

ISSN 1810-634X

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 77 N° 2

ABRIL - JUNIO 2011



INSTITUCIÓN CIENTÍFICA FUNDADA EN 1933

LIMA, PERÚ

SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ
CONSEJO DIRECTIVO
(marzo 2011 - marzo 2013)

Presidenta	: Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo
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	: Quím Farm. Gabriela Chávez
Director Administrativo	: Quím. Neptalí Ale Borja
Vocales	: Dr. José Juárez Eyzaguirre
	: Quím. Lucía Mondragón Hernández
	: Dra. María Luisa Castro de Esparza
	: Dra. María del Rosario Sun Kou
	: M. Sc. Jorge Eduardo Loayza Pérez
	: Quím. Marco Guerrero Aquino
	: M.Sc. Graciela Untiveros Bermúdez
	: Quím Farm. Nora Herrera Hernández

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

LABORATORIO DANIEL ALCIDES CARRIÓN 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

Comité Editor

Presidente : Mario Ceroni Galloso

Editor en Jefe : Luis Valles Fernández

Miembros : Ana Valderrama Negrón
Julio Santiago

Comité Consultivo

Beyer, Lothar

Universidad de Leipzig - Alemania

Calvo Buendía, Eduardo

Univ. Nac. Mayor de San Marcos - Perú

Chávez Orellana, Haydee

Univ. Nac. San Luis Gonzaga - Perú

García Herbosa, Gabriel

Universidad Burgos - España

Gamboa Fuentes, Nadia

Pontificia Universidad Católica del Perú

Guija Poma, Emilio

Universidad Científica del Sur - Perú

Muñoz Jáuregui, Ana María

Universidad San Martín de Porres

Lock Sing, Olga

Pontificia Universidad Católica del Perú

Angulo Cornejo, Jorge

Univ. Nac. Mayor de San Marcos - Perú

Korswagen Ederi, Richard

Pontificia Universidad Católica del Perú

Picasso, Gino

Universidad Nacional de Ingeniería - Perú

Rueda Sánchez, Juan Carlos

Pontificia Universidad Católica del Perú

Rabinovich Jaitin, Daniel

University of N. Carolina, USA

Troncoso Corzo, Luzmila

Facultad de Medicina UNMSM - Perú

Gutiérrez Correa, Marcel

Universidad Nacional Agraria La Molina - Perú

Revista indizada en el Chemical Abstracts, SciELO y Latindex

Licenciada en EBSCO

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

Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú

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

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

Portal web: www.sqperu.org.pe

Ley 26905 – Hecho el depósito legal a la Biblioteca Nacional del Perú

Certificado N° 95-1567

Vol 77

ABRIL - JUNIO 2011

N°2

En el Perú: N° suelto S/.15

Suscripción anual: S/. 60.00

En el extranjero: Suscripción anual: \$50.00

CONTENIDO

(Vol 77 N° 2 - 2011)

- Editorial	99
-------------------	----

Trabajos originales

- Caracterización de una quitinasa extracelular producida por <i>Serratia</i> sp. BIOMI 363706 usando quitina coloidal como sustrato, por Castro, Rocío; Álvarez, Adriana; Machado, Elwi; Mendoza, Mónica; Gómez, Rubén; García, Pablo.	101
- Caracterización microestructural de cenizas de <i>Morinda citrifolia</i> Linneo (noni), por Zoila Garay, Alcides López, Otilia Acha de la Cruz, Ingrit Collantes, Paula Olivera, Julio Santiago.	109
- Constituyentes químicos del túbero de <i>Dracontium spruceanum</i> (Schott) G. Zhu ex <i>Dracontium lorentense</i> Krause (araceae), por Ingrit E. Collantes Díaz, Eduardo G. Gonçalves, Massayoshi Yoshida.	117
- Evaluación de la actividad antioxidante del pisco peruano, mediante voltametría cíclica, por Adolfo La Rosa Toro G., Fredy Vigo López, Golfer Muedas Taipe.	127
- Compuestos fenólicos, actividad antioxidante, contenido de resveratrol y componentes del aroma de 8 vinos peruanos, por Rodrigo Salazar, Giovana Espinoza, Candy Ruiz, María de Fátima Fernández, Rosario Rojas.	135
- Studies on mercury (II), nickel (II) and lead (II) biologically important binary complexes with α -aminobutyric acid in solution, for Brij Bhushan Tewari.	144
- Aislamiento de ácido úsnico y parietina de <i>Caloplaca saxicola</i> Hoffm., por Olivio Castro Mandujano, Ana Pastor de Abram, Ingrit E. Collantes Díaz.	152

INFORMACIONES

A.- De la Sociedad Química del Perú	163
B.- Otras informaciones	170

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.

Por exceso de correcciones de estilo se cobrará a partir de un mínimo de S/. 50.00

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 at 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. Las figuras deben ser originales y de alta resolución.
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 la 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>) Las referencias citadas se escribirán con el tamaño de fuente 10 y se seguirá el estilo de Vancouver.

Editorial

¿Por qué la Química?

Estamos en pleno desarrollo de actividades celebrando el “Año Internacional de la Química”, declarado así por la Asamblea General de la ONU. La elección de este año 2011 se basó en dos hechos: Se cumplen 100 años del Premio Nobel de Química concedido a Marie Curie (1911), y también hace 100 años que se fundó la primera asociación internacional de Química, que dio origen a la actual International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), que agrupa las Sociedades de Química de todo el mundo.

La IUPAC y la UNESCO están coordinando los actos celebratorios a nivel internacional; en el Perú lo hace la Sociedad Química, conjuntamente con el Colegio de Químicos.

“La Química, - nuestra vida, nuestro futuro”, lema adoptado para este año, nos recuerda el contenido esencial de la Química y su importancia para el desarrollo y bienestar de la humanidad. La Química está presente en todo: nuestros alimentos – su calidad, su conservación -; nuestro vestido – fibras sintéticas, colorantes,- nuestra salud – medicinas, desinfectantes -; ...

Llevamos más de dos siglos desde que empezó la Revolución Industrial. Con ella vino un gran aumento en la producción de bienes de consumo, y grandes cambios en el campo laboral. Se trataba de producir más y más, sin medir las consecuencias que este desarrollo, falta de control, traería consigo. El suelo, el aire y las aguas sufren grandes contaminaciones. Con los años, y agravado por el uso abusivo de combustibles fósiles, esta contaminación pone en grave riesgo la salud de nuestro planeta. Sólo a partir del último cuarto del siglo pasado los líderes mundiales empezaron a preocuparse del problema, aunque con muchos altibajos, y a establecer normas, para conseguir una industria más limpia y desarrollar fuentes alternativas de energía no contaminantes.

La comunidad científica, por su parte, en especial, la química, desarrolla métodos para remediar la contaminación. Así lo atestiguan la cantidad de trabajos publicados en las revistas científicas, fruto de su investigación.

Uno de los objetivos que la IUPAC y la UNESCO se han propuesto alcanzar durante este año, es llegar y entusiasmar a los jóvenes por la química. Las estadísticas nos hablan de un descenso de postulantes a las diversas especialidades de la Química en las universidades. Si la química está en todo en nuestra vida, ¿por qué no lo perciben los jóvenes colegiales? ¿No será que estamos fallando en la metodología de la enseñanza de este curso en el colegio? Se dirá que el profesor es un pedagogo, lo importante es que sea un profesional de la química. Si no lo es, como parece que esta es la realidad en la gran mayoría de los colegios estatales, es posible que ese profesor sepa poco de química.

Desde el 30 de julio al 07 de agosto del año en curso, tendrá lugar el 43° Congreso Mundial de Química en San Juan de Puerto Rico, organizado por la IUPAC con el Colegio de Químicos de Puerto Rico. A este Congreso asistirán siete Premios Nobel de Química. Entre las diversas actividades en las que participarán, está una sesión especial con estudiantes y profesores de colegios.

Es en el colegio donde empiezan a formarse los químicos del futuro. Un profesor que sabe, que sabe enseñar y entusiasmar a sus estudiantes con el curso, encontrará seguidores de su especialidad.

En los últimos años se han dado pasos muy positivos en el Ministerio de Educación. El estímulo económico para que los profesores mejoren sus conocimientos, y lo demuestren a través de exámenes, es uno de ellos. Pero eso no debe ser todo. En la Secundaria se imponen cambios en la estructura curricular. Las ciencias naturales están muy descuidadas. Necesitan más horas. El caso de la Química es clamoroso. Muchas universidades han eliminado las preguntas de química en los exámenes de ingreso, para no perder postulantes. Además de abogados, sociólogos..., necesitamos científicos. La tecnología química, y otras que tanto contribuyen a nuestro bienestar, nacen de la ciencia.

La permanencia en el colegio de los jóvenes peruanos es muy corta. Debe aumentarse el número de horas diarias, y considerar la posibilidad de implementar un año más la Secundaria. A partir de los 6 años, el colegial peruano permanece sólo 11 años en el colegio. El mínimo, en casi todos los países es de 12. Habrá que presentar cara, de una vez, y solucionar este problema.

Estas mejoras podrían llevar más tiempo del deseado. Mientras tanto, habría que dar alguna solución ¡ya! para mejorar la enseñanza del curso de Química. El Ministerio de Educación podría llegar a un acuerdo con las universidades estatales y particulares que cuenten con alguna de las especialidades de química, para que los estudiantes del último año ayuden a los profesores de química de los colegios en la organización y desarrollo de los experimentos de laboratorio y en la enseñanza de la nomenclatura, y en otros temas que un profesor de química con pocos conocimientos no lo puede hacer.

La Sociedad Química del Perú se compromete a renovar sus esfuerzos para hacerse escuchar por las autoridades responsables del Ministerio de Educación, al mismo tiempo que ofrece su apoyo para mejorar el sistema educativo.

Luis Valles F.

