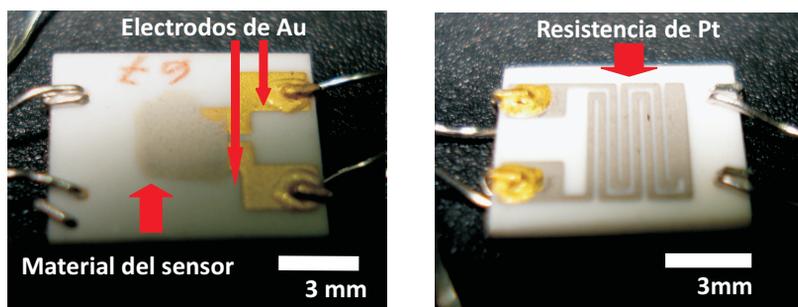


Figura 1. Vista de un soporte de alúmina con material del sensor y los electrodos de Au (izquierda) y con la resistencia de Pt (derecha)

II.- Caracterización de los sensores

Los métodos de caracterización empleados con las muestras mágicas y soportadas fueron:

Difracción de rayos X (XRD). Para la identificación cristalográfica de las muestras se utilizó la técnica de difracción de rayos. El equipo utilizado fue un RIGAKU Modelo Miniflex, con tubo de cobre y filtro de níquel, con 30 kV y 15 mA. El equipo está provisto de un ánodo rotatorio. Se usó un monocromador de grafito con el objeto de seleccionar la radiación CuKa

del ánodo de cobre ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$) y se ha trabajado con ángulos de barrido entre 5° y 100° , con una medida de paso de $0,10^\circ$ y un tiempo de paso de 2,5 s. Los picos de difracción obtenidos fueron identificados a partir de los manuales del International Centre for Diffraction Data (JCDS). El tamaño medio de los granos cristalinos fue calculado a partir del análisis de los picos de difracción más intensos mediante la ecuación de Debye-Scherrer:

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta}$$

Donde D - es el tamaño medio de grano cristalino (\AA), λ - es la longitud de onda de la radiación incidente ($1,5418 \text{ \AA}$), k es una constante de calibración medida a partir de muestras patrón de tamaño conocido de partícula y que toma el valor de 0,9; β es la anchura del pico a la mitad de su intensidad máxima (en radianes) y θ es el ángulo de difracción para dicha intensidad.

Microscopio electrónico de transmisión (TEM). Esta técnica fue empleada para determinar el tamaño medio de las nanopartículas preparadas. El microscopio electrónico de transmisión emite un haz de electrones dirigido hacia el objeto que se desea analizar. Una parte de los electrones se retrodispersan o son absorbidos por la muestra y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra; dicha imagen se registra mediante una placa fotográfica. El microscopio electrónico de transmisión (TEM) empleado es del modelo Philips EM 300G de 80 keV, ubicado en el laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería; tiene un límite de resolución de aproximadamente 2 nm y es ideal para detectar nanopartículas en el rango de 5 a 40 nm, que son las que se obtuvieron en este proyecto. La muestra en suspensión fue dispersada mediante ultrasonido; posteriormente se colocó una pequeña porción de esta suspensión sobre una rejilla con membrana de soporte de parlodión y se mantuvo allí hasta que el solvente se evaporó completamente.

Adsorción-desorción de N_2 (técnica BET): Mediante esta técnica se obtuvo información de la textura superficial de las muestras. El equipo utilizado para la realización de las isotermas fue un Micromeritics modelo ASAP 2000. Las isotermas de adsorción (representación del volumen de N_2 adsorbido por cm^3 STP/g de catalizador frente a la presión relativa de N_2 , P/P_0) fueron obtenidas a la temperatura del nitrógeno líquido (77 K), en el rango de bajas presiones 10^{-4} - 10^{-8} torr. Antes de cada análisis, las muestras fueron sometidas a un pretratamiento de desgasificación a 200°C por 8 h y con un vacío residual de 10^{-3} torr. Este pre-tratamiento tuvo por objetivo eliminar el agua fisisorbida y las sustancias retenidas en la superficie del sólido.

Microscopía de luz blanca. Mediante esta técnica se cuantificó el espesor medio de la capa de óxido depositado sobre la alúmina. Esta técnica está basada en microscopía de luz blanca que consiste en hacer pasar un haz de luz a través de la muestra obteniendo una imagen, que luego es amplificada mediante una serie de lentes para poder ser registrada luego en una cámara digital.

III.- Ensayos en el equipo de detección de H_2S

Para los ensayos de detección de H_2S con los sensores preparados se utilizó gas patrón (sulfuro de hidrógeno, AIRGAS, 99,02 ppm) y aire comprimido como diluyente para obtener las mezclas gaseosas seleccionadas de: 30, 50, 70 y 90 ppm. Las temperaturas de operación de los sensores en este trabajo fueron: 159, 205, 251, 296 $^\circ \text{C}$. Estas variaciones se realizaron con

el objetivo de determinar la temperatura óptima de trabajo de cada sensor a diferentes concentraciones y para evaluar la influencia del porcentaje de plata en la sensibilidad del sensor. Dicha sensibilidad se determinó mediante la siguiente expresión: G_{gas}/G_0 , donde G_{gas} , es la conductancia en presencia del gas modelo mezclado con aire y G_0 , es la conductancia en presencia sólo de aire. A través del equipo de ensayo de sensores se recogen valores de voltaje, los cuales son transformados a valores de conductancia mediante la siguiente fórmula:

$$G = V_x/[R(V-V_x)]$$

Donde, V_x es el voltaje que se mide en el equipo, V es el voltaje de referencia (5 voltios), R es igual a 20 Mohm = 20×10^6 ohm.

Previo a los ensayos se calibró el controlador de temperaturas y se establecieron los caudales en los flujómetros para la obtención de la concentración de H_2S en aire.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 2, se presentan los difractogramas característicos de las muestras estudiadas. Los patrones de difracción de los óxidos sintetizados muestran mayoritariamente la presencia de los picos característicos del Fe_2O_3 en la forma de α -hematita (JCPDS - Internacional Centre for Diffraction Data N° 33-0664). Se distinguen especialmente los picos mayoritarios de la fase α -hematita para un 2θ igual a $33,18^\circ$ y $35,64^\circ$ con una intensidad relativa de 100 y 70, respectivamente.

En general, las muestras calcinadas han presentado mayor cristalinidad que las no calcinadas, como se observa en la figura 2 al comparar el difractograma de $Fe_2O_3(ss)-c$ con el correspondiente a $Fe_2O_3(ss)-nc$ y el de la muestra $Fe_2O_3(pg)-c$ con el de $Fe_2O_3(pg)-nc$. De igual forma las nanopartículas sintetizadas sin surfactante mostraron una mayor cristalinidad que sus homólogas con surfactante, como se aprecia en la misma figura, al comparar los perfiles de $Fe_2O_3(ss)-c$ y $Fe_2O_3(pg)-c$. Los óxidos preparados han presentado un tamaño medio de grano de 20 nm, que coincide con el obtenido en algunos trabajos¹⁸⁻¹⁹.

El tamaño medio del grano ha sido afectado por la presencia del surfactante, como se observa en la figura 2, al comparar el difractograma de $Fe_2O_3(ss)-c$ con la correspondiente a $Fe_2O_3(pg)-c$; la primera presenta un mayor grado de cristalinidad y, por tanto, con mayor tamaño de grano que la segunda. La temperatura de calcinación en las muestras fue fundamental para la definición de la fase α -hematita, como se observa en la misma figura. Si bien el efecto del surfactante ha contribuido en parte a la formación de la red cristalina, el tratamiento térmico a $400^\circ C$ durante la calcinación ha sido determinante en la estabilidad y sensibilidad de las nanopartículas.

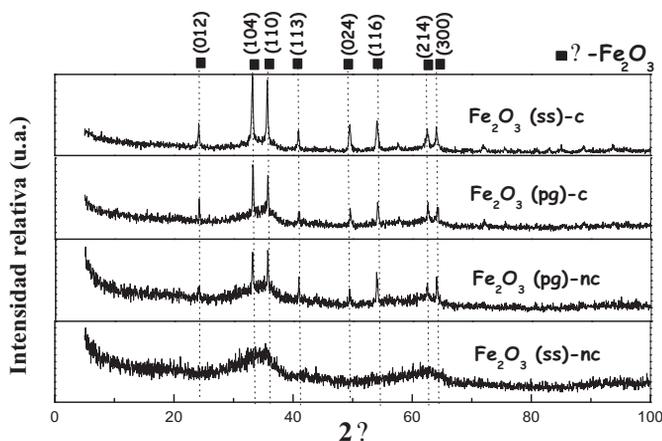


Figura. 2. Efecto de la temperatura de calcinación y del surfactante en los difractogramas de las nanopartículas de óxido de Fe

El dopaje con Ag no afectó ni la cristalinidad inicial obtenida en el óxido de Fe ni el tamaño de grano como se aprecia en la figura 3, por lo que se puede deducir que la introducción de la plata no ha modificado la estructura matriz del óxido de Fe. Por otro lado, la muestra (Cl-Fe₂O₃ (cs)-c) preparada a partir de precursor cloruro siguiendo un tratamiento experimental similar a las muestras preparadas a partir del precursor nitrato, no ha presentado suficiente cristalinidad para identificar la fase α -hematita, como se observa en la figura 3, debido probablemente a la influencia negativa del cloruro en los procesos de nucleación y crecimiento de los granos cristalinos.

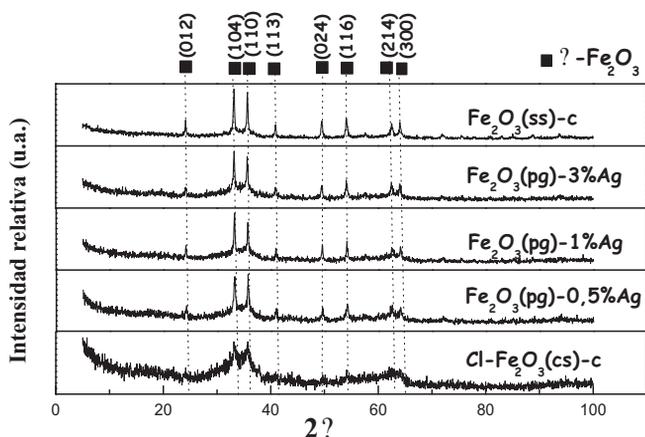


Figura. 3. Efecto del dopaje con Ag en los difractogramas de las muestras basadas en nanopartículas de óxido de Fe

En referencia a la muestra Fe_2O_3 (ss)-c, se puede observar en la micrografía TEM de la figura 4, partículas esféricas de tamaño uniforme entre 30 y 40 nm con presencia de aglomeraciones de diversos tamaños. En la misma muestra analizada con mayores aumentos (micrografía de la figura 5), se observan las partículas pequeñas así como el patrón de difracción electrónica con buena definición de los anillos del patrón cuando crecen los granos cristalinos. Esta característica está en acuerdo con los difractogramas XRD de la figura 3, que también describen a las muestras como altamente cristalinas. Algunas partículas han presentado una morfología de aspecto cúbico aunque prevalecen más las partículas con formas esferoidales (figura 6). El mayor tamaño de partícula observado por la técnica TEM fue de 40 nm.

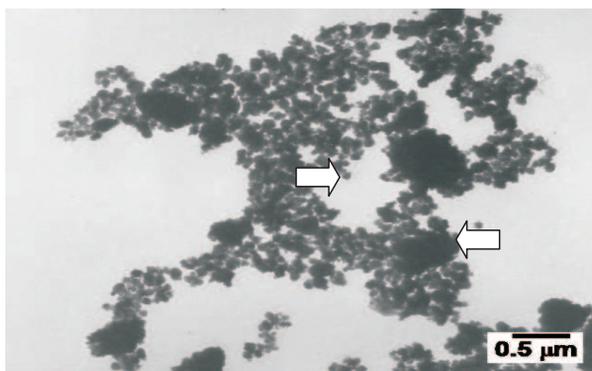


Figura 4. Micrografía TEM de la muestra Fe_2O_3 (ss)-c (vista panorámica)

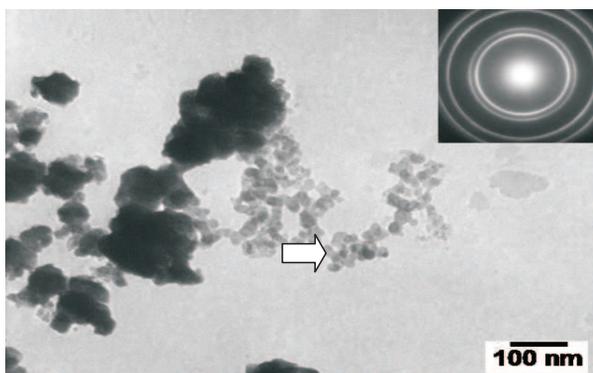


Figura 5. Micrografía TEM de la muestra Fe_2O_3 (ss)-c (partículas pequeñas)

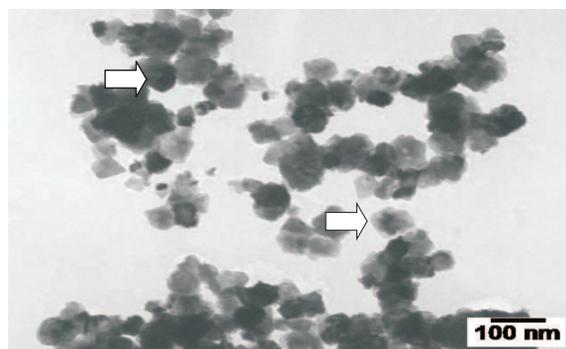


Figura 6. Micrografía TEM de la muestra Fe₂O₃ (ss)-c (simetría de las partículas)

Para estudiar el efecto del surfactante en los sensores soportados se presentan en las figuras 7 y 8, las micrografías TEM de las muestras Fe₂O₃ (ss)-1%Ag y Fe₂O₃ (pg)-1%Ag, respectivamente. Se puede apreciar en la figura 7 que las partículas están aglomeradas en forma de racimo con tamaños medios de 40 a 50 nm, similares al observado en la muestra Fe₂O₃ (ss)-c. En este caso también se producen partículas de simetría cúbica que se observan mejor en la ampliación en la misma figura 7. Las nanopartículas se encuentran mejor dispersadas en presencia de surfactante, tal como se observa en la figura 8, con un tamaño medio de partícula entre 10 a 15 nm. La presencia del surfactante permitió estabilizar térmicamente las nanopartículas, pues no se observó cambios estructurales apreciables por efecto de la temperatura. Un resultado similar se observó en las micrografías TEM de las figuras 9 y 10, correspondientes a las muestras Fe₂O₃ (ss)-5%Ag y Fe₂O₃ (pg)-5%Ag, respectivamente. La diferencia observada en este caso está en la prevalencia de partículas esféricas. Además, en la figura 10 se observa el patrón de difracción de electrones de la muestra Fe₂O₃ (pg)-5%Ag en donde la presencia de una alta definición en los anillos de difracción ha significado también (como en el caso de la figura 5), un crecimiento de los granos cristalinos.

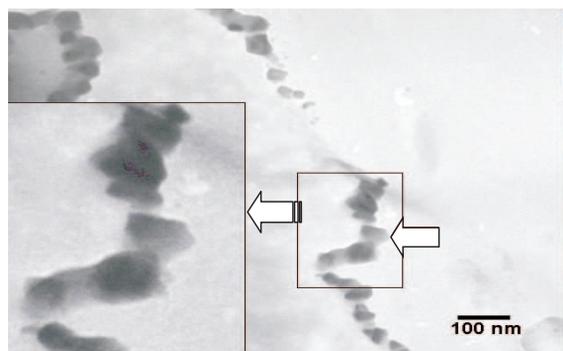


Figura 7. Micrografía TEM de la muestra Fe₂O₃ (ss)-1%Ag

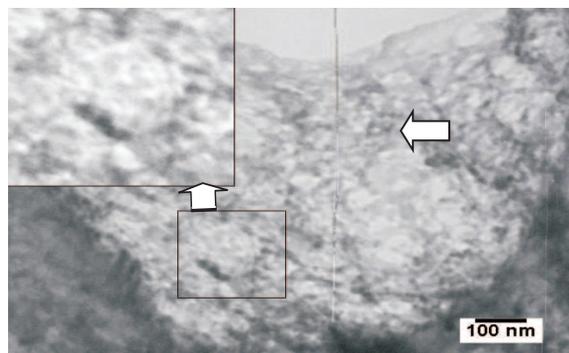


Figura 8. Micrografía TEM de la muestra Fe_2O_3 (pg)-1%Ag

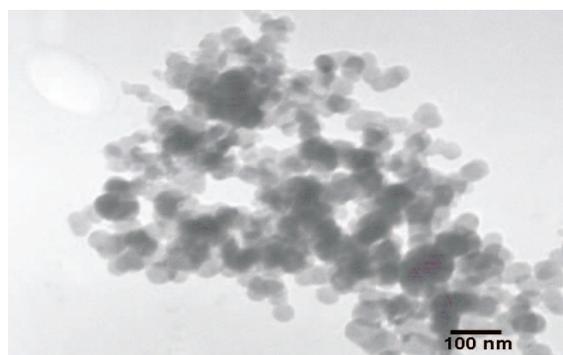


Figura 9. Micrografía TEM de la muestra Fe_2O_3 (ss)-5%Ag

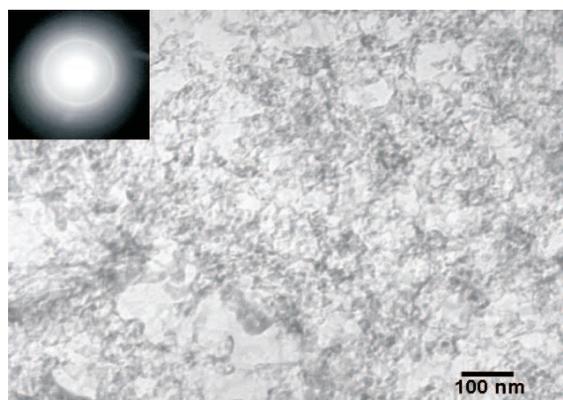


Figura 10. Micrografía TEM de la muestra Fe_2O_3 (pg)-5%Ag

La fijación del material sensor sobre la superficie del soporte de alúmina se analizó por la técnica de microscopía de luz convencional; esto permitió estudiar el grado de homogeneidad superficial y el espesor obtenido del material sensor mediante la deposición por impregnación, con ayuda del polímero ligante (formbar). En la figura 11, en una vista de perfil, se observa que el espesor de recubrimiento obtenido de la capa de óxido fue de aproximadamente 120 μm , muy por debajo del correspondiente al soporte de alúmina (600 m). En general, un espesor medio de recubrimiento de 100 μm es el valor obtenido en algunos trabajos con óxido de Fe^{7,19}.

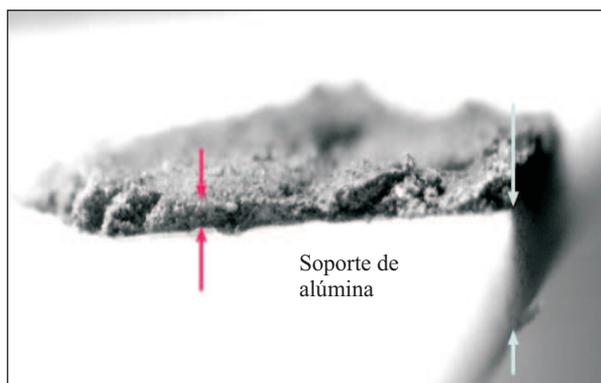


Figura 11. Micrografía por microscopía de luz blanca del recubrimiento de óxido de Fe, vista de perfil

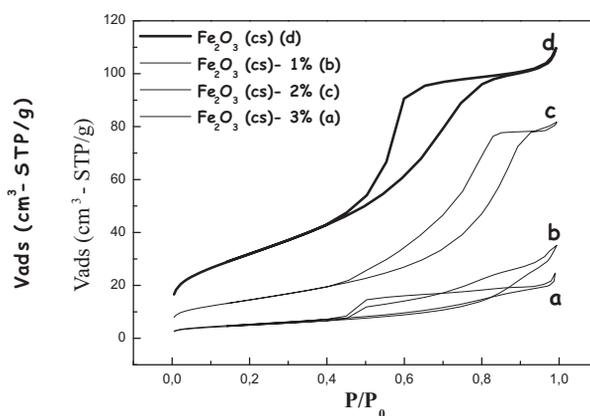
En la tabla 2 se recogen los valores de la superficie BET de las muestras de óxido de Fe puro y dopadas, preparadas sin surfactante y con etilenglicol. En la figura 12 se muestran las isotermas de los sensores basados en óxido de Fe puro y con dopante usando etilenglicol como surfactante y en la figura 13, se tienen los resultados de las mismas muestras pero en ausencia de surfactante. En general, todas las muestras presentaron una isoterma tipo IV, según la clasificación IUPAC, característica de materiales mesoporosos. Las muestras con surfactante presentaron mayor superficie (por ejemplo, la muestra Fe_2O_3 (cs)-2%Ag tuvo una superficie de 53 m^2/g que fue mayor comparada con su homóloga Fe_2O_3 (ss)-2%Ag, con 36 m^2/g); esta diferencia fue atribuida al mayor tamaño de la molécula del surfactante, la cual después de ser eliminada por calcinación forma espacios vacíos (poros) de mayor diámetro.

Tabla 2. Superficie BET de las muestras no dopadas y sin dopar preparadas con etilenglicol

Muestra	S_{BET} total (m^2/g)
Fe_2O_3 (ss)	88
Fe_2O_3 (ss)-1%Ag	12
Fe_2O_3 (ss)-2%Ag	36
Fe_2O_3 (ss)-3%Ag	19
Fe_2O_3 (cs)	116
Fe_2O_3 (cs)-1%Ag	18
Fe_2O_3 (cs)-2%Ag	53
Fe_2O_3 (cs)-3%Ag	20

SS= sin surfactante, CS=con etilenglicol

La introducción de la plata redujo drásticamente la superficie en casi 10 veces, como se observa en la tabla 2 para las muestras Fe_2O_3 (ss) y Fe_2O_3 (ss)-1%Ag con una reducción de 88 a 12 m^2/g , y Fe_2O_3 (cs) - Fe_2O_3 (cs)-1%Ag, con una disminución de 116 a 18 m^2/g , respectivamente. Este hecho y el cambio que se observó en las isotermas (figura 12) en la forma de la histéresis del tipo H1 al tipo H2, característico este último de materiales con poro cuello de botella, permiten establecer que posiblemente estos cambios sean la consecuencia de la obstrucción de la entrada de los poros por las partículas de plata o podría ser debido a la formación de aglomerados independientes sobre la superficie externa, tal como sugieren algunos autores⁷⁻¹⁸.

**Figura 12.** Isotermas de adsorción de $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ puro y de las muestras dopadas con Ag, usando etilenglicol como surfactante

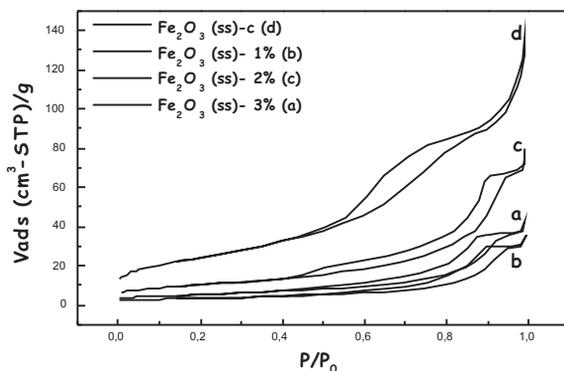


Figura 13. Isotermas de adsorción de α - Fe_2O_3 puro y dopadas con Ag, sin surfactante

La forma y tipo de isoterma de adsorción de los sensores preparados con polietilenglicol (figura 14), también son del tipo IV pero la histéresis no está bien definida y podría aproximarse al tipo H1, el cual se atribuye a materiales con poros aproximadamente cilíndricos. Como se observa en la tabla 3 y figura 14, el cambio en la magnitud de la superficie conforme aumenta el contenido de plata sigue la misma tendencia que la observada para el etilenglicol, con cambios en la forma de la histéresis al tipo H2. Sin embargo, los valores de superficie de las muestras dopadas con polietilenglicol son de mayor valor que las correspondientes a etilenglicol con la misma carga dopante, por ejemplo para 1%Ag/ Fe_2O_3 (pg) con 48 m^2/g (tabla 3) frente 18 m^2/g correspondiente a su homóloga 1%Ag/ Fe_2O_3 (cs) (tabla 2). Esta diferencia confirma la mayor capacidad antiaglomerante del polietilenglicol.

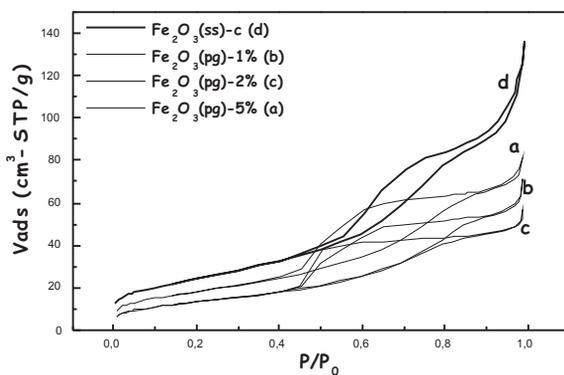


Figura 14. Isotermas de adsorción de α - Fe_2O_3 puro sin surfactante y de las muestras con diferentes dopajes, usando polietilenglicol como surfactante

Tabla 3. Superficie BET del α -Fe₂O₃ puro sin surfactante y de las muestras dopadas con Ag preparadas con polietilenglicol

Muestra	S _{BET} total (m ² /g)
Fe ₂ O ₃ (ss)	88
Fe ₂ O ₃ (pg)-1%Ag	48
Fe ₂ O ₃ (pg)-2%Ag	48
Fe ₂ O ₃ (pg)-5%Ag	66

pg = con polietilenglicol

Ensayos con los sensores en el equipo de detección de H₂S

Se han realizado experimentos en el equipo de sensores en fase gas con el objeto de estudiar la sensibilidad del sensor frente a cambios de temperatura (intervalo de 159 a 388 °C), de concentración del sulfuro de hidrógeno (rango de 30 a 90 ppm) y las muestras preparadas con polietilenglicol dopadas con Ag, en el rango entre 0,5 al 5%. El equipo experimental para los ensayos con los sensores consiste en 3 partes fundamentales:

- Sistema de alimentación, consistente en la fuente de gas de alimentación, controlado por 2 flujómetros, que permitieron establecer las concentraciones de sulfuro de hidrógeno en aire (en ppm).
- Sistema de análisis, consistente en un cilindro de acero con cerradura hermética para la introducción y estudio del sensor soportado en alúmina. Además conectado a éste un voltímetro (para el seguimiento de la conductividad y temperatura) y una interfase de control digital.
- Sistema de procesamiento de datos, consistente en una PC con el software empleado para el estudio del sensor de gases.

Las muestras de óxido de Fe sin dopar preparadas a partir de precursor nitrato presentaron en general muy baja sensibilidad a bajas temperaturas (< 350 °C), mientras que la preparada a partir de precursor cloruro produjo una mejor sensibilidad. Esto se podría explicar considerando que a la temperatura de calcinación de los sensores (400°C), el precursor nitrato se ha descompuesto en su totalidad formando óxido mientras que en el caso de la muestra con cloruro, se ha demostrado en trabajo anterior que el cloruro es más difícil de eliminar por calcinación²⁰, por lo que el cloro residual podría haber contribuido parcialmente con la oxidación del sulfuro de hidrógeno.

Los sensores preparados tuvieron en general buena señal de respuesta en relación con las concentraciones de H₂S, como se observa en la figura 15 para el sensor Fe₂O₃ (pg)-0,5%Ag, en la figura 16 para el sensor Fe₂O₃ (pg)-1%Ag, en la figura 17 para el sensor Fe₂O₃ (pg)-3%Ag y en la figura 18 para el sensor Fe₂O₃ (pg)-5%Ag. En la tabla 4 se recogen las sensibilidades máximas de los sensores dopados a 159 °C y 90 ppm de H₂S.

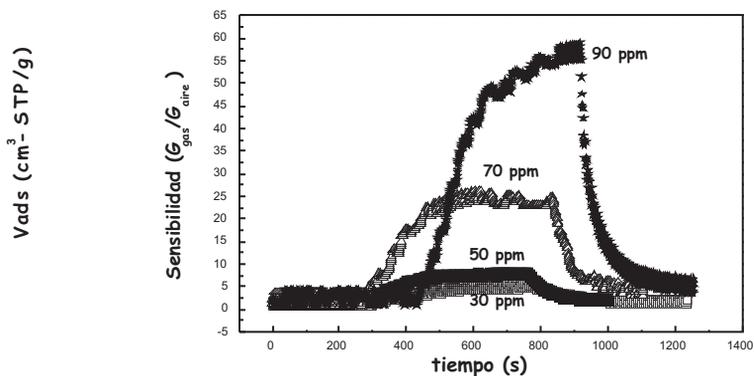


Figura 15. Dependencia de la sensibilidad con el tiempo para la muestra Fe_2O_3 (pg)-0,5%Ag a 205 °C

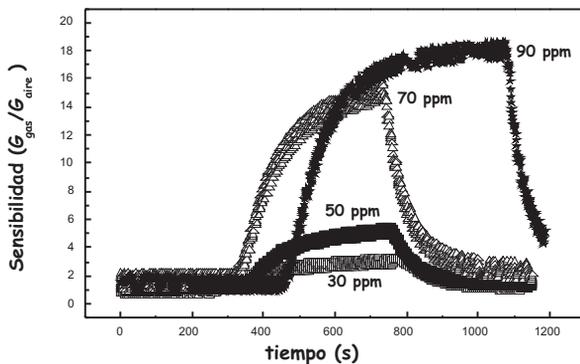


Figura 16. Dependencia de la sensibilidad con el tiempo para la muestra Fe_2O_3 (pg)-1%Ag a 205 °C

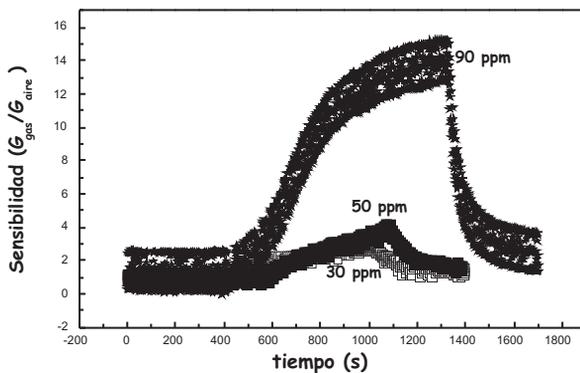


Figura 17. Dependencia de la sensibilidad con el tiempo para la muestra Fe_2O_3 (pg)-3%Ag a 251 °C

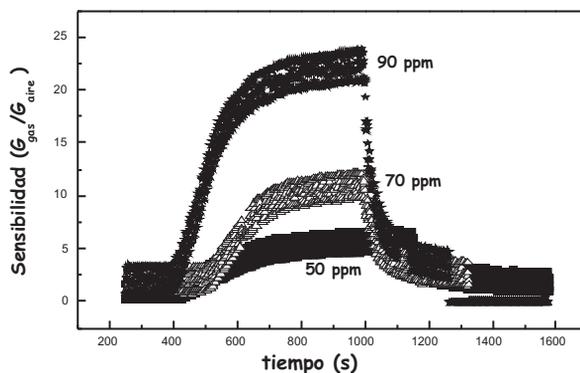


Figura 18. Dependencia de la sensibilidad con el tiempo para la muestra Fe_2O_3 (pg)-5%Ag a $296\text{ }^\circ\text{C}$

Tabla 4. Sensibilidades máximas de los sensores a la temperatura de $159\text{ }^\circ\text{C}$ y $[\text{H}_2\text{S}]=90\text{ ppm}$

Muestra	sensibilidad
Fe_2O_3 (pg) - 0,5%Ag	57,5
Fe_2O_3 (pg) - 1%Ag	29,7
Fe_2O_3 (pg) - 3%Ag	10,1
Fe_2O_3 (pg) - 5%Ag	4,8

En todos los casos, la sensibilidad y el tiempo de detección fueron más altos a una mayor concentración del H_2S . En ningún caso se ha observado una dependencia lineal de la señal de respuesta respecto a la concentración que es explicable considerando el mecanismo complejo de detección y la naturaleza de los sitios activos. Por otro lado, el sensor Fe_2O_3 (pg)-0,5%Ag ha resultado tener mejor comportamiento, que ha conducido a mayores sensibilidades a la menor temperatura de operación, como se observa en la tabla 4 con una señal máxima de 57,5 muy por encima respecto a los otros sensores dopados a la misma temperatura y concentración. Este buen resultado en la muestra dopada al 0,5% de Ag tiene relación con la formación de la estructura α -hematita estudiada por la técnica de rayos X (figura 3) y la presencia en la superficie de una adecuada posición de los sitios activos de Ag.

Respecto a la temperatura, los sensores dopados con plata han presentado una mayor sensibilidad en todo el rango de temperaturas estudiado con relación a sus análogos sin dopar, como se puede observar en la figura 19. El sensor sin dopar (preparado con nitrato) no registró señal mientras que el preparado con cloruro presentó sensibilidades pequeñas y menores a las de todas las muestras dopadas (figura 19).

Como se observa en la figura 19, la sensibilidad experimental respondió bien a los cambios de temperatura y tiende a disminuir al aumentar su magnitud como se observa en los sensores dopados 0,5%, 1% y 3% o permanecer aproximadamente constante como en la muestra al 5%. La capacidad receptora del sensor es sensible al tamaño de las nanopartículas de óxido de

Fe y a la presencia de límites de grano⁷. El aumento de temperatura promueve la sinterización de partículas y por tanto disminuye las fronteras de grano por lo que la capacidad receptora del sensor tiende a disminuir. La mejor sensibilidad de los sensores se obtuvo a las temperaturas de 159 y 205°C (figura 19). El sensor Fe₂O₃ (pg)-0,5%Ag presentó la máxima sensibilidad respecto a todas las muestras a las temperaturas de 159, 205 y 251°C con una concentración de H₂S de 90 ppm. De los resultados obtenidos se puede establecer que la plata ha contribuido favorablemente en la interacción del oxígeno quimisorbido en la superficie de las nanopartículas de óxido de Fe. Las temperaturas de máxima sensibilidad obtenidas en este trabajo están dentro del promedio de temperaturas reportadas para sensores de H₂S, como por ejemplo en el trabajo de Wang y col.⁹ la máxima sensibilidad se obtuvo con un sensor de óxido de Fe dopado con 2%Wt Pt a 160 °C para 100 ppm de H₂S, y en el trabajo de Xu y col.²¹ se obtuvo con un sensor de In₂O₃ a una temperatura de 268,5 °C para 50 ppm de H₂S.

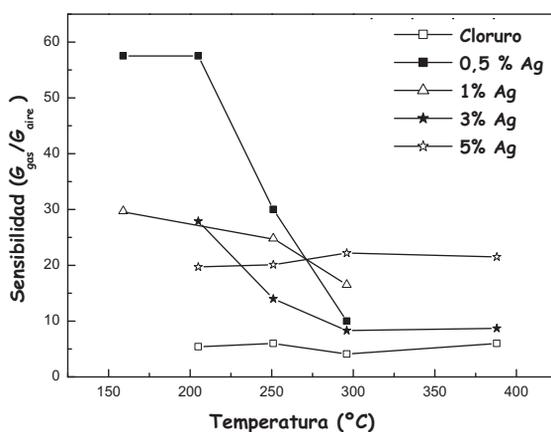


Figura 19. Dependencia de la sensibilidad con la temperatura de operación de los sensores de óxido de Fe puro (con cloruro) y dopados con Ag, a una [H₂S]=90 ppm

El sensor Fe₂O₃ (pg)-0,5%Ag presentó además una buena estabilidad térmica a la temperatura de 159°C después de 4 días del ensayo original (figura 20). Como se observa, la señal de respuesta de máxima sensibilidad se mantiene prácticamente constante después del cuarto día de ensayos, e incluso el tiempo de respuesta fue similar. La estabilidad térmica alcanzada del sensor se le puede atribuir a la capacidad estabilizadora del surfactante y al posicionamiento de la plata en sitios superficiales de fácil acceso para el contacto gas-sólido. El buen rendimiento del sensor de 0,5% Ag a la temperatura de 151 °C y su estabilidad térmica hace atractiva su aplicación como sensor de H₂S aunque se requiere estudios posteriores para describir la naturaleza de los sitios metálicos ocupados por la plata en la superficie del sensor y mejorar la sensibilidad de detección de H₂S a bajas concentraciones.