CARACTERIZACIÓN DE UNA QUITINASA EXTRACELULAR PRODUCIDA POR *Serratia* sp. BIOMI-363706 USANDO QUITINA COLOIDAL COMO SUSTRATO

Castro, Rocío^a; Álvarez, Adriana^a; Machado, Elwi^a; Mendoza, Mónica^a; Gómez, Rubén^b; García, Pablo^a

RESUMEN

La quitinasa es una enzima capaz de hidrolizar quitina en sus componentes oligo y monoméricos. Los quito-oligosacáridos, el dímero acetilquitobiosa y los monómeros de N-acetilglucosamina son de gran interés para la industria debido a su amplio rango de aplicaciones médicas, agrícolas e industriales. En el presente trabajo se realizó la caracterización de una enzima quitinolítica extracelular obtenida del aislado bacteriano BIOMI-363706, caracterizado molecularmente como *Serratia* sp. Esta bacteria usa la quitina coloidal como única fuente de carbono y nitrógeno. Al ser inoculada en un medio que contenía 2% de quitina coloidal (QC), 0,1% K₂HPO₄ y 0,05% MgSO₄·7H₂O, a pH 7,2, la bacteria produjo óptimamente quitinasa extracelular después de 72 horas de incubación a 37 °C. La temperatura y pH óptimos, así como la termoestabilidad de la enzima, fueron 50 °C, pH 6,5 y < 70 °C. La quitinasa fue activada por Mn⁺² y Co⁺². La actividad sobre diferentes sustratos siguió este orden: quitina coloidal > polvo de quitina (<1mm) > glicol-quitina. La enzima presentó un valor de V_{max} de 0,015 μmol/min y un Km de 1,278 mg/ml, utilizando quitina coloidal como sustrato. La enzima estudiada mostró, entre sus características, una termoestabilidad que puede ser una ventaja para la maximización de reacciones en escalas industriales que mejoren y potencien la degradación enzimática de la quitina.

Palabras clave: Quitina coloidal, N-acetilglucosamina, actividad quitinasa.

CHARACTERIZATION OF A EXTRACELLULAR CHITINASE PRODUCED BY *Serratia* sp. BIOMI-363 706 USING COLLOIDAL CHITIN AS SUBSTRATE

ABSTRACT

Chitinase is an enzyme able to hydrolyze chitin into its oligo and monomeric components. The chitin-oligosaccharids, the acetylchitobiose dimer and the acetylglucosamine monomers are very important to industry due their wide range of medical, agricultural and industrial applications. In the present report was made the characterization of an extracellular chitinolytic enzyme obtained from BIOMI-363706 bacterial isolate, molecularly characterized as *Serratia* sp. This bacterium uses colloidal chitin as unique carbon and nitrogen source. While inoculated into a media containing 2% colloidal chitin (QC), 0,1%

^{a*} Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos "SIXTO DAVID ROJO", Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Sector La Hechicera, Núcleo Universitario Pedro Rincón Gutiérrez, Ciudad Mérida 5101 Venezuela, rociojcm@gmail.com

^b Laboratorio de Ciencia, Ingeniería y Biotecnología de los Alimentos, Universidad de los Andes, Sector La Hechicera, Núcleo Universitario Pedro Rincón Gutiérrez, Ciudad Mérida 5101 Venezuela.

K_2HPO_4 and 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, at pH 7,2, the bacteria yields optimally extracellular chitinase after incubation along 72 hours at 37 °C. Optimal temperature, pH as well as thermostability of the enzyme were 50 °C, pH 6,5 and < 70 °C. Chitinase was activated by Mn^{+2} y Co^{+2} . Activity upon different substrates was according the following order: Colloidal chitin > chitin powder (< 1mm) > glycol-chitin. The enzyme showed a V_{max} value of 0,015 mol/min and a K_m of 1,278 mg/ml, using colloidal chitin as substrate. The studied enzyme shown, as one of their characteristics, an thermostability that can be an advantage in order to maximize the reactions at industrial scales that improve and potentiate the enzymatic chitin degradation.

Key words: Colloidal chitin, N-acetylglucosamine, chitinase activity.

INTRODUCCIÓN

La quitina -el polímero más abundante en la naturaleza, después de la celulosa^{1,2}- está formada por aminoazúcares unidos entre sí por enlaces glicosídicos β -(1 \rightarrow 4), que forman una cadena lineal de unidades de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa, algunas de las cuales se encuentran desacetiladas^{3,4} y que desempeñan un papel importante en su estructura molecular, ya que le permiten formar auténticos tejidos que confieren resistencia y soporte -como componente estructural- al exoesqueleto de artrópodos, arácnidos, insectos, nematodos, anélidos y otros invertebrados; a la concha exterior de crustáceos, braquiópodos y moluscos, así como a las paredes celulares de muchos hongos, como ascomicetos, basidiomicetos, ficomicetos e imperfectos. Está también presente en algunos tunicados y algas clorofíceas^{1,2,5}. Por su insolubilidad en agua, tamaño, complejidad molecular y composición heterogénea, la quitina no se degrada dentro de la célula, sino que los microorganismos recurren a la secreción de enzimas quitinolíticas con diferente especificidad para transformarla o hidrolizarla como fuente de carbono y nitrógeno⁶. La quitinasa (EC 3.2.11.14) es una enzima capaz de hidrolizar quitina insoluble en sus componentes oligo y monoméricos. La actividad de la quitinasa ha sido encontrada en numerosas bacterias y *Streptomicetos*, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados. Desempeña una función importante en el proceso de muda de los insectos y la digestión de alimentos quitinosos, y puede también servir como enzima potencialmente defensiva contra patógenos quitinosos².

Los quito-oligosacáridos producidos por hidrólisis enzimática de quitina han estimulado recientemente la investigación debido a su amplio rango de aplicaciones y propiedades médicas, agrícolas e industriales. El interés comercial en la utilización de quitina y sus derivados ha llevado a la necesidad de buscar fuentes estables, seguras y baratas de enzimas quitinolíticas aisladas de organismos, como alternativa a los métodos químicos¹.

En el presente trabajo, se reporta la caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 empleando la quitina coloidal como sustrato, que se obtuvo del procesamiento de exoesqueletos de camarón.

PARTE EXPERIMENTAL

Microorganismo

Se utilizó la bacteria *Serratia* sp. BIOMI-363706, perteneciente al cepario del Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos «Sixto David Rojo» de la Universidad de los Andes. Esta cepa fue aislada de una fuente hidrotermal azufrada en Aguas Calientes, Ureña, estado del Táchira, Venezuela.

Para la reactivación de la cepa, que se encontraba conservada en viales con glicerol al 60% v/v -siguiendo la metodología por Meza *et al.*⁷-, se usó agar nutritivo, cuya composición en g l⁻¹

fue: 3 g de extracto de malta, 3 de extracto de levadura, 5 de peptona, 10 de glucosa y 18 de agar. Este medio fue utilizado tanto en su modalidad sólida -para la conservación de la cepa a tiempos cortos y confirmación de su pureza- como líquida (sin agar), todo lo cual fue mantenido en refrigeración.

Preparación de quitina coloidal (QC)

La quitina coloidal fue preparada por modificación del método de Hsu y Lockwood⁸, el cual consiste en disolver 40 g de quitina en 400 ml de HCl concentrado en agitación constante durante 50 min. Posteriormente, se añadieron 2 litros de agua destilada fría. La mezcla fue dejada en agitación continua durante 12 horas a temperatura ambiente. Después se procedió a filtrar al vacío el precipitado obtenido y se efectuaron sucesivos lavados con agua destilada de acuerdo con el volumen inicial usado, con el fin de eliminar el ácido. La pasta obtenida, de consistencia gelatinosa, se esterilizó durante 15 min a 15 psi; luego, se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

Microorganismo y la producción de enzima

El crecimiento de *Serratia* sp. BIOMI-363706 tuvo lugar en un medio modificado, el cual contiene¹ en g l⁻¹: 0,5 de extracto de levadura, 1,0 MgSO₄·H₂O, 1,36 KH₂PO₄, QC al 2% (p/v) con pH 7,2, durante 24 horas. Diez por ciento (10%) del preinóculo fue transferido a 100 ml de medio mínimo, cuyo contenido es el siguiente⁵: 0,1% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄·7H₂O y 2% (p/v) de QC con pH 7,2; dicho porcentaje se dejó incubando 120 horas a 37 °C en agitación constante de 120 rpm. Después de la incubación, la biomasa fue separada por centrifugación a 12,000 x g, a 4 °C durante 15 min; el sedimento se descartó, mientras que el sobrenadante fue colectado para la medición de la actividad enzimática.

Determinación de la actividad enzimática

El procedimiento utilizado -que se basa en evaluar colorimétricamente la N-acetil-D-glucosamina (NAG), liberada por la acción hidrolítica de la quitinasa sobre el sustrato quitina coloidal, según el método de Morgan-Elson modificado (Reissig *et al.*)⁹- se realizó como sigue: La mezcla de la reacción se compuso con 1 ml del extracto crudo enzimático y 1 ml de QC al 10% (p/v), y se suspendió en buffer fosfato 0,2 M a pH 7. Se incubó a 50 °C durante 1 hora, en baño metabólico. La reacción se detuvo adicionando 1 ml de NaOH al 1%. Posteriormente, a 250 µL del sobrenadante obtenido se les adicionaron 40 µL de tetraborato de potasio 0,8 M a pH 9,1, y se incubaron durante 3 min. Se dejó enfriar la mezcla en baño de hielo; a continuación, se le agregó 1 ml de p-dimetilaminobenzaldehído (DMAB) al 10% en ácido acético glacial al 87,5% (el cual contiene 12,5 ml de HCl 10N) antes de ser incubada a 37 °C durante 1 hora.

Los resultados se interpolaron en una curva tipo preparada con NAG, en una concentración de 0 a 200 µg/ml, y se expresó la actividad en unidades de quitinasa (UQUITINASA), siendo una unidad la cantidad de enzima que produce un µmol de NAG por minuto, bajo las condiciones antes descritas¹⁰.

Determinación de proteína

El contenido de proteína se determinó por el método Bradford¹¹, que usa concentrado de reactivo colorante Bio-Rad Protein Assay y albúmina de suero bovino como estándar. En el ensayo, se utilizaron 1000 µl del reactivo y 100 µl de la muestra de extracto crudo enzimático. Se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. La concentración de proteína se extrapoló mediante una recta de regresión obtenida de cotejar valores crecientes de albúmina.

Caracterización parcial de la enzima producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706

La caracterización parcial de la quitinasa de *Serratia* sp. BIOMI-363706 se realizó utilizando el extracto crudo enzimático, y del modo como se menciona a continuación:

Efecto del pH, la temperatura y estabilidad térmica en la actividad de la enzima quitinasa

Para la determinación del pH óptimo, se hizo reaccionar 1 ml de extracto crudo enzimático con 1 ml de quitina coloidal al 10% (p/v), mezcla que fue suspendida en los siguientes amortiguadores de pH: glicina-HCl (50 mM, pH 3), acetato (50 mM, pH 4-5), fosfato (50 mM, pH 6-8) y Na₂CO₃-NaHCO₃ (50 mM, pH 9-11)⁵. La incubación duró 30 min a 50 °C. Luego, se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. Posteriormente, se determinaron las unidades quitinolíticas utilizando el método definido antes. Teniendo en cuenta el pH óptimo, se realizó la determinación de la temperatura óptima. Se utilizaron las mismas condiciones anteriores, la reacción se llevó a cabo a diferentes temperaturas (20, 30, 40, 50, 60 y 70 °C) durante 30 min, y se detuvo colocándola en un baño de hielo durante 5 minutos. Se llevó a centrifugar a 3500 rpm durante 15 min y, finalmente, se determinaron las unidades quitinolíticas (UQ).

La estabilidad de la temperatura se consiguió sometiendo el extracto enzimático a diferentes gradientes de temperatura: de 10 a 30 °C, de 40 a 60 °C y de 70 a 90 °C durante 5 min. Las muestras fueron mantenidas a 4 °C durante 10 min. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción con 500 µL de extracto enzimático y 500 µL de quitina coloidal al 10% (p/v), mezcla suspendida en buffer fosfato 0,2 M, a pH y temperatura óptimos durante 30 min. Se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min, y se realizó la cuantificación de la actividad quitinasa en la forma indicada anteriormente para determinar las unidades quitinolíticas luego del tratamiento térmico.

Efecto de varios compuestos químicos

Con la finalidad de determinar el efecto inhibitorio de algunos metales divalentes sobre la actividad quitinasa, se procedió a preincubar la enzima en 50 mM de buffer fosfato, pH 6,5, durante 30 min a 50 °C, en presencia de las siguientes sales de cloruro: CaCl₂, CoCl₂, MgCl₂, MnCl₂, ZnCl₂, en concentración 2 M. Se realizaron controles negativos sin añadir ninguna de las sales. La actividad residual de la enzima se determinó bajo las condiciones mencionadas con anterioridad¹.

Actividad en diferentes sustratos

Se evaluó la actividad quitinasa sobre los siguientes sustratos: quitina coloidal al 1% (p/v), como control positivo, quitina en polvo (QP) al 1% (p/v) y glicol-quitina (GQ) al 1% (p/v). Las preparaciones enzimáticas fueron incubadas a 50 °C durante 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 min. El montaje se realizó por triplicado para cada uno de los tratamientos. La actividad fue determinada como se indicó anteriormente.

Cinética de la enzima en el sustrato quitina coloidal

Se efectuaron cinéticas de la enzima quitinasa empleando quitina coloidal en distintas concentraciones: de 2,5, 5, 7, 10 y 15% (p/v). Una vez conformadas las mezclas enzima/sustrato, fueron incubadas a 50 °C durante tiempos variables de: 0,5, 15, 30, 45, 60 y 75 min para determinar la actividad enzimática como se indicó anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El medio reportado por Wang *et al.*⁵, que contenía 2% de quitina coloidal como única fuente de carbono y nitrógeno, permitió que la *Serratia* sp. BIOMI-363706 degradara el polímero, lo cual favoreció la expresión de la actividad quitinolítica. Al comienzo de la incubación, se

detectó un incremento en el crecimiento del cultivo, pero, después de 24 h de incubación, se observó una aceleración en el crecimiento celular (fase exponencial). Posteriormente, el cultivo entró en la fase de muerte, sin evidenciarse una fase estacionaria clara. Esto puede deberse a cambios fisicoquímicos en el medio, como el agotamiento de nutrientes o la aparición de metabolitos secundarios que inhibieron el crecimiento (figura 1).

En cuanto a la actividad quitinolítica, como se observa en la figura 1, la producción de la enzima estuvo asociada al crecimiento y se detectó actividad a partir de las 8 h hasta las 48 h, y fue significativamente observada y se mantuvo durante 72 h. Esto es concordante con la quitinasa producida por *Bacillus* sp. 13,26, como fue reportado por Purwani *et al.*¹

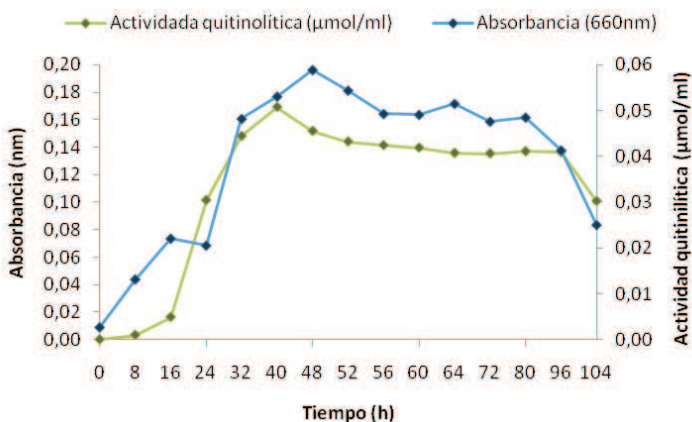


Figura 1. Curva de crecimiento y producción de enzima quitinasa secretada por *Serratia* sp. 363706-BIOMI en medio mínimo.

La caracterización parcial de las muestras del extracto crudo enzimático de *Serratia* sp. 363706-BIOMI mostró que la enzima tenía un pH óptimo de 6,5 (figura 2), una temperatura óptima de 50 °C (figura 3) y una termoestabilidad menor que 70 °C (figura 4).

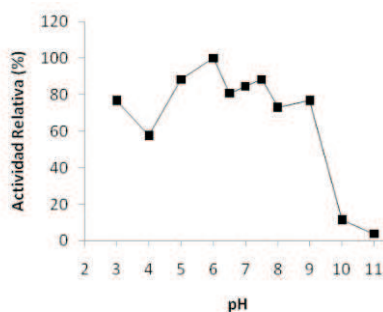


Figura 2. Medición de la actividad de la enzima quitinasa a diferentes pH del extracto enzimático.

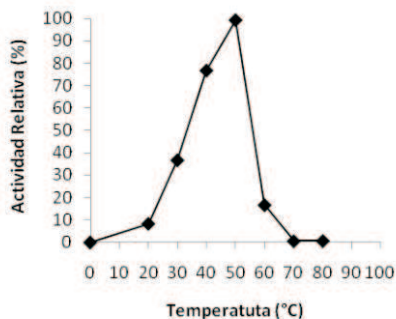


Figura 3. Medición de la actividad quitinolítica a diferentes temperaturas del extracto enzimático.

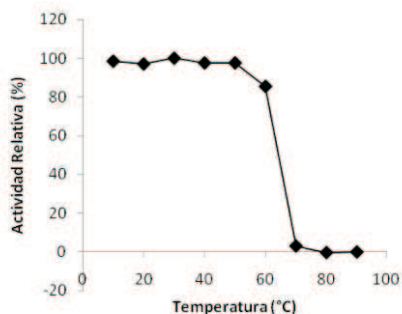


Figura 4. Medición de la estabilidad de la actividad quitinolítica a diferentes gradientes de temperatura y con un pH 6,5 durante 5 min.

Estos resultados son similares a los reportados con la enzima purificada de la línea TKU015 de *Pseudomona* sp., usando concha de camarón como sustrato, y la caracterización de dos isoformas de quitinasa de *Vibrio alginolyticus*^{5,12}. La quitinasa purificada de *Bacillus* sp. 13.26 fue también óptima a pH cerca del neutro (pH 7), la temperatura óptima fue 60-65 °C, y su termoestabilidad se mantuvo a 80 °C. Estos datos pueden ser de utilidad -siempre que existan condiciones neutrales- para aplicaciones industriales, tales como la producción de quito-oligosacáridos con propósitos médicos.

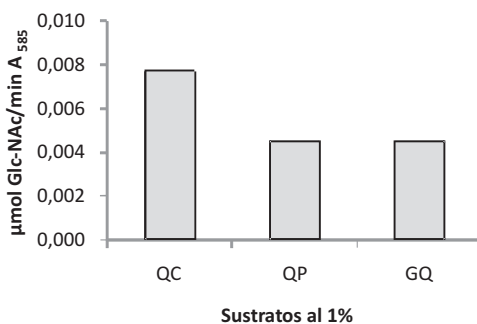
La actividad de la quitinasa fue incrementada por Mn^{+2} y Co^{+2} con 100 y 88%, respectivamente, y ligeramente incrementada con Mg^{+2} , Ca^{+2} y Zn^{+2} (tabla 1).

Reportes del efecto de iones metálicos sobre quitinasas purificadas de *Bacillus* sp. 13.26 señalan que es activada por Mg^{+2} y Ni^{+2} en 131 y 116%, respectivamente¹, mientras que es completamente inhibida por Mn^{+2} y Co^{+2} , y casi en un 50% inhibida por la adición de Ca^{+2} , en una concentración de 2 mM. Por otra parte, la actividad de la enzima purificada de la línea TKU015 de *Pseudomona* sp. fue inhibida completamente por Fe^{+2} y Mn^{+2} , usando concha de camarón como sustrato⁵. Ni^{+2} y Mn^{+2} fueron encontrados como inhibidores de quitinasa de *C. lindermuthianum*¹³.