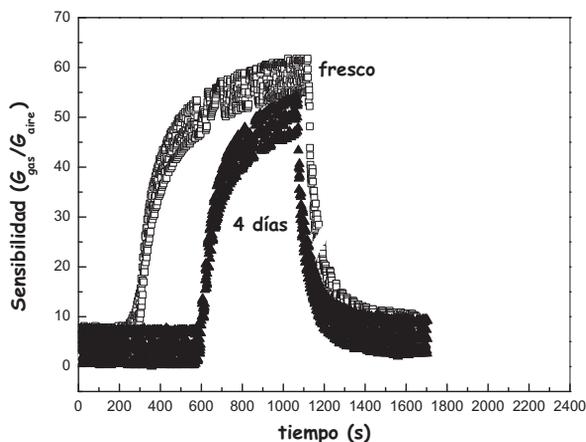


Figura 20. Prueba de estabilidad del sensor Fe_2O_3 (pg)-0,5%Ag a la temperatura de 159°C

CONCLUSIONES

- En este trabajo se han preparado sensores basados en nanopartículas de óxido de Fe puros y dopados con Ag por coprecipitación. Los sensores preparados por este método presentaron buena sensibilidad y estabilidad.
- El análisis XRD de los sensores mostraron la presencia mayoritaria de la fase hematita en todos los materiales, presentando mayor cristalinidad las muestras sin surfactante y calcinada. El análisis TEM ha mostrado la presencia de partículas de 40 nm. El área superficial disminuye conforme aumenta el contenido de plata posiblemente por efecto de la obstrucción producida por la presencia de la plata en la entrada de los poros o por aglomeración de este metal en la superficie externa del sensor.
- Los sensores mostraron mejor estabilidad en la deposición de las nanopartículas sobre el soporte de alúmina cuando fueron calcinadas a 400°C por 8 h con un espesor medio de 120 m.
- Los sensores de óxido de Fe dopados con plata mostraron una mayor sensibilidad, que las no dopadas, comprobando el efecto favorable de la presencia de la plata en la reacción de oxidación del H_2S sobre la superficie del sensor.
- Los ensayos realizados variando la sensibilidad del sensor con la temperatura, concentración y tiempo de detección revelaron que las muestras preparadas con nitrato y dopadas con plata fueron mucho más efectivas que sus homólogas sin material dopante. El sensor de óxido de Fe dopado con 0,5 % de Ag presentó el mejor comportamiento a la temperatura de 159°C , con una concentración de 90 ppm y con un tiempo de detección de 1000 s (aproximadamente 17 minutos), atribuyéndose probablemente este comportamiento a la presencia de la estructura α -hematita, estabilidad térmica del sensor y menor presencia probable de aglomerados de Ag.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONCYTEC (PROYECTO PROCYT 240-2008-CONCYTEC-OAJ), al Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, al Lab. 4 de la Sección Química de la PUCP y al Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Universidad de Zaragoza por el apoyo logístico y la ayuda financiera otorgada a este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Picasso G., Quintilla A., Pina M.P., Herguido J, *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 46, p. 133-143, (2003).
2. Mitra S., Das S., Mandal K., Chaudhuri S., *Nanotechnology* 18, 275608 (2007).
3. Chen, L.N. Xu, W.Y. Li, *Adv. Mater.* 17, 582–586 (2005).
4. Huo L.H., Li Q., Zhao H., Yu L.J., Gao S., Zhao J.G., *Sensors and Actuators B: Chemical*, V. 107, I. 2, p. 915-920 (2005).
5. Esteban-Cubillo A., Tullían J.M., Pecharromán C., Moya J., *J. European Ceramic Society* 25, p. 1983-1989 (2007).
6. Mukta V. Vaishampayan, Rupali G. Deshmukh, Pravin Walke, I.S. Mulla, *Materials Chemistry and Physics* 109, 230–234 (2008).
7. Wang Y., Wang Y., Cao J., Kong F., Xia H., Zhang J., Zhu B., Wang S., Wu S., *Sens. Actuators B* 131, p. 183-189 (2008).
8. Wang Y., Kong F., Zhu B., Wang S., Wu S., Huang W., *Materials Sci. and Eng. B* 140, 98-102 (2007).
9. Wang Y., Wang S., Zhao Y., Zhu B., Kong F., Wang D., Wu S., Huang W., Zhang S., *Sensors and Actuators B* 125, 79-84 (2007).
10. Malyshev V.V., Eryshkin A.V., Koltypin E.A., Varfolomeev A.E., Vasiliev A.A., *Sensors and Actuators B* 18-19, 434-436 (1994).
11. Huo L.H., Li Q., Zhao H., Yu L.J., Gao S., Zhao J.G., *Sens. Actuators B* 107, 915–920 (2005).
12. Funazaki N., Hemmi A., Ito S., Asano Y., Yamashita S., Kobayashi T., Haruta M., *Sens. Actuators B* 14, 536-538 (1993).
13. Tan O.K., Cao W., Zhu W., Chai J.W., Pan J.S., *Sens. Actuators B* 93, 396–401 (2003).
14. Dai G.R., *Sens. Actuators B* 53, 8–12 (1998).
15. Neri G., Bonavita A., Ipsale S., Rizzo G., Baratto C., Faglia G., Sberveglieri G., *Materials Science and Engineering: B* 139, p. 41-47, (2007).
16. http://en.wikipedia.org/wiki/Hydrogen_sulfide, 12.05.09.
17. Luo C., Zhang Y., Zeng X., Zeng Y., Wang Y., *J. Colloid Interface Sci.* 288, 444-448 (2005).
18. Wang X., Gao L., Zheng H., Ji M., Shen T., Zhang Z., *J. Crystal Growth* 269, 489-492 (2004).
19. Jing Z., Wu S., *Material letters* 58, 3637-3640 (2004).
20. Picasso G., Sun Kou M.R., Gómez G., Hermoza E., López A., Pina M.P., Herguido J., *Revista de la Sociedad Química del Perú*, v. 75, Nº 2, p 163-176 (2009).
21. Xu J., Wang X., Shen J., *Sensors and Actuators B* 115, 642-646 (2006).

ALGUNAS PROPIEDADES CINÉTICAS DE UNA L-AMINOÁCIDO OXIDASA PURIFICADA DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops atrox* “JERGÓN”

Nora Ruiz¹, Christian Solís¹, Gustavo A. Sandoval¹, Fanny Lazo¹,
Edith Rodríguez¹ y Armando Yarleque^{1*}

RESUMEN

Se han determinado las principales propiedades cinéticas de una L-aminoácido oxidasa (L-AO) purificada del veneno de *B. atrox*, usando diferentes aminoácidos como sustratos, tales como: L-leucina, L-fenilalanina, L-metionina y L-arginina. Previamente se establecieron las curvas de pH óptimo para L-AO en función de cada aminoácido y luego se calcularon los valores de K_m , V_{max} , K_{cat} y K_{cat}/K_m a pH 7,5 y 8,5. Asimismo, se determinaron los valores de K_i al emplearse inhibidores específicos tales como: ácido antranílico, ácido benzoico, ácido sulfanílico y ácido salicílico. Entre los sustratos ensayados a pH 8,5, la L-AO presentó mayor actividad específica sobre L-fenilalanina, y luego sobre L-leucina, L-metionina y L-arginina, siendo los valores de pH óptimo de 8,1 con L-metionina; 8,9 con L-arginina, y 8,2 con L-fenilalanina. De acuerdo a la eficiencia catalítica, la L-leucina fue el mejor sustrato a 7,5 ($K_{cat}/k_m = 40,90 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) y pH 8,5 (K_m y V_{max} ($K_{cat}/k_m = 71,21 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$)). Asimismo, en los estudios de inhibición enzimática se encontró que el ácido antranílico tuvo el menor valor de K_i (0,008 mM), ajustándose al modelo de inhibición no competitiva, en tanto que el ácido benzoico fue considerado un inhibidor competitivo y los ácidos salicílico y sulfanílico se comportaron como inhibidores de tipo mixto.

Palabras clave: L-aminoácido oxidasa, *Bothrops atrox*, parámetros cinéticos, inhibición enzimática, K_i .

SOME KINETIC PROPERTIES OF A L-AMINO ACID OXIDASE ISOLATED FROM *Bothrops atrox* PERUVIAN SNAKE VENOM “JERGÓN”

SUMMARY

We have determined main kinetic properties of a L-amino acid oxidase (L-AO) purified from *Bothrops atrox* venom, on different aminoacids as L-leucine, L-phenylalanine, L-methionine and L-arginine. Previously optima pH curves were establish for each aminoacid and then K_m , V_{max} , K_{cat} y K_{cat}/K_m values at pH 7,5 and 8,5 were calculated. Furthermore K_i values using anthranilic, benzoic, sulphanylic and salycilic acids were obtained. Between substrates assayed at pH 8,5, L-AO showed higher specific activity on L-phenilalanine, followed by L-leucine, L-methionine and L-arginine, being optimum values of 8,1 for L-metionine, 8,9 for L-arginine, and 8,2 for L-fenilalanine. According to catalytic efficiency, L-leucine was the best substrate at pH 7,5 ($K_{cat}/k_m = 40,90 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) and 8,5 ($K_{cat}/k_m = 71,21 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$). On the other hand, enzymatic inhibition assays showed that anthranilic acid had the lowest K_i value

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

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

(0,008 mM), fitting it to a non-competitive model. Benzoic acid was considered a competitive inhibitor, while salicylic and sulphanylic acid showed mixed-type inhibition.

Key words: L-amino acid oxidase, *Bothrops atrox*, kinetics parameters, enzyme inhibition, K_i

INTRODUCCIÓN

El veneno de las serpientes es considerado una mezcla de toxinas, enzimas y péptidos, los cuales inducen diversos efectos en sus víctimas. Su función primaria es la captura de sus presas; sin embargo, puede ser usado como defensa, causando daños severos a sus agresores, entre ellos los seres humanos¹. Debido a su composición, los venenos de serpiente son objeto de numerosos estudios orientados a: 1) aislar una o más sustancias activas del veneno, que en bajas concentraciones puedan presentar efectos farmacológicos de gran interés para el desarrollo de medicamentos; 2) tener una mejor comprensión de la función de las sustancias aisladas del veneno de serpientes en el proceso del envenenamiento; y 3) verificar si existe algún principio activo, sintético o natural que pueda inhibir la acción del veneno y de algunas proteínas aisladas del mismo. En este aspecto, el veneno de las serpientes de la familia Viperidae presenta una composición más compleja que la de otras familias, pues contienen un gran número de proteínas bioquímica y farmacológicamente activas².

En el Perú existe una fauna ofídica muy variada habiéndose reportado hasta la fecha 47 especies de serpientes venenosas, de las cuales 24 pertenecen al género *Bothrops*. Entre ellas se destaca la especie *Bothrops atrox*, perteneciente a la familia Viperidae³, por ser la causante del 90% de mordeduras, lo cual constituye un problema de salud pública muy importante⁴. Dentro de los principales componentes del veneno de *B. atrox*, estudiado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, encontramos a la L-aminoácido oxidasa o L-AO (EC 1.4.3.2), la cual es una flavoproteína responsable del color amarillo de los venenos y es específica para la desaminación oxidativa de un L-aminoácido hasta un α -cetoácido con la consiguiente producción de amoníaco y peróxido de hidrógeno⁵. Además, se han aislado y caracterizado otras L-aminoácido oxidasas como las de *Lachesis muta*⁶ y *Bothrops brazili*⁷.

En cuanto al estudio de L-AO de *B. atrox*, Lazo *et al.*⁵ aislaron y determinaron varias características bioquímicas de esta enzima, como el peso molecular y la determinación de azúcares asociados. Así, también se determinó su acción biológica, encontrándose que presenta efecto antimicrobiano *in vitro* sobre microorganismos patógenos, efecto *in vitro* contra promastigotes de *Leishmania braziliensis braziliensis*, y contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, además de un marcado efecto edemático⁸. Dado el potencial biotecnológico de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente de mayor interés médico en Perú, *Bothrops atrox*, es necesario evaluar sus principales propiedades cinéticas. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar experimentalmente la cinética enzimática de esta L-AO para evaluar el efecto que tiene sobre ella, la naturaleza química de los sustratos, como también ensayar posibles inhibidores, evaluando el grado y la naturaleza de la interacción, para seleccionar así los mejores inhibidores candidato lo que permitirá establecer posibles mecanismos de regulación de esta enzima.

PARTE EXPERIMENTAL

Enzima purificada

Se empleó la L-aminoácido oxidasa del veneno de *B. atrox*, la cual fue purificada siguiendo la metodología reportada previamente por Lazo *et al.*⁵, utilizando para esto una cromatografía de filtración molecular en Sephadex G-75, seguido de una cromatografía de intercambio iónico

en CM Sephadex C-50. La enzima purificada fue almacenada a -20°C hasta la realización de los ensayos cinéticos.

Sustratos e inhibidores en estudios

Como sustratos se emplearon los siguientes L-aminoácidos: L-leucina, L-metionina, L-arginina y L-fenilalanina (Sigma Chemical Co.) (figura 1). Asimismo, para los estudios de inhibición enzimática se utilizaron los siguientes compuestos: ácido salicílico, ácido sulfanílico, ácido benzoico y ácido antranílico. (Sigma Chemical Co) (figura 2).

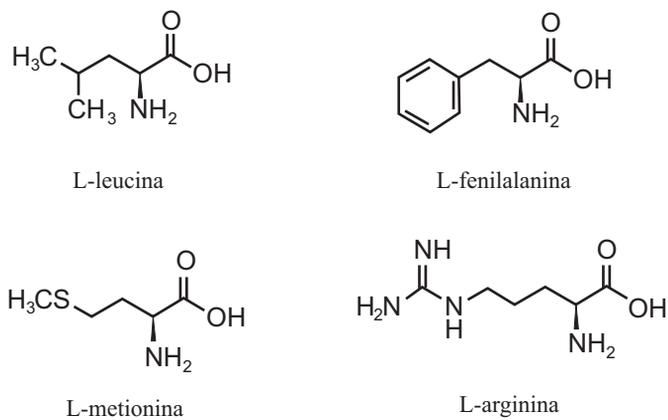


Figura 1. L-aminoácidos empleados en la caracterización enzimática de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*

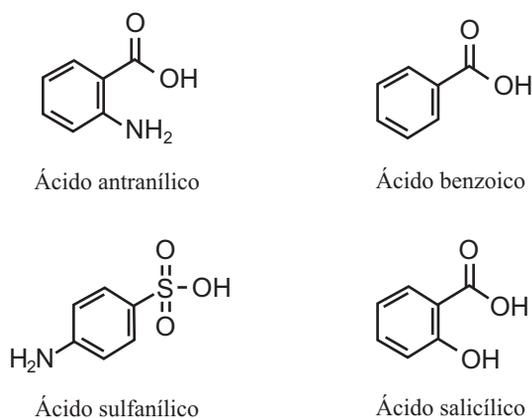


Figura 2. Compuestos sintéticos empleados en los ensayos de inhibición de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*

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 laboratorio¹¹ utilizando un fotocolorímetro Spectronic Bausch & Lomb, empleando albúmina sérica bovina como proteína estándar.

Actividad de L-aminoácido oxidasa

Se determinó por el método descrito en el Worthington Enzyme Manual¹², utilizando Buffer Tris-HCl 0,2 M pH 7,5 conteniendo O-dianisidina 0,0065%, peroxidasa de rabanito al 0,001% y L-leucina 1%. La mezcla fue preincubada durante 5 minutos a 37 °C y luego se agregaron 20 µl de la solución de enzima, determinándose el incremento de absorbancia a 436 nm. La actividad enzimática fue expresada en µmoles de L-leucina oxidados por minuto. En tanto que la actividad específica se expresó en U/mg de proteína. Una unidad de actividad corresponde a la oxidación de 1 µmol de L-leucina por minuto. Del mismo modo, se evaluó la actividad de L-AO sobre L-fenilalanina, L-arginina y L-metionina.

Determinación del pH óptimo

Se determinaron los pH óptimos de actividad de L-AO sobre L-fenilalanina, L-metionina y L-arginina siguiendo el método descrito en el Worthington Enzyme Manual¹². Para esto se utilizaron en la mezcla de reacción buffer acetato de amonio 0,2 M (pH 5,0, 5,5, 6,0 y 6,5), buffer Tris-HCl 0,2 M (pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5) y buffer glicina-NaOH 0,2 M (pH 10,0 y 10,5). Los valores de pH óptimo se obtuvieron mediante el Modelo de Gauss utilizando el programa Microcal Origin versión 6,0.

Determinación de los parámetros cinéticos

Se determinó el comportamiento cinético de la L-AO purificada en buffer Tris-HCl 0,2 M sobre L-leucina, L-metionina, L-fenilalanina y L-arginina a pH 7,5 y pH 8,5. La concentración de enzima utilizada fue de $6,85 \times 10^{-9}$ M, la cual se calculó a partir del peso molecular de la enzima (127,87 kDa) estimado previamente⁵ y expresado en g/mol. El incremento en la absorbancia a 436 nm se calculó de la porción inicial linear de la velocidad. Adicionalmente, se estimaron los parámetros cinéticos K_m y V_{max} según la ecuación de Michaelis-Menten ($V_o = V_{max}[S]/k_m + [S]$), mediante la representación de Michaelis Menten y Lineweaver-Burk, utilizando el software Sigmaplot versión 10,0. Se calcularon además los valores de K_{cat} y eficiencia catalítica.

Ensayos con inhibidores sintéticos de la actividad enzimática

Se determinó la acción inhibitoria del ácido salicílico, ácido benzoico, ácido sulfanílico y ácido antranílico (0,005 - 16 mM sobre la actividad de L-AO utilizando L-leucina (0,2 - 1,5 mM) como sustrato a pH 8,5 mM. obteniéndose las curvas respectivas con las diversas concentraciones de inhibidor. En cada caso se determinó el tipo de inhibición y la constante de inhibición K_i , de acuerdo a la representación de Lineweaver-Burk, utilizando el software Sigmaplot versión 10,0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad de L-AO y determinación del pH óptimo

De los ensayos de actividad de L-AO, se encontró que la mayor actividad específica sobre los aminoácidos L-metionina, L-leucina, L-arginina y L-fenilalanina, a una concentración de 7,5 mM y pH 8,5. Asimismo, la enzima demostró tener acción en el rango de pH de 6,9 a 9,6, obteniéndose valores de pH óptimo de 8,9 para L-arginina, 8,1 para L-metionina y 8,2 para L-fenilalanina (tabla 1).

Tabla 1. Estimación de parámetros cinéticos para la L-aminoácido oxidasa de *B. atrox* sobre diferentes sustratos

Sustrato	pH	K_m (mM)	V_{max} (μ moles/min/mg)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($s^{-1} M^{-1}$) $\times 10^4$
L-leucina	7,5	0,127	24,49	52,19	40,90
	8,5	0,118	39,52	84,24	71,21
L-fenilalanina	7,5	0,067	7,21	15,17	22,44
	8,5	0,051	11,47	24,44	47,89
L-metionina	7,5	0,283	29,90	63,72	22,54
	8,5	0,449	22,98	48,97	10,91
L-arginina	7,5	26,465	47,12	100,42	0,38
	8,5	1,652	17,25	36,78	2,23

Parámetros cinéticos para los principales sustratos

Los valores de V_{max} (μ moles/min/mg) y K_m (mM) obtenidos a pH 7,5 y 8,5 se muestran en la tabla 1. Para todos los casos se observó que la enzima se ajustó al modelo de cinética Michaeliana a concentraciones bajas de sustrato y también se observó inhibición por sustrato a altas concentraciones. Los menores valores de K_m se obtuvieron a pH 8,5 para los L-aminoácidos: L-leucina, L-fenilalanina, y L-arginina, mientras que para L-metionina el menor valor de K_m se obtuvo a pH 7,5. Asimismo, se muestran los valores de K_{cat} y eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) para dichos sustratos.

Modelo de inhibición y valores de K_i

La actividad de L-AO fue inhibida de modo no competitivo por ácido antranílico con constante de inhibición (K_i) de 0,0082 mM. La inhibición de L-AO fue competitiva cuando se empleó ácido benzoico, con un valor de K_i de 2,2 mM. Al emplearse ácido sulfanílico y ácido salicílico, el modelo de inhibición fue mixto con valores de K_i de 3,8 y 4,5 mM, respectivamente (tabla 2).

Tabla 2. Acción de diversos inhibidores sobre la L-aminoácido oxidasa de *B. atrox* utilizando L-leucina como sustrato

Inhibidor	Concentraciones ensayadas (mM)	K_i (mM)	K_m (mM)	V_{max} (μ mol/min/mg)	Modelo de inhibición
ácido antranílico (o-aminobenzoico)	0,005, 0,01 y 0,02	0,008	0,199	43,7	no competitivo
ácido benzoico	2, 3, 6, 8 y 12,5	2,2	0,137	41,1	competitivo
ácido sulfanílico (p-aminobenzenosulfónico)	5, 6,5, 8, 9 y 10	3,8	0,176	44,7	mixto total
ácido salicílico (o-hidroxi benzoico)	2, 3, 4, 5, 9, 10 y 16	4,5	0,175	43,9	mixto total

Actividad de L-AO sobre diversos sustratos y pH óptimo

Se ha reportado que este tipo de enzimas presenta una especificidad muy marcada para cierto tipo de sustratos L-aminoácidos, la cual varía dependiendo de la especie de serpiente en estudio. De los resultados obtenidos en el presente estudio, la L-AO de *B. atrox* mostró mayor preferencia por aminoácidos apolares hidrofóbicos, como la L-leucina, L-fenilalanina y L-metionina, seguido por aminoácidos polares básicos, como la L-arginina. Esto sugiere que la cadena lateral del aminoácido debe ser apolar para que el sustrato sea más específico, debiendo existir en el centro activo de la enzima una región apolar que interaccione con dicha cadena lateral. La preferencia por este tipo de aminoácidos hidrofóbicos ha sido reportada para la L-AO de *Bothrops pirajai*¹³. Asimismo, se encuentran resultados similares reportados para las L-AO de *Lachesis muta*⁶ y *Bothrops brazili*⁷.

Con respecto a los ensayos para establecer el pH óptimo de L-AO de *B. atrox*, la máxima actividad se registra a pH 8,3 usando L-leucina como sustrato, siendo este valor similar al reportado previamente para esta misma enzima⁵. Además, se encontró que la enzima mantiene un 80% de esta actividad máxima en el rango de pH 7,5 a 8,7. Estos valores de pH óptimo son semejantes a los reportados para las L-AO de *Lachesis muta*⁶ (pH óptimo: 7,5, sobre L-leucina), *Bothrops brazili*⁷ (pH óptimo: 9,0, sobre L-lisina; 8,5 sobre L-leucina, L-metionina, L-fenilalanina y L-arginina; 8,0 sobre L-isoleucina y 7,5 sobre L-triptófano) y *Bothrops pirajai*¹³ (pH 6,0 y 7,4 sobre L-fenilalanina y L-leucina, respectivamente). En todos los casos reportados se observa que el pH óptimo varía dependiendo del aminoácido utilizado como sustrato.

Análisis cinético

La L-AO de *B. atrox* exhibió una cinética enzimática que se ajusta al modelo de Michaelis-Mente, donde el valor de K_m corresponde a la concentración de sustrato a la cual se alcanza la mitad de la velocidad máxima, V_{max} , y es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato. En la tabla 2 se muestran los valores de K_m para la L-aminoácido oxidasa empleando L-leucina, L-metionina y L-arginina como sustratos. A pH 7,5 y 8,5, se observa que la cadena lateral del aminoácido debe ser apolar para que el sustrato sea más específico, obteniéndose valores de K_m menores. Esto nos indica que en el centro activo de la enzima existiría una región apolar que interacciona con la cadena lateral de los aminoácidos apolares. Los menores valores de K_m se obtuvieron a pH 8,5, y son resultados muy similares a los obtenidos para *Calloselasma rhodostoma*¹⁴, *N. naja kaouthia*^{15,16} y *Ophiophagus hannah*¹⁷, donde se encuentra la misma especificidad, es decir: L-fenilalanina > L-leucina > L-metionina > L-arginina. Esto demuestra que las L-AO de venenos de serpientes exhiben un comportamiento cinético muy similar.

La presencia de una región apolar en el centro activo podría favorecer una mayor actividad de la enzima respecto a otras del mismo tipo, ya que polariza no sólo el grupo catalítico sino también los posibles enlaces con el sustrato, exhibiendo una mayor reactividad. En cuanto a la eficiencia catalítica encontramos que el mayor valor lo exhibe L-leucina tanto a pH 7.5 como 8.5, lo cual está en relación con su grado de hidrofobicidad y sobretodo por su abundancia en el medio celular¹⁹.

Modelos de inhibición

Debido a la preferencia de L-AO de *B. atrox* sobre aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos, se evaluó la actividad inhibitoria de un grupo de moléculas sintéticas que presenten un anillo aromático en su estructura, ya que esta característica ofrecería un mayor ajuste del sustrato al sitio activo. De los parámetros cinéticos que muestra el efecto de inhibición enzimática se

consideró el valor de K_i (constante de inhibición), que corresponde a la concentración de inhibidor que reduce a un tercio el valor de V_{max} , cuando $[S] = K_m$. El valor de K_i es comparable al de K_m ya que revela el grado de afinidad de la enzima por el inhibidor. De acuerdo a los resultados de la tabla 2, el ácido antranílico, ácido acetilsalicílico, ácido benzoico y ácido sulfanílico, inhibieron la actividad de L-AO, si bien en diverso grado y presentando diferentes modelos de inhibición.

En el caso de la inhibición por el ácido benzoico, ésta se ajustó al modelo de inhibición competitiva, la cual se explicaría por la presencia del anillo bencénico. Por otro lado, el ácido antranílico u o-aminobenzoico, resultó ser el inhibidor más potente, donde la presencia del sustituyente amino en el anillo bencénico incrementa la polaridad positiva y por ende la afinidad de la enzima por esta molécula. Estas moléculas presentan una semejanza estructural con los sustratos, por un lado poseen un grupo carboxilo cargado y por otro un grupo hidrofóbico, el anillo bencénico: por lo que se estarían reaccionando en la misma región de la enzima que en el caso de los sustratos. Estos resultados sugieren que las porciones electrostáticas e hidrofóbicas presentes en la estructura del inhibidor estarían involucradas en su trayectoria hacia el sitio activo, siendo ambas características complementarias para lograr una inhibición de esta enzima. Sin embargo, el modelo de inhibición para el ácido antranílico es no competitivo, lo que sugeriría que la interacción de éste con los residuos positivos no se da a nivel de residuos básicos en el sitio activo, sino más bien a lo largo de la trayectoria hacia el sitio activo.

Diversos estudios de inhibición enzimática realizados con las L-aminoácido oxidasas han mostrado que este tipo de enzimas responde al modelo de inhibición competitiva. En 1948, Zeller señaló que el ácido benzoico, ácido salicílico, ácido mandélico, las sulfonamidas, los ácidos sulfónicos aromáticos y los ácidos alifáticos α -aminosulfónicos, son inhibidores competitivos de la L-aminoácido oxidasa de *V. aspis*. Asimismo, De Kok *et al.*¹⁸, utilizando diferentes inhibidores competitivos realizó un análisis del mecanismo de unión de los inhibidores al sitio activo de la enzima de *C. adamanteus*, observándose que los ácidos benzoicos metasustituídos fueron los inhibidores más fuertes.

Con respecto al ácido sulfanílico y al ácido salicílico, los valores de K_i son mucho mayores, lo que demuestra que son menos afines a la enzima. Este se debe probablemente a que exhiben una mayor acidez (valores de pKa menores), lo cual constituye un factor que podría incidir en la fuerza de unión del sustrato a la enzima. Además, estos ácidos exhibieron un patrón de inhibición del tipo mixto. Estos resultados se complementa con los reportados por Page y Vanetten²⁰ para la L-AO de *C. adamanteus*, quienes indican que el mecanismo de catálisis general implicado en la reacción enzimática utilizando L-leucina como sustrato es de naturaleza básica.

Diversas estructuras de inhibidores sugieren que los compuestos aromáticos que tienen un grupo carboxilo o hidroxilo son capaces de inhibir a las enzimas L-AO¹⁸. La similar afinidad que presentan los ácidos grasos sustituidos y no sustituidos por la L-AO, sugiere que el efecto de adicionar el componente aromático resulta comparable a incrementar el tamaño de la cadena alifática. Aún cuando no se ha establecido, es razonable suponer que la interacción entre L-AO y los aminoácidos involucran tanto a los grupos amino como a los carbonilo. Del mismo modo, se esperaría que los grupos ácidos del inhibidor reaccionen en la misma porción de L-AO que las porciones carboxilo de los aminoácidos. Por estas razones se cree que los inhibidores que contengan tanto el grupo básico como ácido pueden ser más efectivos que los que sólo cuenten con uno de éstos. Otro factor estructural es el cofactor FAD, que tiene una importante interacción con los átomos de la proteína, siendo considerado inclusive como un

dominio de ésta, por lo que se piensa que el incremento en el ambiente apolar alrededor del FAD puede perturbar su espectro de absorción, afectando así también la actividad enzimática. Además, el grupo FAD de la enzima es importante para establecer interacciones con los sustratos los residuos de aminoácidos básicos tales como la histidina 461, arginina 88 y lisina 324. Esto explica la afinidad a moléculas como los ácidos benzoicos que presentan como sustituyentes característicos un grupo carboxilo, grupo también presente en los sustratos L-aminoácidos de esta enzima.

A partir de este análisis, se puede decir que la estructura farmacofórica de un inhibidor de la L-aminoácido oxidasa apropiado para especies del género *Bothrops* debe poseer al menos un grupo aromático con un sustituyente con carga negativa y otro sustituyente con polaridad positiva, con el fin de que tenga una mayor fuerza de unión al centro activo de la enzima, inhibiendo de esta manera su actividad enzimática pudiendo reducir así los efectos tóxicos del veneno.

CONCLUSIONES

La presente investigación ha permitido establecer que la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* es capaz de hidrolizar diversos L-aminoácidos; siendo más activo sobre los L-aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos. Esta afinidad por determinados sustratos servirá de base para el diseño de moléculas sintéticas con residuos aromáticos y sustituyentes con carga negativa y positiva que puedan inhibir esta enzima, reduciendo así sus efectos tóxicos.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue parte de la Tesis de Biólogo con mención en Biología Celular y Genética de la Blga. Nora Ruiz. Además, los autores del presente trabajo agradecen al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por el apoyo financiero brindado para llevar a cabo esta investigación (Proyecto PROCYT N° 161-2006-CONCYTEC-OAJ).

REFERENCIAS

1. Tu, A.T. **Venoms: chemistry and molecular biology**. Ed. John Wiley & Sons, New York, 1977. p.560.
2. Suhr, S.M. y Kim, D.S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224 (1): 134-139.
3. Carrillo, N. e Icochea, J. Lista taxonómica preliminar de los reptiles vivientes del Perú. Publicaciones del Museo de Historia Natural Javier Prado. UNMSM. 1995; Serie A (49): 27.
4. Loja, D., Avilés, R., Necochea, Y., Vilca, M. y Castro, J. Ofidismo por *Bothrops atrox*: estudio clínico-epidemiológico. *Diagnóstico* 2000; 39(5):261-5.
5. Lazo, F., Málaga, O., Yarlequé, A. *et al.* Algunas propiedades bioquímicas de una L-aminoácido oxidasa aislada del veneno de la serpiente *Bothrops atrox*. *Rev. Soc. Quím. Perú*, jul./set. 2007, vol.73, no.3, p.131-141.
6. Cisneros, Y.; Lazo, F., Gutiérrez, S., Yarlequé, A. Características bioquímicas de una proteína antibacteriana aislada del veneno de *Lachesis muta* "Shushupe". *Rev. Soc. Quím. Perú*, oct./dic. 2006, vol.72, no.4, p.187-196.
7. Solís, C., Escobar, E., Yarlequé, A. y Gutiérrez, S. Purificación y caracterización de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* "Jergón shushupe" *Rev Peru Biol*, 1999; 6(1): 75-84.

8. Lazo, F., Málaga, O., Yarlequé, A. *et al.* Actividad antimicrobiana de una flavoproteína aislada del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* ("jergón"). *Rev. Soc. Quím. Perú*, oct./dic. 2007, vol.73, no.4, p.197-207.
9. Warburg, O. and Christian, W. Isolierung and cristallisation del Gärungs ferments enolase. *Biochemische Zertschrift*. 1941; 31: 384-421.
10. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
11. Loayza, S., Morante, Y., Campos, S., y Yarlequé, A. Enzimas proteolíticas en el veneno de las serpientes peruanas *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Bol Soc Quím del Perú* 1985; LII (3): 151-163.
12. Worthington Biochemical Corporation. L-Amino Acid Oxidase. New Jersey: The Worthington Enzymes Manual. Enzymes Related Biochemicals; 1993 p. 34-35.
13. Izidoro, L.F., Ribeiro, M.C., Souza, G.R., Sant'ana, C.D., Hamaguchi, A., *et al.* Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bioorg. Med. Chem.*, 2006. v.14, p.7034-43.
14. Ponnudurai, G., Chung, M.C. y Tan, N.H. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. *Arch Biochem Biophys* 1994; 313(2): 373-378.
15. Sakurai, Y., Takatsuka, H., Yoshioka, A., Matsui, T., Suzuki, M. Titán, K. y Fujimura, Y. Inhibition of human platelet aggregation by L- amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. *Toxicon* 2001; 39(12): 1827-1833.
16. Tan, N.H. y Swaminathan, S. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from monocellate cobra (*Naja naja kaouthia*) venom. *Internat J Biochem* 1992; 24: 967-973.
17. Li , Z.Y., Yu, T.F. y Lian, E. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom and its effects on human platelet aggregation. *Toxicon* 1994; 32(11): 1349– 1358.
18. De Kok, A. y Veeger, C. Studies on L- amino acid oxidase I. Effects and the competitive inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1968; 33:345.
19. Du, X.Y. y Clemetson, K.J. Snake venom L- amino acid oxidases. *Toxicon* 2002; 40(6): 659-665.
20. Page, D. y Van Etten, R. L- amino acid oxidase. II. Deuterium isotope effects and the actino mechanism for the reduction of L- amino acid oxidase by L- leucine. *Biochim Biophys Acta* 1971; 227: 16-31.

EFFECTO DE LA ASISTENCIA DEL LÍQUIDO IÓNICO [BMIM][BF₄] EN LA CRISTALINIDAD Y LA MORFOLOGÍA DE NANOESTRUCTURAS DE Sb₂S₃ SINTETIZADAS POR ULTRASONIDO

Juan Pablo Salinas Estevane^{a*}, Eduardo Maximiano Sánchez Cervantes^{b*}

RESUMEN

Se logró sintetizar nanoestructuras cristalinas unidimensionales de Sb₂S₃ por medio de irradiación de ultrasonido asistido por el líquido iónico (LI) tetrafluoroborato de 1-n-butil-3-metilimidazolio [BMIM][BF₄]. Los reactivos utilizados fueron SbCl₃, tioacetamida, etanol absoluto (ETA); el líquido iónico utilizado fue [BMIM][BF₄]. Los materiales resultantes fueron sometidos a tratamientos térmicos posteriores en condiciones controladas de vacío a 155 y 200 °C. Los experimentos mostraron que el LI jugó un papel clave en la cristalinidad y morfología de los productos obtenidos. Los productos fueron caracterizados por difracción de rayos X en polvos (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB), y espectroscopía de rayos X dispersados (EDS).

Palabras clave: nanobarras, líquido iónico, ultrasonido.

[BMIM][BF₄] IONIC LIQUID ASSISTANCE EFFECT ON THE CRYSTALLINITY AND MORPHOLOGY OF Sb₂S₃ NANOSTRUCTURES SYNTHESIZED BY ULTRASOUND

ABSTRACT

Unidimensional crystalline Sb₂S₃ nanostructures were successfully synthesized by ultrasound irradiation assisted with the ionic liquid 1-n-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate [BMIM][BF₄]. The starting reagents were SbCl₃, thioacetamide, absolute ethanol (AET), and the used ionic liquid was [BMIM][BF₄]. The resultant materials were thermally annealed at 155 and 200 °C under controlled vacuum conditions. The experiments showed that IL assistance played a key role in the crystallinity and morphology of the obtained products. The resultant materials were characterized by powder X-ray diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), and Energy Dispersive X-ray analysis (EDX).

Key words: nanorods, ionic liquid, ultrasound.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han realizado esfuerzos de magnitud considerable para sintetizar materiales inorgánicos de forma nanoestructurada los cuales tienen aplicaciones numerosas en la electrónica, la medicina y la biología. Los semiconductores han mostrado propiedades

^{a*} Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. México, jsestevanee@yahoo.com

^{b*} Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Pedro de Alba s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. México, eduardo.sanchezcv@uanl.edu.mx

nuevas lo que los convierte en candidatos prometedores para la manufactura de dispositivos electrónicos y optoelectrónicos. La estibnita (Sb_2S_3) es un material prospecto para aplicaciones en energía solar¹, así como en dispositivos termoeléctricos² y optoelectrónicos en la región infrarroja³. La estibnita es un material anisotrópico con una estructura de capas y cristaliza en una fase ortorrómbica (grupo especial pbnm), las capas de SbS_3 y SSb_3 forman pirámides interconectadas. Estas características explican su tendencia a formar estructuras unidimensionales (1-D). Hay un gran interés en preparar la estibnita con diferentes morfologías, como nanobarras⁴, nanoalambres⁵, nanotubos⁶ y nanolistones⁷, entre otras morfologías⁸, utilizando una amplia variedad de procedimientos químicos, tales como los solvotermales⁹, hidrotermales¹⁰ y sonoquímicos¹¹ o métodos de transporte de vapor¹².

La utilización de ultrasonido de alta potencia en pequeñas áreas permite obtener estructuras de diferente tamaño y morfologías. El proceso más importante en la irradiación de ultrasonido es la cavitación, la cual se inicia con la nucleación y la formación y disipación de esferas en donde éstas implosionan con presiones y temperaturas muy altas (varias atmósferas y miles de kelvins, respectivamente) localmente y como resultado produce la formación de materiales de diferente forma y tamaño y por lo tanto con diferentes propiedades. Se reporta la preparación de la estibnita por medio de ultrasonido en forma de nanobarras¹¹, nanowhiskers¹³ y microcristales¹⁴. Recientemente, la síntesis de materiales inorgánicos nanoestructurados a temperatura ambiente, utilizando líquidos iónicos, ha recibido mucha atención debido al aumento de las consideraciones ambientales (química verde) como una alternativa económica a las rutas tradicionales, en las cuales la utilización de solventes orgánicos y tóxicos es común. Los líquidos iónicos son sales fundidas a temperatura ambiente, tienen una viscosidad relativamente baja, puntos de fusión menores a 100C y están compuestos de un catión y un anión. Los líquidos iónicos tienen una amplia variedad de propiedades útiles¹⁵, las cuales incluyen baja presión de vapor, gran estabilidad térmica y electroquímica, inflamabilidad, buena miscibilidad en solventes y alta conductividad. Estas características los hacen útiles en aplicaciones tales como catálisis, electroquímica, fotoquímica, entre otras. Los líquidos iónicos más populares¹⁶ tienen cationes tales como imidazolio, piridinio, amonio cuaternario y pirrolidinio.