Tabla 1. Efecto de varios compuestos químicos.

Compuestos químicos	Concentración	Actividad relativa (%)
Control	2M	79
Mn ⁺²	2M	100
Co ⁺²	2M	88
Zn ⁺²	2M	87
Mg ⁺²	2M	86
Ca ⁺²	2M	85

La actividad sobre diferentes sustratos siguió este orden: quitina coloidal > polvo de quitina (<1mm) > glicol-quitina (figura 5). La diferencia entre estos tipos de sustratos va a depender del tamaño y la forma de sus partículas, la concentración de quitina, la facilidad de contacto y el reconocimiento por parte de la enzima, lo cual desempeña un papel fundamental en la rapidez y las diferencias en la degradación que se manifiestan en la disparidad de los tiempos de concentración de N-acetilglucosamina liberada¹⁴.

**Figura 5.** Actividad quitinasa producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 medida sobre diversos sustratos.

El empleo de medios basados en quitina coloidal ha sido reportado por Gómez *et al.*¹⁰, y en ellos la actividad de la quitinasa sobre sustratos quitinosos sólidos y coloidales coloreados con Remazol Azul Brillante (RBB) muestra mejores resultados con quitina coloidal, ya que las moléculas de sustrato son más accesibles a la enzima que en la más densa y cerrada organización molecular presente en la estructura de los sustratos sólidos, como la quitina molida.

El comportamiento de la expresión de la enzima con respecto a diferentes concentraciones del sustrato quitina coloidal puede afectar o favorecer la producción de N-acetilglucosamina bajo condiciones óptimas. Los resultados obtenidos en este ensayo están representados en la tabla 2, mostrando la enzima su máxima actividad a pH 6,5.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la actividad quitinasa de *Serratia* sp. BIOMI-363706 sobre el sustrato quitina coloidal.

Enzima	Km (mg/ml)	Vmax (μ mol/min)
Quitinasabacterial. <i>Serratia</i> sp. BIOMI-363706	1,278	0,015

CONCLUSIONES

Utilizando quitina coloidal como sustrato, la enzima producida por *Serratia* sp. BIOMI-363706 mostró, entre sus características, un rango de termoestabilidad que puede ser una ventaja para la maximización de reacciones en escalas industriales que mejoren y potencien la degradación enzimática de la quitina.

AGRADECIMIENTO

Este proyecto, identificado con el código número PO05AE-06-12-15, fue financiado por La Fundación Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental y Agroindustrial, CIEPE, San Felipe - estado del Yaracuy, Venezuela; y el Laboratorio de Biotecnología de Microorganismos «Sixto David Rojo», Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Mérida - estado de Mérida, Venezuela.

BIBLIOGRAFÍA

- Purwani, E. Y., Suhartono, M. T., Rukayadi, Y., Hwang, J. K., Pyunb, Y. R. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35, 47–153.
- Trudel, J., Asselin, A. *Analytical Biochemistry*, 1989, 178:362-366.
- Peniche, C. Estudios sobre Quitina y Quitosana. [Tesis doctoral]. La Habana- Cuba: Facultad de Química, Universidad de La Habana; 2006.
- Tokura, S., Tamura, H. Chitin and Chitosan. Eds.; Birkhaus Verlag: Boston, 2007, pp-449-468.
- Wang, S. L., Chen, S. J., Wang, C. L. *Carbohydrate Research*, 2008, 343, 1171-1179
- Cotrell, T. M., Moore, A. J., Kirchman, L. D. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, pp 2553-2557.
- Meza, R. A., Monroy, A. F., Mercado, M., Poutou, R. A., Rodriguez, P. *et al. Universitas Scientiarum*, 2004, 9, 235-42.
- Hsu, S., Lockwood, J. *Applied Microbiology*, 1975, 29 (3): 422-426.
- Reissig, J. L., Strominger, J. L., Leloir, L. F. *J. Biol. Chem.* 1955, 217:959-966.
- Gómez-Ramírez, M., Rojas-Avelizapa, L. I., Rojas-Avelizapa, N. G., Cruz-Camarillo, R. *J. Microbiol.* 2004, 56: 213–219.
- Bradford, M. M. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, 248-254.
- Suginta, W. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41: 212–220.
- Patil, R. S., Ghormade, V., Deshpande, M. V. *Enzyme Microb Technol*, 2000; 26:473–83.
- Sastoque, C. «Aislamiento y selección de microorganismos productores de quitinasas a partir de residuos de concha de camarón con potencial biocontrolador». Tesis para optar el título de microbiólogo industrial, agrícola y veterinario, Pontificia Universidad Javeriana, 2005. [Tesis de grado].

CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL DE CENIZAS DE *Morinda citrifolia* Linneo NONI

Zoila Garay¹, Alcides López^{1,2,*}, Otilia Acha De la Cruz¹, Amanda Souza³,
Ingrit Collantes¹, Paula Olivera², Julio Santiago^{2,4}

RESUMEN

El noni, Morinda citrifolia Linneo, es muy utilizado en la medicina tradicional debido a su actividad antibacteriana, antiviral, antiparasitaria, anti-hongos, previniendo la proliferación de tumores y la diabetes. En este trabajo se presenta el estudio de la composición elemental y morfológica de las cenizas de las cáscaras, semillas, pulpa y hojas del noni. Se ha encontrado que estas cenizas son básicamente de naturaleza amorfa, excepto las que provienen de la calcinación de las hojas. Los compuestos principales que han sido identificados son: CaCO_3 (semillas y hojas), Ca_2O_4 (cáscaras y semillas), KHCO_3 (en todas las muestras excepto en las hojas), KCl (hojas) y SiO_2 (hojas y pulpa). Se han podido observar nanopartículas (20 nm) en todas las muestras, excepto en las cenizas de hojas.

Palabras clave: Noni, caracterización microestructural, cenizas.

MICROSTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF ASHES FROM *Morinda citrifolia* Linneo NONI

ABSTRACT

Noni, *Morinda citrifolia* Linnaeus, is widely used in traditional medicine due to its antibacterial, antiviral, antiparasitic and antifungal properties, preventing the proliferation of tumors and diabetes. This paper presents a study of the elemental and morphological composition of the ashes from the peels, seeds, pulp and leaves of the noni. These ashes are basically amorphous, except those from the annealing of the leaves. The main compounds that have been identified are the CaCO_3 (seeds and leaves), Ca_2O_4 (peels and seeds), KHCO_3 (all samples except in leaves), KCl (leaves) and SiO_2 (leaves and pulp). Nanoparticles (20 nm) have been observed in all samples except in the ashes of leaves.

Key words: Noni, microstructural characterization, ashes.

INTRODUCCIÓN

El noni (Morinda citrifolia Linneo) conocida como queso de frutas, noni, morera india, etc; pertenece a la familia de las Rubiáceas y es nativa del sureste de Asia, Oceanía y de Asia tropical que se extiende desde la Polinesia a la India.

El noni es una planta mundialmente utilizada en la medicina tradicional para reforzar el

* Correspondencia autor: alopez@ipen.gob.pe

¹ Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Lima 25, Perú

² Dirección de Investigación y Desarrollo, Instituto Peruano de Energía Nuclear. Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

³ Laboratorio de Extração, Universidade Paulista. Av. Paulista 900, Bela Vista, São Paulo, Brazil

⁴ Facultad de Química e Ing. Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Venezuela S/N, Lima 1, Perú

sistema inmunológico debido a su actividad antibacteriana, antiviral, antiparasitaria, anti-hongos, lo que permite prevenir la proliferación maligna de tumores y la diabetes¹⁻⁴. Por esta razón ha despertado un gran interés económico y actualmente se cultiva a escala comercial en los trópicos y en el hemisferio sur⁴.

El género *Morinda* comprende alrededor de 80 especies y están presentes exclusivamente en zonas de clima tropical⁵. Esta especie es un árbol pequeño con flores blancas, hojas anchas y brillantes; la fruta madura tiene un olor fétido, cuyo responsable sería el octanoato de metilo, componente mayoritario del aceite esencial de la cáscara, pulpa y semillas⁶.

Se han hecho muchos estudios para identificar los componentes presentes en el noni; hasta el momento se han aislado aproximadamente 200 compuestos en los que se observa antraquinonas glicosiladas, ácidos grasos y sus derivados, iridoides e iridoides glicosilados, lignanos, neolignanos, flavonoides glicosilados, fenilpropanoides, triterpenos y azúcares⁷⁻¹⁰. Sin embargo, no se ha reportado hasta el momento ningún estudio de la composición de las cenizas obtenidas por calcinación de las diferentes partes del noni.

Como referencia de otros estudios de cenizas de especies vegetales podemos mencionar el estudio por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) de las cenizas de la cáscara de arroz, donde se observó un 94% de SiO₂ nanoestructurado^{11,12}. De otro lado, en un estudio realizado por MET y difracción de rayos X (DRX) sobre las cenizas del bagazo de la caña de azúcar calcinado a 800 y 1000 °C se encontraron partículas menores a 90 micras que cambian su morfología y textura en presencia de calcio y silicio, observándose magnetita en sitios ricos en calcio, se encontraron además, que estas cenizas tienen alta influencia en la actividad puzolánica^{13,14}. En otro estudio con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y MET se ha identificado la morfología de la parte orgánica que no ha sido completamente calcinada encontrándose que estas fibras retienen sus características originales¹⁵.

De acuerdo con lo mostrado, los vegetales tienen componentes inorgánicos que pueden mantener o cambiar su fase con los procesos y en especial con los tratamientos térmicos que se les practique y que han podido ser estudiadas a nivel microscópico. Tales trabajos han motivado una propuesta de estudio para las cenizas de diferentes partes de la *M. citrifolia* mediante MET y otras técnicas analíticas.