La técnica de irradiación de ultrasonido asistida con líquido iónico es una técnica relativamente nueva para preparar nanomateriales. Esta técnica ha sido utilizada para sintetizar nanopartículas de ZnS utilizando el líquido iónico tetrafluoroborato de 1-n-butil-3-metilimidazolio [BMIM][BF₄]¹⁷. Partículas similares fueron preparadas utilizando etil sulfato de 1-etil-3-metilimidazolio [EMIM][EtSO₄]¹⁸; este líquido iónico también se ha reportado en la preparación de nanocúmulos de CuS¹⁹.

En este trabajo reportamos la preparación de nanoestructuras de Sb_2S_3 mediante irradiación de ultrasonido de baja potencia, bajo la asistencia del líquido iónico [BMIM][BF₄] y el subsecuente tratamiento térmico a vacío. Se caracterizó a los materiales por difracción de rayos X en polvos (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopía de rayos X dispersados (EDS).

PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizó SbCl_3 , tetrafluoroborato de 1-n-butil-3-metilimidazolio [BMIM][BF₄] y tioacetamida; éstos fueron comprados en Fluka. El etanol absoluto y la acetona se compraron en CTR Scientific. Para la síntesis de Sb_2S_3 se utilizaron 0,40g de SbCl_3 y 0,45g de tioacetamida los cuales se disolvieron en diferentes proporciones en volumen de etanol absoluto y líquido iónico como se indica en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones experimentales de síntesis de Sb₂S₃

Muestra	Irradiación de ultrasonido (70W, 42kHz), 24h	Volumen etanol absoluto (mL)	Volumen de líquido iónico [BMIM][BF ₄] (mL)	Temperatura de reacción (°C)	Tratamiento térmico Temperatura (°C), 1h
a	Si	9	1	60	No
b	Si	8	2	60	No
c	Si	7	3	60	No
d	Si	6	4	60	No
e	Si	5	5	60	No
a'	Si	6	4	60	155
b'	Si	6	4	60	200

Estos materiales fueron introducidos en un balón de base redonda de dos bocas; una de ellas conectada a un termómetro, y la otra a un sistema de reflujo. Todo el sistema fue introducido en un baño de ultrasonido Branson (70W, 42kHz) durante 24 horas. La temperatura alcanzada en la reacción fue de 60 °C. Después de la reacción, los polvos resultantes fueron lavados en secuencia con etanol absoluto, agua destilada y acetona. Después, las muestras fueron sometidas a un tratamiento térmico en condiciones controladas de vacío (Shel Lab, 1410) a 6,8kPa durante una hora a 155 y 200 °C. Los análisis de difracción de rayos X en polvos (DRX) se llevaron a cabo en un equipo Rigaku Miniflex Desktop X-ray diffractometer (CuK_α1, Ni, 1,540562nm, 30kV, 15mA, tamaño de paso 0,02°, tiempo de paso 2s). La morfología y el análisis de dispersión de energía fueron analizados en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6490LV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestra el análisis de DRX realizado a las muestras sintetizadas según las condiciones presentadas en la tabla 1, y para las muestras en donde no se realizó tratamiento térmico posterior, se muestra además el patrón correspondiente al Sb₂S₃ (JCPDS 06-0474). Como se puede observar, en ninguno de los casos se tiene un número de cuentas muy alto, únicamente alcanzando cerca de 1000; sin embargo, algunos de los planos de difracción comienzan a ser evidentes sobre todo para las muestras d y e en donde se les puede indexar a los planos <120>, <310>, <130> y <221>. En particular para la muestra d, el plano <120> muestra una definición alta y en un grado menor para los planos <310> y <130>. Se puede concluir que la irradiación de ultrasonido de baja potencia (70W, 42kHz) aunado a la adición de [BMIM][BF₄] ayuda a la obtención de Sb₂S₃, pero con un grado de cristalinidad bajo. A pesar de que los resultados para una proporción de 40 por ciento de líquido iónico tiende a mejorar las propiedades cristalinas del material, su patrón de difracción de rayos X muestra todavía un número e intensidad de las señales bastante bajo para considerarlo como un material cristalino; es por ello que se propuso un tratamiento térmico posterior a la síntesis en condiciones controladas de vacío a 6,8kPa para que la energía térmica que se le dé al material pudiera ser aprovechada para tornar este material de semi-cristalino o amorfo a totalmente cristalino.

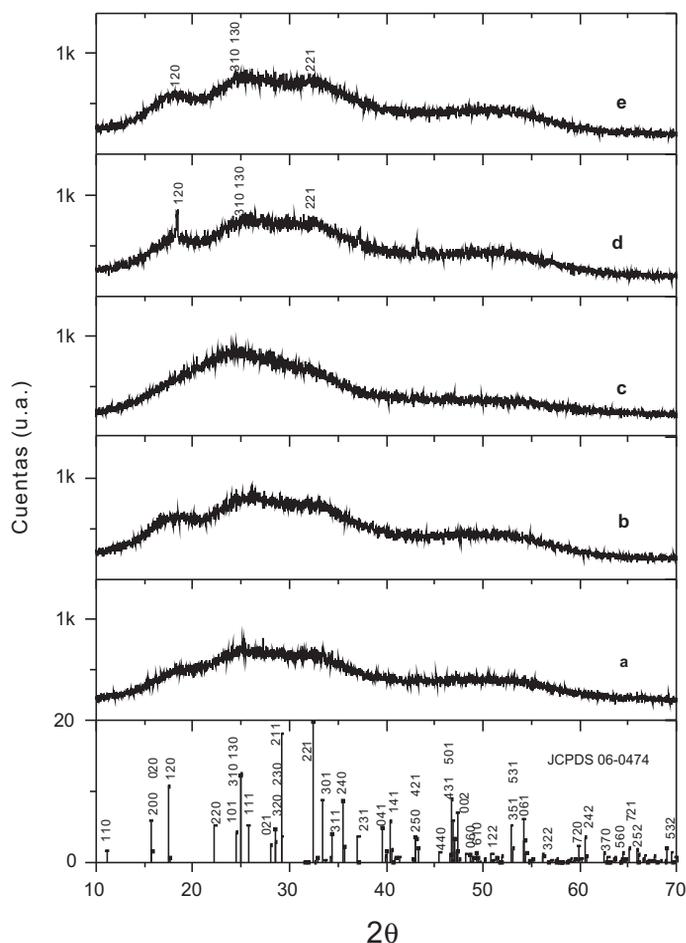


Figura 1. Análisis de DRX Sb_2S_3 asistido con $[\text{BMIM}][\text{BF}_4]$

En la figura 2 se tiene el análisis de DRX llevado a cabo, correspondiente a las muestras a' y b' de la tabla 1; también se muestra como referencia el patrón de la estibnita (JCPDS 06-0474). A los 155 °C el grado de cristalinidad es bastante evidente, llegando hasta cerca de las 5000 cuentas y todas las señales de difracción se pueden indexar al patrón JCPDS 06-0474 que corresponde a una fase puramente ortorrómbica. No se detectaron algunas otras fases como pudiera ser Sb_2O_3 . Para el tratamiento a 200 °C se incrementa aún más el grado de cristalinidad en donde las señales principales llegan a tener más de 5000 cuentas. Se puede concluir que un tratamiento térmico posterior a la síntesis ayuda a que la energía térmica irradiada sobre el material sea aprovechada para lograr un mayor grado de cristalinidad y pureza, como es de esperarse al utilizar esta energía para que los átomos componentes se ordenen a largo alcance y se disminuyan los defectos cristalinos.

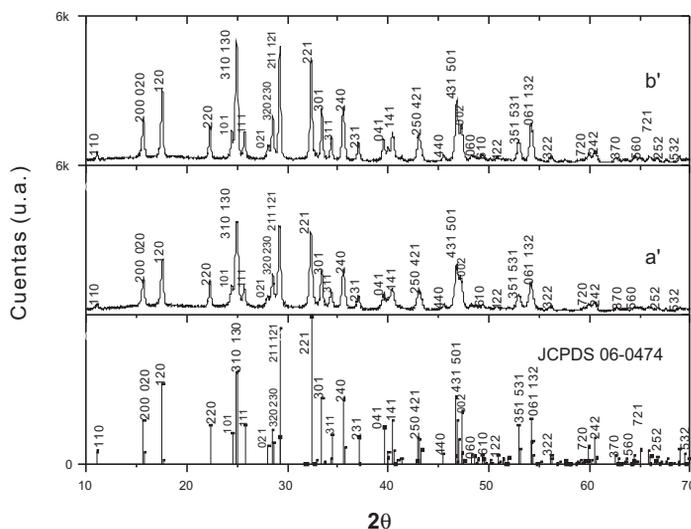


Figura 2. Análisis DRX Sb₂S₃ tratamiento térmico

En la figura 3 se muestra el análisis de microscopía electrónica de barrido y de espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS) realizado a las muestras con y sin tratamiento térmico posterior. El objetivo de realizar MEB fue el de elucidar las morfologías, distribución y tamaño de los productos obtenidos bajo diferentes condiciones experimentales. Las figuras 3a-e son representativas de la morfología obtenida mediante la síntesis obtenida por las condiciones de la a la e, donde encontramos morfologías aproximadamente esféricas y distribuidas de una forma más o menos uniforme. El tamaño promedio de las nanoestructuras obtenidas fue de cerca de 80nm. En algunas regiones de ambas figuras es posible encontrar la formación de pequeños aglomerados de aproximadamente 1µm de diámetro, el cual es un tamaño relativamente pequeño, lo que nos lleva a elucidar que estas nanoestructuras son muy estables termodinámicamente. En la figura 3a' tenemos la formación de aglomeraciones de nanobarras. Se observa, además, una distribución uniforme de estos paquetes de nanobarras, las cuales tienen un diámetro aproximado a 60nm y varios micrómetros de largo. El análisis de DRX correspondiente (figura 2a') muestra las señales de la estibnita completamente definidas y desarrolladas, alcanzando un número máximo de cuentas cercano a 5000. Resulta evidente que el incremento en la energía térmica proporcionada al material fue utilizado en crecer en diámetro y el largo de las nanoestructuras y en lograr un cambio fuerte en el grado de cristalinidad con respecto a las muestras sin tratamiento térmico. En la figura 3b', observamos cambios en la morfología en donde en algunas regiones tenemos la formación de nanoestructuras de forma cilíndrica con un diámetro aproximado entre 70-80nm y varios micrómetros de largo. Los aglomerados en algunos casos llegan a tener dimensiones mayores de 1µm. El análisis de DRX asociado (figura 2b') muestra de nuevo totalmente desarrolladas las fases de la estibnita como era de esperarse con un número máximo de cuentas superior a las 5000. El cambio logrado en la morfología y grado de cristalinidad se debe principalmente al cambio en la energía entregada al material debido al tratamiento térmico a 200 °C. En la figura 3 se muestra un análisis EDS representativo en donde solamente se aprecian señales correspondientes al Sb y S. Se observa una relación cercana a 2:3 con respecto al Sb y S. La

señal de antimonio se encuentra cercana a los 4keV y al del azufre a poco más de 2keV; estas energías corresponden a la energía entre los orbitales base y el primer estado excitado de los electrones de cada uno de estos elementos. En este gráfico se observa, además, una proporción de aproximadamente 2:3 entre la señal del antimonio con respecto a la de azufre, lo cual constituye una comprobación de que se obtuvo el compuesto deseado, es decir Sb_2S_3 , lo cual ya se había corroborado también por DRX.

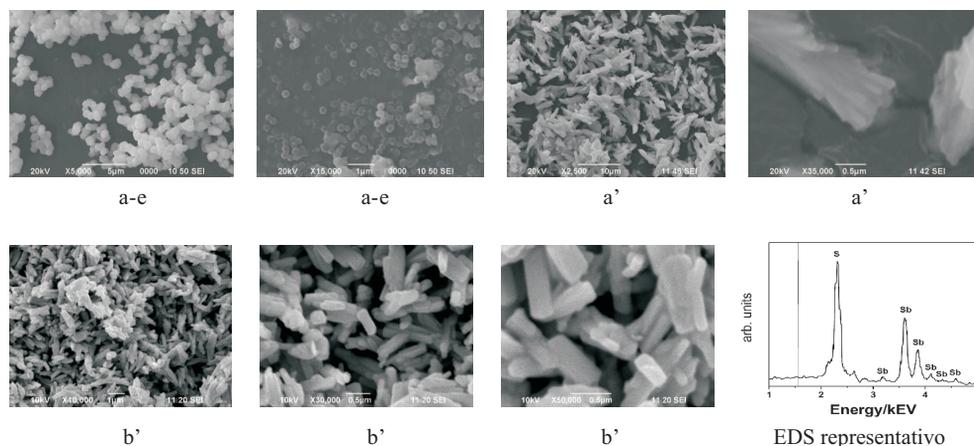


Figura 3. Análisis de MEB y EDS

Se propone que el líquido iónico $[BMIM][BF_4]$ promueve la formación de nanoestructuras unidimensionales. Esta idea puede ser explicada dado que los líquidos iónicos pueden formar sistemas de puentes de hidrógeno extendidos en el estado líquido y son altamente estructurados. Existe una fuerza atractiva entre $[BMIM]^+$ y S^{2-} que es similar a un puente de hidrógeno (formado entre el átomo de hidrógeno en la posición C2 del anillo de imidazolio y el átomo de azufre en los enlaces S-Sb) que actúa como un enlace efectivo para interconectar S^{2-} de un núcleo recién formado de un metal y $[BMIM]^+$, que a su vez ayuda a alinear el crecimiento de las nanopartículas haciendo posible la localización de las moléculas basado en la capacidad del imidazolio para auto-ensamblarse en estructuras ordenadas, estabilizadas por interacciones adicionales $\pi-\pi$, resultando en la auto-organización de nanopartículas en nanoestructuras unidimensionales.

CONCLUSIONES

- Es evidente que el $[BMIM][BF_4]$ tiene una aportación importante en la definición de las señales de difracción de rayos X en polvos para las condiciones experimentales de la muestra d.
- Los tratamientos térmicos posteriores a vacío logran aumentar significativamente la cristalinidad del material sintetizado, aun a temperaturas y tiempos moderados.
- La asistencia del $[BMIM][BF_4]$ en la síntesis de Sb_2S_3 logra la transformación de estructuras cero dimensionales a nanobarras.
- El análisis de EDS muestra que se obtuvo Sb_2S_3 .

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo otorgado por medio de los proyectos NSF-CONACyT #35998U y CONACyT #60170. Además se reconoce el apoyo de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, bajo el programa PAICyT. También, ambos autores reconocen los apoyos académicos provistos por CONACyT.

BIBLIOGRAFÍA

1. S. Messina, M.T.S. Nair & P.K. Nair., 517(7): 2503-2507 (2009).
2. H. Bao, X. Cui, C.M. Li, Q. Song, Z. Lu & J. Guo., *Journal of Physical Chemistry C*, 111(45):17131-17135 (2007).
3. M. Calixto-Rodriguez, H. Martinez, Y. Pena, O. Flores, H.E. Esparza-Ponce, A. Sanchez-Juarez, J. Campos-Alvarez & P. Reyes., *Applied Surface Science*, 256(8):2428-2433 (2010).
4. Q.F. Han, L. Chen, M-J Wang, X-J Yang, L-D Lu & X Wang., *Materials Science & Engineering, B: Advanced Functional Solid-State Materials*, 166(1):118-121 (2010).
5. Z.R. Geng, M. Wang, G.H. Yue & P.X. Yan., *Journal of Crystal Growth*, 310(2):341-344 (2008).
6. K.H. Park, J. Choi, H.J. Kim, J.B. Lee, S.U. Son., *Chemistry of Materials*, 19(16): 3861-3863 (2007).
7. Y. Yu, R.H. Wang, Q. Chen, L-M Peng., *Journal of Physical Chemistry B*, 109(49):23312-23315 (2005).
8. Q. Han, L. Chen, W. Zhu, M. Wang, X. Wang, X. Yang, L. Lu, Lude., *Materials Letters*, 63(12):1030-1032 (2009).
9. L. Zhang, L. Chen, H. Wan, H. Zhou & J. Chen., *Crystal Research and Technology*, 45(2):178-182 (2010).
10. L. Chen, W. Zhu, Q. Han, X. Yang, L. Lu & X. Wang., *Materials Letters*, 63(15):1258-1261 (2009).
11. H. Wang, Y.N. Lu, J.J. Zhu & H.Y. Chen., *Inorganic Chemistry*, 42(20):6404-6411(2003).
12. J. Yang, Y.C. Liu, H.M. Lin & C.C. Chen., *Advanced Materials*, 16(8):713- (2004).
13. H. Wang, J-J Zhu & H-Y Chen., *Chemistry Letters*, (12): 1242-1243 (2002).
14. J.H. Zhang, Z. Chen, Z.L. Wang & N.B. Ming., *Journal of Materials Research*, 18(8):1804-1808 (2003).
15. J.H. Davis., *Chemistry letters*, 33(9):1072-1077 (2004).
16. T. Welton., *Chemical Review*, 99:2071-2084 (1999).
17. Y. Wu, X. Hao, J. Yang, F. Tian & M. Jiang., *Materials Letters*, 60(21-22): 2764-2766 (2006).
18. M. Behboudnia, A. Habibi-Yangjeh, Y. Jafari-Tarzanag & A. Khodayari., *Journal of Crystal Growth*, 310(21): 4544-4548 (2008).
19. M. Behboudnia, A. Habibi-Yangjeh, Y. Jafari-Tarzanag & A. Khodayari., *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 11(2):134-139 (2009).

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE FITOESTEROLES, COMPUESTOS FENÓLICOS Y MÉTODOS QUÍMICOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN SEMILLA DE SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.)

Ana Muñoz Jáuregui^{a*}, Fernando Ramos Escudero^b, Carlos Alvarado Ortiz-Ureta^a,
Benjamín Castañeda Castañeda^a, Edy Barnett Mendoza^a, Jaime Yáñez Farfán^c,
Delia Cajaleón Asencios^d

RESUMEN

En el presente estudio se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC según condiciones cromatográficas descritas por Muñoz et al. La torta de sachá presentaron ácidos fenólicos tales como ácido cafeico 3,51 mg/kg, y ferúlico 1,68 mg/kg. Asimismo, se encontraron flavonoides: 42,93 mg/kg de rutina, 28,46 mg/kg de hesperidina y 53,24 mg/kg de morina. Se identificaron en torta y aceite por el método descrito por Fierro et al., usando TLC la presencia de fitoesteroles en sachá inchi. Inmediatamente se cuantificaron fitoesteroles por HPLC en aceite donde se realizó el tratamiento de la muestra mediante extracción por saponificación según CEE 2568-91. Los resultados mostraron un contenido promedio de 75,49 mg/100g para estigmasterol y 74,56 mg/100g de β -sitosterol. La actividad antioxidante se realizó mediante los métodos ABTS según Van Overveld *et al.*, y DPPH según Brand-Williams *et al.* Los resultados mostraron que el extracto lipofílico del aceite presentaba mayor actividad antioxidante y mayor capacidad inhibitoria con el método DPPH; sin embargo, el extracto hidrofílico del aceite mostró mayor actividad con el método ABTS.

Palabras clave: ácidos fenólicos, flavonoides, fitoesteroles, sachá inchi.

EVALUATION OF THE CONTENT OF PHYTOSTEROLS, PHENOLIC COMPOUNDS AND CHEMICAL METHODS TO DETERMINE ANTIOXIDANT ACTIVITY IN SACHA INCHI'S SEED (*Plukenetia volubilis* L.)

ABSTRACT

The present research was the quantification of phenolic compounds by HPLC chromatographic conditions as described by Muñoz et al., in the sachá inchi's cake that quantified phenolic acids found an average of 3,51 mg/kg of caffeic and 1,68 mg/kg of ferulic. Also flavonoids are found an average of 42,93 mg/kg routinely 28,46 mg/kg of hesperidin and 53,24 mg/kg of morin. Was identified by the method described by Fierro et al., using TLC where they detected the presence of phytosterols in sachá inchi. Content were quantified by HPLC phytosterols in oil which was extracted by saponification according to EEC 2568-91. Results were average content of 75,49 mg/100g for stigmasterol, while the content of

^{a*} Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres, Av. Alameda del Corregidor 1531, Lima 12, Perú, amariamj@yahoo.es

^b Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

^c Department of Drug Metabolism and pharmacokinetics, Merck & Co., Inc. Merck Research Laboratories, Kenilworth, NJ 07033, USA.

^d Facultad de Bromatología y Nutrición, Universidad Faustino Sánchez Carrión.

β -sitosterol was 74,56 mg/100g. Antioxidant activity was determined by ABTS methods according to Van Overveld et al., And DPPH as Brand-Williams et al. The results showed that the lipophilic extract oil had higher antioxidant activity showed a greater inhibitory capacity with DPPH method, however, the hydrophilic extract of the oil showed greater activity with the ABTS method.

Key words: phenolic acids, flavonoids, phytosterols, sacha inchi.

INTRODUCCIÓN

El sacha inchi *Plukenetia volúbilis* L. en nuestro país se encuentra en estado silvestre en diversos lugares de San Martín, Ucayali, Huánuco, Amazonas, Madre de Dios y Loreto. El presente estudio evalúa la presencia de fitoesteroles, compuestos fenólicos, y actividad antioxidante de la semilla de sacha inchi¹. Actualmente son de gran importancia los compuestos fenólicos por sus propiedades como antioxidantes y por sus atributos sensoriales que brindan a los alimentos como: sabor, color, y por brindar estabilidad por su resistencia a la oxidación lipídica². Asimismo, son excelentes conservadores naturales brindando estabilidad al alimento desplazando a otros conservadores sintéticos. La proyección en cuanto a su aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica está en aumento; evaluar sus propiedades antioxidantes y la presencia de polifenoles permitirá abrir nuevos posibles mercados³. El objetivo del presente trabajo es determinar el contenido de compuestos fenólicos por HPLC, capacidad antioxidante e identificación y cuantificación de fitoesteroles en semilla de sacha inchi.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales e insumos

Membrana nylon 42mm de 45 um, Acrodisk GHP 45um de 25 mm, Cromatofolios de silicagel G f254.

Metanol HPLC, éter etílico, hidróxido de potasio, agua ultra pura para HPLC, etanol p.a., estándares de ácidos fenólicos: cafeico y ferúlico, estándares de flavonoides: hesperidina, rutina y morina.

Metodología

Preparación de la muestra

La extracción del aceite de las almendras de sacha inchi se llevó a cabo por el prensado en frío. Las presiones de extracción fueron de 300 700 PSIA por espacio de 5 minutos, a la presión y temperatura ambiente. Las extracciones se realizaron con muestras de 90 gramos. Las muestras fueron colocadas en cilindro extractor de acero inoxidable, sometiéndose lentamente hasta llegar a las presiones establecidas, manteniendo la palanca de activación a presión constante por espacio de 5 minutos, controlándose esto con un cronómetro. Terminado el proceso de extracción la torta residual obtenida luego del prensado fue secada a 45 °C durante 2 horas, luego se envasó y selló en bolsas plásticas grado alimenticio (ziploc[®]) y mantenidas en refrigeración.

Luego se procedió a realizar los estudios cromatográficos de identificación y cuantificación de compuestos fenólicos, y fitoesteroles por HPLC en el laboratorio de Bioquímica y Nutrición del Instituto de Investigación de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres.

Determinación de compuestos fenólicos

Ensayos preliminares

Para la cuantificación de los compuestos fenólicos se realizaron pruebas preliminares con estándares de ácidos fenólicos como clorogénico, cafeico y ferúlico, lográndose identificar y

cuantificar dos de ellos: cafeico y ferúlico. Asimismo, se identificaron y cuantificaron hesperidina, rutina y morina.

Las pruebas preliminares de cromatografía fueron desarrolladas en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla en un HPLC Agilent Technologies (Waldbronn, Germany), modelo 1100; el sistema consistió de un desgasificador de vacío, bomba cuaternaria, automuestreador, termostato para columna y detector de arreglo de diodo (DAD). El análisis fue corrido en una columna SB C18 (250 x 4,6 mm, 3,5 μm , Agilent Technologies). La fase móvil fue: solvente A (agua ultrapura ajustada con ácido acético a pH 2,65) y solvente B (20 % A y 80 % MeCN). La velocidad de la inyección fue a 1,5 mLmin⁻¹ y la temperatura de la columna a 40 °C. El tiempo total del análisis fue 45 min y el tiempo post-corrída fue 15 min. El volumen de inyección de la muestra fue 50 μL . Se logró identificar ácido siríngico y cinámico.

Cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC

Las condiciones del análisis por HPLC fueron previamente descritas por Muñoz *et al.* (2007)⁴. Se elaboraron estándares de ácidos fenólicos donde se pesaron individualmente los ácidos fenólicos: cafeico y ferúlico y se preparó otro estándar con flavonoides: rutina, hesperidina y morina de los que se pesó 10 mg de cada uno y se diluyó con agua en fiola de 100 ml; luego se tomaron 2 ml y se llevó a una fiola de 100 ml con una mezcla hidroetanólica en el caso de los ácidos fenólicos. De los flavonoides se pesaron 10 mg en fiolas de 50 ml y de ahí se tomó 2 ml para diluirlo en 25 ml con una mezcla hidroetanólica (60:40); seguidamente fueron identificados por su tiempo de retención y calculados en función a sus respectivas áreas de los picos registrados a 370 nm.

La separación cromatográfica fue desarrollada a temperatura ambiente con una columna LiChroCART[®] 250-4 LiChrospher[®] 60 RP-18 (5 μm) (Merck KGaA, Alemania). La separación fue corrida a un flujo de 1000 $\mu\text{L min}^{-1}$ y la fase móvil consistió en una mezcla de gradiente del eluyente A (agua – ácido o-fosfórico, pH 2,5) y eluyente B (acetonitrilo). El programa de gradiente utilizado fue el siguiente: 0 min, 100 % de A; 2 min, 80 % de A y 20 % de B; 15 min, 70 % de A y 30 % de B; 16 min, 40 % de A y 60 % de B; 22 min, 60 % de A y 40 % de B; 26 min, 100 % de A; 28 min, 100 % de A. las concentraciones de los ácidos fenólicos y flavonoles se expresaron en mg/kg de peso. Para el tratamiento de la torta de sachá inchi se trabajó con el extracto acuoso a una concentración de 8%, la misma que fue sonicada 20 minutos y agitada por media hora antes de llevar a volumen.

Identificación de fitoesteros por TLC

Se realizó mediante el método descrito por Fierro *et al.*, (2004)⁵. Las muestras de torta y aceite de sachá inchi fueron pesadas en tubos diferentes y se les agregaron metanol a una concentración de 10mg/ml. Los tubos fueron agitados en vortex por 30 minutos y 20 minutos sonicados; luego se guardó 24 horas. Después se procedió a sembrar en las placas cromatográficas con micropipeta 10 μl . Se utilizaron dos sistemas cromatográficos como fase móvil. La primera fase móvil fue (CHCl₃:CH₃OH:H₂O 10:1:0,05) y fue corrida hasta la mitad de la placa cromatográfica. Luego la placa fue secada y corrida completamente en el segundo sistema de solvente (CHCl₃).

Cuantificación de fitoesteros

Se realizó el procesamiento de las muestras según el método descrito por el reglamento CCE 2568-91⁶ donde se pesó en un balón 5 gramos de aceite de sachá inchi y se trataron de forma similar al estándar constituido por aproximadamente 10 mg de β -sitosterol y 50 mg de estigmasterol, los que fueron saponificados en baño maría y se les extrajo con éter etílico usando peras de decantación tres veces, llevando a volumen en una fiola de 100 ml; luego se concentró sólo 25 ml con nitrógeno y se reconstituyó con metanol HPLC para ser analizados bajo las condiciones cromatográficas similares a las descritas por Fierro *et al.*⁵, donde se

trabajó en un HPLC Lachrom Merck -Hitachi 7100 con detector uv.vis a una longitud de 215 nm con una columna RP 18 250x4 de 5 um con fase móvil ACN:METOH (65:35) con flujo de 1,2 ml por 30 minutos. El tiempo de retención fue de 19,4 minutos para el estigmasterol y de 22,23 minutos el β -sitosterol.



Figura 1. Proceso de saponificación de la muestra de aceite de sachá inchi para la determinación de fitoesteroles.

Actividad antioxidante

Ensayo DPPH

Se utilizó el radical estable DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995; Gómez-Alonso *et al.*, 2003)⁷. Se tomó 300 μ L de cada fase y se añadió 2700 μ L de DPPH de 100 μ M, se vorteoó durante 1 minuto, luego se centrifugó durante 5 minutos a 3500 rpm; a los 10 minutos se tomaron las lecturas a 515 nm. Los resultados se expresaron en función a Trolox equivalente; el rango de las concentraciones fue de (1, 5, 10 y 15 μ mol/L).

Ensayo ABTS

Las mediciones del potencial antioxidante total radical-trapping (TRAP), fue desarrollado mediante el ensayo ABAP/ABTS (van Overveld *et al.*, 2000)⁸. Se tomaron 150 μ L de cada fase y se añadió 2850 μ L de ABTS/ABAP; se vorteoó durante 1 minuto, luego se centrifugó durante 5 minutos a 3500 rpm; a los 10 minutos se tomaron las lecturas a 734 nm. Los resultados se expresaron en función a Trolox equivalente; el rango de las concentraciones fue de (1, 4, 7 y 10 μ mol/L).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de compuestos fenólicos por HPLC

Los resultados obtenidos sobre el contenido de compuestos fenólicos en torta de sachá inchi están expresados en la tabla 1. El contenido de compuestos fenólicos muestra cantidades inferiores a la que presenta el aceite de oliva². Los frutos secos como el maní y las semillas oleaginosas son buena fuente de de ácidos fenólicos como el cafeico⁹. Estudios realizados por Oliveras² manifiesta que hasta el momento se han detectado los siguientes compuestos polifenólicos en aceite oliva extra virgen: hidroxitirosol, tirosol, cafeico, vanillina, p-cumárico, luteolina, quercetina y apigenina. Asimismo, Oliveras expresa que estos

componentes son los que se encuentran con más frecuencia en el aceite de oliva virgen, tal y como lo reflejan numerosos estudios (Pirisi, 1997; Mateos, 2001; Montedoro, 1993; Brenes, 1999)¹⁰⁻¹³.

Determinación de fitoesteroles

Identificación de fitoesteroles por TLC

Podemos apreciar la presencia de fitoesteroles β -sitosterol y stigmasterol siendo los RF muy cercanos de ambos estándares. En la muestra de aceite se observó mayor concentración de β -sitosterol que en la muestra de torta de sachá inchi.

Cuantificación de fitoesteroles

La tabla 2 nos muestra el contenido de estigmasterol y β -sitosterol en el aceite de sachá inchi expresados en mg/100 g. Se observa en el cromatograma de la figura 2 la corrida de los estándares estigmasterol y β -sitosterol, y en la figura 3 la corrida correspondiente al aceite de sachá inchi.

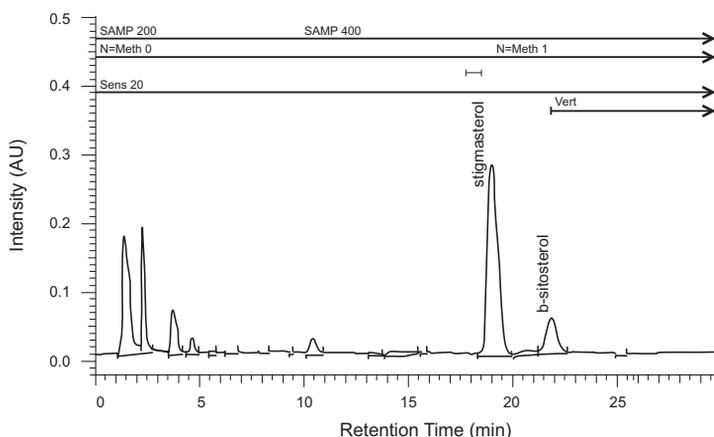


Figura 2. Cromatograma de los estándares estigmasterol y β -sitosterol

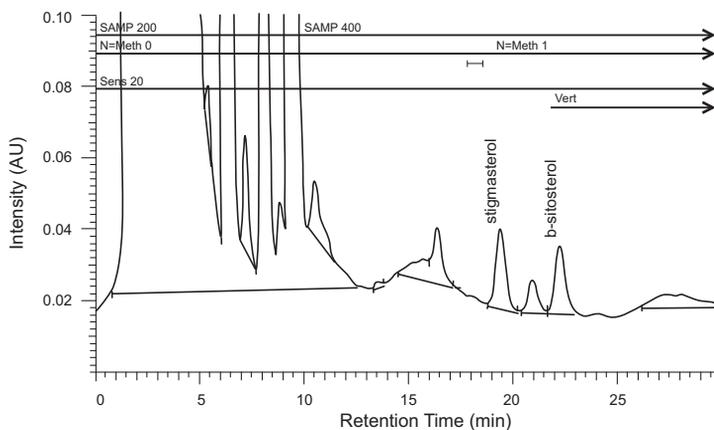


Figura 3. Cromatograma de la muestra de aceite de sachá inchi.

Tabla 1. Contenido de compuestos fenólicos en torta de sachá inchi expresados en mg/kg.

Compuestos fenólicos	Expresado en mg/kg			
	muestra 1	muestra 2	Promedio	SD
cafeico	3,572	3,457	3,51	0,08
ferulico	1,621	1,746	1,68	0,09
rutina	42,547	43,317	42,93	0,54
hesperidina	28,522	28,395	28,46	0,09
morina	52,441	54,033	53,24	1,13

Tabla 2. Contenido de estigmasterol y β -sitosterol en aceite de sachá inchi.

Fitoesteroles	Expresado en mg/100g			
	muestra 1	muestra 2	Promedio	SD
stigmasterol	75,947	75,04	75,49	0,64
β -sitosterol	74,764	74,468	74,62	0,21

En cuanto a fitoesteroles el sachá inchi presenta mayor contenido de β -sitosterol que otros alimentos como los frejoles 17,1 mg/100g y arvejas 49,5 mg/100 g estudiados por Fierro⁵ y que otros aceites en el mercado según lo que reporta Aparicio¹⁴.

Los límites que establece el reglamento (CEE) N° 2568/91, modificados en el reglamento (CE) N° 282/98⁶ para aceite de oliva virgen, los niveles de esteroides totales se establece 1000mg/kg, los que pueden presentar los distintos tipos de esteroides: colesterol 0,5 %, brasicasterol 0,1 %, campesterol: 4,0 %, estigmasterol = campesterol, β -sitosterol 93 %, δ -7-estigmastenol: 0,5 %.

La presencia de fitoesteroides dentro de la fracción insaponificable y su cantidad, está considerado como uno de los en la calidad del aceite de oliva. Por otro lado, altos niveles de estigmasterol se correlacionan con alta acidez y baja calidad sensorial del aceite (Gutiérrez *et al.*, 1999; Soledad *et al.*, 2001)¹⁵⁻¹⁶.

Actividad antioxidante

Ensayo DPPH

El ensayo de la actividad antioxidante por decoloración de radical estable DPPH, los resultados se muestran en la tabla 3, tanto del aceite como de la torta en ambas fases.

Tabla 3. Actividad antioxidante del aceite y torta de sachá inchi.

Condición extracto	Fase	Muestra	Actividad antioxidante (μ mol TE/kg)	CV (%)
Hidrofílico	MeOH:agua (60:40)	Torta	2,42	1,7
Lipofílico	Hexano	Aceite	15,97	0,11
Hidrofílico	MeOH:agua (60:40)	Aceite	1,94	1,17
Lipofílico	Hexano	Torta	10,56	0,16

El extracto lipofílico del aceite muestra mayor actividad antioxidante.

Ensayo ABTS

Tabla 4: Resultados del ensayo ABTS y DPPH expresados en trolox equivalente/kg

EXTRACTO	DPPH	ABTS	Total Inhibición
Aceite lipofílico	15,97	0,660	16,625
Aceite hidrofílico	1,94	9,88	11,826
Torta lipofílico	10,56	6,45	17,013
Torta hidrofílico	2,40	8,14	10,538

La mayor parte de los métodos de medida de la actividad antioxidante miden solamente compuestos solubles en agua debido a las naturalezas hidrofílicas de las especies reactivas y de los sustratos oxidables que emplean. Algunos ensayos pueden adaptarse para medir antioxidantes lipofílicos como el ABTS; por ese motivo es aconsejable emplear varios métodos, ya que cada uno ofrece información diferente. Hay compuestos antioxidantes que no reaccionan con determinadas especies oxidantes y sí con otras. **En la matriz de la semilla sacha inchi encontramos componentes antioxidantes como los compuestos fenólicos, tocoferoles y vitaminas antioxidantes que van a influir en los resultados.** La actividad antioxidante en sacha inchi según el método de DPPH muestra mayor actividad en el extracto lipofílico del aceite, mientras ABTS muestra mayor actividad antioxidante en el extracto hidrofílico del aceite (tabla 4); sin embargo, cuando adicionamos ambos métodos el extracto lipofílico del aceite muestra mayor actividad antioxidante; esto se explica porque ambos métodos abarcan también otros componentes antioxidantes que son capaces de reaccionar con cada reactivo diferente en cada método; por lo tanto no necesariamente van a coincidir los métodos aplicados. El método ABTS se adapta más para medir extractos lipofílicos que el DPPH, siendo en ambos especies radicales no biológicas.

CONCLUSIONES

- La torta de sacha inchi contiene compuestos fenólicos en promedio: 3,51 mg/kg de cafeico, 1,68 mg/kg de ferúlico, 42,93 mg/kg de rutina, 53,24 mg/kg de morina y 28,46 mg/kg de hesperidina.
- Se detectó en la torta de sacha inchi la presencia de ácido cinámico y siríngico.
- El aceite de sacha inchi contiene en promedio 75,49 mg/100g de estigmasterol y 74,62 mg/100g de β -sitosterol.
- El extracto lipofílico del aceite mostró mayor actividad antioxidante con el método DPPH, mientras el extracto hidrofílico del aceite mostró mayor actividad con el método ABTS.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo recibido por CONCYTEC, a su Presidente Dr. Augusto Mellado Méndez; a la USMP y al Decano de la Facultad de Medicina Humana Dr. Frank Lizaraso Caparó por haber hecho posible la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

1. D. Cachique. "Estudio de la Biología Floral y Reproductiva en el Cultivo de Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) INIEA-UNSM", tesis para optar el título de Ing. Agrónomo, Universidad Nacional de San Martín-Perú, 70, 2006.
2. M. Oliveras, "Calidad del aceite de Oliva virgen extra antioxidantes y función biológica", tesis para optar el grado de Doctor en Farmacia, Universidad de Granada- España, 104, 2005.
3. A. Brack, "Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Cusco-Perú, 1999, 550.
4. A. Muñoz, A. Fernández, F. Ramos, C. Alvarado-Ortiz. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 2007; 73(1):30-40.
5. A. Fierro, Y. Vásquez, M. Reyes-Parada, S. Sepúlveda-Boza. *Clinica y Ciencia*, 2004; 2(2):43-48.
6. Reglamento Comunidad Económica Europea (CEE) No 2568/91 de la comisión de 11 de julio de 1991.
7. W. Brand-Williams, M. Cuvelier, C. Berset. *Food Science and Technology*, 1995; 28(1): 25 – 30.
8. V. Overveld, G. Haenen, J. Rhemrev, J. Vermeiden, A. Bast. *Chemico-Biological Interactions*, 2000; 127(2): 151 – 161.
9. J. Sabaté, "Nutrición vegetariana". Editorial Safeliz científica, Madrid-España, 2005, 356-57.
10. F. Pirisi y col. *J. Chromatogr A.*, 1997; 768:207-213.
11. R. Mateos y col. *J. Agric. Food. Chem.* 2001; 49(5):2185-2192.
12. G. Montedoro y col. *J. Agric. Food. Chem.* 1993; 41:2228-2234
13. M. Brenes, A. García, P. García, J. Ríos, A. Garrido. *J. Agric. Food. Chem.* 1999; 47:3535-3540.
14. R. Aparicio, L. Roda, M.A. Albi, F.J. Gutierrez. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999; 47(10); 4150 – 4155.
15. F. Gutiérrez, B. Jiménez, A. Ruiz, and M. Albi. "Effect of Olive Ripeness on the Oxidative Stability of Virgin Olive Oil Extracted from the Varieties Picual and Hojiblanca and on the Different Components Involved". *J. Agric. Food Chem.*, 1999; 47, 121-127.
16. M^a. Soledad. *Grasas y Aceites*, 2001; 52(1): 52 – 58.

ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPÍA UV Y FTIR DE MACERADOS ACUOSOS Y ALCOHÓLICOS DE *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller. INTERACCIÓN CON SALES INORGÁNICAS

Félix Saavedra Nizama^{1*}, Neptalí Ale Borja^{2*}, Gloria Gordillo Rocha³, Alfonso Apestequí Infante³, Bertha Jurado Teixeira³, y Andrés Revilla Casalino³

RESUMEN

Los heterósidos antraquinónicos de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller (sábila) **son utilizados como purgantes y están incluidos en las principales farmacopeas, en las cuales también se incluyen** algunas sales inorgánicas -CuSO₄·5H₂O, Bi(NO₃)₃, AgNO₃- por sus beneficiosas propiedades terapéuticas. Se propone investigar si estas sales y FeCl₃ utilizado como reactivo para cuantificar antraquinonas naturales interaccionan con los macerados acuosos y alcohólicos de hojas de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller (sábila) cuando se guardan herméticamente cerrados en frascos ámbar y bajo refrigeración durante *doce meses*. Se utilizó la espectroscopía FTIR para determinar la presencia de antraquinonas naturales en diez sólidos residuales de las sales mencionadas, obtenidos por filtración, luego de interacción durante siete días con los macerados mencionados; los líquidos filtrados se guardaron nuevamente bajo refrigeración (siete preparados con pequeñas cantidades de sal disuelta), y se analizaron por UV y FTIR después de doce meses.

Para comparar resultados, también se obtuvieron los espectros UV y FTIR de los macerados acuosos y alcohólicos de ambos aloes -sin adición de sales inorgánicas y guardados bajo refrigeración-, con lecturas a los 03, 06 días, 12 y 24 meses; asimismo, se obtuvieron espectros recientes -03 días- de infusiones de *Rheum palmatum* (ruibarbo) y *Cassia senna* L (Sen).

Los espectros UV presentan máximos de absorción **característicos para los derivados antraquinónicos**, la mayoría con desplazamiento hipsocrómico. Todos los espectros FTIR presentan con claridad el máximo que corresponde al grupo funcional carbonilo (C=O), dentro del rango esperado; entre 1590,56 cm⁻¹ y 1644,23 cm⁻¹ para las muestras sólidas; 1593,76 cm⁻¹ y 1641,19 cm⁻¹ para los preparados acuosos (incluyendo sen y ruibarbo), y 1601,28 cm⁻¹ y 1,709,74 cm⁻¹ para los preparados alcohólicos.

Los residuos sólidos de las sales de hierro provenientes de los macerados acuosos y alcohólicos y el residuo de la sal de cobre del preparado acuoso, son los más significativos por su cristalización, y la transmitancia de los correspondientes espectros FTIR indican, de manera relativa, incremento de derivados antracénicos libres respecto al lavado que le dio origen. El desplazamiento del máximo FTIR del residuo sólido de la sal de cobre hacia zona de menor longitud de onda indica la formación de quelato de cobre.

Palabras clave: antraquinonas en *Aloe vera* L, *Aloe barbadensis* Miller, espectroscopía FTIR, interacción en sales inorgánicas.

^{1*} Laboratorio Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Fesn2709@gmail.com

^{2*} Laboratorio Química Analítica e Instrumentación. Facultad de Química e Ing. Química. nalebunmsm@yahoo.es

³ Laboratorio de Bioquímica. Facultad de Farmacia y Bioquímica.

UV AND FTIR SPECTROSCOPIC ANALYSES OF AQUEOUS AND SPIRITS WASHINGS OF *Aloe vera* L. AND *Aloe barbadensis* Miller, INTERACTION WITH INORGANIC SALTS

ABSTRACT

Natural anthraquinones – anthraquinone heteroside - *Aloe vera* L. and *Aloe barbadensis* Miller (aloe) is used as a purgative and is included in the main pharmacopoeias; on the other hand, some inorganic salts - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, AgNO_3 - also included in the pharmacopoeias for its beneficial therapeutic properties. In this sense, there is the initiative to find out if these salts and FeCl_3 used as reagents to quantify natural anthraquinones when mixed with aqueous and alcoholic washings of leaves of *Aloe vera* L. and *Aloe barbadensis* Miller (Aloe), interact with each other, when stored in airtight amber bottles and refrigerated for *twelve months*. FTIR spectroscopy was used to determine the presence of natural anthraquinones in ten solid waste - the salts specified - obtained by filtration after seven days of interaction with the washing mentioned, the filtrates were stored under refrigeration again (seven preparations with small amounts of dissolved salts), and analyzed by UV and FTIR after twelve months.

To compare results, it was also obtained UV and FTIR spectra of aqueous and alcoholic washings of both aloes - without addition of inorganic salts and stored under refrigeration - with readings of 03, 06 days; 12 and 24 months; also were recent spectra obtained - 03 days - infusions of *Rheum palmatum* (rhubarb) and *Cassia senna* L (Sen). All UV spectra show characteristic absorption peaks for anthraquinone derivatives, most hipsocromic displacement; however, the FTIR spectra of all samples - solid and liquid - clearly show the maximum that corresponds to the functional group carbonyl ($\text{C}=\text{O}$) within the expected range.

Solid waste from the iron salts from aqueous and alcoholic preparations and the residue of the copper salt of aqueous preparation are the most significant for its crystallization. The transmittance of the corresponding FTIR spectra relatively indicate, increased of free anthracene derivatives – according to the washing which it was originated - and for copper by displacement of the maximum towards to shorter wavelength, perhaps to form copper chelates.

Key words: anthraquinones in *Aloe vera* L. *Aloe barbadensis* Miller, FTIR spectroscopy, interaction inorganic salts.

INTRODUCCIÓN

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) se utiliza para identificar el componente más importante en mezclas de sustancias, como la caracterización nutricional de alimentos para animales¹, la identificación de hidroxitolueno butirato en aceite de palma², la caracterización estructural de grasas y aceites comestibles³, la identificación de colorantes antraquinónicos en pinturas de restos arqueológicos⁴ y para el análisis cualitativo y cuantitativo de ácido rosmarínico compuesto polifenólico, en cultivos de suspensión celular de *Lavandula officinalis*⁵.

Asimismo, para el análisis IR no se recomiendan los solventes agua y etanol, el primero por tener absorción en casi todo el espectro IR y el segundo porque presenta absorción en diversas regiones del espectro, por ejemplo, entre $1000\text{-}1500\text{cm}^{-1}$ y $2800\text{-}3500\text{cm}^{-1}$; las menos acentuadas se presentan entre $1600\text{-}2200\text{cm}^{-1}$. El grupo alcohólico OH libre (no asociado)

absorbe (estiramiento O-H) como una banda aguda cerca de 3610cm^{-1} ; en las asociaciones poliméricas el grupo hidroxilo absorbe bajo forma de una banda redondeada e intensa⁶ cerca de 3300cm^{-1} .

El estudio de la cristalización del antiulceroso cimetidina en mezcla agua-etanol, a porcentajes de agua menores al 20 %, se obtiene fundamentalmente el polimorfo A, el cual cumple con los requerimientos de la Farmacopea Americana. El procedimiento por espectroscopía infrarroja tiene en cuenta que la cimetidina A presenta cuatro picos característicos en las bandas 1400 , 1385 , 1205 y 1155cm^{-1} y el polimorfo B presenta una banda característica a 1180cm^{-1} , lo cual permite la evaluación cuantitativa del contenido del polimorfo B empleando las mezclas etanol-agua⁷.

En la cuantificación del agua directamente unida a una matriz polimérica, se determina la frecuencia para dos tipos de agua - $1655,8$ y $1640,3\text{cm}^{-1}$, estableciendo que el agua con frecuencia más baja corresponde al agua en contacto directo con el sólido metilcelulosa⁸.

A nivel biológico, en personas con desórdenes en el metabolismo de carbohidratos (diabetes) se determina la concentración de glucosa humana evaluando la correlación entre la transmisión de una señal infrarrojo a diferentes concentraciones de glucosa en un rango clínicamente aceptable. Para ello se evaluó la zona espectral teniendo en cuenta los picos de absorción de glucosa y las potenciales interferencias como el agua, proteínas, lípidos etc.⁹.

Por otro lado, en sen, ruibarbo, cáscara sagrada, frángula, sábila se hallan antraquinonas naturales libres en mínima cantidad y en forma de glicósidos en mayor porcentaje, los cuales por su efecto farmacológico son utilizados como purgantes. Asimismo, el ácido carmínico –obtenido principalmente de la cochinilla- es un derivado antraquinónico cuyos quelatos metálicos tienen aplicaciones como colorantes y preservantes en las industrias de textiles, alimentos, medicinas y cosméticos¹⁰. También los derivados antracénicos naturales han demostrado tener propiedades antivirales, fungicidas y antimicrobianas^{11,12}.

Las hojas de *Picramnia macrostachys* (Ami) –especie nativa del Perú, Brasil y de las Guyanas– son utilizadas por sus efectos cicatrizantes, antimicrobiano, catártico y como colorante textil; por espectroscopía IR –previa separación cromatográfica- se identificó crisofanol (1,8-dihidroxi-3-metil-antraquinona); tanto la muestra patrón como la muestra analizada presentan una banda significativa a 1620cm^{-1} , la cual corresponde al grupo carbonilo; otras bandas se presentan entre 1265 - 752cm^{-1} . La antraquinona parietina (1,8-dihidroxi-3-metil-6-metoxiantraquinona), obtenida en menor proporción y su muestra patrón presentan la banda del grupo $\text{C}=\text{O}$ ¹³ a 1640cm^{-1} . También se identificaron por espectroscopía IR derivados antraquinónicos (1674cm^{-1} , 1633cm^{-1} , 1608cm^{-1} , 1594cm^{-1}) obtenidos de suspensión celular de *Rubia cordifolia*¹⁴ y de la corteza del árbol maderero *Melanoxylon brauna* –previa separación cromatográfica – con máximos para el grupo carbonilo¹⁵ a 1664cm^{-1} y 1642cm^{-1} .

Las antracilinas doxorrubicina, daunorrubicina, epirubicina e idarrubicina son antibióticos naturales -con núcleo antraquinónico- utilizados como quimioterápicos antineoplásicos¹⁶; por esta razón, el interés por la síntesis de nuevas antraquinonas es permanente. Cuatro derivados antracénicos presentan bandas a 1650 - 1670cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), 1030 - 1050 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$), 1580 - 1590cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), 1030 - 1050 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$), 1580 - 1590cm^{-1} ($\text{C}-\text{N}^+\text{HET}_2$), 2935 - 2940cm^{-1} y 2970 - 2980cm^{-1} (stretching C-H de grupos metil y metileno)¹⁷. En la síntesis de antraquinonas, a partir de fenolatos, las bandas para el grupo carbonilo se ubican en la región 1668 - 1672 - 1676cm^{-1} ¹⁸.

Previo separación cromatográfica se caracterizaron las antraquinonas fenólicas de *Aloe vera* L., (*Aloe barbadensis* Miller), y se determinó que la mayor cantidad de antraquinonas

están en la savia que las contenidas en la cutícula y en el gel. La savia presenta bandas de absorción a 1600 cm^{-1} (C=O) y $3369,4\text{ cm}^{-1}$ (OH fenólico), las antraquinonas de la cutícula a $1623,9\text{ cm}^{-1}$ y $3398,3\text{ cm}^{-1}$, las del gel a $1629,7\text{ cm}^{-1}$ y $3408,0\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. Las fracciones cromatografiadas de la savia de aloe, disueltas en cinco mezclas de solventes, presentan la banda para el grupo carbonilo entre $1595,0\text{ cm}^{-1}$ (metanol) y $1633,6\text{ cm}^{-1}$ (acetato de etilo). La banda correspondiente al grupo O-H fenólico presenta máximos de absorción entre $3388,7\text{ cm}^{-1}$ (metanol) y $3417,6\text{ cm}^{-1}$ (acetato de etilo-acetona 4:1). El análisis UV para el grupo carbonilo en la cutícula, gel y savia presenta un primer pico a 217-220 nm, otro a 265-268 nm y uno tercero a 360-370 nm, característicos de las antraquinonas fenólicas¹⁹.

Las antraquinonas de *Aloe vera* y *Aloe barbadensis* (zona Falcón-Venezuela) tienen aplicación como inhibidores de la corrosión; por cromatografía en columnas se determina que 71,03% de la resina contiene los compuestos más polares; de esta fase por cromatografía se logró aislar un solo componente caracterizado como 1,8-dihidroxi-antraquinona, $1624,37\text{ cm}^{-1}$ (característica para cetonas con posibles equilibrios cetoenólicos); el 11,2% de la resina corresponde a los derivados medianamente polares y 14,94% a los de menor polaridad. El análisis IR realizado para los tres grupos de fracciones revela resultados similares. Las bandas características para el grupo carbonilo aparecen en la región de $1870\text{--}1540\text{ cm}^{-1}$, las cuales podrían corresponder a carbonilo de cetonas. La diferencia de polaridad entre los tres grupos de fracciones podría ser explicada en función del tipo de grupo presente, del número de grupos presentes y de la distribución espacial de estos en los compuestos²⁰.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales.- Hojas de sábila *Aloe vera* Linneo. y *Aloe barbadensis* Miller, polvo de hojas secas de sen, raíz de ruibarbo. Sales inorgánicas $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, FeCl_3 y AgNO_3 , etanol 96°, agua destilada, materiales de vidrio

Equipos.- Para los espectros UV-visible, espectrofotómetro Cary del laboratorio de Bioquímica, E.A.P. Farmacia y Bioquímica. Para los espectros FT-IR, equipo Elmer Perkinson de la Unidad de Servicios de Análisis Químico, ambos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Preparación de los macerados acuosos y alcohólicos

- A.- 450 g de trozos de hojas de *Aloe vera* Linneo –*Aloe barbadensis* Miller- se dejan reposar en 600 mL de agua destilada –etanol 96°- por dos horas, luego son separados los pedazos de hojas y se filtran los cuatro macerados obtenidos para eliminar remanentes insolubles. Para comparación se guardan 100 mL de los filtrados -acuoso y alcohólico para cada planta- en frascos herméticamente cerrados. Cuatro preparados sin sales inorgánicas.
- B.- Con el macerado acuoso de las hojas de *Aloe vera* L. se preparan cuatro soluciones, 2% p/p con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 % con AgNO_3 , 2% $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, 1 % con FeCl_3 ; de manera semejante se procede con el macerado alcohólico de esta planta. Ocho preparados en total.
- C.- Con el macerado acuoso y el macerado alcohólico de las hojas de *Aloe barbadensis* Miller se procede de igual manera, añadiendo la misma cantidad de sal inorgánica indicada en B. Ocho preparados análogos.
- D.- Los veinte preparados se guardan en recipientes color ámbar con doble tapa por siete días, luego se filtran y los residuos sólidos (de las sales inorgánicas) son desecados en estufa a 30°C -posteriormente se analizan por espectroscopía FT-IR-; los filtrados se guardaron en frascos similares herméticamente cerrados y se conservaron doce meses bajo refrigeración.

Preparación de las infusiones

- A.- Se pesa 2 g de rizomas de ruibarbo en polvo y se vierte en 200 mL de agua hirviendo 200 mL de alcohol hirviendo- agitando constantemente con bagueta de vidrio, luego se retira del fuego.
- B.- Por otro lado, se pesa 2 g de hojas de sen en polvo y se vierte en 200 mL de agua hirviendo 200 mL de alcohol hirviendo agitando constantemente, luego se retira del fuego.
- C.- Los cuatro preparados –dos de sen y dos de ruibarbo- se filtran y guardan tres días en recipientes color ámbar con doble tapa, herméticamente cerrados y bajo refrigeración, luego son analizados por espectroscopía UV e IR. Sin embargo algunos de los preparados proporcionaron datos inadecuados por lo cual no se reportan en las tablas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de acidez de los preparados antraquinónicos de *Aloe vera* L.

Para tratar de comprender los procesos de oxidación y reducción que se producen en mezclas tan complejas como son los lavados acuosos y alcohólicos de sábila (*Aloe vera* L.) en presencia de sales inorgánicas disueltas durante periodo variable 07 días y 12 meses se procedió a la medición de pH y se comparó con los valores de pH de tres lavados acuosos de *Aloe vera* sin sales inorgánicas, guardados una semana bajo refrigeración y con el pH de las soluciones de sales utilizadas (tabla 1).

Tabla 1. Variación de acidez de los preparados antraquinónicos de *Aloe vera* L., guardados bajo refrigeración

Macerado	Macerado acuoso 07 días	CuSO ₄ 2%	Macerado + CuSO ₄ 12 meses	AgNO ₃ 1 %	Macerado+ AgNO ₃ 12 meses	FeCl ₃ 1 %	Macerado+ FeCl ₃ 12 meses
pH	6,11 -6,28	4,3	3,41 -3,54	3,5	2,90-3,0	2,4	1,88-1,98
Macerado (Etanol pH = 10)	Macerado alcohólico 07 días		Escasa solubilidad 12 meses		Macerado+ AgNO ₃ 12 meses		Macerado+ FeCl ₃ 12 meses
pH	4,97-5,06		3,88-3,93		3,31-3,34		2,14-2,16

En todos los casos la adición de sales inorgánicas favorece la acidificación -y coloración marrón rojiza de los macerados-; de las muestras sin sales, es posible que los procesos de hidrólisis de los electrolitos fuertes Cu²⁺, Ag⁺ y Fe³⁺ favorezcan la formación de policones²¹, entre otros procesos químicos; parcialmente se formen complejos entre los metales y los grupos funcionales C=O de los heterósidos antraquinónicos de la sábila (aloe emodina, barbaloinas A y B, aloinósidos A/B, crisofanol), y los aniones SO₄⁻, NO₃⁻, Cl⁻ se combinen con los hidrogeniones libres, restableciendo la acidez del medio. Además, la presencia de azúcares reductores y enzimas hidrosolubles provenientes del gel de sábila (dentro de recipientes cerrados y bajo condiciones adversas de aireación, temperatura e iluminación), favorecen la ruptura del enlace C-glicosídico y posterior oxidación de la antrona- antranol para originar antraquinonas libres¹⁰.

Identificación de antraquinonas y derivados antracénicos de *Aloe vera* L., *Aloe barbadensis* Miller, *Rheum palmatum* (ruibarbo) y *Cassia* sp. (sen).

En tubo de ensayo verter 2-3 mL de macerado acuoso o alcohólico de *Aloe vera* L., *Aloe barbadensis* Miller, guardados bajo refrigeración –o recientemente preparados–, añadir 5-6 gotas de NaOH 2N; la coloración amarillenta se torna rojo vinosa o violácea según la menor o mayor cantidad de derivados antraquinónicos presentes. El mismo procedimiento se utilizó con las infusiones acuosas y alcohólicas de sen y ruibarbo, obteniendo similares coloraciones. También se comprobó la presencia de antraquinonas con la reacción de Bornträger, solución de NH₄OH 25%, la cual permite identificarlas con formación de complejos de color ámbar o rojo vinoso²². Ambas reacciones permiten la detección directa de quinonas en los extractos vegetales.

Esta variación de color en medio ácido y en medio alcalino de algunos reactivos orgánicos con núcleo antraquinónico solubles en agua, permitió elaborar técnicas fotométricas para la determinación de los iones Al³⁺, Zr^{IV}, Th^{IV}; por ejemplo, alizarina roja S o alizarina azul BS²³. Un antecedente importante de quelación de antraquinonas con iones metálicos (1910) propuso alizarina y otros colorantes alizarínicos disueltos en alcohol, adicionarle solución de TiCl₃, llevar a ebullición y titular con Fe³⁺ hasta desaparición de la coloración azul verdosa de la solución²⁴.

Identificación UV del grupo funcional carbonilo (C=O) en derivados antracénicos de *Aloe vera* L. (sábila) y *Rheum palmatum* (ruibarbo).

Los macerados acuosos de hojas de sábila y las infusiones de ruibarbo constituyen en realidad una mezcla compleja, ya que los derivados antracénicos no fueron aislados por cromatografía u extracción en solventes de diferente polaridad; sin embargo, en la tabla 2 se observan máximos UV característicos para los derivados antraquinónicos^{25,26}, con desplazamiento batocrómico para infusión acuosa de sen y desplazamiento hipsocrómico para las infusiones de ruibarbo.

Tabla 2. Máximos UV para grupo (C=O) en lavados de *Aloe vera* e infusiones de ruibarbo

Preparado	Tiempo	Heterósido	λ habitual	λ batocrómico	λ hipsocrómico
Alizarina	Referencia		248-255 (bencenoide)		
Solución 0,1%	teórica		308-315		
Macerado acuoso de <i>Aloe vera</i>	03 días		245-270		210, 230,
Macerado acuoso de <i>Aloe vera</i>	12 meses		275		210-215; 234
Macerado acuoso de <i>Aloe vera</i>	02 años		296-298 312-314		
Infusión acuosa de ruibarbo	03 días		275-280		220, 230-235, 245-250
Infusión alcohólica de ruibarbo	03 días				210; 230-235 260
Inf. acuosa acidificada de ruibarbo	03 días		275,28		210-225; 255-260
Infusión acuosa de sen	03 días		240,26	345	

Espectros UV de macerados acuosos de *Aloe vera* L. Interacción con sales inorgánicas de Fe, Ag y Bi. Espectros de macerados acuosos de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller sin sales. Preparados guardados bajo refrigeración por doce meses.

En la figura 1 destaca el espectro 1 del derivado antracénico con FeCl_3 con máximo alrededor de 330 nm. (absorción bencenoide) y otros máximos a 263-272 nm correspondientes a la región quinoidea²⁷; este mayor contenido de compuestos 1,8-hidroxiantracénicos por mayor absorbancia respecto al mismo preparado sin FeCl_3 (espectro 2), se debería a procesos de hidrólisis en presencia de cloruro férrico (pH= 2,4), lo cual facilita la ruptura del enlace del carbono glicosídico y por tanto, la obtención de quinonas libres de quinonas unidas en forma de glicosidos²⁸. Los macerados acuosos de *Aloe vera* L con los iones Ag^+ y Bi^{3+} originan espectros (2 y 3), con máximo de absorción alrededor de 300 nm (el espectro del preparado acuoso con CuSO_4 es muy semejante), aunque de menor intensidad respecto al originado con FeCl_3 .

Al comparar los espectros 2 y 5 de los macerados acuosos de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller sin sales inorgánicas y, considerando que se prepararon bajo las mismas condiciones -incluyendo la dilución de los lavados iniciales a 1/5-, por mayor absorbancia, se deduce mayor cantidad de derivados antraquinónicos en *Aloe vera* L. que en *Aloe barbadensis* Miller.

Asimismo, en la figura 1 para todos los espectros es notorio un máximo alrededor de 195-210 nm correspondiente al grupo carbonilo, el cual se debe a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$; sin embargo, para interpretaciones cualitativas del espectro, solamente es de real utilidad la región sobre 200 nm⁶.

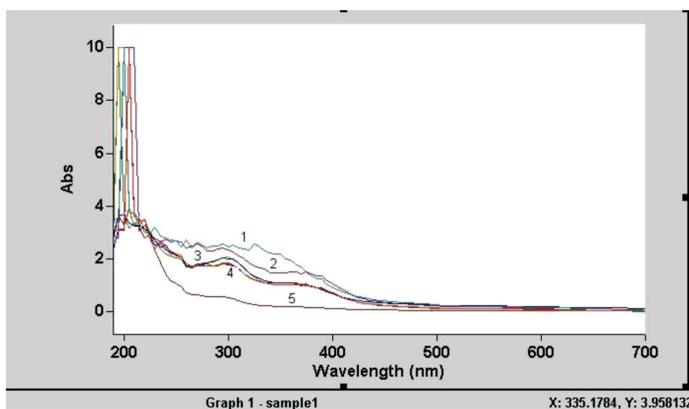


Figura 1. Espectros de macerados acuosos de *Aloe vera* L almacenados doce meses bajo refrigeración, con cloruro férrico (1), sin sal inorgánica (2), con nitrato de plata (3), con nitrato de bismuto (4) y, macerado acuoso de *Aloe barbadensis* Miller sin sal inorgánica (5).

Espectros UV de macerados alcohólicos de hojas de *Aloe vera* L. Interacción con sales inorgánicas de Br, Ag y Fe. Preparados guardados bajo refrigeración por doce meses. Espectro de *Aloe vera* L de macerado alcohólico guardado 02 años.

Los macerados iniciales se diluyeron a 1/5, destaca la intensidad de picos a 305-310 nm del preparado alcohólico de *Aloe vera* sin adición de sales -espectro 1-, esta mayor cantidad de derivados antracénicos libres, probablemente, se debe a la atracción del grupo polar carbonilo de las antraquinonas naturales con el grupo funcional OH del alcohol -puente hidrógeno-

produciéndose la hidroxilación de los derivados antracénicos²⁹. Los espectros 2, 3 y 4 respectivamente, (figura 1) de los tres preparados alcohólicos con sales de Bi, Ag y Fe, son semejantes entre sí, y presentan su mayor absorbancia alrededor de 300 nm. El preparado alcohólico con la sal de cobre –que no figura- presenta espectro UV semejante (figura 2).

El espectro correspondiente al preparado con la sal de bismuto –sin adición de ácido para solubilizarlo por su carácter básico-, presenta además, dos picos agudos, uno a 200 nm y otro cerca de 220 nm; el espectro del preparado con nitrato de plata presenta solamente un pico, alrededor de 230 nm y el espectro del preparado con cloruro férrico tiene un pico alrededor de 200 nm; por su ubicación, estos picos se atribuyen a los grupos funcionales quinónicos de los derivados antracénicos, es decir, el carácter básico del medio favorece la mayor absorbancia de los dos primeros espectros.

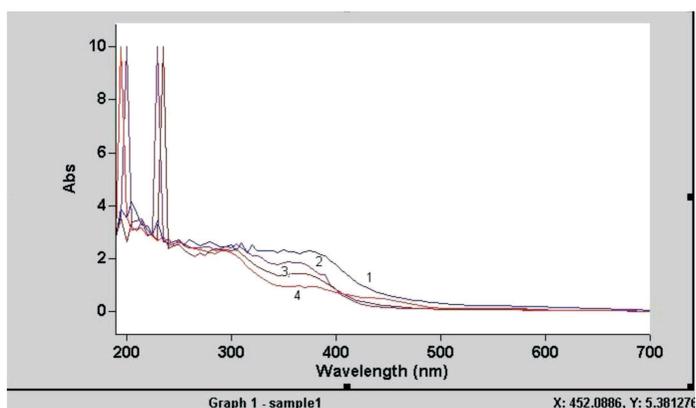


Figura 2. Espectros de macerados alcohólicos de *Aloe vera* L guardados bajo refrigeración por doce meses: sin sal inorgánica guardado 02 años (1). Con nitrato de bismuto (2), nitrato de plata (3) y cloruro férrico (4).

Análisis espectral infrarrojo de sólidos residuales de sales inorgánicas por interacción con macerados acuosos y alcohólicos de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller, durante doce meses.

Los residuos sólidos provenientes de AgNO_3 fueron de color marrón claro y negruzco; los residuos de la sal de cobre fueron de color celeste o verdoso, recordando el color inicial de la sal, pero los cristales fueron más grandes. La recrystalización más vistosa del CuSO_4 fue rojo vinosa oscuro brillante, quizás conteniendo compuestos de cobre (I). Los residuos de la sal de bismuto fueron marrón-blancuzco, anaranjado-amarillento y marrón, y los residuos del cloruro férrico fueron de color marrón negruzco, gris y castaño. Con ayuda de la espectrofotometría IR nos planteamos la tarea de investigar si en la superficie de estos sólidos se habrían formado quelatos metálicos por interacción entre los grupos funcionales $\text{C}=\text{O}$ de los derivados antracénicos presentes en los macerados acuosos y alcohólicos y los cationes metálicos de las sales usadas.

A manera de referencia, se muestra los residuos sólidos de cloruro férrico con lavado acuoso de *Aloe vera* L. (más de dos semanas), los cuales no se analizaron, y al parecer, son derivados inorgánicos de hierro (figura 3).



Figura 3. Cristales formados por interacción de cloruro férrico con lavado acuoso de hojas de *Aloe vera* L.

Tabla 3. Análisis espectral infrarrojo de sólidos residuales de sales de cloruro férrico, nitrato de plata, nitrato de bismuto y sulfato de cobre (II) por interacción con macerados alcohólicos y acuosos de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller.

Código	Especie	Sal	Macedo inicial	Estado Final	C=O cm^{-1}	%T
Referencia	Alizarina (indicador)			Polvo anaranjado oscuro	1588,28 1661,16 1634,21	20-27
055-01	<i>Aloe vera</i> L.	FeCl_3	Acuoso	Polvo gris	1622,17	58,0
055-02	<i>Aloe vera</i> L.	AgNO_3	Alcohólico	Sólido oscuro cierto brillo	1590,56	69,0
055-03	<i>Aloe vera</i> L.	FeCl_3	Alcohólico	Cristales oscuros	1615,30 (1557,36)	35
055-04	<i>Aloe vera</i> L. (03 años)	FeCl_3	Acuoso	Sólido marrón negruzco	1642,46	54
055-05	<i>Aloe vera</i> L.	FeCl_3	Alcohólico (parénquima)	Polvo cristalino castaño	1608,13 (1559,44)	38,5
055-06	<i>Aloe vera</i> L.	CuSO_4	Alcohólico	Pequeños cristales celestes	1627,48 (1582,93)	58,5
055-07	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	AgNO_3	Alcohólico	Polvo oscuro cierto brillo	1638,30	63,0
055-08	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$	Acuoso	Polvo gris oscuro	1644,23	66,0
055-09	<i>Aloe vera</i> L.	$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$	Alcohólico	Polvo gris	1629,22	52,5
055-10	<i>Aloe vera</i> L.	CuSO_4	Acuoso	Cristales rojo-oscuro	1598,29	29,0

Tabla 4. Análisis espectral infrarrojo de preparados acuosos y alcohólicos de *Aloe vera* L., *Aloe barbadensis* Miller e infusiones acuosas de *Rheum palmatum* (ruibarbo) y *Cassia sp.* (sen) interacción con sales inorgánicas durante tiempo variable.

Código	Especie	Sal	Preparado inicial	Estado final	C=O cm ⁻¹	% T
Estándar Nº 1	<i>Aloe vera</i> L.	—	Macerado alcohólico	Solución alcohólica (03 días)	1602,92	62,0
Estándar Nº 2	<i>Aloe vera</i> L	—	Macerado acuoso	Solución acuosa (06 días)	1606,27	82,5
Estándar Nº 3	<i>Aloe vera</i> L	—	Macerado acuoso	Solución acuosa (03 días)	1604,52	90,5
Ruibarbo Nº 4	Ruibarbo	—	Infusión acuosa	Solución acuosa (03 días)	1621,48	91,0
Old Nº 5	<i>Aloe vera</i> L	—	Macerado acuoso	Solución acuosa (02 años)	1645,58	65,0
Miller Nº 6	<i>Aloe barbadensis Miller</i>	—	Macerado alcohólico	Solución alcohólica (03 días)	1602,4	70,0
Sen Nº 7	Sen	—	Infusión acuosa	Solución acuosa (03 días)	1593,76	83,5
AVL Nº 8	<i>Aloe vera</i> L	FeCl ₃	Macerado acuoso	Solución acuosa (12 meses)	1609,03	40,0
AVL Bi Nº 9	<i>Aloe vera</i> L	Bi(NO ₃) ₃	Macerado acuoso	Solución acuosa (12 meses)	1603,16	86,0
Nº 10	<i>Aloe vera</i> L	AgNO ₃			No válido	
AVL Nº 11	<i>Aloe vera</i> L	CuSO ₄	Macerado acuoso	Solución acuosa (12 meses)	1641,19	74,0
AVL Nº 12	<i>Aloe vera</i> L	FeCl ₃	Macerado alcohólico	Solución alcohólica (12 meses)	1601,28	51,5
AVL Nº 13	<i>Aloe vera</i> L	CuSO ₄	Macerado alcohólico	Solución alcohólica (12 meses)	1641,18	45,0
Miller Nº 14	<i>Aloe barbadensis Miller</i>	FeCl ₃	Macerado alcohólico	Solución alcohólica (12 meses)	1601,52	42,0
Miller Nº 15	<i>Aloe barbadensis Miller</i>	CuSO ₄	Macerado alcohólico	Solución alcohólica (12 meses)	1709,74 (1671,92)	68,0

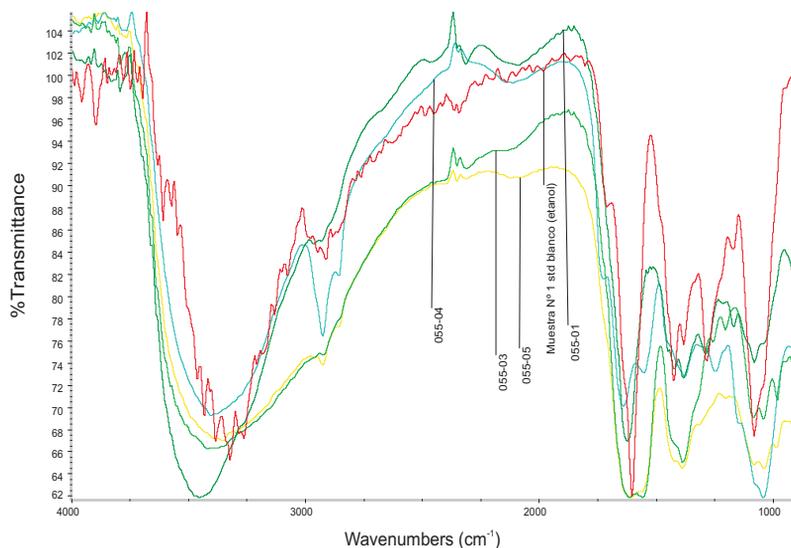


Figura 4. Análisis espectral infrarrojo de macerados acuosos y alcohólicos de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller por interacción con cloruro férrico.

Tabla 5. Análisis espectral infrarrojo de macerados acuosos y alcohólicos de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller por interacción con cloruro férrico

Código	Especie y tiempo del macerado	Tiempo con sal	Solución inicial	Estado final	C=O cm ⁻¹	%T
Muestra N°1	<i>Aloe vera</i> L. (02 días)	—	Alcohólica	Sol. alcohólica	1602,92	62,0
055-01	<i>Aloe vera</i> L.	FeCl ₃ 07 días	Acuosa	Polvo gris	1622,17	57,5
055-03	<i>Aloe vera</i> L.	FeCl ₃ 07 días	Alcohólica	Cristales oscuros volátiles	1615,30 (1557,36)	37,0
055-04	Aloe acuoso (antiguo, 02 años)	FeCl ₃ 07 días	Acuosa	Sólido negruzco	1642,46	56,0
055-05	<i>Aloe vera</i> L.	FeCl ₃ 07 días	Alcohólica	Polvo cristalino castaño	1608,13 (1559,24)	41,5

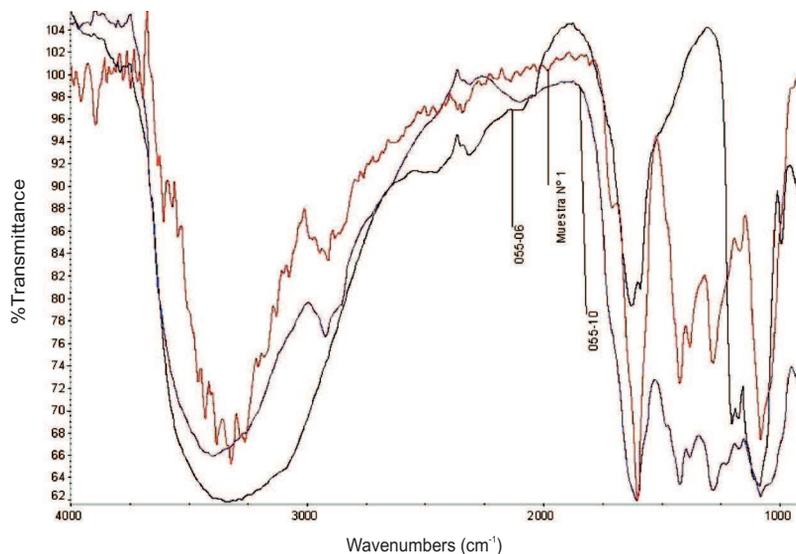


Figura 5. Espectros FTIR de sólidos residuales de sulfato de cobre por interacción con macerados acuoso y alcohólico de *Aloe vera* L.