PARTE EXPERIMENTAL

Las muestras de la *Morinda citrifolia* fueron obtenidas en la ciudad de Pucallpa, departamento de Ucayali el 15 de mayo de 2007 y fueron depositadas en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos e identificadas por la Bióloga Joaquina Albán Castillo.

Las cenizas para el presente estudio fueron preparadas por calcinación a 400 °C en una mufla eléctrica y caracterizadas haciendo uso de un equipo de FTIR SHIMADZU ATR por reflectancia difusa; un microscopio electrónico de transmisión marca Philips EMG 300, en los modos de imagen y difracción de electrones; Microscopía de Luz (Meiji ENT), Difracción de Rayos X (Rigaku, modelo Miniflex, utilizando el intervalo 5° < 2θ < 80° con pasos 2θ de 0,02° y avance de 2 s/paso), Fluorescencia de Rayos X en Energía Dispersiva. Se irradió la muestra con una fuente anular de Cd-109 durante 1000 segundos. La adquisición de datos se llevó a cabo con un sistema de espectrometría de rayos X, constituido principalmente por un detector de alta resolución, de Si (Li) marca CANBERRA Modelo SL 30165 (Resolución 165 eV para 5,89 keV) y un Analizador Multicanal PCAII The Nucleus. La evaluación de los espectros e identificación de los elementos presentes en las muestras se hizo utilizando el Software Quantitative X Ray Analysis System (QXAS) proporcionado por el Organismo Internacional de Energía Atómica.

Preparación de la muestra para análisis por MET

Luego de la calcinación, el tamaño de las partículas fueron homogenizadas mediante la **molienda** de las cenizas en un mortero de ágata. Dichas partículas fueron suspendidas en agua destilada para hacer que las partículas más grandes precipitaran más rápido, la parte alta de la suspensión, la cual contenía las partículas más pequeñas fueron tomadas con una pipeta Pasteur y colocadas sobre una membrana de parlodion de las rejillas portamuestras. Luego de evaporarse el agua a temperatura ambiente se procedió al análisis morfológico y su microestructura cristalina mediante la Difracción de Electrones de Área Selecta (DEAS).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis por IR, figura 1, no se detecta estructuras orgánicas, pero sí se llega a identificar la presencia de CaCO_3 en todas las muestras.

En el análisis por microscopía de luz se observa que las cenizas de cáscara de noni, figura 2a, presentan un aspecto granular con un diámetro medio de 0,5 mm distinguiéndose una fase oscura y otra clara, ambos duros para la molienda. Las cenizas de las hojas, figura 2b, son de color gris claro con aspecto de polvo muy suave para la molienda. Las cenizas de la pulpa, figura 2c, están constituidas de granos oscuros de aproximadamente 0,3 mm mezclados con un polvo blanco, ambos muy suaves para la molienda. En contraste con los casos anteriores, las cenizas de la semilla, figura 2d, tienen un color gris claro y granos blancos de 0,4 mm, suaves a la molienda.

En el estudio de las cenizas por MET de los diferentes órganos de *M. citrifolia* se ha encontrado abundante material micro y nano estructurado. En la figura 3, en cada caso, se muestran las imágenes obtenidas por esta técnica, mostrando su respectiva barra de calibración con el propósito de estimar las formas y dimensiones de los diferentes componentes presentados en cada micrografía. Adicionalmente, en algunas de las micrografías se han incorporado en una esquina, su correspondiente patrón de difracción electrónico. Al hacer el estudio de dichos patrones se han encontrado coincidencias con estructuras variadas y se muestran en la tabla 1; éstas se obtuvieron al ser comparadas con las distancias interplanares de la base de datos JCPDF (Joint Committee of Powder Diffraction File) usados para los análisis por difracción de rayos X. Según los espectros de DRX, figura 4, en las cenizas de cáscara se observa la predominancia de oxalato de calcio, CaC_2O_4 , bicarbonato de potasio y KHCO_3 , siendo la mayor parte de este material de naturaleza amorfa.

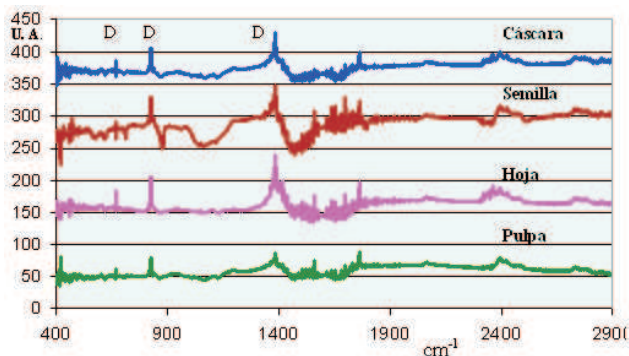


Figura 1. Espectros FTIR de cenizas de la cáscara, semilla, hoja y pulpa de *M. citrifolia*. D corresponde al CaCO_3 .

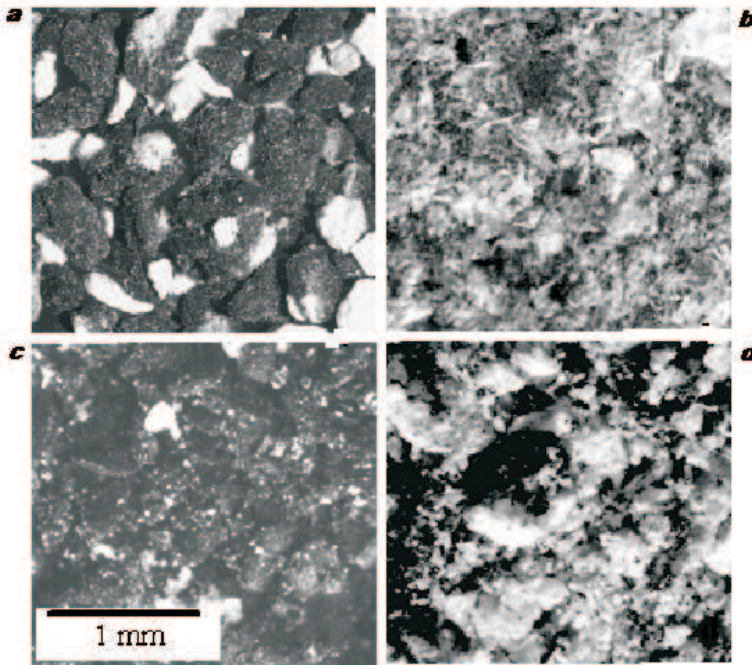


Figura 2. Imágenes por microscopía de luz a iguales ampliaciones de las cenizas de *M. citrifolia* a) cáscara, b) hoja, c) pulpa y d) semilla.

Tabla 1. Resultados del análisis por MET.

Muestra	Sólidos cuyas difracciones coinciden con el análisis DEAS	Análisis morfológico por MET
Pulpa	Si, Mn β , Al ₂ SiO ₅ , C ₁₀ H ₁₆ , Fe ₂ SiO ₄ , Al ₃ Zr ₄ , Mg(OH) ₂ , Ta ₂ O, Mn, Fe(α), Ca, Ni(OH), (Li, Al)Mn ₂ O ₄ y C ₆ H ₇ NaO ₇	Se observan fragmentos bien cristalizados de gran tamaño, mayores a 3 μ m
Semilla	Mn, Si y Fe(α), Ca, SiO ₂ Mn(β), Fe, Ca	Partículas cristalinas del orden de los 20 nm, y casquetes esferoidales de material inorgánico amorfo del orden de los 300 nm de diámetro. Aglomerados de partículas amorfas del orden de 1 μ m, nanopartículas amorfas menores a 20 nm de tamaño.
Cáscara	Material amorfo	Se observan cristales alargados de 100 nm de ancho y más de 1 μ m de longitud sobre un fondo de nanopartículas de 20 nm.
Hoja	Ca, Si, Mn, Fe	

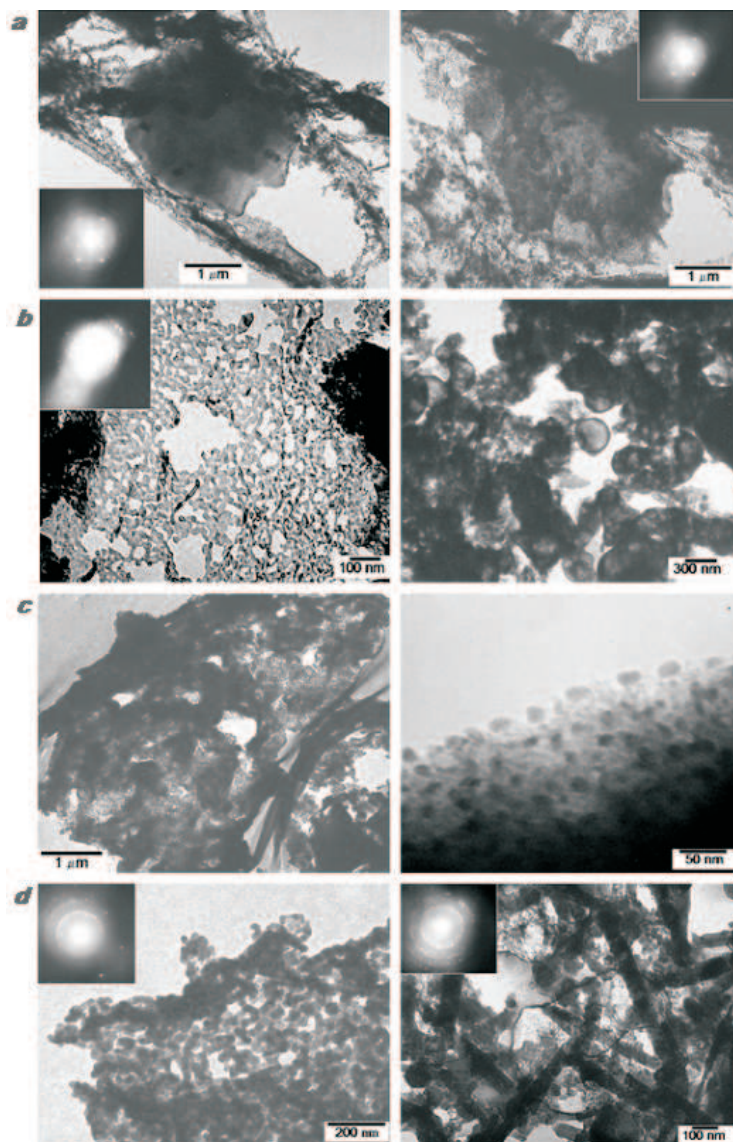


Figura 3. Micrografías MET vistas a dos ampliaciones (izquierda y derecha) y patrones de difracción (DEAS, ver esquinas) de cenizas de *M. citrifolia*. **a)** pulpa, **b)** semilla, **c)** cáscara y **d)** hojas.