Tabla 6. Análisis espectral FTIR de sólidos residuales de sulfato de cobre por interacción con macerados acuoso y alcohólico de *Aloe vera* L.

Código	Especie y tiempo del macerado	Tiempo con sal	Solución inicial	Estado final	C=O cm^{-1}	%T
Muestra Nº 1	<i>Aloe vera</i> Linneo (02 días)	-	Alcohólica	Solución alcohólica	1602,92	62,0
055-06	<i>Aloe vera</i> Linneo	CuSO ₄ 07 días	Alcohólica	Pequeños cristales brillantes celestes	1627,48 (1582,93)	57,5
055-10	<i>Aloe vera</i> Linneo	CuSO ₄ 07 días	Acuosa	Pequeños cristales oscuro rojizos	1598,29	30,5

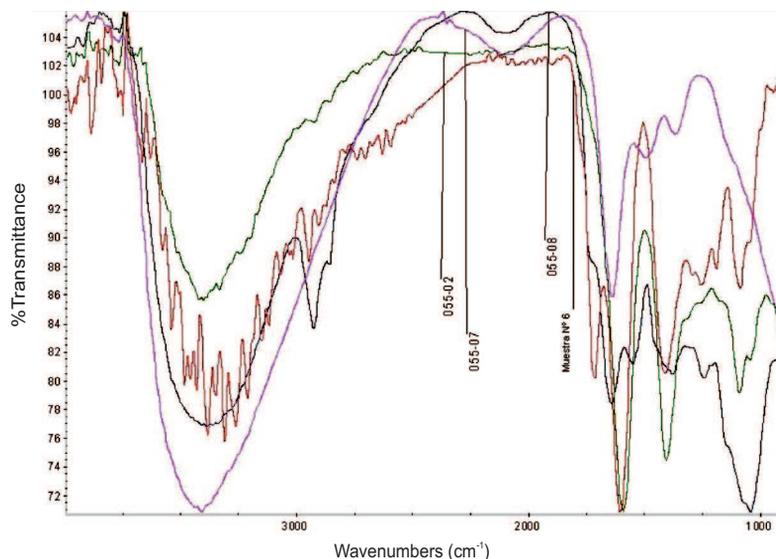


Figura 6. Análisis espectral FTIR de sólidos residuales de sales de plata y bismuto por interacción con macerados alcohólicos y acuoso de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller.

Tabla 7. Análisis Espectral FTIR de sólidos residuales de sales de plata y bismuto por interacción con macerados alcohólicos y acuoso de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller.

Código	Especie y tiempo del macerado	Tiempo con sal	Solución inicial	Estado final	C=O cm^{-1}	%T
Nº6 Miller	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	—	Alcohólica	Sol. alcohólica (03 días)	1602,40	69,5
055-02	<i>Aloe vera</i> L.	AgNO ₃ 07 días	Alcohólica	Sólido oscuro cierto brillo	1590,56	69,0
055-07	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	AgNO ₃ 07 días	Alcohólica	Polvo oscuro cierto brillo	1638,30	63,0
055-08	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	Bi(NO ₃) ₃ 07 días	Acuosa	Polvo gris oscuro	1644,23	66,0

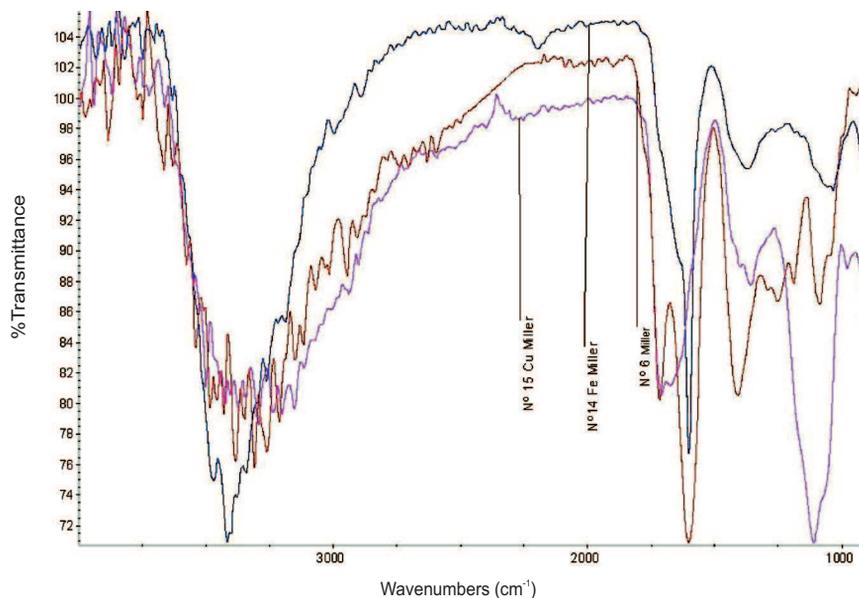


Figura 7. Análisis espectral FTIR de soluciones alcohólicas *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller con sales de hierro y cobre.

Tabla 8. Análisis espectral FTIR de soluciones alcohólicas *Aloe vera* L. y *Aloe Barbadensis* Miller con sales de hierro y cobre

Código	Especie	Tiempo con sal	Solución inicial	Estado final	C=O cm ⁻¹	%T
N°6 Miller	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	-	Alcohólica	Sol. alcohólica (03 días)	1602,40	69,5
N°14 Miller	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	FeCl ₃ 07 días	Alcohólica	Sol. alcohólica (12 meses)	1601,52	41,0
N°15 Miller	<i>Aloe barbadensis</i> Miller	CuSO ₄ 07 días	Alcohólica	Sol. alcohólica (12 meses)	1709,74 (1671,92)	68,0

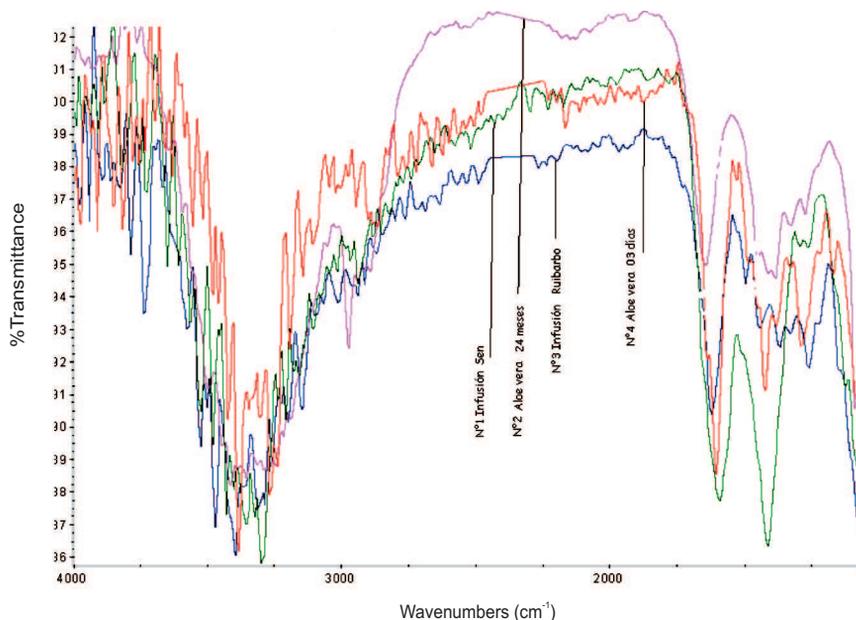


Figura 8. Análisis espectral FTIR de soluciones acuosas de *Aloe vera* L. e infusiones de *Rheum palmatum* (ruibarbo) y *Cassia senna* L. (sen)

TABLA 9. Análisis espectral FTIR de soluciones acuosas de *Aloe vera* L. e infusiones de *Rheum palmatum* (Ruibarbo) y *Cassia senna* L. (Sen)

Muestra	Especie	Tiempo con sal	Solución inicial	Estado final	C=O cm ⁻¹	%T
Nº 1	Sen (03 días)	-	Acuosa	Sol. acuosa	1593,76	83,0
Nº 2	<i>Aloe vera</i> Linneo (24 meses)	-	Acuosa	Sol. acuosa	1645,58	64,0
Nº 3	Ruibarbo (03 días)	-	Acuosa	Sol. acuosa	1621,48	92,5
Nº 4	<i>Aloe vera</i> Linneo (03 días)	-	Acuosa	Sol. acuosa	1604,52	90,8

A) Las figuras 4, 5, 6, 7 y 8 presentan los máximos de absorción del grupo funcional carbonilo (C=O) de todos los preparados -sólidos y líquidos- analizados. Estos picos se hallan en la zona 1600cm^{-1} - 1700cm^{-1} , dentro del rango de trabajos relacionados^{13,14}, incluyendo *Aloe vera* L.^{19,20}.

Las figuras 4 y 5 (tablas 5,6) presentan el espectro del macerado alcohólico reciente de *Aloe vera* L. con pico de absorción a $1602,92\text{cm}^{-1}$, este líquido amarillento con el tiempo se oxida pasando a color rojo vinoso y el máximo de absorción se desplaza a zona de mayor longitud de onda; es probable que este máximo corresponda a la mezcla de aloína (C-glucósido de la antrona aloe emodina) y aloinósido (C y O-glucósido de la antrona de aloe emodina)³⁰⁻³³, presente en las diferentes variedades de aloes, por ejemplo en aloe de los barbados (28%) y aloe del Cabo (18%)³³.

En la figura 4 (tabla 5) se observa los espectros de los sólidos residuales de la interacción de FeCl_3 con macerados alcohólicos y acuosos de *Aloe vera* L. obteniéndose espectros superpuestos -incluyendo el lavado de aloe sin FeCl_3 -, siendo más ensanchado el máximo de absorción para los residuos sólidos obtenidos de los preparados alcohólicos, sugiriendo equilibrios cetoenólicos, con formación de diversos compuestos.

La figura 5 (tabla 6) presenta los espectros de los sólidos residuales de la sal de cobre con los macerados -acuoso y alcohólico- de *Aloe vera* L., en armonía con el máximo del lavado alcohólico sin sal inorgánica; el ensanchamiento de la banda alcohólica, con máximos aledaños ($1627,48\text{cm}^{-1}$ - $1582,93$) presupone, la formación de derivados antraquinónicos libres, vía hidrólisis con la sal (a pesar de la escasa solubilidad de CuSO_4 en etanol), con participación de sustancias solubles del gel de sábila presentes en el envase cerrado; en cambio el sólido proveniente del preparado acuoso con la sal de cobre genera un máximo de absorción a 1598cm^{-1} . Aquí, por el desplazamiento a zona de menor longitud de onda, se puede postular la formación de un quelato de cobre.

B) Las figuras 6 y 7 (tablas 7,8) tienen en común el espectro del macerado alcohólico reciente de *Aloe barbadensis* Miller -02 días-, con máximo de absorción para el grupo carbonilo a $1602,40\text{cm}^{-1}$ (similar al máximo referencia de las figuras 4 y 5); además, en la figura 6 (tabla 7), se observan los espectros de los residuos sólidos de AgNO_3 provenientes de la interacción de dicha sal con los macerados alcohólicos de las dos variedades de aloes; el pico a $1590,56\text{cm}^{-1}$, sugiere la formación del quelato de plata; en cambio, el máximo a $1638,30\text{cm}^{-1}$ (proveniente del macerado alcohólico de *Aloe barbadensis* Miller), se puede atribuir al incremento -hidroxilación- de formas libres de derivados antraquinónicos -provenientes de aloína-, por procesos de hidrólisis.

En la figura 6 también se observa el espectro de la interacción de la sal de bismuto con el macerado acuoso de *Aloe barbadensis* Miller, el máximo para el grupo carbonilo se halla a $1644,23\text{cm}^{-1}$, lo cual sugiere que por procesos de hidrólisis se incrementa la cantidad de derivados 2,8-dihidroxiantracénicos libres a partir de aloína.

La figura 7 (tabla 8) presenta los espectros de tres preparados alcohólicos de *Aloe barbadensis* Miller superpuestos, uno corresponde al macerado sin sal inorgánica ($1602,40\text{cm}^{-1}$); otro espectro corresponde a la interacción con la sal de cobre, el cual presenta una banda ancha con dos máximos ($1709,74\text{cm}^{-1}$ - $1671,92\text{cm}^{-1}$), lo que sugiere la formación de amidas y aldehídos aromáticos; el tercer espectro corresponde al preparado con cloruro férrico, con un máximo agudo a $1601,52$, lo cual indica grupos cetónicos diferenciados; sin embargo, los tres espectros se hallan dentro del rango señalado para los derivados 1,8-dihidroxiantracénicos de diferente polaridad²⁰.

C) La figura 8 (tabla 9) presenta los espectros de cuatro preparados acuosos, infusiones de sen y ruibarbo, -con predominio de diantronas glicosadas- y macerados acuosos de *Aloe vera* 02 años y *Aloe vera* 03 días -con predominio de antraquinonas glicosadas-; algunas zonas espectrales tienen gran similitud, sobre todo para las infusiones de sen y ruibarbo. Observando la intensidad de los picos -y % Transmitancia- del grupo funcional carbonilo, de manera relativa, el sen tiene mayor porcentaje de derivados antracénicos libres que el ruibarbo. Respecto a los preparados acuosos de *Aloe vera* L.-03 días y 02 años-, por incremento en la intensidad del máximo -aunque se desplaza a zona de mayor longitud de onda-, se colige mayor contenido de antraquinonas libres en el preparado acuoso 02 años.

CONCLUSIONES

- El análisis UV de macerados acuosos y alcohólicos de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller y de las infusiones acuosa y alcohólica de *Rheum palmatum* (Ruibarbo) y *Cassia senna* L. (sen) permite detectar derivados antracénicos.
- Por FTIR se detecta la formación de derivados antraquinónicos en la superficie de sólidos residuales producto de la interacción de macerados acuosos y alcohólicos de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller con sales inorgánicas de Fe, Ag, Cu y Bi. Los máximos de absorción con algunos preparados de plata y cobre sugiere la formación de quelatos.
- El análisis por FTIR de los macerados acuosos y alcohólicos de *Aloe vera* L. y *Aloe barbadensis* Miller -guardados por diferente tiempo- y de las infusiones acuosas recientes de *Rheum palmatum* y *Cassia senna* L. -sin adición de sales-, permite identificar derivados antracénicos en dichas soluciones, además, con el tiempo estos espectros se desplazan a mayor longitud de onda disminuyendo la Transmitancia, es decir, aumentan las antraquinonas libres.
- El análisis por FTIR de los filtrados obtenidos de la interacción entre los macerados acuosos y alcohólicos de *Aloe vera* L. con sales inorgánicas -guardados durante doce meses- permite identificar derivados antracénicos en dichas soluciones. Para los preparados de cobre, por el desplazamiento del máximo hacia zona de mayor longitud de onda y variación de Transmitancia, con los meses, se deduce mayor cantidad de derivados antraquinónicos.
- En los preparados alcohólicos -sin adición de sales- y en igualdad de condiciones experimentales, se distingue mayor cantidad de derivados antracénicos en *Aloe vera* L. que en *Aloe barbadensis* Miller (por el % de Transmitancia); diferencia que se mantiene cuando los macerados alcohólicos interaccionan con sulfato de cobre, aunque los máximos de absorción se presentan a diferente longitud de onda.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Héctor Pablo Rivera Riofano, docente asociado de la Facultad de Ciencias Físicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a la Unidad de Servicios de Análisis Químico de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM y a la Srta. Kelita Ytamar Rodríguez Rojas por su valiosa colaboración.

REFERENCIAS

1. Vásquez D.R., Abadía B., Arreaza L.C. *Revista Corpoica* 2004 Vol. 5 N°1. Colombia. Pág.49-55.
2. Ammawath W., Che Man R.B., Rahman A. and Baharin B.S. *Journal of The American Oil Chemists' Society*; 2006. 83, 3.

3. Crowther M.W. *Journal of Chemical Education*. 2008. Tom 85, iss 11; Pág.1550.
4. Hansen E.F., Hansen R.D., Derrick M.R. VIII Simposio de Investigaciones arqueológicas en Guatemala. Museo Nacional de Arqueología y Etnología Guatemala (versión digital), 1994, Pág. 456-470.
5. K. Stehfest, M. Boese, G. Kerns, A. Piry, Ch. Wilhelm. *Journal of Plant Physiology*; Feb.2004; 161, 2; ProQuest Biology Journals.
6. Dyer J.R. Aplicaciones de espectroscopía de absorción en compuestos orgánicos. Edit. Prentice-Hall International Englewood Cliffs, N.J. USA. 1973. Pág. 9,18, 24-28.
7. García J.V., Portas M.P. Estudio de la cristalización de la Cimetidina en mezclas de etanol-agua. 1999. *Sintefarma* 5(2).
8. Velásquez G., Martín-Polo M.O., Herrera A. Cuantificación por IR del agua directamente unida a una matriz polimérica. Superficies y vacío 11. 2000. México Pág. 24-31.
9. Pulenta L.J., Ávila E.M. XV Congreso Argentino de Bioingeniería: 047F1.
10. Gibaja S. Pigmentos naturales quinónicos. Fondo Editorial UNMSM. 1998. Lima-Perú Pág. 73, 81, 93, 100, 102,184. 200-203.
11. Sydiskis RJ, Owen DG, Lohr JL, Rosler KH, Blomster RN. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrob Agents Chemother*. 35(12):2463-6. 1991.
12. Ali MI, Shalaby NM, Elgamal MH, Mousa AS. Antifungal effects of different plant extracts and their major components of selected aloe species. 1999. *Phytother. Res*; 13(5):401-7.
13. Arana CR, Julca IB. Estudio Farmacognóstico y de la Actividad Antimicrobiana de *Picramnia*. Trabajo de Aptitud Profesional para optar el Título de Químico Farmacéutico. 1987. Lima, Perú.
14. Mishenko N.P., Fedoreiev S.A., Briuxanov V.M., Zvierev Ya F. Composición química y actividad farmacológica de las antraquinonas de cultivo celular de *Rubia Cordifolia*. *Zhurnal Ximiko Farmasevticheskii*. 1997. Tom 41, N° 11, Pág. 38-41.
15. Gottlieb O.R., Martins H., Magalhães M.T. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, v 42, 1979. Pág. 73-76.
16. Cristóbal Pera. Cirugía: Fundamentos, indicaciones y opciones técnicas. Edit. Elsevier. 1996. España, Tomo I, pág. 307. books.google.com.pe/books.
17. Litvinova L.A., Lempart G.V., Filippova L.A. y Zhuk O.V. 1978. Synthesis and immunotropic activity. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, Vol.12, N°11, Pág. 65-67.
18. Bailey D., Jeffrey N., Murphy, and Williams V.E. From enolates to anthraquinones *Canadian Journal of Chemistry*. 2006; 84, 4.
19. Rajendran A., Narayanan V. *Gnanavel I. Journal of Applied Sciences Research*, 3(11): 1407-1415. 2007.
20. Prato María de Rosario, Ávila Ramona, Donquis Carmen, Medina Edgar y Reyes Rosa Antraquinonas en *Aloe vera* *Barbadensis* de zonas semiáridas de Falcón, 2008. Venezuela, como inhibidores de la corrosión. *Multiciencias*, V.8,N°2,Pág.148-154.
21. V.Zenitagoya, H. Alarcón. Polimerización de hierro (III) y tungsteno (VI) en solución acuosa. *Tecnia*. 2003. Vol. 13, N° 2 diciembre UNI, Lima-Perú.
22. USP-23; NF-18; 1995 Tom. I.
23. Julius Lurie. *Handbook of Analytical Chemistry* Mir Publishers Moscow, 1978, Pág. 194, 196, 360.
24. Asnworth M.R.F. *Titrimetric Organic Analysis Part II Indirect Method* Interscience Publishers New York-London-Sydney. 1970. Pág. 972.

25. Belikov V.G. Farmashevitcheskaya Ximia. Edit. Vuishaya Shkola Moscú, 1985. Pag. 55.
26. E.Pretsch, T.Clerc, J.Seibl, W. Simon. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Edit. Alhambra Madrid. 1980. pp. 21, 267, 274.
27. Olga Lock de Ugaz. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Fondo Editorial PUCP Lima-Perú. 1994. Pág.190.
28. Ibarretxe P., M.E.Hernández J. O. García P. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* ISSN 1028-4796 versão on-line 2005. Pág 1-5.
29. Potapov M.M. Tatarinchik. Química Orgánica Edit. MIR Moscú. 1983. Pág. 180.
30. Barrantes E., Guinea M. Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel. 2003. *Life Sci.* Jan 3; 72(7):843-50.
31. Shen Z., Li J, Hu Z. Distribution of anthraquinones in leaves of two Aloe species and defence strategy. 2002. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* Nov; 13(11):1381-4.
32. ElSohly M.A., Gul W, Murphy TP. Analysis of the anthraquinones aloe-emodin and aloin by gas chromatography/mass spectrometry. *Int. Immunopharmacol.* 2004 Dec 20; 4(14): 1739-44.
33. Castillo García E., Martínez Solís Y. Manual de Fitoterapia. 2007. Edit. Elsevier Masson. [books google.com.pe/books](https://books.google.com.pe/books) ISBN=8445817973.

BARNETOBINA: UN NUEVO PRINCIPIO COAGULANTE PURIFICADO DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops barnetti*

Dan Vivas Ruiz^{a*}, Rosalina Inga Arellano^a, Julio Mendoza Fernández^a,
Fanny Lazo Manrique^a y Amando Yarlequé Chocas^a

RESUMEN

Se ha aislado una enzima similar a trombina, barnetobina, del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti*, mediante dos pasos cromatográficos sobre CM Sephadex C-50 y Sephadex G-100, en ambos casos utilizando acetato de amonio 0,05 M a pH 5,0. La enzima fue purificada 45 veces con un rendimiento de 14% y por PAGE-SDS se obtuvo una sola banda proteica de 52 kDa en condiciones reductoras con 2 β -mercaptoetanol y de 48 kDa en condiciones no reductoras, determinándose que la enzima consta de una sola cadena polipeptídica con al menos un enlace disulfuro. El tratamiento con N- glicosidasa (PNGasa F) determinó que es una glicoproteína, con un 45% de contenido total de carbohidratos. La enzima mostró tener actividad coagulante sobre plasma citratado y fibrinógeno. También mostró actividad amidásica sobre BApNA y Chromozym TH. La potencia coagulante sobre fibrinógeno bovino fue equivalente a 131 unidades NIH de trombina/mg. La enzima es inhibida por PMSF y por el inhibidor de tripsina de soya calificándola como una serinoproteasa; el pH óptimo para la actividad amidolítica fue de 8,0 y es estable hasta los 40 °C. Se demostró mediante inmunoelectroforesis e inmunodifusión la antigenicidad de la enzima frente al suero antibotrópico polivalente, así como su neutralización probada sobre plasma citratado (Dosis eficaz: 250 μ l de antiveneno/ mg de enzima).

Palabras clave: Veneno, serpiente, enzima similar a trombina, *Bothrops barnetti*, coagulante.

BARNETOBIN: A NEW COAGULANT PRINCIPLE PURIFIED FROM *Bothrops barnetti* PERUVIAN SNAKE VENOM

ABSTRACT

A thrombin- like enzyme, barnetobin, was purified from *Bothrops barnetti*, peruvian snake venom using CM Sephadex C-50 followed by Sephadex G-100, in both two cases with 0,05 M ammonium acetate buffer pH 5,0. The enzyme was purified 45 fold with 14% of yield and the PAGE-SDS showed only protein band of 52 kDa under reducing condition with 2 β -mercaptoetanol and 48 kDa under non reducing condition indicating that the enzyme has a single polypeptide chain with disulfide bond. The PNGase treatment showed that it is a basic glycoprotein containing 45% total carbohydrates. The enzyme has coagulant activity on fibrinogen and citrated plasma and amidolytic activity on BApNA and Chromozym TH. The coagulant potency was equivalent to 131 NIH thrombin Units/ mg. In addition the enzyme is inhibited by PMSF and soybean trypsin inhibitor suggesting that is a serine proteinase. The enzyme had optimal amidolytic activity pH was 8,0 and is stable until 40 °C. The antigenicity

^{a*} Laboratorio de Biología Molecular – Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
devivasr@hotmail.com

and neutralization of enzyme was demonstrated by immunodiffusion and immunoelectrophoresis with the polyvalent antithrombotic serum on citrated plasma (Effective Doses: 250 μ l of antivenom/ mg of enzyme).

Key words: Venom, snake, enzyme, thrombin like, *Bothrops barnetti*, coagulant.

INTRODUCCIÓN

La alteración del sistema hemostático es una de las principales sintomatologías causadas en el envenenamiento por mordeduras de serpientes Viperidas¹. La actividad proteolítica de muchas enzimas del veneno de estos animales (serinoproteasas y metaloproteasas) está direccionada a los componentes de la coagulación sanguínea. Un grupo particular de estas enzimas son las que poseen acción tipo trombina (similares a trombina o EST) que actúan sobre el fibrinógeno induciendo la formación de una malla anómala de fibrina que es fácilmente degradada por la acción proteolítica de la plasmina, conduciendo a un decremento de la viscosidad sanguínea y de la concentración del fibrinógeno circulante².

La investigación sobre las enzimas similares a trombina es amplia y a la fecha se conocen más de 40 ESTs distribuidas en varios géneros de serpientes. La mayoría de ellas son glicoproteínas de una sola cadena que tienen la capacidad de liberar los fibrinopéptidos A o B de las cadenas A _{α} y B _{β} del fibrinógeno respectivamente^{3, 4}. Además, estas enzimas poseen actividad similar a la tripsina, actividad amidolítica y actividad esterásica, pero no tienen efecto sobre ninguno de los componentes de la cascada de la coagulación⁴.

Bothrops barnetti, conocida comúnmente como **sancarranca**, es una serpiente venenosa de la zona norte del Perú, localizada en los departamentos de La Libertad, Lambayeque, Cajamarca Piura y Tumbes, siendo la principal causante de los accidentes ofídicos para estos departamentos⁵.

En el presente trabajo, describimos el hallazgo y posterior purificación de una enzima similar a trombina a la que hemos denominado barnetobina, procedente del veneno de la serpiente peruana *Bothrops barnetti* y detallamos algunas de sus propiedades bioquímicas más relevantes.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

Veneno de *Bothrops barnetti*, fue obtenido de especímenes criados en el serpentario del Instituto Nacional de Salud, INS (Lima-Perú). El veneno fue liofilizado y mantenido a -20°C hasta su uso. El suero equino antitrombótico polivalente fue obtenido del Centro Nacional de Productos Biológicos-INS

Agarosa, fibrinógeno bovino, N-glicosidasa F, benzoil arginil p-nitroanilida (BAPNA), estándares de peso molecular e inhibidores de proteasas fueron adquiridos de Sigma Chemical Company (USA). El tosil-gly-pro-arg-4-nitranilina acetato (Chromozym TH) fue adquirido de Roche Diagnostic (Germany).

Purificación

Veneno total liofilizado (80 mg) fue diluido en 2 ml de buffer acetato de amonio 0,05M pH 5,0 y centrifugado a 1000 rpm por 15 min a 20 °C para remover los componentes insolubles. El sobrenadante fue aplicado a una columna cromatográfica de CM- Sephadex C-50 (30 x 1,5 cm). La columna fue equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05M pH 5,0, a un flujo de 5 ml/hora; después de esto, fue eluida con dos cambios de concentración de NaCl (0,3 y 0,6M, respectivamente). En las fracciones colectadas se determinó la cantidad de proteína por absorbancia a 280 nm y la actividad coagulante, usando como sustrato fibrinógeno bovino.

Aquellas fracciones que mostraron actividad fueron juntadas, concentradas y dializadas para aplicarlas en una columna de filtración sobre Sephadex G-100 (30 x 1,0 cm) equilibrada con buffer acetato de amonio 0,05 M pH 5,0, a un flujo de 8ml/hora; en cada fracción obtenida se determinó la actividad coagulante.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Fue llevada a cabo usando el método de Laemmli⁶ bajo condiciones reductoras y no reductoras, usando una cámara vertical MINI-GEL System (Sigma); las corridas se realizaron por 1 hora. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie. Los estándares de peso molecular usados fueron: albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y lisosima (14,3 kDa).

Actividad coagulante sobre plasma

Muestras de sangre periférica fueron colectadas de personas voluntarias en 3,8% de citrato de sodio (9:1) y centrifugados a 3000 rpm a 15°C por 15 min para la obtención de plasma. La actividad coagulante fue medida por el método de Copley⁷ usando plasma humano citratado. La mezcla de reacción contenía 0,2 ml del sustrato y 0,1 ml de cloruro de sodio 0,9% tamponado a pH 7,4; preincubándose por 10 minutos a 37 °C para luego agregar 0,1 ml del veneno crudo o de la enzima purificada. Se determinó la actividad enzimática dividiendo la inversa del tiempo de coagulación entre los mg de proteína utilizada.

Potencia coagulante

El tiempo de coagulación del fibrinógeno fue medido por la mezcla de 0,1 ml de muestra con 0,2ml de fibrinógeno bovino (5mg/ml en Tris HCl 0,05 M pH 7,4) e incubado a 37 °C. La potencia coagulante fue determinada por el método de Baughman⁸ y expresada en unidades NHI equivalentes de trombina.

Actividad caseinolítica

La actividad proteolítica fue medida usando caseína al 2% en buffer tris HCl 0,01 M pH 8,5, midiéndose luego de la reacción la concentración de productos ácidos solubles a 280 nm según el método de Takahashi y Ohsaka⁹.

Actividad sobre sustratos sintéticos

La actividad amidolítica fue medida sobre los sustratos benzoil arginil p-nitroanilina (BApNA), de acuerdo al método de Erlanger¹⁰, y tosyl-glycyl-prolyl-arginyl-4-nitranilina acetate (Chromozym TH) de acuerdo al método de Svendsen¹¹. La actividad se determinó por absorbancia a 405 nm. Una unidad de actividad amidolítica fue definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de sustrato por minuto.

Efectos del pH y la temperatura

La determinación del pH óptimo para la actividad amidolítica fue determinado por la variación del pH entre un rango de 4 a 10. La enzima fue diluida en buffer acetato de sodio (0,2 M pH 4,0-6,0), buffer fosfato de sodio (0,2 M pH 6,0-7,0) y buffer Tris HCl (0,2M 8,0-10,0). Asimismo, la tolerancia de la enzima a la temperatura fue determinada entre el rango de 20 a 90 °C. La enzima fue preincubada por 15 min a valores de temperatura establecidos para luego medir su actividad amidolítica.

Deglicosilación de la proteína

20 μl de la enzima purificada fue diluida en buffer de reacción (50 μl Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) y posteriormente se agregaron 2,5 μl de solución denaturante (SDS 2% y 1M 2-β mercaptoetanol) para luego someter la mezcla a calentamiento por 5 min a 100 °C e inmediatamente enfriarla. Se agregaron 2,5 μl de solución detergente (IGEPAL® 15%) y por último se añadió 2 μl de N-glicosidasa F (2 unidades/mg de proteína). La muestra fue incubada a 37 °C por 24 horas y la proteína deglicosilada fue evaluada por PAGE-SDS.

Efecto de los inhibidores de proteasas

La enzima purificada (25 μ l) fue preincubada con 25 μ l de inhibidor proteolítico correspondiente (tabla 2), la actividad residual fue determinada con BAPNA y la reacción fue detenida agregando ácido acético al 60%. La absorbancia se midió a 405 nm.

Ensayos de inmunogenicidad y neutralización

La inmunogenicidad fue evaluada mediante inmunodifusión e inmunolectroforesis de acuerdo a Ouchterlony y Nilsson¹². Asimismo, la neutralización de la actividad coagulante sobre plasma humano citratado fue evaluada mediante la obtención de la Dosis Eficaz del suero antibotrópico polivalente, siguiendo el Manual del Instituto Clodomiro Picado¹³.

RESULTADOS

Purificación de barnetobina.

La figura 1 muestra el perfil electroforético del veneno de *B. barnetti* sobre CM-Sephadex C-50. Se obtuvo cinco picos (Bb I-V) y se monitoreó las actividades amidolítica y coagulante para las fracciones eluidas. Solo el pico Bb III mostró tener actividad amidolítica y coagulante. Estas fracciones fueron juntadas y dializadas para ser aplicadas en una columna de Sephadex G-100. En este paso sólo tres picos fueron resueltos (Bb III 1-3), y la actividad similar a trombina se encontró en el pico Bb III 1 (figura 2).

La enzima se mostró como una entidad homogénea migrando como una sola banda en análisis de PAGE-SDS bajo condiciones reductoras y no reductoras, lo que indica que se trata de una proteína monomérica. El peso molecular estimado en condiciones no reductoras fue de 48 kDa mientras que en condiciones reductoras fue de 52 kDa (figura 3). Asimismo, la barnetobina, luego del tratamiento con N-glicosilasa F, mostró una reducción notable de su peso molecular, ya que el valor calculado fue de 29 kDa (figura 4). Adicionalmente, los análisis de inmunodifusión e inmunolectroforesis ensayados, mostraron a la enzima como una única banda homogénea (figura 5).

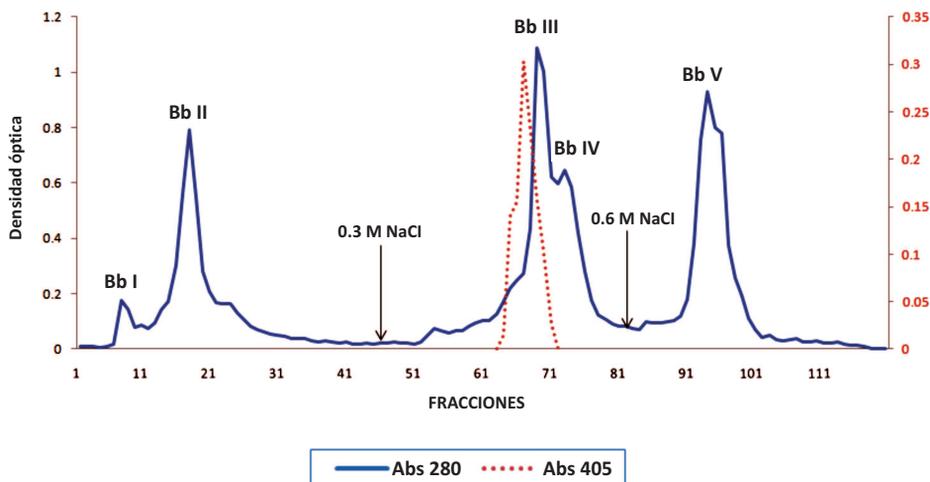


Figura 1. Primer paso de purificación de barnetobina del veneno de *Bothrops barnetti* por cromatografía de intercambio iónico CM Sephadex c-50

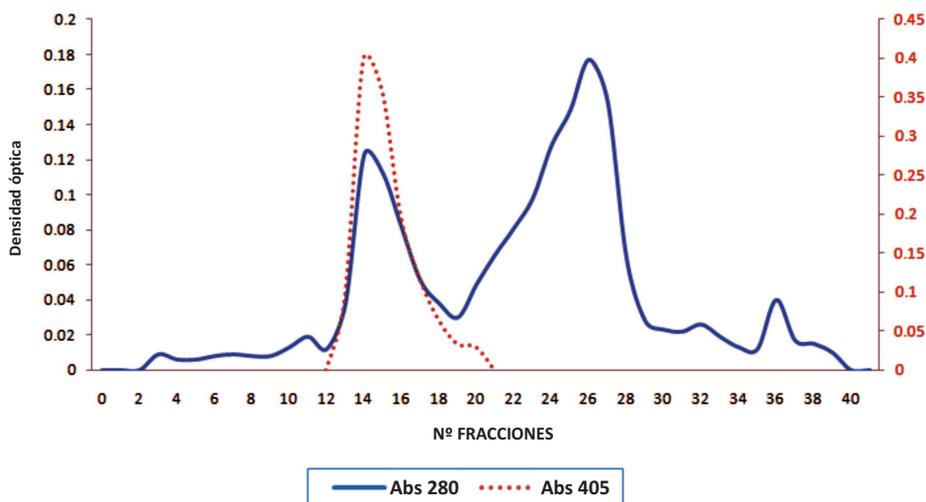


Figura 2. Segundo paso de purificación de barnetobina por cromatografía de filtración molecular Sephadex G-100.

Actividad de la enzima

La barnetobina fue capaz de coagular el plasma humano citratado y el fibrinógeno bovino, con una potencia coagulante de 121,1 NHI unidades/mg. Asimismo, la enzima mostró tener actividad arginil éster hidrolasa sobre los sustratos sintéticos BApNA y Chromozyn TH (tabla 1). Sin embargo, la enzima no mostró tener actividad caseinolítica.

pH óptimo y temperatura

La actividad amidolítica (hidrólisis del BApNA) muestra la esperada dependencia en forma de campana del pH a 37 °C, con una actividad máxima centrada en 8, 1. Cerca de un 50 % de la actividad máxima fue reflejada a pH 9,5 y cerca de 20% a pH 5,5. La óptima temperatura de la actividad catalítica de barnetobina sobre el sustrato BApNA mostró una alta hidrólisis en proporciones progresivas de los 25 hasta los 40 °C. La enzima perdió hasta el 50 % de su máxima actividad a los 60 °C, siendo completamente inactivada a los 80 °C.

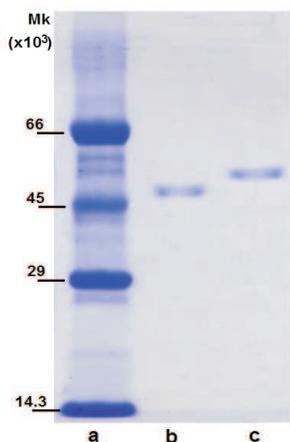


Figura 3. Análisis por PAGE SDS de barnetobina. (a) patrones de peso molecular, (b) barnetobina en condiciones no reductoras 48 kDa y (c) reductoras, 52 kDa,

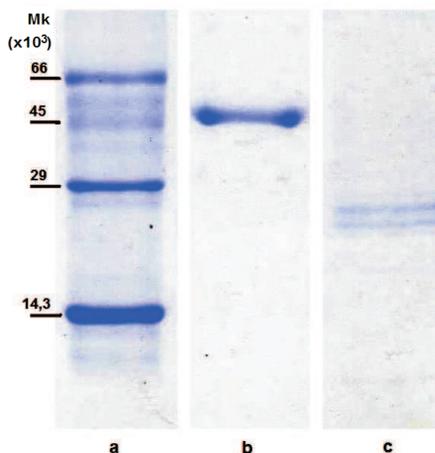


Figura 4. Deglicosilación de barnetobina, a: marcadores de peso molecular, b: enzima nativa, c: enzima tratada con PNGasa F.

Inhibidores enzimáticos

La actividad enzimática no fue inhibida por el quelador de metal EDTA, tampoco por el TLCK, ni los inhibidores iodoacetato y ácido glutámico. Sin embargo, la actividad fue severamente inhibida por el PMSF (50%) y el inhibidor de tripsina de soja (20%). El polisacárido heparina, inhibidor específico de la trombina, no tiene efecto alguno sobre la actividad de barnetobina. El agente β -mercaptoetanol no tuvo efecto alguno sobre la actividad enzimática, pese a que reduce a la proteína.

Inminogenicidad y neutralización de la enzima

Finalmente, los ensayos de inmunodifusión e inmunoelectroforesis mostraron arcos de precipitación de la enzima purificada con el antiveneno botrópico, lo que demuestra su reactividad antigénica. En cuanto a la efectividad del suero antibotrópico para neutralizar a la enzima coagulante, el antiveneno analizado fue capaz de neutralizar tanto la actividad coagulante del veneno como de la enzima purificada a una dosis eficaz (DE) de 146,7 y 250 μ l de antiveneno/mg de proteína, respectivamente.

Tabla 1. Actividades de la barnetobina sobre distintos sustratos.

Sustrato	pH	Actividad específica (UA/ mg de prot eína)		Incremento de actividad (veces)
		Veneno	EST	
Fibrinógeno bovino	7,4	0,64 ¹	23,88 ¹	37,3
Plasma humano	7,4	0,69 ¹	26,66 ¹	38,6
BAPNA	8,0	0,02 ²	1,05 ²	45
Chromozym TH	8,3	0,81 ²	10,6 ²	12

UA: ¹Inversa del tiempo de coagulación en segundo
²(μ moles de p-nitroanilina liberada/ minuto)

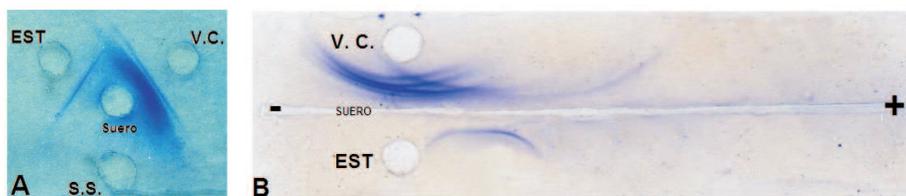


Figura 5. Reconocimiento de barnetobina (EST: enzima similar a trombina) por el suero antibotrópico polivalente (INS). **A:** inmunodifusión, **B:** inmunolectroforesis.

DISCUSIÓN

Esta es la primera investigación hecha sobre una proteína coagulante purificada del veneno de una especie ofídica que, además de ser típica de la costa norte del Perú, también se le puede encontrar en regiones de la sierra y de la selva (departamentos de La Libertad, Lambayeque, Cajamarca, Piura y Tumbes). Se trata de un hecho singular puesto que el hábitat de las serpientes aún cuando, puede ser amplio en territorio, generalmente está limitado por condiciones climáticas que en este caso, resultan ser muy variables por lo que, es muy interesante evaluar la ecología de esta serpiente a la luz de su localización geográfica⁵.

La técnica empleada fue idónea para obtener la barnetobina al estado homogéneo, por lo que esta enzima constituye un hallazgo más sobre una proteína coagulante presente en el veneno de ofidios sudamericanos. El peso molecular de la EST en estudio, está en el rango de 48 a 52 kDa, lo que la ubica entre las enzimas de este grupo con los mayores pesos encontrados³. La estructura unicitenaria encontrada para esta enzima es común en todas las ESTs estudiadas⁴. Además, se logró evidenciar la presencia de puentes S-S en la proteína, los cuales son reducidos por el β -mercaptoetanol, no tienen un papel crucial en la actividad enzimática, lo que indicaría que dichos puentes estarían ubicados en un dominio alejado del sitio activo.

El tratamiento de barnetobina con PNGasa, mostró que la enzima posee una glicosilación de tipo N (asociado al aminoácido asparagina¹⁴) y que sus carbohidratos asociados representan cerca del 45% del peso de la proteína; esto significa que la enzima está protegida por una gran masa molecular de azúcares que probablemente contribuyen a su estabilidad y protección frente a una eventual proteólisis, como ya se ha demostrado para otras proteínas del mismo tipo¹⁵. Esta propiedad es de mucha importancia debido a que las ESTs están involucradas en el evento de captura y muerte de la presa debido a que produce una rápida coagulación sanguínea inmediatamente después de ocurrida la mordedura¹. Hasta la fecha no se había reportado una proteína coagulante de venenos de serpientes que presente un contenido alto de carbohidratos similar a lo que se presenta en este trabajo.

Tabla 2. Efecto de algunos inhibidores de proteasas sobre la enzima similar a trombina de *Bothrops barnetti*.

Agente	Concentración final	Actividad (%)
Control	-	100
Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF)	5mM	55,3
Inhibidor de tripsina de soya	1 mg	80,4
Etilen diamino tetracético (EDTA)	5mM	115,6
Tosyl lisil clorometil cetona (TLCK)	5mM	118,2
Glutation	5mM	94,5
Iodo acetato	5mM	119
Ácido glutámico	5mM	109,8
Heparina	5 unidades	95,1
2 β-mercaptoetanol	5 Mm	97,2

El estudio del efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática mostraron que barnetobina se comporta al igual que la mayoría de las enzimas similares a trombina reportadas³; actuando en un significativo rango de pH (pH óptimo de 8,0) y una temperatura óptima de 40 °C. La fuerte inhibición de la actividad enzimática por parte del inhibidor PMSF, así como la significativa inhibición del inhibidor de la tripsina de soya, sugieren fuertemente que Barnetobina se comporte al igual que la trombina, pero una notable diferencia con esta última radica en que no es inhibida por el mucopolisacárido heparina⁴.

El veneno de *B. barnetti* demostró ser reconocido, mediante inmunodifusión e inmunoelectroforesis, por el suero antibotrópico polivalente; de la misma manera, la barnetobina fue reconocida como un agente antigénico lo que indica que, esta proteína genera respuesta inmune contra su estructura (figura 5). En cuanto a la neutralización de la actividad coagulante de la enzima purificada, ésta fue más baja que la del veneno crudo (250 µl de antiveneno/ mg de enzima) lo que indica que, la neutralización de la actividad coagulante del veneno total no ocurriría necesariamente sólo contra barnetobina, sino también contra otros factores procoagulantes que estarían presentes en la ponzoña. Obviamente, este tema debe ser más profundamente investigado en otro estudio.

CONCLUSIONES

- El veneno de la serpiente *Bothrops barnetti* posee una enzima similar a trombina (barnetobina) y es posible purificarla mediante dos pasos cromatográficos usando una columna de CM Sephadex C-50, seguida de una columna de Sephadex G100 a pH 5,0.
- Estructuralmente la enzima es una glicoproteína unicatenaria de mediano peso molecular (48 kDa) con actividad coagulante sobre plasma humano y fibrinógeno bovino y actividad amidolítica sobre BApNA y Chromozym TH.
- La enzima es una serinoproteasa con una potencia coagulante equivalente de 131 NIH U/mg de trombina.
- La enzima es estable en rango de pH de 7 a 9,5 con un pH óptimo de 8,0 y su actividad amidolítica es progresiva hasta los 40 °C, y posee al menos un puente disulfuro.
- El suero antibotrópico polivalente neutraliza la actividad coagulante del veneno de *Bothrops barnetti* y la enzima similar a trombina purificada.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Superior de Investigaciones de la UNMSM así como al Instituto Nacional de Salud por el apoyo brindado en la realización de este trabajo. El presente trabajo fue parte de la Tesis del autor principal para obtener el Título Profesional de Biólogo.

REFERENCIAS

1. Stocker, K.. Medical Use of snake venoms protein. CRC Press, Boca Raton, FL. 1990.
2. Ouyang, C.; Teng, C. and Huang T. Characterization of snake venoms components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon* 1992; 30(9): 945-966.
3. Pirkle, H.. Thrombin-like enzymes from snake Venoms: An updated inventory. *Thromb. haemost.* 1998; 79: 675-683.
4. Castro, H.C.; Zingali, R.B.; Albuquerque, M.G.; Pujol-Luz, M. and Rodrigues, C.R., 2004. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. *Cell Mol. Life Sci.* 61: 843-856.
5. Ascencios, H. y Cutti, F. Distribución geográfica de la fauna ofídica ponzoñosa en el Perú." *Bol. Lima* 1995; N° 97, pp.91-96.
6. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
7. Copley, A. Studies of snake venoms on the blood coagulation. The thromboserpentin enzyme in the venoms. *Thrombos Res* 1973; 2: 487-508.
8. Baughman, D.J.. Thrombin assay, In: Methods in enzymology, proteolytic enzymes. G.E. Periman & L. Lorand Eds. Academic Press. New York-London 1970: 145-157.
9. Takahashi, T. and Oohsaka, A.. Purification and characterization of a proteinase in the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Complete separation of the enzyme from hemorrhagic activity. *Biochim. biophys. Acta* 1970; 198: 293-307.
10. Erlanger, B.; Kokowsky, N. and Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys.* 1961; 95: 271-278.
11. Svendsen, L.. Aktivitatsbestimmung proteolytischen enzyme mit synthetischen substanzen (Activity determination of proteolytic enzyme with synthetic substances). Chromogene substrate in der Gerinnunsanalytik, Aktuelle Diagnostik, Boheringer Mannheim. 1977: Pp 14-17.

12. Ouchterlony, O. and Nilsson, L.. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Handbook of Experimental Immunology*. 1967; I (34): 655-660.
13. Instituto Cloromido Picado. Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos. Manual de Laboratorio. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica. 2007; Pág.21-22.
14. Norris, G.; Stillman, T.; Anderson, B. and Baker, E.. The three-dimensional structure of PNGase F, a glycosyl asparaginase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Structure* 1994; 2(11): 1049-1059
15. Silva-Junior, F.; Guedes, H.; Garvey, C.; Aguiar, A.; Bourguignon S.; Di Cera, E. and Giovanni-De-Simone S. BJ-48, a novel thrombin-like enzyme from the Bothrops jararacussu venom with high selectivity for Arg over Lys in P1: Role of N-glycosylation in thermostability and active site accessibility. *Toxicon* 2007; 50(1): 18-31.

CONTENIDO DE ALCALOIDES EN CORTEZA DE *Uncaria tomentosa* (Wild.) DC PROCEDENTE DE DIFERENTES HÁBITATS DE LA REGIÓN UCAYALI - PERÚ

Gilberto Domínguez Torrejón^{1*}, Juan de Jesús García Martín²,
Deysi Guzmán Loayza³, Rosa Alanoca⁴

RESUMEN

Uncaria tomentosa (Wild.) DC (uña de gato), es una especie que aporta cantidades suficientes de alcaloides oxindólicos pentacíclicos y tetracíclicos. En el presente trabajo se exponen los resultados comparativos entre los extractos obtenidos a partir de corteza de cuatro hábitats de esta especie. Se hace un análisis comparativo del comportamiento de la especie en diferentes altitudes y tipo de suelos de IIAP-Pucallpa, Nuevo Ucayali, el Porvenir y Tres de Octubre y se reportan diferencias en la concentración de alcaloides en la corteza de estas localidades. Se evalúa también los métodos ácido y alcalino de extracción de alcaloides.

Palabras clave: *Uncaria tomentosa*, alcaloides, método alcalino

ALKALOIDS CONTENT IN BARK OF *Uncaria tomentosa* (Wild.) DC FROM DIFFERENT HABITATS IN THE REGION UCAYALI - PERÚ

ABSTRACT

Uncaria tomentosa (Wild.) DC, (cat's claw) is one of the most important species whose has been able to exhibit the penthaciclic and tethraciclic alkaloids. In this paper we report the comparative results between different extracts from bark of four different habitats. We have made a comparative study about the behavior of these species in different altitude and kinds of soils in IIAP-Pucallpa, Nuevo Ucayali, El Porvenir, Tres de Octubre and we reported differences in the concentration of alkaloids in bark. Finally we test the extractive method in the isolation of alkaloids in the point of view acid and alkaline. The differences between those methods have been reported too.

Key words: *Uncaria tomentosa*, alkaloids, method alkaline

INTRODUCCIÓN

Uncaria tomentosa (Wild.) DC tiene una amplia distribución geográfica, pero esto no garantiza, en condiciones naturales, la conservación de la diversidad genética¹. La diversidad genética confiere adaptabilidad y potencial evolutivo a las especies que llevan tales genes. Por ello en primer lugar hay que mantener los componentes de la diversidad, después hay que estudiarlos y finalmente basándose en estos conocimientos, hay que utilizarlos sosteniblemente².

^{1*} Universidad Nacional Agraria La Molina, código postal. 12056. Lima- Perú
gdominguez@lamolina.edu.pe, Departamento de Manejo Forestal

² Universidad de Pinar del Río, Pinar del Río Cuba ilia@princesa.pri.sld.cu

³ deysigl@lamolina.edu.pe, Laboratorio de Pulpa y Papel. Dpto. Industrias Forestales. UNALM

⁴ Laboratorios Hersil- Lima-Perú.

Para aprovechar esta diversidad se requiere de un proceso de domesticación que facilite el mejoramiento genético para propiciar la producción sostenible de este recurso forestal no maderable. El problema fundamental radica en que la corteza, como principal materia prima de *Uncaria tomentosa* que se encuentra en el comercio, es significativamente heterogénea en cuanto a rendimiento y calidad de sustancias con actividad biológica, debido a la variabilidad de factores genéticos y de hábitat, que no son manejados en el proceso de extracción del bosque natural¹.

La presente investigación tiene como objeto de estudio la corteza de plantas desarrolladas en bosques naturales con diferentes condiciones de hábitat, caracterizados por los niveles altitudinales y de precipitación en donde se han desarrollado³. Bajo esta premisa se ha propuesto el siguiente objetivo: Determinar el contenido y tipo de alcaloides presentes en la corteza de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC proveniente de cuatro condiciones de hábitat seleccionados.

El conocimiento del aspecto ecológico de la especie es el factor más importante para el manejo y la obtención de materia prima de calidad; pero en este caso es el tema menos estudiado. Los estudios en este campo se concentran principalmente en la caracterización del medio natural en donde la especie ha sido reportada a nivel de muestras dispersas de su amplia distribución. Algunos autores reportan estudios de determinación edafo climática en una sub cuenca de la amazonía peruana⁴, mientras que estudios de campo, realizados por otros, determinan una variada y compleja distribución y características de poblaciones de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC en el bosque natural¹.

Existen muy pocas experiencias sobre manejo de la uña de gato en bosque primario, que es de donde proviene la mayor cantidad de corteza para la comercialización. Así, se describe una experiencia de manejo de la uña de gato para ser desarrollado en bosque primario⁵; sin embargo, el tipo de extracción aplicado y las condiciones de baja luminosidad no garantiza que el rebrote prospere por lo que se puede ocasionar la muerte de la planta y la disminución de población que es fuente de semillas y variabilidad genética⁶. De esta manera aún no se cuenta con mecanismos de control de la extracción de este recurso que disminuya los riesgos de su extinción por la sobre explotación, como también la desaparición del producto "uña de gato" en el mercado por la pérdida de credibilidad propiciada por la diversidad de calidades¹.

En productos naturales de uso medicinal el aspecto más importante que se debe considerar es el contenido de sustancias químicas con actividad biológica representada por los metabolitos secundarios, entre los que se encuentran alcaloides, glicósidos, taninos, esencias y resinas. Todos estos componentes (excepto las resinas), se encuentran almacenados en el interior de la célula vegetal, encerrados en vacuolas especializadas ubicadas en cualquier parte de la planta⁷. Así se tiene que los alcaloides pueden concentrarse en hoja, corteza, tallo, raíz, etc.; su presencia depende del metabolismo del vegetal y éste es variable de una especie vegetal a otra, e inclusive, de una variedad a otra⁷.

En *Uncaria tomentosa*, ha sido observado que hay tres variedades de corteza que pueden tener relación con el clima; así, la variedad gris blanquecina suele estar en condiciones frías y secas, el tipo rojo oscuro en clima cálido y húmedo y la variedad marrón amarillenta entre ambas condiciones climáticas; afirman los autores que no encontraron correlación entre el color de la corteza de la raíz y su contenido de alcaloides⁸. Comparando las muestras de varias plantas individuales llegan a la conclusión de que cambian de un patrón alcaloide a otro con el transcurrir del tiempo y para diferentes épocas del año; asimismo, muestras de varias plantas individuales también tenían variaciones en sus patrones alcaloides⁸.

Otros estudios concluyen que el grosor de tallos no es un factor muy determinante. Sin embargo, la tendencia es de un mayor contenido de mitrafilina en los tallos jóvenes (ramas con espinas) y mucho mayor en las hojas y peciolo⁹.

En el caso de la uña de gato, los análisis químicos existentes no han sido en su conjunto sistemáticamente realizados; es por ello que se reportan variadas diferencias en el contenido fitoquímico; es decir, el material analizado proviene de orígenes diversos, en donde factores genéticos o ambientales pueden estar incidiendo en una mayor o menor producción diferenciada de alcaloides, o simplemente las metodologías de análisis químico son diferentes. Esta situación no permite un análisis comparativo de resultados que contribuya con más eficacia al conocimiento de la especie.

PARTE EXPERIMENTAL

Características de la materia prima

Se hizo un trabajo previo de selección de lugares de colecta tomando en cuenta características climáticas generales de acuerdo a isotermas e isoyetas elaboradas por estudios realizados previamente¹⁰, complementado con información directa sobre el nivel altitudinal tomada en el trabajo de campo, tal como se muestra en la tabla 1. Con esta información se ubicaron bosques residuales en cuya composición florística se encuentre ejemplares de la especie en estudio³.

Tabla 1. Características climáticas de los lugares de cosecha

Parámetros	Localidades			
	IIAP Pucallpa	Nuevo Ucayali	El Porvenir	3 de octubre
Altitud (m.s.n.m.)	136	286	405	884
Precipitac. media anual (mm)	1324	4266	4471	4471
Temperatura media anual (°C)	25,07	24,06	24,98	24,98
Evapotransp.potencial (mm)	1150	1200	1200	1200

Las cosechas se realizaron manualmente utilizando machete y tijeras de podar, depositando el material de cada planta muestreada en envases de plástico separados, para garantizar la precisión de las mediciones y facilitar el transporte, conservación y procesamiento del material que será destinado a los análisis.

Para estos análisis se siguió una serie de procedimientos aplicados de acuerdo a los estándares establecidos para los estudios fitoquímicos de plantas medicinales sugeridas por el Centro de Productos Naturales de La Habana¹¹.

Tratamiento a la droga cruda

Posterior a la cosecha que se realizó el mismo día en los 4 lugares, se secó en horno solar; luego, molidas y tamizadas a 200 mallas para su conservación y estudios de control de calidad, cumpliendo con los requisitos exigidos por la farmacopea británica (BHP-2000) como son:

humedad gravimétrica menor a 10%; cenizas totales menor a 1%; cenizas insolubles en HCl menor a 0,02%; cenizas insolubles en agua menor a 0,1%; solubilidad óptima en etanol al 50%; ausencia de aflatoxinas por cromatografía de capa delgada semicuantitativa (T.L.C.), los cálculos se efectuaron según Norma NRSP-309/Cuba y la ISO 9014-Comité 54-Comisión E.

Extracción de alcaloides

Como prueba preliminar se aplicó el método de extracción ácida en donde se observaron pocos alcaloides con buena resolución; dos de ellos no estaban bien separados y otros se observaban deprimidos en los cromatogramas, frente a los del patrón secundario, por lo que fue necesario probar un nuevo método de extracción por la vía alcalina evaluándose los resultados por TLC, espectroscopía IR-TF, UV-visible (229 nm), HPLC-FR.

Método alcalino

A partir del resultado de cromatografía de gas de muestras diferentes de corteza y el tamizaje fitoquímico por diferentes métodos (Dragendorff, Mayer, Wagner, Marquis), se trató de descubrir la presencia o no de alcaloides en muestras sometidas a análisis por HPLC. Se aplicó el método alcalino de extracción amoniacal por maceración en etanol + NH₄OH + éter dietílico, utilizando un estándar secundario con igual tratamiento que la muestra y la misma instrumentación para HPLC fase reversa.

Identificación de alcaloides por T.L.C., UV, IR-TF

Se aplicaron 10 µL de las muestras en placas de 20 x 20 F254 sílica gel de Merck, evaluándose los valores de R_f de cada mancha, concordándose éstos con el patrón internacional de Wagner utilizado para alcaloides indólicos. Las manchas se rasparon, se eluyeron en metanol con AlCl₃ como desplazante y se encontraron las señales típicas de alcaloides oxindólicos a partir de longitudes de onda de 315 nm. Estos fueron corroborados por espectroscopía infrarroja en un equipo Varian IR-TF identificando cada grupo funcional característico en 3700-3200 cm⁻¹ para OH y NH₂; 1780-1620 para CO, 1600, 1550-1500 cm⁻¹ para aromáticos y 900-800 cm⁻¹ para metoxilos y metoxilendioxo.

Identificación de alcaloides clásicos por HPLC-FR

Cada muestra se evaluó por triplicado, reportándose los porcentajes de alcaloides por cada localidad estudiada. Se usó un estándar de 99-98% de pureza (Merck) los cuales aparecieron en el siguiente orden junto a la muestra (tabla 2):

Tabla 2. Alcaloides identificados en corteza de *Uncaria tomentosa* Wild DC

Orden	Tiempo de retención	Alcaloides
1	9,8 min	Especiofilina
2	12,2 min	Mitrafilina
3	13,2 min	Uncarina F
4	16,5 min	Pteropodina
5	17,3 min	Isomitrafilina
6	20,3 min	Rinchofilina
7	21,6 min	Isorinchofilina
8	27,1 min	Isopteropodina

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método ácido aplicado para corteza en todas las muestras tuvo una baja efectividad; los cromatogramas respectivos mostraron en todos los casos un alcaloide mayoritario que, por el tiempo de retención, corresponde a la uncarina F (tetracíclico); la pteropodina e isomitrafalina aparecen en baja concentración en el caso de la localidad IIAP, mientras que en las otras tres localidades aparecen deprimidos.

Tabla 3. Concentración de alcaloides en corteza cosechada en diferentes hábitats (g/100g)

Alcaloides	Porcentajes			
	IIAP 136 msnm	Nuevo Ucayali 286 msnm	El Porvenir 385 msnm	Tres de Octubre 884 msnm
Especiofilina	0,016		0,959	0,257
Mitrafalina	0,412	0,286	* 1,124	* 3,904
Uncarina F	0,114	0,082	0,047	0,076
Pteropodina	* 2,816	* 10,828	0,421	1,398
Isomitrafalina				
Rincofilina	1,123			
Isorincofilina				
Isopteropodina				
TOTALES	4,481	11,196	2,551	5,635

* Alcaloide mayoritario en cada localidad

En la tabla 3 se muestra los contenidos promedio de alcaloide por cada localidad logrados con el método de extracción alcalino; los cromatogramas respectivos muestra los picos más definidos en todos los casos; sin embargo, los alcaloides mayoritarios son diferentes.

Así se tiene que para el caso de las localidades de IIAP y Nuevo Ucayali, el alcaloide mayoritario es la pteropodina (tetracíclico), con menor concentración en IIAP y alta concentración en Nuevo Ucayali, mientras que para El Porvenir y Tres de Octubre aparece como mayoritario la mitrafalina (pentacíclico); coincidentemente las dos primeras localidades se encuentran a una menor altitud (136 y 286 m.s.n.m.), mientras que las otras dos, relacionadas a la mitrafalina están a mayor altitud (385 y 885 m.s.n.m.). Esto puede indicar el efecto de la presencia de estos alcaloides con las características ambientales de cada localidad; se puede decir que en este caso, mayores concentraciones de alcaloides tetracíclicos se han presentado a menor altitud, mientras que los penta cíclicos se manifestaron en mayor concentración a mayores altitudes.

De otro lado, en cuanto a alcaloides totales, la menor concentración se presenta en las localidades de IIAP y El Porvenir; éstos tienen suelos más ácidos con mayor contenido de arena; mientras que los suelos de Nuevo Ucayali y Tres de Octubre tienen suelos con mayor contenido de arcilla, pH más alto, ligado a un mayor contenido de materia orgánica.

En la figura 1 se observan picos bien definidos pero a bajas concentraciones, en orden descendente la rinchofilina como mayoritario, seguido de la pteropodina, a menor concentración la uncarina F, mitrafilina y especiofilina que aparece deprimida. Las condiciones de suelos ácidos y pobres en nutrientes caracterizan a esta localidad.

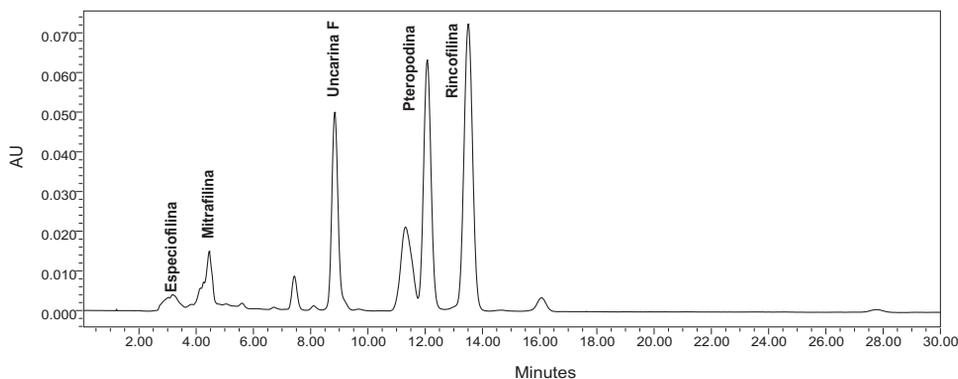


Figura 1. Extracción alcalina, localidad IIAP (136 msnm) (Muestra 2)

En la figura 2 se observa una alta concentración de pteropodina como mayoritario, y a baja concentración la mitrafilina; la uncarina F aparece deprimida.

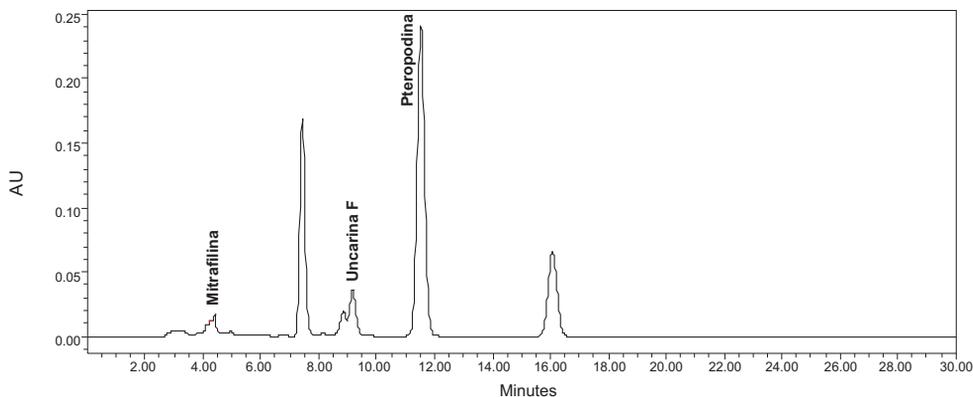


Figura 2 Extracción alcalina, localidad Nuevo Ucayali (286 msnm) (Muestra 1)

A diferencia de la localidad IIAP, en la localidad El Porvenir (figura 3) se presenta la pteropodina como mayoritario. En el caso de IIAP el mayoritario es la rinchofilina, seguido de pteropodina y uncarina F (tetracíclico). Especiofilina y mitrafilina, se presentan a muy bajas concentraciones, igual que en IIAP y no aparece la rinchofilina a diferencia de IIAP que si se presenta, mientras que la uncarina F (tetracíclico), aparece algo deprimida en este caso, el cual sugiere la alta capacidad del método alcalino de deprimir tetracíclicos.

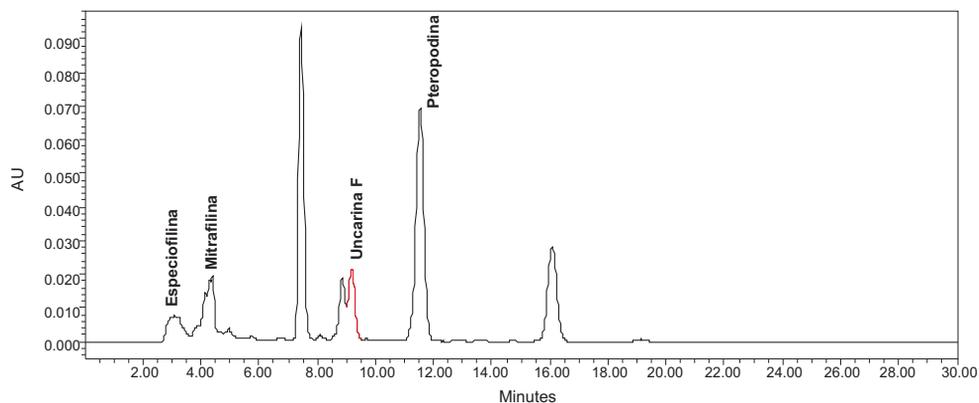


Figura 3. Extracción alcalina, localidad El Porvenir (385 msnm) (Muestra 4)

En la figura 4, se puede observar que el alcaloide mayoritario de esta localidad es también la pteropodina, seguido de la uncarina F (tetracíclico). A más baja concentración se presenta la mitrafilina, mientras que la especiofilina aparece muy deprimida.

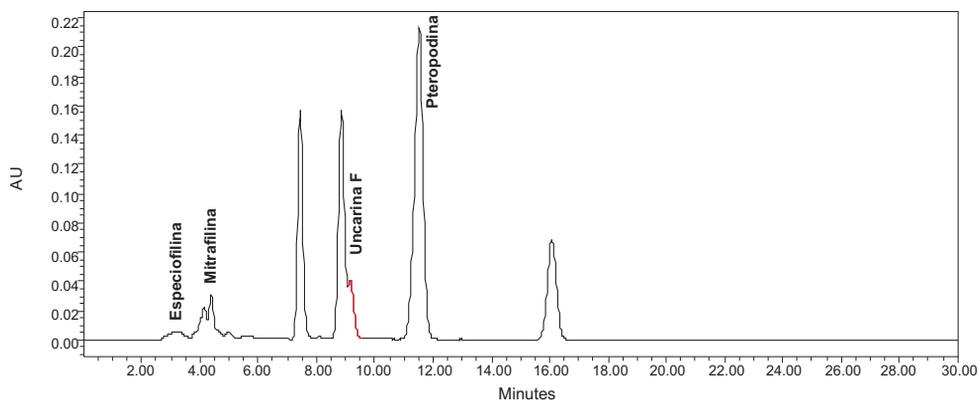


Figura 4. Extracción alcalina, localidad Tres de Octubre (884 msnm) (Muestra 3)

CONCLUSIONES

- La aplicación del método alcalino de extracción de alcaloides ha permitido obtener una mayor cantidad de alcaloides con la depresión de tetracíclicos.
- La corteza presenta altas concentraciones de alcaloides tetracíclicos en relación a la presencia de pentacíclicos.
- Existen diferencias significativas en el contenido de alcaloides de corteza de diferentes localidades estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Domínguez, G. Uña de gato y producción sostenible. Ed. Publifor, UNALM – Facultad de Ciencias Forestales Lima, Perú. 1997. 138 p
2. Kani, I., Faik, Y., Aytog, A. Los bosques la diversidad biológica y el mantenimiento del patrimonio natural. En: Diversidad Biológica Forestal y el Mantenimiento del Patrimonio Natural. Actas del XI Congreso Forestal Mundial. 1997. Vol. 2.
3. Domínguez, G. y Castillo, A. Crecimiento de un clon de *uncaria tomentosa* (willd.) dc. en cuatro condiciones de hábitat. Aceptado para publicación en: Ecología Aplicada vol 6 dic.07, Departamento de Biología – UNALM. Lima-Perú. 2007.
4. Quinteros, B. Distribución natural y determinación edafoclimática de la *Uncaria tomentosa* (Wild) D.C. y *Uncaria guianensis* (Aubl) Gmel (Uña de gato) en la cuenca del Río Aguaytía. Tesis para optar el Título de Ingeniero Forestal, Facultad de Forestales. Universidad Nacional de Ucayali. 2004. 83 p.
5. Barriga, C. Experiencias en el Plan de Manejo Forestal para la Producción Sostenible de uña de gato (*Uncaria tomentosa* (Willd)DC.. En: I Reunión Internacional del Género *Uncaria* “Uña de gato”, 16 al 18 de agosto. 2001. p. 25-36.
6. Wetzell, A. Análisis de los factores de sitio que influyen en la regeneración natural de “uña de gato” *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. y *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel., en el bosque nacional Alexander Von Humboldt. Tesis para obtener el Título de Bióloga. Facultad de Ciencias, UNALM. Lima, Perú. 2005. 180 p.
7. Palacios, J. Plantas medicinales nativas del Perú. Serie Ciencias. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC). Lima-Perú, 1997. 292 p.
8. Laus, G. Y Keplinger, K. Separation of stereoisomeric oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*. A. 1994. 662, p. 243-249.
9. Laus, G., Brossner, D. Y Keplinger, K. Alkaloids of Peruvian *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry*. 1997. Vol 45. N° 4. p 855-860.
10. IIAP. 1997. Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana.
11. García, J. de J. Curso de capacitación “Metodología Básica para el estudio Fitoquímico de Plantas Medicinales – Técnicas analíticas”. Notas del curso. Universidad Nacional Agraria La Molina. 2006. 88 p.

CINÉTICA DE LA BIOADSORCIÓN DE IONES CADMIO (II) Y PLOMO (II) DE SOLUCIONES ACUOSAS POR BIOMASA RESIDUAL DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)

Myriam Eugenia Pacheco Tanaka^a, Jorge Paúl Pimentel Frisancho^a,
Wilfredo Fernando Roque Villanueva^{a,b}

RESUMEN

La biomasa residual del café, químicamente modificada, fue utilizada para evaluar la adsorción y la cinética de los iones plomo (II) y cadmio (II) de soluciones acuosas a escala de laboratorio en proceso Batch. Experimentalmente se comprueba que el biosorbente preparado tiene preferencia por el ion plomo (II) frente al ion cadmio (II). El proceso de adsorción está representado por el modelo cinético de pseudo primer orden, Elovich y reversible de primer orden.

Palabras clave: Adsorción, equilibrio, cinética, taninos, biosorbente.

BIOSORPTION KINETIC OF CADMIUM (II) AND LEAD (II) IONS FROM AQUEOUS SOLUTIONS BY *biomass* RESIDUAL OF COFFEE

ABSTRACT

Residual biomass of the chemically modified coffee was used to evaluate the adsorption and the kinetics of lead (II) and cadmium (II) ions from aqueous solutions scale of laboratory in process batch. Experimentally it is verified that the adsorbent has preference by the lead (II) ion, in front of cadmium (II) ion. The process of adsorption is represented by the kinetic model of pseudo first order and model of Elovich and reversible of first order.

Key words: adsorption, equilibrium, kinetic, tannin, biosorption.

INTRODUCCIÓN

La continua descarga de relaves mineros a fuentes acuíferas es aún un problema de nivel mundial en espera de solución¹. Diversos metales pesados bajo su forma iónica son descargados a ríos y mares especialmente el cadmio y plomo provenientes de la industria metal-mecánica, curtiembre, fotográfica, de baterías y metalúrgica, sin el debido control ambiental, sobrepasando en muchos casos los valores máximos permisibles por legislaciones internacionales². El establecimiento de normas rígidas, así como la conciencia ambiental están apuntando para la necesidad de seguir investigando a fin de encontrar nuevas tecnologías para la remoción de metales tóxicos del ambiente.

Las técnicas usadas para eliminar metales tóxicos de aguas residuales de desecho son filtración, electro-deposición, resinas de intercambio iónico, ósmosis, micro-precipitación,

^a Facultad de Ingeniería Química Universidad Nacional del Altiplano

^b Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa
Av. El Ejército 329 Casilla Postal 291 Puno-PERÚ

* rvnando@gmail.com

etc. Desafortunadamente, dichos métodos no encuentran efectividad ante bajas concentraciones de metales pesados en solución, tornándose altamente costosos y de bajo rendimiento en esas condiciones.

Dentro de este contexto, la biotecnología ha separado dos grandes áreas dentro del mismo objetivo: bioacumulación y biosorción. La primera es considerada como un proceso activo de eliminación de metales mediante mecanismos metabólicos involucrando masa viva, mientras que la biosorción es entendida como un proceso pasivo con mecanismos netamente físico-químicos, por medio de biomasa muerta. Por lo tanto, la biosorción es un área de investigación con muchos aportes a la comunidad industrial, por ser una alternativa técnica y económicamente viable, por su capacidad de depuración y de bajo coste de operación que tiene, y por ser considerada una tecnología “limpia” en la eliminación de metales tóxicos y de alta ley, de soluciones acuosas^{3,4}.