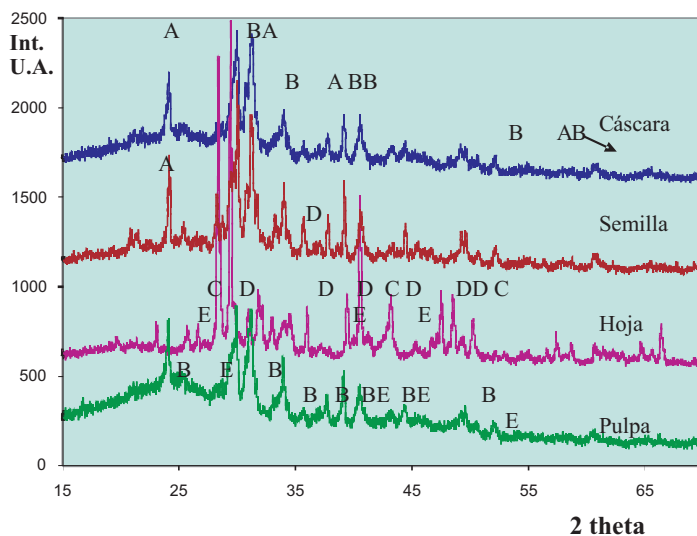


Figura 4. Patrones de Difracción de Rayos X de cenizas de la cáscara, semilla, hoja y pulpa de *M. citrifolia*. Ver descripción en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de los análisis por difracción de rayos X de cenizas de la cáscara, semilla, hoja y pulpa de la *M. citrifolia*, referidos a los patrones de difracción de la figura 4.

Etiqueta	Fórmula	Nombre	Ref. JCPDF
A	CaC_2O_4	Oxalato de calcio	00-003-0090
B	KHCO_3	Bicarbonato de potasio	01-086-0912
C	KCl	Cloruro de potasio	01-075-0296
D	CaCO_3	Carbonato de calcio	00-004-0636
E	SiO_2	Dióxido de silicio	01-083-0539

En la semilla se nota la predominancia del oxalato de calcio CaC_2O_4 , bicarbonato de potasio KHCO_3 y poca cantidad de carbonato de calcio, CaCO_3 . En la hoja se nota la abundancia de CaCO_3 y KCl y pocas cantidades de SiO_2 con una alta cristalinidad en toda la muestra. Finalmente, en la pulpa se ve una abundancia de KHCO_3 , presencia de SiO_2 y una porción considerable de material amorfo. Estos datos están agrupados en la tabla 2.

El análisis de las cenizas de las hojas por FRX, figura 5, permite identificar la presencia de potasio, calcio y estroncio y en menor cantidad relativa el cloro, hierro, manganeso, zinc, bromo y rubidio.

CONCLUSIONES

Las cenizas de las cáscaras, semillas, pulpa y hojas del noni son mayoritariamente de naturaleza amorfa, excepto las que provienen de la calcinación de las hojas. Los compuestos principales que han sido identificados son el CaCO_3 (semillas y hojas), CaC_2O_4 (cáscaras y semillas), KHCO_3 (en todas las muestras excepto en las hojas), cloruro de potasio KCl (hojas) y óxido de silicio SiO_2 (hojas y pulpa). También se ha podido observar estructuras

nanoparticuladas, tanto amorfas como cristalinas, de aproximadamente 20 nm en todas las muestras, excepto en las cenizas de hojas.

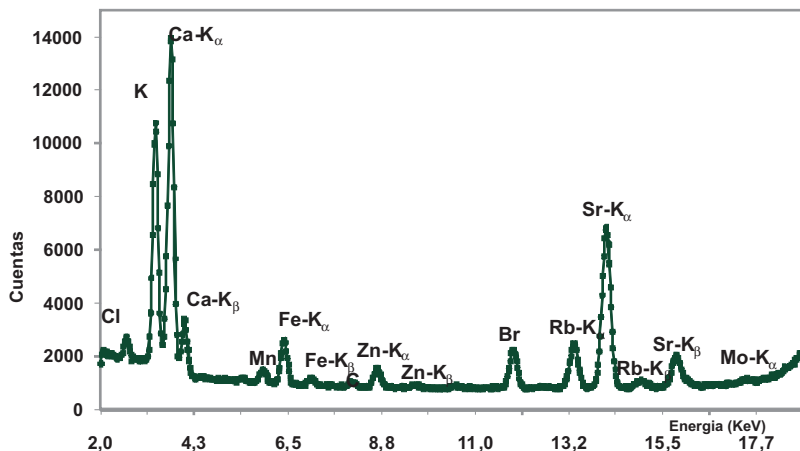


Figura 5. Espectroscopía de Fluorescencia de Rayos X de la muestra de hoja.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Solís V. de la Dirección de Investigación y Desarrollo del Instituto Peruano de Energía Nuclear y a la Bióloga Joaquina Albán Castillo, del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kumar S, Saravanan M, Illanchezian S, Antibacterial, Antifungal and Tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. *International Journal of Integrative Biology*. 2008; 3(1):44-49.
2. Rodríguez M, Boffill M, Lorenzo G, Sánchez P, López R, Verdecía B, Díaz L, Evaluación preclínica del efecto antiinflamatorio del jugo de *Morinda citrifolia* L. *Revista Cubana de plantas medicas*. 2005; 10(3-4).
3. Palu A, Seifulla R., West B, *Morinda citrifolia* L. (noni) improves athlete endurance: Its mechanisms of action. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2008; 2(7):. 154-158.
4. Pawlus A, Kinghorn D, Review of the ethnobotany, chemistry, biological activity and safety of the botanical dietary supplement *Morinda citrifolia* (noni). *Journal of Pharmacy and pharmacology*. 2007; 59: 1587-1609.
5. Potterat O, Hamburger M, *Morinda citrifolia* (Noni) Fruit-Phytochemistry, pharmacology, Safety, *Planta Medica*. 2007; 73: 191-199.
6. González S, Estrada A, del Val R, Rosales T, Andrade I, Hernández A, Determinación de compuestos volátiles en compuestos de Noni (*Morinda citrifolia* L.) mediante microextracción en fase sólida y cromatografía de gases, XVII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. Acapulco, marzo 2010. Disponible en http://biomedbiotec.homelinux.org/congreso2010/Extensos/Prod_naturales/NAT71ALE20091209.pdf

7. García C, Kim N, Bich N, Tillan J, Romero A, Darío O, Fuste V, Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora incarnata* L., *Matricaria recutita* L. y *Morinda citrifolia* L. Secondary metabolites in *Passiflora incarnata* L., *Matricaria recutita* L. and *Morinda citrifolia* L. dry extracts. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2009; 14(2). Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962009000200004&script=sci_arttext
8. Simonsen J, Note on the Constituents of *Morinda citrifolia*. *Journal of the Chemical Society Transactions*. 1920; 117:561–564.
9. Chunhieng T, Hay L, Montet D, Detailed study of the juice composition of noni (*Morinda citrifolia*) fruits from Cambodia, *Fruits*. 2005; 60:13-24.
10. Chan-Blanco Y, Vaillant F, Pérez A, Belleveille M, Zúñiga C, Brat P, The Ripening and aging of noni fruits (*Morinda citrifolia* L.): Microbiological Flora and Antioxidant Compounds, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007; 87: 1710–1716.
11. Proctor A, X-ray diffraction and scanning electron microscope studies of processed rice hull silica, *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1990; 67(9):576-584.
12. Sánchez N, Solache M, Teresa M, Fripiat J, Pacheco G, Saniger J, Bulbulian S, Selectivity of the Cd²⁺/Ca²⁺ exchange on modified rice hull silica. *Environmental Technology*. 2009; 30(3):269-275.
13. Payá J, Monzó J, Borrachero M, Díaz L, Ordóñez L, Sugar-cane bagasse ash (SCBA): studies on its properties for reusing in concrete production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2002; 77 (3):321-325.
14. Frias M, Villar E, Valencia E, Characterization of sugar cane straw waste as pozzolanic material for construction: Calcining temperature and kinetic parameters. *Waste Management* 2007; 27:533–538.
15. Batra V, Urbonaitė S, Svensson G, Characterization of unburned carbon in bagasse fly ash. *Fuel*. 2008; 87(13-14):2972-2976.

CONSTITUYENTES QUÍMICOS DEL TÚBERO DE *Dracontium spruceanum* (Schott) G.Zhu ex *Dracontium loretense* Krause (Araceae)

Ingrit E. Collantes Díaz^{1*}, Eduardo G. Gonçalves², Massayoshi Yoshida^{3,4}

RESUMEN

Este trabajo describe el análisis fitoquímico de los túberos de *Dracontium spruceanum* (Schott) G.Zhu, nativo de la región amazónica, el cual es usado popularmente contra picada de la serpiente *Bothrops atrox* y también para algunas enfermedades. A partir de la extracción con solventes orgánicos y la separación por cromatografía del extracto etanólico, se obtuvo sitosterol (I), estigmasterol (II), 3-β-hidroxi-5-eno-7-cetona (III), *p*-hidroxibenzaldehído (IV), ácido *p*-hidroxybenzoico (V), sitosterol acilglicosilado (VI), 7-oxositosterol acilglicosilado (VII), sitosterol glicosilado (VIII), sacarosa (IX); las fracciones polares fueron acetiladas y sometidas a purificación por cromatografía, que condujeron a una mezcla de carbohidratos peracetilados, 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-1-etil-glucosa (X); los diez compuestos fueron identificados y elucidados por análisis espectroscópico CG-EM, RMN¹H y RMN¹³C.