La capacidad de biosorción de estas biomásas se debe a la potencial cantidad de compuestos orgánicos capaces de secuestrar y/o intercambiar iones metálicos, entre los cuales destacan: taninos, polialginatos, péptidoglucanos, polisacáridos, glicoproteínas, fucanoides, compuestos heterocíclicos, flavonoides^{5,6} etc., en los cuales los centros atrayentes de cationes son los grupos funcionales amino, hidroxilo, carboxilato, fosfato, sulfhidrilos, conocidos por su potencial nucleófilo.

En los últimos años se ha estudiado diversos tipos de biosorbentes, especialmente algas y residuos agrícolas, analizando su capacidad para retener diversos metales. En el presente trabajo se utilizó como biosorbente, la biomasa residual del café (fruto cereza de café despojado de la pulpa o epicarpio), que es el principal subproducto de la agroindustria cafetera.

La industria cafetalera produce este producto en grandes cantidades y sus costos son muy bajos o nulos; además, genera en ocasiones problemas para su gestión, por lo que su uso como biosorbente de metales pesados se convierte en una alternativa muy deseable y que se convertiría en dar un valor agregado al beneficio del café antes de su eliminación final.

Se sabe que por cada dos toneladas de café verde se produce también una tonelada de biomasa residual de café (en peso seco). A nivel mundial se producen más de 7 000 000 de TM de café por año.⁷

El presente trabajo pretende obtener en la primera etapa un biosorbente mediante la inmovilización de taninos presentes en la cáscara de café, seguido de la caracterización mediante el estudio IR a fin de determinar los grupos funcionales presentes que puedan participar en la biosorción.

En la segunda etapa se propone evaluar el proceso de la biosorción de iones metálicos Pb (II), y Cd (II) en un sistema mono-metálico, a escala de laboratorio, de soluciones diluidas utilizando este biosorbente, y evaluar también los parámetros: temperatura, granulometría, pH y tiempo de adsorción. Posteriormente y en base a los resultados obtenidos, estudiar la cinética y el equilibrio de biosorción en proceso discontinuo; ensayar modelo predictivos: pseudo-primer orden, pseudo-segundo orden, Elovich, de difusión intrapartícula y de primer orden reversible que ayuden a describir el proceso.

PARTE EXPERIMENTAL

Los trabajos experimentales se han realizado en la ciudad de Puno, a condiciones ambientales de 487 mm de Hg de presión, altitud a 3 832 msnm y una temperatura variable entre 10 y 20 °C registrados durante la ejecución de las pruebas experimentales.

Sólido sorbente

En todos los experimentos se ha utilizado la biomasa residual del grano de café, el cual ha sido obtenido luego del proceso denominado “beneficio del café” vía húmeda de los productores de café del distrito de San Juan del Oro provincia de Sandia del departamento de Puno.

Para realizar el estudio granulométrico del residuo, se tomaron muestras de 100 gr que previamente han sido secadas, triturada y seleccionadas mediante una tamizadora de alta vibración, malla 30 y tamaño de partículas de 0,50 mm.

Obtención y evaluación del extracto acuoso concentrado (EAC) de la biomasa residual de café

Considerando que la obtención del extracto de tanino es con fines de cuantificación se propone obtenerlo de acuerdo con lo que presentan Waterman-Mole (1994) y González *et al.* (1989), con respecto a los solventes y condiciones de extracción para compuestos fenólicos; los extractos se obtuvieron a partir de la biomasa residual de café seca y triturada, tamizada a un tamaño de partícula de malla 30 y 60.

Se obtuvieron extractos en etanol acuoso al 50 %. En los extractos etanólicos se utilizaron 10 g de cáscara y 100 ml de etanol al 50 %, se maceraron a temperatura ambiente durante 24 horas y se filtraron sobre papel filtro. A la cáscara remanente se le adicionaron 100 ml de solvente fresco y se repitió el proceso. Los extractos obtenidos de la primera y segunda maceración se combinaron y concentraron a temperatura de 35°C aplicando vacío, obteniendo un extracto acuoso concentrado (EAC), a partir del cual se realizaron los análisis.

Se obtuvo el EAC del material vegetal antes y después de la inmovilización de taninos, y se utilizó como solvente una solución de 1:1 de etanol-agua.

Sustancia de referencia

Como sustancia de referencia se utilizó ácido tánico puro para análisis, de la firma Merck.

Para la medición de la absorbancia se empleó un espectrofotómetro UV-VIS SPECTRONIC GENESYS serie 10.

Método espectrofotométrico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de la biomasa residual de café

Fundamento

Los taninos vegetales presentes en la corteza de los árboles constituyen una mezcla de grupos fenólicos los mismos que se oxidan por el reactivo Folín-Ciocalteu el cual está formado por mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que se reduce, por acción de fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}). La coloración azul producida posee una absorción máxima aproximadamente a los 700 nm y es proporcional a las tasa de compuestos fenólicos, obteniéndose con esta determinación el porcentaje de taninos reportado como ácido tánico.

Reactivos

Reactivo de Folín-Ciocalteu adquirido de Laboratorios Merck., *solución de Carbonato de sodio al 20 %*. (p/v), solución standard de 25 ppm de ácido tánico.

Determinación de fenoles en EAC (expresados como ácido tánico)

El análisis de fenoles totales se realizó por el método de Folín-Ciocalteu, de acuerdo con lo establecido por Waterman-Mole (1994) y Scalbert (1992), utilizando ácido tánico como estándar, por lo que los resultados se expresan como porcentaje de ácido tánico en cada extracto.

Este es un método espectrofotométrico que consiste en tomar 2 ml de EAC en un matraz de 25 ml que contenga de 6 a 7 ml de agua desionizada, luego 2 ml del reactivo comercial de Folín-Ciocalteu. Después de 1 min. y antes de 8 min. se agregan 1 ml de Na_2CO_3 al 20%, se afora a 25 ml con agua desionizada, se agita, homogeniza, enrasa y se dejó reposar por 5 min. Leer la absorbancia de dichas soluciones a 700 nm después de transcurridos dos minutos.

Curva patrón

Se pesó con precisión 25 mg de ácido tánico, se transfirieron a un matraz aforado de 1000 ml y se completó el volumen con agua destilada, a partir de la cual se realizó una curva de calibración con las siguientes concentraciones: 0, 4, 7, 10, 13, y 16 mg/L.

Especificidad: Se analizaron muestras que contenían solamente la sustancia de interés (taninos) y otras a las que se les secuestraron los taninos con una solución de gelatina al 20%.

Repetibilidad: Se repitió el método espectrofotométrico descrito anteriormente, tres veces para cada muestra, el mismo día y con el mismo equipo.

Reproducibilidad: Se repitió el método espectrofotométrico descrito anteriormente, tres veces para cada muestra, en días diferentes y con el mismo equipo.

Linealidad: Con los datos obtenidos se construyeron curvas de absorbancia (A) contra concentración (ppm), y se efectuó un análisis de regresión lineal.

Obtención del adsorbente

Inmovilización de taninos (medio ácido)

Pesar 10 gramos de la biomasa residual de café, con tamaño de partícula seleccionado con malla 30 y 60, previamente secada en la estufa durante un tiempo de 4-6 horas y a una temperatura de 98-110 °C. Verter la muestra en un balón de 500 mL que contenga 1,5 mL de formaldehído 200 mL de agua destilada y 0,2 mL de HCl concentrado a una temperatura constante de 60-80°C. Calentar la mezcla reaccionante durante un tiempo de 30-45 minutos y después agitar (a una velocidad de agitación entre 45 y 70 rpm) durante un tiempo entre 20 y 35 min. Pasado este tiempo filtrar el material obtenido y el residuo sólido lavar con suficiente cantidad de agua destilada. Secar el producto durante un período entre 3 y 5 horas a una temperatura entre 100 y 105°C. Se obtendrá de esta forma el adsorbente.

Análisis químico.

La caracterización química consiste en la determinación de los grupos funcionales activos del adsorbente (cáscara de café), se realizaron en la Universidad de Surrey de Inglaterra en un espectrofotómetro de Infra Rojo, Modelo Spectrum 4500, utilizando como diluyente de la muestra yoduro de potasio.

Preparación de la solución patrón de metales (plomo y cadmio)

Se preparó soluciones estándar con una concentración de 1000 ppm de Pb (II) y Cd (II) respectivamente a partir de la sal nitrato (Aldrich grado analítico).

Estudio de la adsorción en batch

Los factores que afectan la capacidad del adsorbente fueron examinados en un sistema batch. Las soluciones del ion metálico fueron preparadas diluyendo la solución stock de 1000 ppm. Para la ejecución de los experimentos en proceso discontinuo se ha evaluado metal por metal Pb (II) y Cd (II), y se ha contado con una instalación consistente en un baño termostático, un agitador magnético, (todos los experimentos fueron realizados pesando exactamente 1 gramo de adsorbente y disolviéndolos en 50 ml de una disolución de Pb y Cd a una concentración de 150 ppm, y luego se ajustó el pH al valor deseado).

Una vez transcurrido el tiempo de operación (240 minutos), se extrae del reactor la fase

líquida se centrifuga y se filtra la disolución sobrenadante, desechándose el biosorbente. Finalmente, se analiza la fase líquida, junto con una muestra de disolución original, para determinar la concentración inicial y final del catión metálico, y por lo tanto, obtener el porcentaje del mismo que ha sido retirado por el biosorbente estudiado.

La evaluación de la capacidad de adsorción por el adsorbente hacia los cationes de Pb, se evaluaron por lotes analizando la concentración del Pb antes y después del equilibrio mediante titulación complexométrica con EDTA y mediante absorción atómica en un equipo modelo 3100 de Perkin Elmer de la Universidad de ORURO (Bolivia), dotado de un cátodo hueco mono cátodo con una llama aire-acetileno, recomendada para ambos cationes.

Se han utilizado soluciones estándar para que la concentración quede dentro del rango lineal del espectrofotómetro. Todas las mediciones se realizan por triplicado obteniéndose un valor promedio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del bioadsorbente

Pagnanelli, Bressani, determinaron el porcentaje de taninos (polifenoles) 2,90 % (base seca)^{6,8}.

Cuantificación de taninos

El primer parámetro evaluado fue la linealidad de la curva de calibración del ácido tánico; esta curva de calibración, en el rango de las concentraciones estudiadas, corresponde a la línea recta de ecuación: $Y = 0,1372X - 0,1556$, (con un coeficiente de correlación de 0,9963.)

La muestra estudiada tuvo una absorbancia de 0,242 lo cual representa un % de taninos de 2,23 de acuerdo a la curva de calibración que se realizó; luego de inmovilizar el tanino se midió la absorbancia obteniendo 0,085 lo cual representa un porcentaje de taninos de 0,82; obteniendo un rendimiento en la inmovilización de 63,23 %

Los taninos disminuyen en el extracto luego de una reacción de polimerización por condensación del biosorbente, esto determina que la diferencia corresponde a la cantidad de taninos que ha sido inmovilizado retenido por el adsorbente.

Estudio infrarrojo del bioadsorbente

Para evaluar el efecto de la retención de los cationes Pb y Cd sobre la posición e intensidad de vibración, se han determinado los espectros IR mostrados en las figuras 1 y 2; con objeto de compararlos se han incluido el espectro IR del biosorbente antes de su uso, a fin de observar cómo varía la transmitancia; para ello se han elegido las condiciones de operación, concentración inicial de Pb (II) y Cd (II), tiempo, temperatura, pH y granulometría.

De los espectros se recogen los picos más significativos junto con la intensidad y posición; se muestran las principales diferencias encontradas en las bandas de vibración antes y después del proceso de bioadsorción.

En bibliografía se encuentran numerosas referencias que indican la importante participación de estos picos hacia 3200 cm^{-1} en la retirada del plomo y cadmio que es atribuido al O-H de los grupos carboxilo.

Asimismo, se observa una banda variada e intensa centrada alrededor de $1605,95\text{ cm}^{-1}$ que correspondería a los grupos carbonilo presentes y al doble enlace C=C aromático; la presencia de polímeros orgánicos presentes en la cáscara del café se atribuye una alta capacidad de adsorción, la que se debe a que es un sorbente rico en grupos funcionales superficiales con sitios negativos, destacándose vibraciones de alargamiento O-H alcohólicos o fenólicos, vibraciones del C=O de cetonas, ésteres, quinonas o ácidos carboxílicos, se confirma la

presencia del grupo carboxilo, por la banda de absorción intensa y bastante amplia centrada en $3288,05\text{ cm}^{-1}$ y que correspondería al alargamiento O-H. Las bandas de alargamiento C-H más débiles se encuentran superpuestas sobre la banda de O-H al igual que las otras bandas de O-H fenólico y vibraciones de aromáticos CH que en parte son muy similares para los dos cationes, confirmando la presencia de grupos carboxilos fundamentalmente y por la variación del pH durante la biosorción, siendo mayor para el Pb que el Cd lo que parece indicar que la biosorción del Pb (II) y Cd (II) puede llevarse a través de un proceso de intercambio iónico. También puede observarse una menor intensidad en las bandas de vibración para el Cd que el Pb lo que parece estar de acuerdo con la menor retención del Cd que el Pb con este biosorbente.

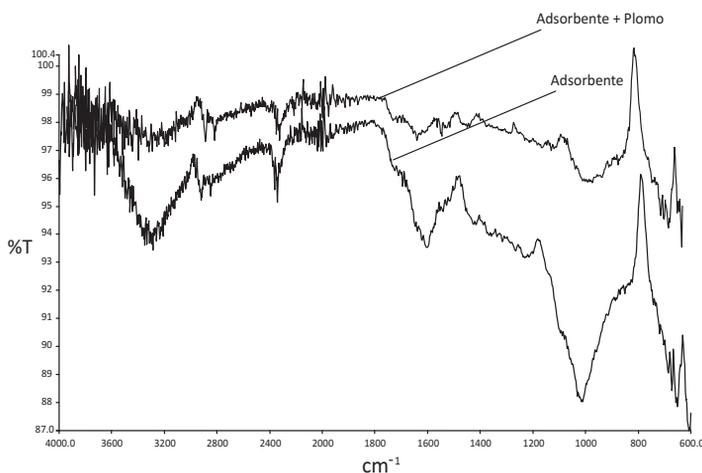


Figura 1. Espectro IR para el adsorbente y después de la adsorción de Pb (II)

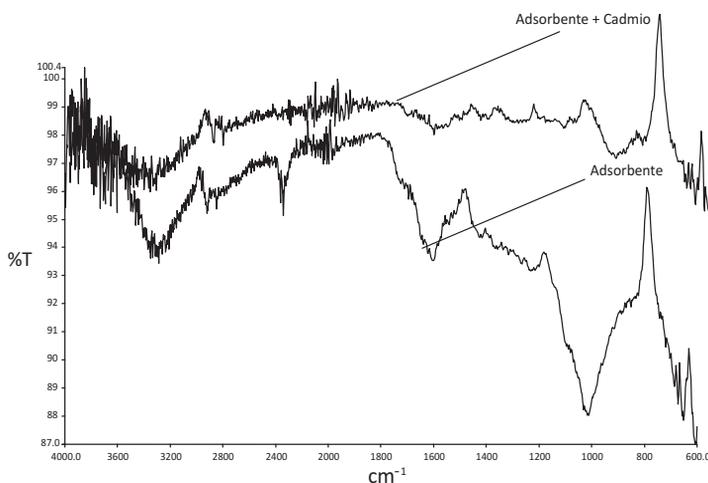


Figura 2. Espectro IR para el adsorbente y después de la adsorción de Cd (II)

Cinética de adsorción

Para estudiar la cinética de adsorción del Pb (II) y Cd (II) se han seleccionado 5 modelos propuestos en la bibliografía^{9,10}: modelo cinético de pseudo primer y segundo orden, Elovich, difusión intrapartícula y primer orden reversible; para el ajuste de los resultados experimentales se ha analizado la variación de pH durante el tiempo de contacto del metal y el sólido adsorbente; se ha controlado la temperatura a 15 °C velocidad del proceso y tamaño de partícula malla 30. En la figura 3 se muestra la cinética para el Pb (II) y Cd (II).

Influencia del pH

El pH de la solución es una de las variables más importantes en el control del proceso de biosorción de metales pesados y puede influir en sus formas iónicas que se encuentran en disolución como el estado de los grupos funcionales responsables de la unión del metal a la superficie del sólido; a bajos valores de pH, los iones H⁺ se unen a grupos funcionales que quedan cargados positivamente e impiden, por tanto, la unión de los cationes metálicos por la competencia que existe entre ambos iones (Yetis¹¹ et al. 2000).

Se observa una importante influencia del pH en relación a la concentración de los iones en solución ya que en rango de 5 y 3,5 existe la mayor retención Pb y Cd (116-85 ppm) mientras que a partir de 3,5 la concentración de los iones Pb y Cd es mínima, esto significa que existe un efecto de intercambio iónico; habría que trabajar con una mayor cantidad de biosorbente por la saturación de los sitios en este rango de pH.

Tiempo máximo de adsorción

Los resultados de la máxima adsorción con respecto al tiempo se muestran en la tabla 1 y los resultados se interpretan y se discuten por separado catión por catión en la siguiente sección.

Para la determinación del tiempo máximo de adsorción de Pb (II) y Cd (II), y nitrato como anión, se realizó en un prueba por lotes; en esta prueba se utilizó una concentración inicial uniforme de Pb igual a 150 ppm. Se presentan los siguientes resultados para el Pb y Cd a 15 °C y tamaño de partícula malla 30.

Tabla 1. Resultados de absorción respecto al tiempo del plomo y cadmio

N°	t(min)	Plomo			Cadmio		
		Y(ppm/g)	% A	pH	Y(ppm/g)	%A	pH
1	0	0	0	5,50	0	0,00	5,50
2	2	36,84	32,48	3,88	35,08	23,39	3,68
3	10	57,93	42,62	3,86	51,09	34,06	3,72
4	15	71,88	47,94	3,83	54,91	36,61	3,74
5	30	80,56	53,71	3,79	66,69	44,46	3,68
6	60	100,8	67,20	3,72	73,72	49,15	3,59
7	90	102,48	68,32	3,55	74,85	49,90	3,59
8	120	108,21	72,14	3,45	79,19	52,75	3,57
9	180	112,53	75,02	2,72	83,92	55,95	3,52
10	240	116,65	77,77	2,62	84,34	56,23	3,51

Tabla 2. Resumen del ajuste de adsorción de plomo a un modelo cinético a 15°C y malla 30.

Modelo	Ecuación	R ²
Pseudo primer orden	$\text{Log}(Y_{\text{max}} - Y) = -0,176t + 2,302$ $K_1 = 0,405328 \text{ min}^{-1}$	0,975
Pseudo segundo orden	$t/Y = 0,1822t - 0,3241$ $K_2 = -0,1024 \text{ g/ mg min}$	0,8604
Elovich	$Y = 0,497 \ln t + 1,865$ $\alpha = 21,184 \text{ mg/g min}, \quad \beta = 2,012$	0,980
Difusión intrapartícula	$\text{Log } \% A = 0,239 \log t + 0,403$ $K_{\text{id}} = 2,529 \text{ h}^{-1}$	0,938
Reversible de primer orden	$\text{Ln}(1 - \theta) = -0,511t$ $K_e = 0,511 \text{ min}^{-1}$	0,920

Representación de cinéticas de adsorción mediante los Modelos Cinéticos

La cinética de adsorción del Pb (II) y Cd (II) fue analizada usando los modelos cinéticos de pseudo primer y segundo orden, Elovich, difusión intrapartícula y primer orden reversible; el ajuste de los datos experimentales para el Pb se puede observar en las figuras 4 a 8 y para el Cd en las figuras 10 a 14.

Los resultados experimentales ajustados demuestran que los modelos de pseudo primer orden y Elovich son los que mejor reproducen los valores obtenidos y explican al 97,5 y 98 % de incertidumbre, (se muestra un resumen en la tabla 2). La retención de Pb (II) aumenta a medida que pasa el tiempo; sin embargo disminuye al alcanzar el equilibrio. Para analizar el mecanismo probable de interacción entre el sólido y adsorbente se ha medido la variación de pH en el tiempo. Los valores de pH en los primeros minutos descienden rápidamente hasta alcanzar un valor de 2,62 y es el punto donde se consigue la máxima adsorción 77,77% (figura 9).

Los resultados experimentales ajustados demuestran que para el catión Cd (II) los modelos pseudo primer orden, Elovich y reversible de primer orden son los que mejor reproducen los valores obtenidos y explican al 98, 93 y 99 % de incertidumbre, (se muestra un resumen en la tabla 3). La retención de Cd (II) es menor que la obtenida con el Pb (II) en este caso también ocurre un proceso reversible lo que puede estar relacionado a que el Cd (II) tendría menor afinidad hacia el sólido adsorbente y que la interacción sólido-metal es más débil. El pH de la solución de Cd (II) disminuyó de 5,5 a 3,51 que explicaría una menor retención de este metal por el adsorbente. Los valores de pH en los primeros minutos descienden rápidamente hasta alcanzar un valor de 3,51 y es el punto donde se consigue la máxima adsorción 56,23% (figura 15).

El hecho que en medios ácidos disminuya el porcentaje del metal atrapado, podría ser el resultado de la competencia que existe entre los protones H⁺ y iones Pb (II) y Cd (II) por los lugares de sorción con una aparente predominio de los protones de hidrógeno, lo que limita la aproximación de los cationes del metal como consecuencia de las fuerzas de repulsión. A

medida que se aumenta el pH del medio; por una parte este efecto de competencia disminuye, y por otra parte la solubilidad del Pb (II) y Cd (II) también disminuye favoreciendo la formación de hidróxidos del metal correspondiente.

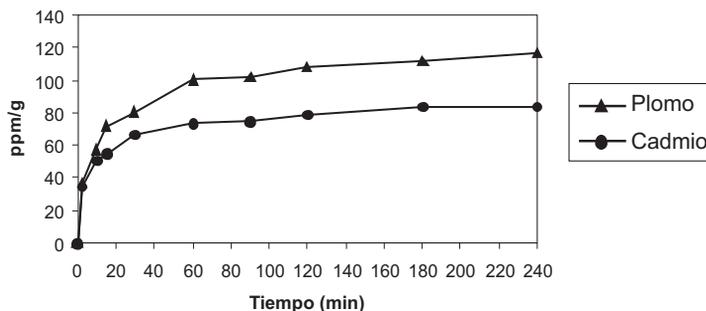


Figura 3. Cinética de bioadsorción de Pb (II) y Cd (II)

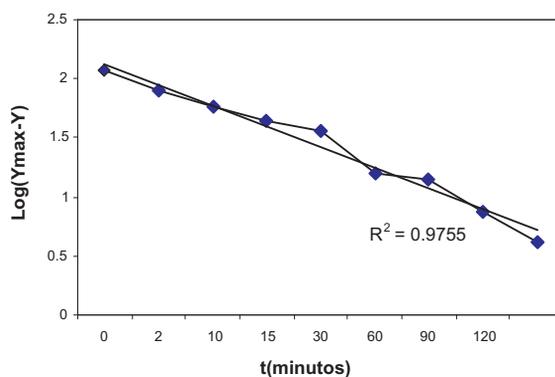


Figura 4. Ajuste de datos cinéticos al modelo de pseudo primer orden de Pb (II)

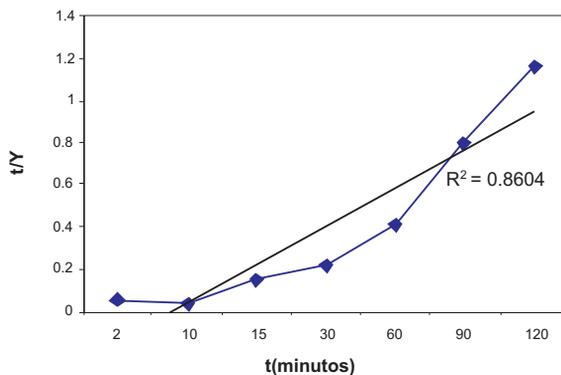
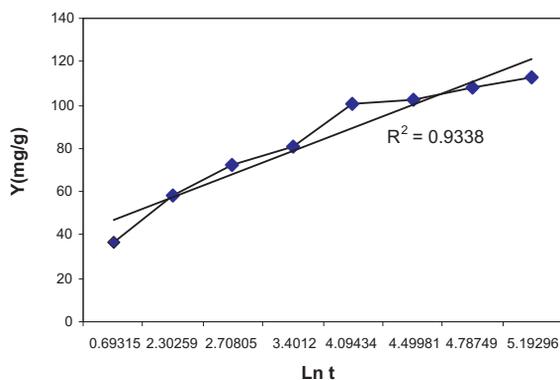
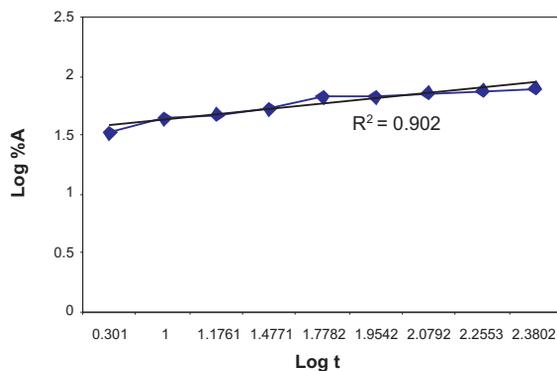


Figura 5. Ajuste de datos cinéticos al modelo de pseudo segundo orden de Pb (II)

Tabla 3. Resumen del ajuste de adsorción de cadmio a un modelo cinético a 15°C y malla 30.

Modelo	Ecuación	R ²
Pseudo primer orden	$\text{Log}(Y_{\text{max}} - Y) = -0,168t + 2,4971$ $K_1 = 0,3869 \text{ min}^{-1}$	0,9849
Pseudo segundo orden	$t/Y = 0,0977t - 0,1771$ $K_2 = -18,552 \text{ g/ mg min}$	0,7769
Elovich	$Y = 15,574 \ln t + 74,326$ $\alpha = 1850,336 \text{ mg/g min}, \beta = 0,064296$	0,9307
Difusión intrapartícula	$\text{Log } \% A = 0,0543 \log t + 1,3864$ $K_{\text{id}} = 23,3445 \text{ h}^{-1}$	0,873
Reversible de primer orden	$\text{Ln}(1 - \theta) = -0,486t$ $K_e = 0,486 \text{ min}^{-1}$	0,9904

**Figura 6.** Ajuste de datos cinéticos al modelo de Elovich de Pb (II)**Figura 7.** Ajuste de datos cinéticos al modelo de difusión intrapartícula de Pb (II)

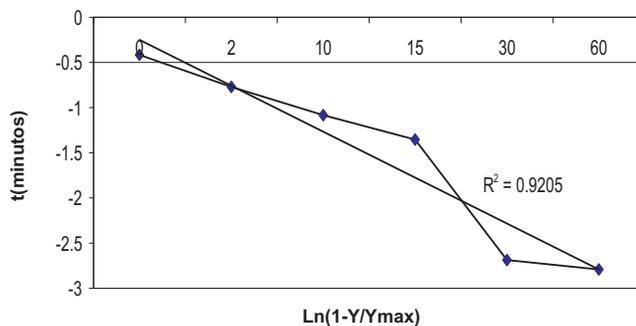


Figura 8. Ajuste de datos cinéticos al modelo reversible de primer orden de Pb (II)

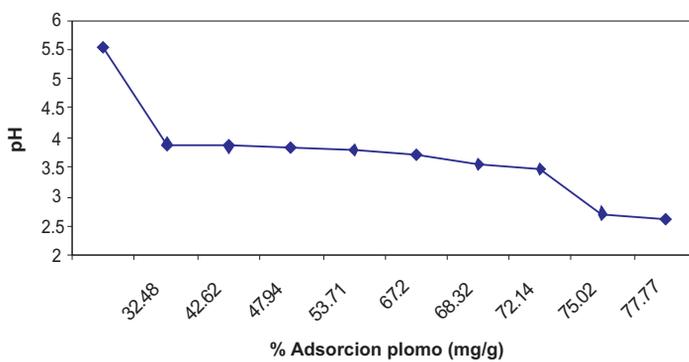


Figura 9. Seguimiento del pH durante los experimentos de biosorción de Pb (II)

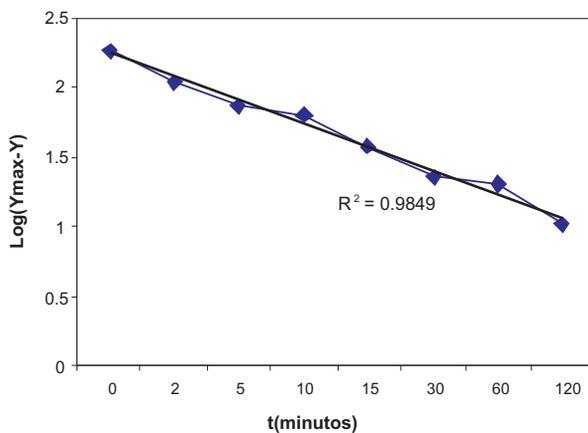


Figura 10. Ajuste de datos cinéticos al modelo de pseudo primer orden de Cd (II)

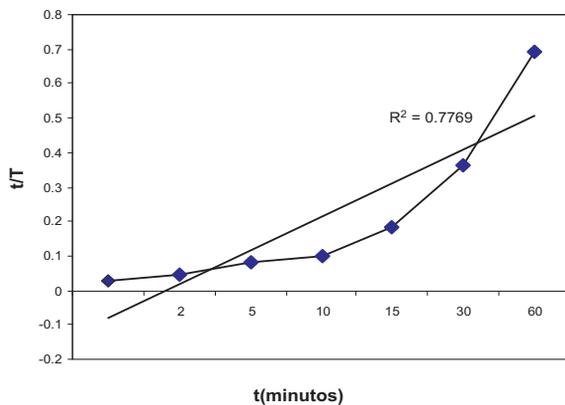


Figura 11. Ajuste de datos cinéticos al modelo pseudo segundo orden de Cd (II)

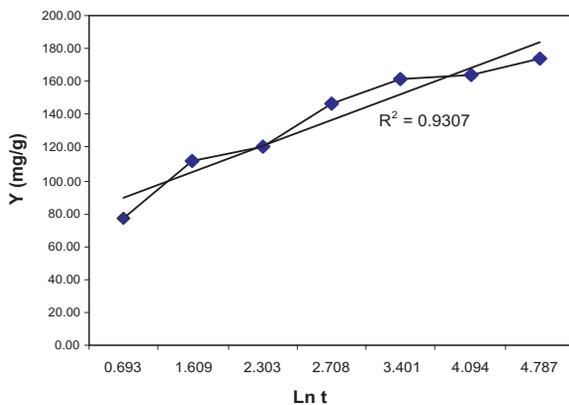


Figura 12. Ajuste de datos cinéticos al modelo de Elovich de Cd (II)

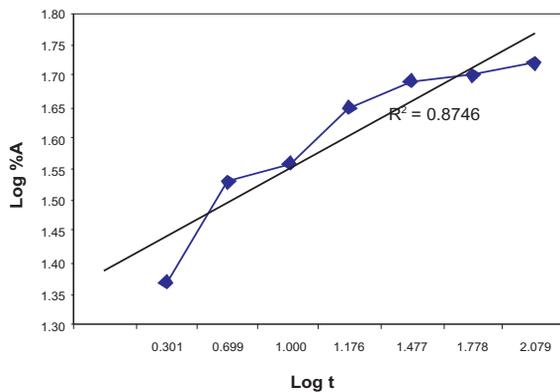


Figura 13. Ajuste de datos cinéticos al modelo de difusión intrapartícula de Cd (II)

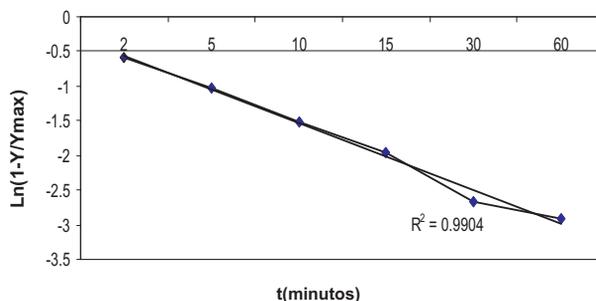


Figura 14. Ajuste de datos cinéticos al modelo reversible de primer orden de Cd (II)

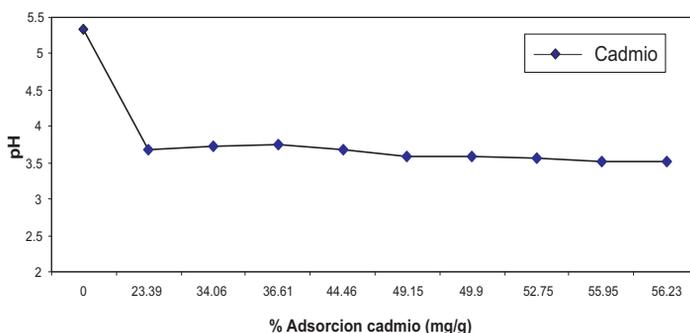


Figura 15. Seguimiento del pH durante los experimentos de biosorción de Cd (II)

CONCLUSIONES

- La biomasa residual del café previamente modificada resulto ser efectiva en la remoción de iones Cd (II) y Pb (II).
- Los espectros infrarrojos del adsorbente analizados muestran una naturaleza altamente compleja debido a la gran cantidad de grupos funcionales superficiales presentes. Los espectros IR de los sólidos después de la biosorción de Pb y Cd demuestran que las bandas de vibración son inferiores para el Cd que para el Pb lo que parece estar de acuerdo a la menor retención de este metal por el adsorbente.
- El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio indica que la retención del Pb y Cd se produce en forma rápida en los primeros 30 minutos y alcanzando el equilibrio cerca a los 90 minutos siendo menor en el Cd que en el Pb; esto sugiere que probablemente existe unión entre el ion y los sitios activos y que tiene lugar preferentemente en la superficie del sólido; además, tiene poca importancia la difusión al interior de la partícula. De otro lado, la mayoría de estudios de bioadsorción muestran que los grupos funcionales presentan mayor afinidad por los iones con mayor radio iónico e índice covalente, que es justamente mayor para el Pb que para el Cd.
- Para el Pb se observó una absorción eficiente entre una concentración de 0 a 100 ppm/g, en un tiempo aprox. de 1 hora.

- Para el Cd se observó una absorción eficiente entre las 0 a 68 ppm/g, en un tiempo aprox. de 30 minutos.
- Los modelos cinéticos de pseudo primer orden y Elovich son los que mejor reproducen la cinética de la adsorción para el ion Pb (II). Para el ion Cd (II) los modelos de pseudo primer orden, Elovich y reversible de primer orden a las condiciones experimentales de estudio.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Surrey, Inglaterra y Universidad de Oruro, Bolivia, por el apoyo en la parte experimental de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Viera, R; Volesky, B.; Biosorption: a solution to pollution. *International Microbiology*, **3 (2003)**, page. **17-24**.
2. J. Ubio, I. Schneider, W. Aliaga, Proc III Int. Conf. on Cleaning Tech. for the Mining Ind., **(85-98, 1996)**.
3. S.R. Shukla, R.S. Pai, *Sep. Pure. Technology*. **43, (1-8), 2005**.
4. M.N. Prasad, H. Freitas, *Environment Pollution.*, **110, (277-83), 2000**.
5. Z. Lin, J. Wu, R. Xue, Y. Yang., *Spectrochemical Act*, **A61, (761-5), 2005**.
6. F. Pagnanelli, A. Esposito, F. Veglio., *Water Research* **36, (4095-4105), 2002**.
7. *Cámara de negocios, Colombia www.portafolio.com.co/negocios/agronegocios/2008-08-11*
8. Bressani R., Estrada V., Jarquin E. Pulpa y pergamino de café: I. Composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. Asociación Latinoamericana de Producción Animal, Alpa. Bogotá. Colombia. Turrialba. 22. 3. Jul.-sept. 1972. 26-30 abr. 1971. 299-304.
9. King P.; Rakesh, N.; Beenalahari, S.; Removal of lead from aqueous solution using *Syzygium cumini* L.; Equilibrium and kinetic studies, *Journal of Hazardous Materials*, **142 (1-2), 340-347 (1007)**.
10. Dabrowski A., Hubicki Z., Podkoscielny P. Robens E. **2004** "Selective Removal of the Heavy Metal Ions From Waters and Industrial Wastewaters by Ion-Exchange Method", *Chemosphere*, **56, 91**.

PAPER ELECTROPHORETIC TECHNIQUE IN THE STUDY OF BERYLLIUM(II) / COBALT(II) - PROLINE BINARY COMPLEXES IN SOLUTION

Brij Bhushan Tewari^{1*}

ABSTRACT

A method, involving the use of Paper Electrophoretic Technique (PET) is described for the study of binary complex systems in solution. This method is based on the movement of a spot of metal ion in an electric field at various pH of background electrolyte. A graph of pH versus mobility was used to obtain information on the binary complexes and to calculate its stability constants. The stability constant of Be(II) – proline and Co(II) – proline complexes were found to be $(7.61 \pm 0.11, 5.81 \pm 0.07)$ and $(4.97 \pm 0.03, 3.69 \pm 0.13)$ (logarithm stability constant values), respectively at ionic strength 0.1 Mol L^{-1} and a temperature of 35°C .

Key words: Paper electrophoretic technique, overall mobility, beryllium(II) complexes, cobalt(II) complexes, stability constants.

INTRODUCTION

Metal complexes play an important role in various biological systems, hence, the formation, stability and reactivity of these complexes have been an active field of research^{1,2}. Beryllium and cobalt are toxic and essential metals respectively. The recommended amount of beryllium and cobalt in human diet are 0.01 mg/day and $0.005 - 1.8 \text{ mg/day}$, respectively. Cobalt is essential component of vitamin B₁₂-coenzymes. Inhaled beryllium compounds cause lung cancer. Beryllium inhibits phosphates enzymes and DNA replication. It is lethal at 1 ppm body weight. Deficiency of cobalt in human cause anemia while excess cause coronary failure³. It seems to very interesting to study the feasibility of controlling their level by complexation. Beryllium and cobalt have several significant applications in biological systems^{4,6}. Proline or pyrrolidine – 2 – carboxylic acid is an amino acid found in protein. Proline has several significant applications in biological systems^{7,9}.

The usual draw backs of PET like variation in the temperature during the electrophoresis, capillary flow on paper, electroosmosis and adsorption affecting the mobility of charged moieties, are quite well known¹⁰. The technique described here is almost free from these vitiating factors. The technique is very convenient in use and gives results in fair agreement with the accepted literature values.

Communications^{11,12} from our laboratory described a new method for the study of metal complexes by paper electrophoretic technique. A search of literature indicated that no report is available on binary complexes of beryllium(II) and cobalt(II) with proline. In view of this, attempts were made to establish the optimum conditions for metal(II) – proline complex formation. In addition, present work describe a paper electrophoretic method for the determination of stability constants of these complexes.

^{1*} Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, University of Guyana,
P. O. Box: 101110, Georgetown, Guyana, Tel: 592-222-6002; Fax: 592-222-3596; Email:
brijtew@yahoo.com

EXPERIMENTAL

Apparatus

A Systronic (Naroda, India) Model 604, electrophoresis was used. The apparatus consisted of a poly (vinyl chloride) PVC moulded double tank vessel. In our laboratory significant change in the instrument has been made. Two hollow rectangular iron plates each weighing one kg, and covered with thin polythene sheets have been used through which thermostated water circulated for controlling the temperature. The tanks are closed with a transparent PVC moulded lid. The whole assembly is tight to prevent moisture changes, which might upset the equilibria in the paper strip. This assembly design thus keeps to a minimum the disturbing effect of evaporation from the unwanted liquid flow in the paper strips. Each electrolyte tank contains a separate electrode chamber in which Pt-wire anode and cathode are placed, respectively. Applied voltage was from a stabilized source. The electrophoresis cell showing sandwiched paper strips and water supply is shown in figure 1.

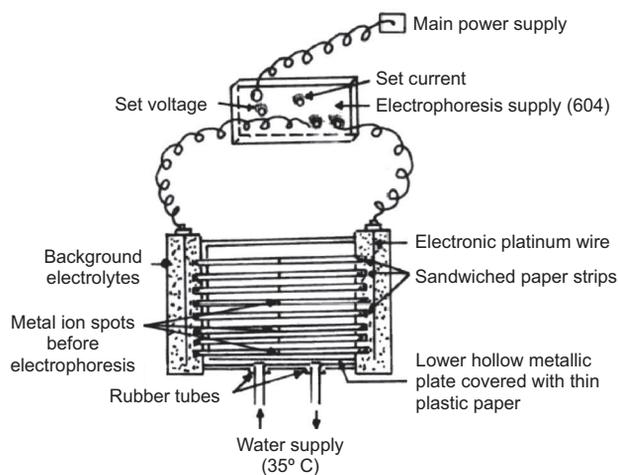


Figure 1. Electrophoresis cell showing sandwiched paper strips.

Whatman No. 1 filter papers for chromatography were used for the purpose of electrophoresis. Elico (Hyderabad, India,) Model L₁₀ pH meter using a glass and calomel electrodes assembly working on 220 V/50 Hz established a.c. mains, was used for the pH measurements. pH meter was calibrated with buffer solution of pH 7.0.

Chemicals

Preparation of metal solutions

Beryllium(II) and cobalt(II) metal perchlorate solutions were prepared by the precipitation of metal carbonates from a 0.1 Mol L⁻¹ solution of beryllium(II) and cobalt(II) nitrates with the solution of sodium carbonate (chemically pure grade, BDH, Poole, UK). The precipitates were washed with boiling water and treated with calculated amounts of 1 % perchloric acid. They were heated and filtered. The metal contents of the filtrates were determined and final concentration was kept 0.005 Mol L⁻¹ ^{13,14}.

Sodium hydroxide solution

Carbon dioxide free sodium hydroxide solution was prepared by dissolving 500 gms of sodium hydroxide in 500 mL of water in a flask. The flask was left overnight. The clear supernatant liquid was filtered rapidly using a high vacuum pump. A suitable volume of the filtrate was diluted and the concentration determined by titrating against a standard oxalic acid solution. A solution (2.0 Mol L^{-1}) was obtained by suitable dilution. The concentration of stock solution was checked from time to time.

Detecting reagents for metal ions and glucose

Solution of 1-(2 - pyridylazo - 2 - naphthol (PAN) (E. Merck, Darmstadt, Germany), in ethanol was used for detecting the metal ions. 0.005 Mol L^{-1} glucose (BDH, Analytical Reagent grade) solutions was prepared in water and used as an electro-osmotic indicator for the correction due to electro - osmosis. A saturated aqueous solution (0.9 mL) of silver nitrate was diluted with acetone to 20 mL . Glucose was detected by spraying with this silver nitrate solution and then with 2% ethanolic sodium hydroxide, when a black spot was formed. Paper strips showing position of metal ion spots after electrophoresis is shown in figure 2.

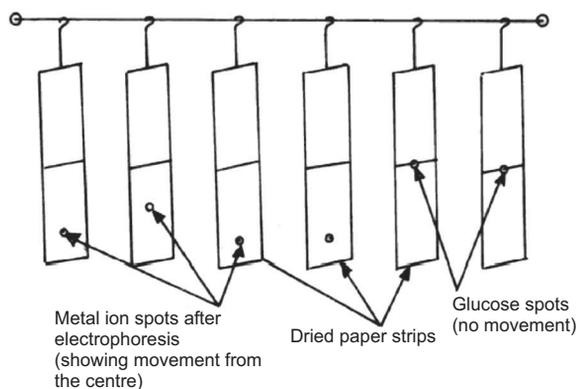


Figura 2. Paper strips showing position of metal ion spots after electrophoresis

Background electrolyte

The background electrolytes used in the study of binary complexes were 0.1 Mol L^{-1} perchloric acid and 0.01 Mol L^{-1} proline. The system was maintained at various pH by the addition of sodium hydroxide. Stock solution of 5.0 Mol L^{-1} perchloric acid (SDS, analytical reagent grade), 2.0 Mol L^{-1} sodium hydroxide (analytical reagent grade) and 0.5 Mol L^{-1} proline were prepared. Each solution was standardized using the appropriate method.

Procedure

Whatman No. 1 filter paper for chromatography was used for the purpose of electrophoresis. For recording observation of particular metal ion, two strips were spotted with the metal ion solution along with additional two spotted with glucose using $1.0 \mu\text{L}$ pipette and then mounted on the insulated plate. Each of the two electrolyte vessel was filled with 150 mL of background electrolyte containing 0.1 Mol L^{-1} perchloric acid and 0.01 Mol L^{-1} proline. The paper became moistened with the background electrolyte solutions due to diffusion. The second insulated plate was placed on paper strips and then thermostated water (35° C) was circulated in the plates to keep the temperature constant. The lid was then placed on the instrument to make it airtight. It was left for 10 minutes to insure wetting of strips.

Subsequently a direct 200 Volts potential was applied between the electrodes. Electrophoresis was carried for 60 minutes after which these strips were removed from the tank and dried. The metal ion and glucose spots were detected by specific reagents. The leading and tailing edge were measured from the marked centre point and the mean were taken. The distance moved by glucose was subtracted (in case of migration toward anode) to obtain correct path length. Migration towards anode and cathode were designated by negative and positive signs respectively.

Electrophoretic observations on metal ions were recorded at various pH values of the background electrolyte obtained by adding sodium hydroxide solution. The ionic strength being maintained at 0.1 Mol L^{-1} . The observed mobility of migrant was calculated by using the formula.

$$U = \frac{d}{x \cdot t}$$

after applying the correction factor the observed mobility is given as

$$U = \frac{d \pm d_G}{x \cdot t}$$

where U = mobility of metal ion / complex ion; d = mean of duplicate distance travelled by metal ion/complex ion; d_G = mean of duplicate distance travelled by glucose spot; x = field strength; t = time for electrophoresis. The mobility of metal / complex ion spots on the paper strips were thus calculated and are reported with different pH values (figure 3).

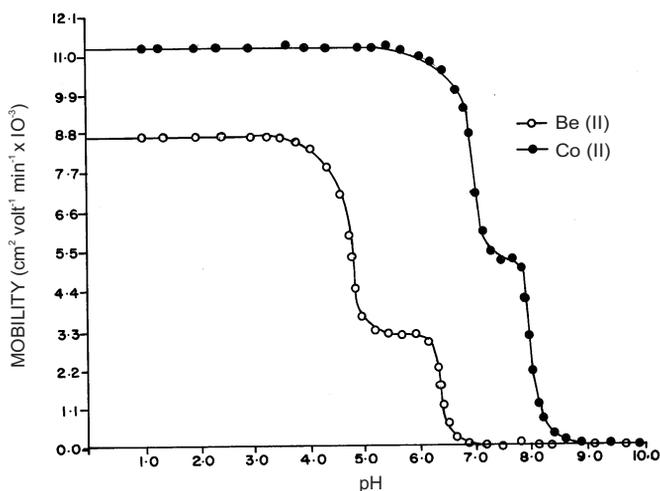


Figure 3. Mobility curve for the metal(II) - proline systems. \circ = Be(II) - proline \bullet = Co(II) - proline. Background electrolytes: 0.1 M perchloric acid and 0.01 M proline. pH's were maintained by addition of sodium hydroxide. The paper strips were spotted with $0.1 \mu\text{L}$ of sample solutions and glucose (for making osmotic corrections).

The protonation constants of pure proline were determined by the same paper electrophoresis technique. The two paper strips were spotted with pure proline along with two with glucose using 0.1 Mol L^{-1} perchloric acid only in a background electrolyte. The electrophoresis was carried for 60 minutes as for metal ions. The electrophoretic speed was calculated. The speed of the metal ion/proline spots are reported with pH values. The individual speeds of the duplicate spots were found to be fairly equal.

RESULTS

Literature reveals that an ionic species of amino acids are the sole coordinating species in complex formation with metal ions^{15,16}. Hence a metal ion spot on the paper strip show a variation in composition of different ionic species of the amino acids in background electrolyte. So the mobility of metal ion spot would depend upon the pH of the background electrolyte.

The electrophoretic mobility of a metal spot against a pH gives a curve with the number of plateau are shown in figure 3. Every plateau indicates the formation of certain complex species. A plateau is obviously an indication of a pH range, where speed is practically constant. The first plateau corresponds to a region, where metal ions are uncomplexed. In this low pH region protonated ionic species of proline is maximum. The second plateau in each case with positive mobility indicates a 1:1, complexes of cationic nature. In this high pH region proline present in the anionic form [L].

One species of proline anion combine with each divalent metal ion to form $[\text{BeL}]^+$ and $[\text{CoL}]^+$ cationic complexes, respectively. At higher pH ranges third plateau was observed in each case at the zero region of mobility curve, which indicates formation of 1:2 metal complexes of neutral nature. The two anionic species of proline combined with metal ion to form $[\text{BeL}_2]$ and $[\text{CoL}_2]$ neutral complexes, respectively. Since there is no fourth plateau, no further interaction with proline anion possible.

The 1:1 and 1:2 metal complexes are formed at pH range 1.0 – 8.5. Chemical literature also assigns a prominent chelating property to the zwitterions^{17,18}. The complexation of Be^{2+} and Co^{2+} with proline anion [L] may be represented as



where M^{2+} is Be^{2+} and Co^{2+} metal ions; [L] is the proline anion; K_1 and K_2 are the first and second stability constants, respectively.

The metal spot on the paper is thus a combination of uncomplexed metal ions, 1:1 and 1:2 metal complexes. The spot is moving under the influence of electric field and the overall mobility is given by equation of Jokl¹⁹.

$$U = \frac{\sum u_{xp} \cdot \beta_{xp} [\text{HpL}]^x}{\sum \beta_{xp} [\text{HpL}]^2} \quad (3)$$

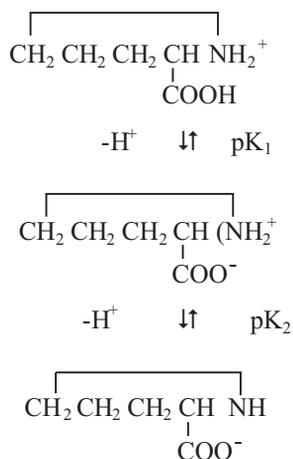
wherein $[\text{HpL}]^x$ is the concentration of general complex species; β_{xp} is the overall mobility constant of the complex; u_{xp} is the speed of the general complex $[\text{M}(\text{HpL})^x]$ present in the conglomeration.

On taking into consideration different equilibria, the above equation is transformed into the following form:

$$U = \frac{u_0 + u_1 K_1 [\text{L}^-] + u_2 K_1 K_2 [\text{L}^-]^2}{1 + K_1 [\text{L}^-] + K_1 K_2 [\text{L}^-]^2} \quad (4)$$

wherein u_0 , u_1 and u_2 are mobilities of uncomplexed metal ion, 1:1 metal complex and 1:2 metal complex, respectively.

The protonation constant of pure proline ($\text{pK}_1 = 1.90$; $\text{pK}_2 = 10.03$) were obtained by same paper electrophoretic technique. The mode of deprotonation of pure proline can be represented as:



With the help of protonation constants of pure proline, the concentration of the ligating proline $[\text{L}^-]$ is calculated.

$$[\text{L}^-] = \frac{[\text{L}_T]}{1 + [\text{H}^+] / \text{pK}_2 + [\text{H}^+]^2 / \text{pK}_1 \cdot \text{pK}_2} \quad (5)$$

wherein $[L_T]$ is total concentration of proline (0.01 Mol L^{-1}); pK_1 and pK_2 are first and second protonation constants of pure proline, respectively.

For calculating first stability constant, K_1 , the region between first and second plateau is pertinent. The overall mobility will be equal to the arithmetic mean of the mobility of uncomplexed metal ion, u_0 , and that of first complex, u_1 at a pH where $K_1 = 1/[L^-]$.

The stability constant K_2 , of second complex can be calculated by taking into consideration the region between second and third plateau of the mobility curve. The calculated values of first and second stability constants are given in table 1.

Table 1. Stability constants of beryllium(II) and cobalt(II) complexes with proline.

Metal ions	Complexes	Stability constants	Logarithm stability constant values
Beryllium(II)	$\text{Be}\{\overbrace{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}_2\text{COO}}^+\}$	K_1	7.61 ± 0.11
	$\text{Be}\{\overbrace{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNHCOO}}\}_2$	K_2	5.81 ± 0.07
Cobalt(II)	$\text{Co}\{\overbrace{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}_2\text{COO}}^+\}$	K_1	4.97 ± 0.03
	$\text{Co}\{\overbrace{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNHCOO}}\}_2$	K_2	3.69 ± 0.13

Ionic strength = 0.1 Mol L^{-1} ; temperature = 35° C ; M = metal cations, (Be^{2+} and Co^{2+}); L = Ligand (proline); proline anion = $\overbrace{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}}^{\text{COO}^-}$

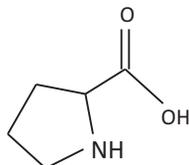
DISCUSSION

Comparison of log stability constants values for both metal ion complexes follow the order:

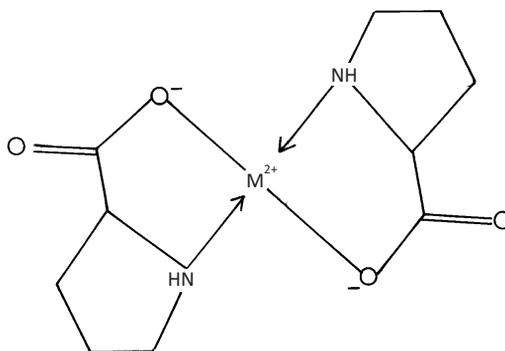
$$\log K_1 > \log K_2$$

The values of second stability constants in each complex found to be lower in comparison to the first stability constant values. It is therefore inferred that the coordinating tendency of a ligand decreases with higher state of aggregation²⁰. High stability constant values of beryllium(II) – proline complexes indicate strong bonding between beryllium(II) cation and proline anion. While low stability constant value between cobalt(II) – proline complexes indicate weak bonding between cobalt(II) cation and proline anion.

The higher stabilities of beryllium(II) complexes may be ascribed to be its greater affinity for the oxygen donor ligands. The precision of the method is limited to that of paper electrophoresis, and uncertainty in the result is $\pm 5\%$. Hence, it can not replace the most reliable methods, even though it is new approach deserving further development. The stability constants of metal complexes, can be very easily calculated by this technique; therefore the present method is advantageous over other methods (viz., polarography, potentiometry, solubility, etc.) reported in chemical literature. The molecular structure of proline is as follows:



To examine the possibility of hydrolysis of beryllium(II) at higher pH, experiments have been performed at two concentrations of the ligand : 0.01 Mol L^{-1} and 0.001 Mol L^{-1} . The mobility curves show that the plateaus at lower ligand concentration are shifted towards higher pH range, but the calculated stability constants are found to be the same in the two cases. Thus the constant obtained is independent of the pH indicating that hydrolysis of beryllium(II) can be ignored here. The proposed structure for the ML_2 complexes may be given as:



CONCLUDING REMARKS

The following conclusions can be drawn from the present study

- Beryllium(II) and cobalt(II) are significant for biological systems as such they are toxic, the proline may be used to reduce the level of these metal ions in the biological systems.
- Beryllium(II) – proline complexes have high stability constant values in comparison to cobalt(II) – proline complexes.
- The present paper electrophoretic technique is very helpful in finding that complex system is formed or not; if formed, its stability constants can also be determined.
- The ML_2 complexes have low stability constant values less stable in comparison to ML complexes.
- Biologically important beryllium(II) and cobalt(II) complexes with proline can be prepared on large scale at particular pH of the background electrolyte solutions.

REFERENCES

1. S. E. Sherman and S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **87**, 1153 (1987).
2. P. K. Bhattacharya, *J. Sci. Ind. Res.* **40**, 382 (1981).
3. D. Banerjea, *Everyman's Sci.* **29(6)**, 176 (1995).
4. J.-Q. Zhao, G. -Z. Du, Y. -C. Xiang, Y. -F. Wen, M. Bhadauria and S. K. Nirala, *Arch. Pharm. Res.* **30(12)**, 1575 (2007).
5. R. G. Rames and K. Olden, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **5(1)**, 4 (2008).
6. A. Muhlrads, I. Ringel, D. Pavlov, Y. M. Peyser and E. Reisler, *Biophys. J.* **91**, 4490 (2006).
7. A. Zarrinpar, S. -H. Park and W. A. Lim, *Nature* **426**, 676 (2003).
8. S. P. Matthew, H. Iwamura, D. G. Blackmond, *Ange. Chemie. Int.* **43 (25)**, 3317(2004).
9. K. Sketty, *Process Biochem.* **39 (7)**, 789 (2004).
10. M. J. McDonald, *Ionography, Electrophoresis in stabilized media*, Year Book Publication, Chicago, 1955.
11. B. B. Tewari, *Trans. SAEST* **30(2)**, 76 (1995).
12. B. B. Tewari, *J. Indian Chem. Soc.* **75**, 91 (1998).
13. I. M. Kolthoff and R. Belcher, *Volumetric Analysis*, Vol. 3, Interscience Publisher Inc., New York, 1957.
14. A. I. Vogel, *Text Book of Quantitative Inorganic Analysis, including Elementary Instrumental Analysis*, 4th Edition, Longman's, London, 1978.
15. Y. Hojo, Y. Sugiura and H. Tanaka, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **39**, 1859 (1977).
16. D. M. Walker and R. D. Williams, *J. Chem. Soc. Dalton*, 1186 (1974).
17. J. J. Christensen, J. L. Oscarson and R. M. Izatt, *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 5949 (1968).
18. G. F Thiers, L. C. Van Poucks, M. A. Herman, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **30**, 1548 (1968).
19. V. Jokl, *J. Chromatogr.* **6**, 432 (1964).
20. J. D Joshi, *Indian J. Chem.* **21**, 446 (1982).

Historia de la Química en el Perú

CARLOS CHIRINOS VILLANUEVA

Un impulsor de la Ciencia y Tecnología en el Perú

Carlos Chirinos Villanueva nació el 3 de junio de 1924 en el distrito de Paiján, ubicado a 50 km al norte de la ciudad de Trujillo. El año 1937 se trasladó a la ciudad de Trujillo, donde realizó sus estudios secundarios en el Colegio Seminario de San Carlos y San Marcelo. El año 1942 terminó el 5to año de secundaria, obteniendo el Premio de Excelencia.

Al año siguiente ingresó a la Universidad Nacional de Trujillo, culminando sus estudios en 1947 e integrando la primera Promoción “Julio Gorbitz Fry” de la Escuela de Ingeniería. El 14 de octubre de 1948 obtuvo los grados profesionales de Químico Industrial e Ingeniero Químico.

El 1ro de junio de 1948 asumió el cargo de Ayudante de la Fábrica de Ácidos de la Escuela de Ingeniería Química y el 1ro de mayo de 1949 asumió la Jefatura de la Fábrica, cargo administrativo que desempeñó hasta el 31 de marzo de 1961.

El 12 de mayo de 1952 fue nombrado Catedrático del curso de Ingeniería Económica en la Escuela de Ingeniería Química y el 26 de abril de 1957 asume también la cátedra de Ingeniería de Petróleo. Asimismo, desde el año 1955 hasta el año 1960 se desempeñó como Jefe de Prácticas del curso de Química Inorgánica en la Escuela de Ingeniería Química y de los cursos de Química en la Facultad de Ciencias.

El 22 de diciembre de 1958 fue nombrado Catedrático Principal Titular del curso de Ingeniería Económica en la Escuela de Ingeniería Química por un periodo de 10 años.

El año 1961, Carlos Chirinos fue nombrado Profesor Principal de la Facultad de Ingeniería Química con las obligaciones de dictar las cátedras de Ingeniería Económica e Ingeniería de petróleo.

El 24 de junio de 1962 contrajo matrimonio religioso con Nelly Guerrero Fernández en la Iglesia San Francisco de la ciudad de Trujillo.

A mediados de 1965 obtuvo una beca de la Comisión Fulbright de Intercambio Educativo y el Departamento de Estado de Estados Unidos para realizar estudios de especialización en los Estados Unidos y le concedieron licencia en la Universidad a partir del 17 de agosto de 1965.

Después de finalizar sus estudios de especialización en Economía de Procesos de Ingeniería en el Instituto Tecnológico de Georgia, se reincorporó a la Facultad de Ingeniería Química el 13 de julio de 1966.

El 3 de junio de 1969 fue nombrado Director del Programa de Ingeniería Química por la Comisión Reorganizadora de la Universidad, cargo que desempeñó hasta fines de junio de 1971. El 19 de junio de 1971 fue nombrado Vice – Rector Administrativo de la Universidad, cargo que desempeñó desde el 1ro de julio de 1971 hasta el 30 de octubre de 1977.

El 4 de noviembre de 1977 asumió el cargo de Jefe del Departamento de Ingeniería, cargo que desempeñó hasta el 4 de diciembre de 1984, que fue elegido Rector de la Universidad Nacional de Trujillo.

Durante su gestión, Carlos Chirinos fue elegido Vicepresidente de la Asamblea Nacional de Rectores para el periodo 1987-1988 y Presidente de la Asamblea Nacional de Rectores para el periodo 1989-1990, institución que agrupaba las 47 universidades existentes en el país.

En octubre de 1990 fue nombrado Presidente del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC), cargo que desempeñó hasta el 11 de agosto de 1995. Durante su gestión apoyó la tarea de generar progreso científico y tecnológico a través de las universidades.

A fines del año 1995 fue nombrado Presidente del Instituto de Transferencia de Tecnologías Apropriadas para Sectores Marginales (ITACAB), que forma parte del Convenio Andrés Bello, cargo que desempeñó hasta fines del año 2000. Durante su gestión editó varios libros sobre el desarrollo sostenible.

Desde el año 2000 hasta el año 2006 se desempeñó como Asesor en el Congreso de la República en temas de educación universitaria.

En su labor institucional, el año 1958 formó parte de la primera Junta Directiva de la Asociación de Ingenieros Químicos de Trujillo. El año 1959, conjuntamente con la Asociación de Ingenieros Químicos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, participó en la formación de la Federación de Ingenieros del Perú. El año 1961 asistió como delegado del Perú a Puerto Rico para la formación de la Confederación Interamericana de Ingeniería Química. El año 2005 fue nombrado Presidente de esta institución.

Carlos Chirinos ha sido nombrado Profesor Honorario de varias universidades del país, entre ellas la Universidad Nacional de Tumbes, la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana en Iquitos, la Universidad Privada San Pedro de Chimbote, la Universidad Nacional de Ucayali, la Universidad Nacional de San Martín de Tarapoto, la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, la Universidad Nacional Federico Villarreal de Lima, la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión de Huacho, la Universidad Nacional de Ucayali y la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

En mayo de 1994 fue nombrado Socio Honorario de la Sociedad Química del Perú. En junio de 1994 fue nombrado Profesor Emérito de la Universidad Nacional de Trujillo. En enero de 1998 recibió la Medalla de Honor de la Municipalidad Provincial de Trujillo y el 12 de octubre del año 2001 recibió la Distinción de Primer Grado del Libertador Simón Bolívar de la Universidad Nacional de Trujillo.

El 30 de setiembre de 2009 en el auditorio del Consejo Departamental de La Libertad del Colegio de Ingenieros del Perú se le otorgó la Orden de la Ingeniería Peruana, que representa el reconocimiento más alto que otorga el Colegio de Ingenieros del Perú en mérito a su destacada labor profesional e institucional en favor de la Ingeniería Peruana.

A pesar que con Dionisio, mi querido y difunto esposo, lo unía una gran amistad quizás desde la década de los 80 o antes, es recién a partir de su nombramiento como Presidente de CONCYTEC en 1990, que tuve la ocasión de conocerlo y por los próximos 20 años compartir una serie de actividades relacionadas a la química e ingeniería química, y sobre todo gozar de su invalorable amistad.

Es por ello, que me permito dejar estos últimos párrafos para resaltar alguna de esas actividades, aún no mencionadas, como el permanente apoyo que me brindara en mi condición de Coordinadora Internacional de la Red Iberoamericana de Productos Naturales, RIPRONAMED, del Programa CYTED y que propició que se desarrollaran importantes grupo de investigación orientadas al conocimiento de nuestras plantas medicinales; igualmente, el impulso que dio a la creación en el año 1992 de la Asociación Peruana de Facultades y Escuelas de Química e Ingeniería Química, APFEIQ, que permitió la capacitación, el intercambio de experiencias y el desarrollo de proyectos de investigación colaborativos entre los docentes de las diferentes áreas de la química e ingeniería química de las 18 universidades que cuentan con esas carreras profesionales. Y no menos importante fue la colaboración que por varios años otorgó a la Sociedad Química del Perú para la publicación de su Revista Científica.

Trabajamos asimismo estrechamente en la organización de dos importantes eventos: uno de ellos, el XX Congreso Peruano de Química que se llevó a cabo en octubre de 1997 en el otrora emblemático Hotel Crillón, evento que fue presidido por Carlos por encargo del Consejo Directivo de la Sociedad Química del Perú que me honraba en presidir en ese entonces; y el otro, el XXI Congreso Interamericano de Ingeniería Química que tuvo lugar en abril del 2005 que me tocó presidir en mi condición de Presidenta de APFEIQ y paradójicamente por encargo de la Federación de Ingenieros Químicos que en ese entonces estaba a cargo de Carlos.

En esos 20 años pude gozar a un incansable trabajador luchando por promover la ciencia y tecnología en nuestro Perú, visitando las diferentes universidades del país, propiciando la formación de grupos de investigación; pude compartir con Carlos muchas celebraciones en los 22 de enero, “Día del Ingeniero Químico”; pude gozar de la “chispa” con la que solía amenizar cada reunión de trabajo; también compartir sus alegrías con los logros de cada uno de sus hijos y compartir su pena y tristeza por la partida de su compañera Nelly.

Carlos Chirinos falleció en la ciudad de Lima el 30 de julio de 2010 a los 86 años de edad.
¡Carlos, descansa en paz en la gloria del Señor!

Agradecimientos: A la familia Chirinos Guerrero por proporcionarnos los datos biográficos.

Olga Lock
Past Presidenta, SQP

INFORMACIONES

A. De la Sociedad Química del Perú

 El pasado 5 de julio sufrimos la pérdida de un gran amigo e ilustrado profesional, Dr. Naldo Balarezo Geinstein.

Como profesor y decano en la Universidad San Luis Gonzaga de Ica, y en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, donde también fue su Vice-Rector, se desempeñó siempre con una gran responsabilidad y un alto sentido de la ética profesional.

En sus últimos años, libre de sus responsabilidades académicas, se dedicó - desde el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) - a promover las publicaciones científicas. Organizaba cursos, conferencias y otros eventos dirigidos a los editores de las mismas, distinguiéndose siempre por su responsabilidad y abnegación ejemplares.

Esta Revista de la Sociedad Química del Perú, de la que llegó a ser su “Editor Asociado”, tuvo la oportunidad de recibir el invaluable asesoramiento del Dr. Naldo Balarezo.

Lamentamos la pérdida de tan magnífica persona, y desde estas páginas expresamos nuestras sentidas condolencias a su Sra. esposa, hijos y demás familiares y amigos.

¡ Descansa en la paz del Señor !

XXV Congreso Peruano de Química ("Ing. Quím. Dionisio Ugaz Mont")

a. Conferencias confirmadas

Ana Rita Cristiano Rocco
Análisis de Alimentos Empleando ICP-MS.

Jorge Angulo
Perspectivas de la química inorgánica en el Perú.

José Vega Baudrit
Nanotecnología en Centroamérica.

María del Rosario Sun Kou
Tamices moleculares: zeolíticos, arcillosos y carbonosos.

Jaime Yañes

Introducción a la cromatografía quiral y su aplicación al análisis de flavonoides.

Ana María Osorio

Arcillas modificadas y sus potenciales aplicaciones en la nanotecnología.

Badhin Gómez Valdez

Las cargas de Hirshefeld en el contexto de la teoría de funciones de la densidad.

Jesús M. Castagnetto M.

Clusters, Grids y Clouds: Uso e Impacto de Arquitecturas de Cómputo Distribuido en Bioinformática.

Nelson Tapia Huanambal

Química coloidal y sus aplicaciones.

Adolfo La Rosa Toro

Electroquímica, una nueva alternativa de tecnología limpia para el presente y para el futuro.

Gino Picasso

Desarrollo de catalizadores basados en óxidos metálicos para la eliminación de compuestos orgánicos volátiles.

William Tiznado

Diseño inteligente de nuevos materiales.

Teresa Blanco Blasco

Contenido químico de carbohidratos, proteínas y grasa en el cuerpo humano.

Antonio Monge

La imitación creativa en el descubrimiento de fármacos. Una aproximación clásica proyectada en el futuro.

Raymundo Cea

Diversidad estructural de anillos inorgánicos.

Eduardo Calvo

Nuevos gases de efecto invernadero.

Carlos A. Gorriti Castro

La modulación química y su influencia en las actividades biológicas de los metabolitos secundarios.

Emilio Guija Poma

Fitoquímicos y señalización celular.

Hans Nowak

Minería de datos y redes neuronales.

Estela Contreras

La acreditación de laboratorios en el Perú; situación actual.

Mirko Zimic

La nicotinamidasa de *Mycobacterium tuberculosis*: Mecanismo de acción y resistencia a pirazinamida.

b. Cursos:

1. La gestión industrial de la innovación en la Química moderna. Antonio Monge.
2. Nanotecnología. José Roberto Vega Baudrit.
3. Espectroscopia IR y Raman Aplicados al estudio de vibraciones moleculares. Esther Juliana Ocola.

Conferencia de los “Jueves Científicos” en la Sociedad Química del Perú

- “Fibra dietaria y sus beneficios”, dictada por la Dra Teresa Blanco de Alvarado-Ortiz, Directora de la Carrera de Nutrición y Dietética en la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, el día jueves 10 de junio del 2010.
- “Las serpientes peruanas y sus venenos: investigación actual y perspectivas”, dictada por el Dr. Armando Yarlequé Chocas, Presidente del Consejo Superior de Investigaciones de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el día jueves 17 de junio del 2010.
- “Contribuciones de la química inorgánica a la medicina”, dictada por la Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón, Coordinadora de la Escuela Profesional de Química de la Universidad Nacional de Ingeniería, el día jueves 15 julio del 2010.
- “Electroquímica: impacto en el avance de la ciencia y tecnología”, dictada por el Dr. Adolfo La Rosa-Toro Gómez, Director de la Escuela Profesional de Química de la Universidad Nacional de Ingeniería, el día jueves 5 agosto del 2010.

Curso taller: “Seguridad en el laboratorio químico e identificación de peligros y evaluación de riesgos (IPER)”, dictado por el Ing. Guillermo Jaramillo Carpio realizado los sábados 19 y 26 de junio del 2010.

XV Olimpiada Peruana de Química 2010

Este evento es un concurso abierto para jóvenes estudiantes de planteles escolares del Perú con vocación al conocimiento de la Química. Tiene como objetivo promover y estimular el desarrollo de capacidades y aptitudes en el campo de las Ciencias Químicas, construir lazos de amistad entre los participantes y crear un marco propicio para fomentar la cooperación, el entendimiento y el intercambio de experiencias. Las evaluaciones son teóricas (2 fases) y experimentales. Este evento cuenta con el auspicio de la Pontificia Universidad Católica del Perú y de la Sociedad Química del Perú. Para mayor información visite:

<http://www.pucp.edu.pe/olimpiada/quimica/>

Falleció el Ing. Carlos Chirinos Villanueva

Lamentamos comunicar el sensible fallecimiento de nuestro Socio Honorario, Carlos Chirinos Villanueva, Ingeniero Químico de profesión, acaecido el pasado 30 de julio de 2010. El Ing. Chirinos se desempeñó en importantes cargos, entre los que citamos: Presidente de la ANR y del CONCYTEC. Fue Miembro Honorario de nuestra Institución desde el año 1994 y presidió el XX Congreso Peruano de Química realizado en el año 1997. El Consejo Directivo de la Sociedad Química del Perú, expresa sus más sentidas condolencias a sus hijos, familiares y amigos, por tan irreparable pérdida.

Falleció el Q. F. Dr. José Mondragón Romero

Con profundo pesar, comunicamos que el Q. F. Dr. José Mondragón Romero, Socio Vitalicio y amigo entrañable de nuestra Institución, profesor de muchas generaciones de químicos farmacéuticos del Perú, distinguido profesional de la industria, excelente esposo y abnegado padre, dejó de existir el pasado 9 de agosto del 2010. Expresamos nuestras más sentidas condolencias a su esposa, hijos, familiares y amigos por la irreparable pérdida.

Donación de Revistas de la Facultad de QIQ de la UNMSM

Nuestra Institución, agradece la generosa donación de la Revista de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

B. Otras informaciones**“Boletín Informativo sobre productos y residuos químicos”**

En nuestro portal institucional: [www:sqperu.org.pe](http://www.sqperu.org.pe), se viene publicando desde el mes de marzo, 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.

Comité de Innovación Tecnológica Industrial

La Sociedad Química del Perú viene participando desde el año pasado de las reuniones mensuales que realiza el Comité de Innovación Tecnológica Industrial - CINTECIN de la Oficina Técnica de Centros de Innovación Tecnológica, Despacho Viceministerio de MyPE e Industria, Ministerio de la Producción, presidido por el Ing. José Valdez Calle. El CINTECIN es un espacio de diálogo para compartir experiencias, apoyar iniciativas y generar propuestas que promuevan las actividades orientadas a la innovación tecnológica, fundamentalmente en el sector industrial. En este Comité participan representantes del sector empresarial, de la academia y del sector público.

Portal de Ingeniería

La Sociedad Química del Perú, ha recibido la invitación a formar parte del “Portal de Ingeniería” que Graña y Montero, en colaboración con el diario El Comercio, han creado. Este portal, es un espacio de comunicación virtual para la comunidad de ingeniería en el Perú; tiene por finalidad contribuir al desarrollo de una red social especializada que permita una comunicación rápida, oportuna y enriquecedora entre sus miembros.

Miembro del Consejo de la Facultad de QIQ de la UNMSM

Felicitamos a nuestro socio activo, el Ingeniero Químico Cesario Condorhuamán Ccorimanya, por su reciente elección como Miembro del Consejo de la Facultad de QIQ de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Director Administrativo de la Facultad de QIQ de la UNMSM

Felicitamos al Director Administrativo de nuestra Institución, Químico Neptalí Ale Borja, por su reciente elección, en el cargo de Director Administrativo de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Premio Nacional Loreal–Unesco- CONCYTEC

La Sociedad Química del Perú, ha presentado a la Dra. Ana María Muñoz Jáuregui, como candidata a la Convocatoria Nacional 2010 al “Premio Nacional Loreal –Unesco-CONCYTEC por la Mujer en la Ciencia”.

Conferencias: "Avances, situación y futuro de la agrobiotecnología"

La Sociedad Química del Perú, ha participado en las Conferencias "Avances, situación y futuro de la agrobiotecnología", convocada por el Dr. Alexander Grobman, Presidente de la Asociación Peruana para el Desarrollo de la Biotecnología - PeruBiotec, realizada el jueves 15 de julio del presente, en homenaje póstumo a Norman Borlaug, Premio Nobel, padre de la Revolución Verde, como un aporte al actual debate nacional sobre transgénicos.

Proyecto Internacional Química: Nuestra vida, nuestro futuro

Como preámbulo a la celebración en el 2011 del “Año Internacional de la Química”, nuestra Institución, ha participado en la reunión de trabajo, en el marco del “Proyecto Internacional Química: Nuestra vida, nuestro futuro”, realizada el día 20 de julio del presente, convocado por Atilio Buendía, Presidente de MILSET AMLAT.

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**