Palabras clave: *Dracontium spruceanum* (Schott) G.Zhu, esteroides, esteroide glicosilado, esteroides acilglicosilados.

CHEMICAL CONSTITUENTS FROM TUBERS OF *Dracontium spruceanum* (Schott) G. Zhu ex *Dracontium loretense* Krause (Araceae)

ABSTRACT

This work describes phytochemical analysis of an Araceae species *Dracontium spruceanum* (Schott) G.Zhu, which occurs in Amazon region and is popularly used against snakebite and treatment of some diseases. The solvent partitions and chromatographic fractionations of extract afforded sitosterol (I), stigmasterol (II), 3-β-hydroxycholest-5-en-7-one (III), *p*-hydroxybenzaldehyde (IV), *p*-hydroxybenzoic acid (V), acyl-glycosyl sitosterol (VI), acyl-glycosyl-7-oxo-sitosterol (VII), sitosteryl-glycoside (VIII), sucrose (IX). The polar fractions were acetylated before the purification and the isolation through chromatographic techniques yielded a mixture of peracetylated carbohydrates: 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-ethylglucose (X), which was identified by spectroscopic analysis [GC-MS, ¹³C NMR and ¹H NMR].

Key words: *Dracontium spruceanum* (Schott) G.Zhu, steroid, steroid glycoside, acylglycosylsteroid.

INTRODUCCIÓN

La familia Araceae comprende 106 géneros y cerca de 3000 especies¹, y el género *Dracontium* está constituido por 23 especies, muchas de ellas distribuidas en los trópicos húmedos, desde

^{1*} Laboratório de Extração da Universidade Paulista, Av. Paulista 900, Bela vista C.E.P 01310-100, São Paulo, Brasil ingrit_uni@hotmail.com

² Jardim Botânico Inhotim, Minas Gerais, Brasil

³ Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Brasil

⁴ Centro de Biotecnologia da Amazônia, Manaus, Brasil

México y Nicaragua hasta Paraguay². *Dracontium spruceanum* (Schott) G.Zhu (antes más conocido como *Dracontium lorentense* Krause) ocurre desde Costa Rica hasta Brasil² y puede medir hasta 1,5-2 m de altura. Esta especie presenta hojas lobulares y el peciolo está cubierto de anillos oscuros muy parecido al de la piel de la serpiente *Bothrops atrox*; comúnmente encontrada con los nombres de hierba del jergón, jergón sacha, hurignpe (Amarakaeri), mágoro (Machiguenga), du nu yubi (Cashinaguas), ronon rao and shanvi yorá (Shipibonibo), see (Ese'eja) y shandórao (Amahuaca)³.

Los habitantes de la selva peruana usan *D. spruceanum* sobándose o chicoteándose con la planta (hojas y peciolo) antes de entrar en la selva como medida de evitar la picada de la serpiente⁴; también es usado para síntomas o enfermedades como temblor de las manos, epilepsia, diarrea, herpes, SIDA, hernia, cáncer, asma. Los túberos son amasados y aplicados en la mordida de la serpiente *B. atrox* para contrarrestar el efecto del veneno⁵. La tribu de los Ese'eja del sud-este del Perú utilizan *Dracontium* sp, llamada de jergón sacha, para la mordida de serpientes; la planta es cocida y macerada, usándola externamente⁶.

Los extractos, acuoso y metanólico, presentan total capacidad reactiva antioxidante, mientras que el extracto de diclorometano de *D. spruceanum* no presenta dicha actividad⁷. *Dracontium pittieri* Engler no es activo contra el veneno de serpiente *B. atrox* cuando se hace pruebas *in vivo* con ratones⁸. El extracto de *D. spruceanum* reduce en 34% el edema inducido por carragenina en el modelo de pata de ratón⁹; ya el extracto acuoso neutralizó la actividad letal del veneno de *Bothrops atrox*³. Cuatro nuevas oxilipinas fueron aisladas del extracto con alcohol n-butílico de las espigas de *D. spruceanum*, y el ácido (9R,10S,7E)-6,9,10-trihidroxioctadec-7-enoico presentó efecto inmunoestimulador en proliferación PBMC humano¹⁰.

En este artículo abordaremos el aislamiento de metabolitos secundarios de los túberos de *D. spruceanum*.

PARTE EXPERIMENTAL

Colecta de la muestra e identificación botánica

Fueron colectados los túberos (figura 1 A) en los alrededores de la ciudad de Pucallpa en el departamento de Ucayali, Perú, en diciembre del 2000; uno de los túberos fue plantado en el vivero del Instituto de Química de la Universidade de São Paulo para la identificación botánica (figura 1 B) y otra se encuentra plantada en el Jardín Botánico Inhotim (JBI 0000956).

El material vegetal fue identificado por el botánico Eduardo Gonçalves del Jardín Botánico Inhotim, Minas Gerais-Brasil como mostramos en la tabla 1. Un ejemplar de la especie (Collantes 001) fue depositado en el herbario del Instituto Botánico de São Paulo-Brasil (tabla 1 y figura 1).

Tabla 1. Identificación taxonómica de *D. spruceanum*.

División XVII	Angiospermae
Clase	Monocotiledónea
Orden	Alismatales
Familia	Araceae
Subfamilia	Lasioideae
Género	<i>Dracontium</i>
Especie	<i>Dracontium spruceanum</i> (Schott) G.Zhu
Nombre común	Jergón sacha

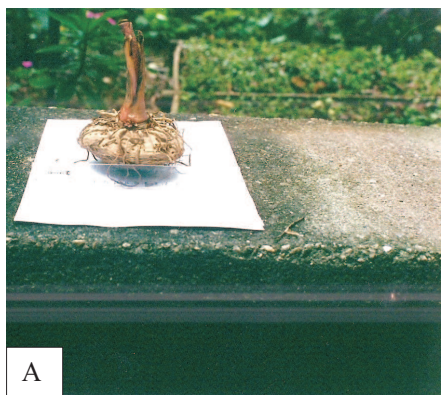


Figura 1A. Tubero de *D. spruceanum*.



Figura 1B. Hojas y peciolo de *D. spruceanum*.

Extracción y aislamiento de metabolitos secundarios

Los tuberos frescos, de 2,8 kg fueron secados en estufa con corriente de aire, obteniéndose 835,7g de material seco que fue molido y macerado en hexano a temperatura ambiente, por tres veces; el material desengrasado fue macerado en etanol al 50%. El extracto hexánico fue concentrado en rotaevaporador hasta la obtención de un extracto pastoso (1,38g); el extracto etanólico fue sometido a concentración en rotaevaporador hasta un volumen de aproximadamente 100 mL, dejando en reposo por tres días a temperatura ambiente, observándose la precipitación de unos cristales cuadrados (4,9g); el extracto fue filtrado, para su posterior concentración hasta la obtención de un residuo pastoso oscuro (19g). Finalmente, el extracto etanol-agua 50% fue concentrado; el etanol en rotaevaporador y el agua fue liofilizado para la obtención del extracto respectivo (75g).

El extracto etanólico (19g) fue resuspendido en metanol para hacer una partición con los solventes hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol-agua, obteniéndose los residuos de 2,1g; 2,4g; 1,09g; 13,4g, respectivamente; el residuo hexánico (2g) fue sometido a cromatografía en columna, usando como fase estacionaria sílica-gel y como fase móvil la mezcla de solventes hexano, acetato de etilo y metanol, de polaridad creciente, obteniéndose 45 fracciones que fueron sometidas a cromatografía en capa delgada en cromatofolios de sílica gel y revelando con una solución de ácido sulfúrico al 20%, seguida de calentamiento; fueron reunidas, siguiendo un patrón de semejanza, las fracciones 4-10, 13-21, 25-30, 32-40; el residuo clorofórmico (2,2g) también fue sometido a cromatografía de igual manera que el residuo hexánico, obteniéndose 51 fracciones, que fueron reunidas siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, obteniéndose las fracciones 3-7, 15-20, 27-38, que fueron comparadas con las fracciones del residuo hexánico, resultando 13-21(hex) fue reunido con 3-7(CHCl_3) y 32-40(hex) fue reunida con 27-38 (CHCl_3).

De la reunión de las fracciones 13-21(hex) con 3-7(CHCl_3) se obtuvo una mezcla de compuestos que fue sometida a cromatografía en una placa de sílica gel PF 254 preparativa de la marca MERCK en una placa de vidrio de 20 x 20 cm y 1 mm de espesor, eluyendo en la mezcla de solventes hexano:acetato de etilo (4:1) sucesivas veces para aislar la mezcla de compuestos **I-II** y **III**. La fracción 15-20(CHCl_3), al igual que las fracciones anterior fue sometido a cromatografía de capa delgada preparativa (CCDP) en la mezcla de solventes

CHCl₃:AcOEt (1:1) para aislar los compuestos **IV** y **V**. De la reunión de las fracciones 32-40(hex) con 27-38 (CHCl₃) que fue sometido a CCDP en la mezcla de solventes CHCl₃:AcOEt:MeOH (2:2:0,5) sucesivas veces, fueron aislados los compuestos **VI**, **VII** y **VIII**.

Fueron transesterificados 5 mg de los compuestos **VI** y **VII** según la literatura¹¹ para analizar los ácidos grasos presentes en las estructuras de dichas moléculas por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (CG-EM).

Los residuos de acetato de etilo y metanol-agua (100 mg de cada uno) fueron acetilados con 20 ml de la mezcla de anhídrido acético:piridina 1:1 (reposo por 24 h), adicionar agua helada y esperar enfriar, luego extraer con cloroformo, esta fase orgánica fue neutralizada con ácido clorhídrico al 10%, seguido de lavado con agua para remover el exceso de ácido y, finalmente, secar con sulfato de sodio anhidro para obtener los residuos acetilados y secos, que fueron analizados por RMN¹H y de ¹³C, de donde fue aislado el compuesto **IX**.

Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear ¹H y ¹³C fueron registrados en un espectrómetro de la marca Varian INOVA DPX-300 (7,05T) operando a 300 MHz para RMN ¹H y 75 MHz para RMN ¹³C. De acuerdo con la solubilidad de las muestras, los espectros fueron obtenidos en CDCl₃, CD₃OD y D₂O de la marca Merck.

Análisis por cromatografía gaseosa (CG).

El análisis por cromatografía gaseosa fue realizado en un cromatógrafo de la Hewlett Packard modelo 5890 serie II con inyector automático HP 7673 e integrador HP 3396A. Como fase estacionaria fue utilizado columna capilar de fenil-silicona 5% y metil-silicona 95% de 0,25 mm de diámetro interno y 30 m de longitud; las condiciones utilizadas en el experimento fueron: temperatura de inyección 220°C, detector de llama (FID) 280°C, el gas de arrastre He, flujo de 6mL/min. (30°C), temperatura de columna 120°C durante 2 min con gradiente de 10°C/min hasta 280°C por 15 min.

Análisis por espectrometría de masas.

Los espectro de masas fueron registrados en un sistema CG-EM Shimadzu constituida por un cromatógrafo modelo CG-17A y espectrómetro MS-QP 5050A, con temperatura de inyección 150°C, con temperatura de horno 60°C por 2 min, con incremento de 10°C/min hasta 250°C por 10 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el fraccionamiento del extracto hexánico y el análisis por RMN ¹H de las fracciones obtenidas, fue observada la presencia de alto porcentaje de ácidos grasos y triglicéridos, lo que complicó la identificación de los metabolitos; para facilitar el aislamiento, las fracciones fueron acetiladas, lo que condujo a la identificación de los compuestos **I-II** y **III** acetilados.

Los cristales cuadrados (4,9 g) que precipitaron del extracto etanólico fueron analizados por RMN ¹H en agua deuterada (D₂O) y fue identificado como sacarosa (**IX**) por comparación del espectro con una muestra original de la marca Sigma.

Compuestos I y II.- Fueron aislados 71,2 mg de cristales de la mezcla de dos compuestos, cuyo espectro de RMN ¹H presenta absorciones características de esteroides como un triplete ancho en 5,3 ppm que indica la presencia de un hidrógeno olefínico (**H-6**); un duplo-duplo-duplo doblete en 3,52 ppm, con constante de acoplamiento (*J*) (*J*=9,5; 4,8; 11,2 y 4,6 Hz); las señales 5,07 y 5,16 ppm indican la presencia de los hidrógenos enlazados a los carbonos 22 y 23 del compuesto II (figura 2). El espectro de RMN ¹³C (tabla 2) obsérvase diversos picos de

carbonos alifáticos entre la región 12 - 57 ppm y las señales de los carbonos carbonílicos en 70,1 y 72,1 ppm. Las señales que permiten una posición estructural en δ 141; 138,5; 129,6; 121,9; siendo que las señales 141 y 121,9 ppm son de mayor intensidad que los demás; la comparación de los picos del espectro con los referentes a sitosterol y estigmasterol disponibles en la literatura¹² confirmamos la estructura de estos compuestos.

Compuesto III.- Se aisló 10 mg de un sólido blanco amorfo, cuyo espectro de RMN ¹H presenta señales características de esteroides, como un *dddd* en δ 3,52 ($J=9,5; 4,8; 11,2$ y $4,6$ Hz) del **H-3**, un singlete en δ 5,3 del hidrógeno olefínico del **C-6**. El espectro de RMN ¹³C (tabla 2) presenta 29 picos; dentro de ellos está una señal característica de carbono carbonílico en δ 70,6 de **C-3**, un pico en δ 202,2 atribuido a un carbonilo (**C-7**) y las señales de δ 165,1 y 126,1 de los **C-5** y **C-6**, que permiten una posición estructural. La comparación de estas señales con la descrita en la literatura¹³ permitió demostrar que el compuesto III es 3- β -hidroxi-5-eno-7-cetona.

Compuesto IV.- Fueron aislados 3,6 mg de sustancia resinosa de color amarillo claro cuyo espectro de RMN ¹H presenta un singlete en δ 9,9 característico de aldehído, dos dobletes en la región aromática en δ 7,8 y 6,9 con $J = 9$ Hz, lo que sugiere que el anillo aromático está sustituido en posición para. El espectro de RMN ¹³C (tabla 2) presenta 5 picos, una señal en δ 190,8 característico del grupo carbonilo de aldehído, una señal en δ 129,3 típica de carbono aromático enlazado a carbonilo (carbono ipso), y las señales en δ 132,4 y 115,9 más intensas que los demás carbonos; cada una representa dos carbonos **C-2**, **C-6** y **C-3**, **C-5**, respectivamente; la comparación de estos datos, con los de la literatura¹⁴, confirma que se trata de *p*-hidroxibenzaldehído.

Tabla 2. Desplazamiento químico de RMN ¹³C (75 MHz) de los compuesto aislados de *D. spruceanum* (Schott) G.Zhu.

	I CDCl ₃	II CDCl ₃	III CDCl ₃	IV CDCl ₃	V CD ₃ OD	VI CDCl ₃	VII CDCl ₃	VIII CDCl ₃ + CD ₃ OD	X CDCl ₃
1	37,6	37,6	36,4	129,3	122,7	37,2	36,4	39,4	100,4
2	31,9	31,9	31,2	132,4	133,0	31,9	31,9	30,4	71,2
3	70,1	72,1	70,6	115,9	116,0	79,8	78,5	79,7	71,6
4	42,6	42,6	41,8	161,3	163,3	42,2	43,1	43,1	68,4
5	141,0	141,0	165,1	115,9	116,0	140,3	165,3	1413	72,8
6	121,9	121,9	126,1	132,4	133,0	122,0	126,1	122,6	61,9
7	32,1	31,9	202,3	CO 190,8	CO 170,1	31,9	202,5	32,7	CH ₂ 65,5
8	32,1	31,9	45,4			31,9	45,4	32,8	CH ₃ 14
9	54,0	50,4	49,9			50,3	49,7	51,2	4CO 169,2-170,5
10	36,8	36,8	38,3			36,1	38,5	38,1	4CH ₃ CO 20,4-20,5
11	21,2	21,2	21,2			21,1	21,3	21,8	
12	39,9	39,9	38,7			39,7	38,7	40,7	
13	42,6	42,6	43,1			42,2	43,1	43,1	
14	57,1	57,2	49,9			56,9	49,7	57,8	
15	24,5	24,5	23,1			24,3	23,1	24,9	
16	28,5	29,1	28,5			28,2	28,5	28,9	
17	56,4	56,4	54,8			56,2	54,9	56,9	
18	-	12,2	11,9			12,0	11,9	12,5	
19	19,3	19,3	17,3			19,3	17,2	19,2	
20	36,4	40,6	36,1			36,1	36,1	37,5	
21	19,2	21,2	19,1			18,9	19,0	20,1	
22	34,3	138,5	33,9			34,2	34,3	36,9	
23	29,5	129,6	26,3			29,2	26,3	26,9	
24	-	51,3	45,4			50,3	45,9	46,8	
25	26,5	31,9	29,2			26,1	29,2	29,9	

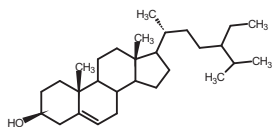
sigue ...

... viene

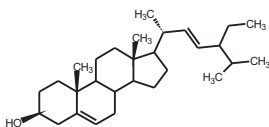
	I CDCl ₃	II CDCl ₃	III CDCl ₃	IV CDCl ₃	V CD ₂ OD	VI CDCl ₃	VII CDCl ₃	VIII CDCl ₃ + CD ₂ OD	X CDCl ₃
26	19,0	19,0	19,1			18,8	19,8	19,7	
27	19,6	21,2	18,9			19,8	19,0	19,4	
28	23,4	25,6	23,1			23,1	23,1	23,8	
29		12,1	11,9			11,9	11,9	12,3	
1'						101,0	101,6	102,0	
2'						73,6	73,4	77,6	
3'						76,1	76,4	74,6	
4'						70,3	70,4	71,2	
5'						73,6	73,4	77,2	
6'						63,2	63,6	62,5	
1''						174,4	174,2		
2''						31,9	31,9		
3''						24,9	24,9		
4''-13''						29,2-29,9	29,2-29,7		
14''						32	32		
15''						22,8	22,6		
16''						14,2	14,0		

- No determinado.

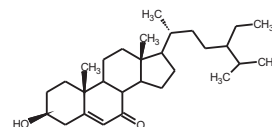
Compuesto V.- Fueron aislados 57 mg de cristales transparentes; el espectro de RMN ¹H presenta dos dobletes con *J* 9 Hz en 6,81 y 7,87 ppm; el espectro de RMN ¹³C (tabla 2) presenta 5 picos: una señal en δ 170 ppm, típico de un carbono carbonílico, en 122,7 ppm de un carbono ipso, en 163,4 ppm de un carbono aromático enlazado a un hidroxilo, dos carbonos más intensos 132,7 y 115,8 ppm. Los desplazamientos químicos, comparados con la literatura ¹⁵, confirman que fue aislado el ácido *p*-hidroxibenzoico.



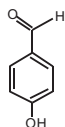
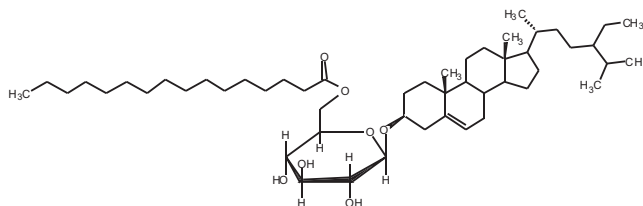
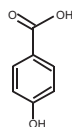
Sitosterol I



Estigmasterol II



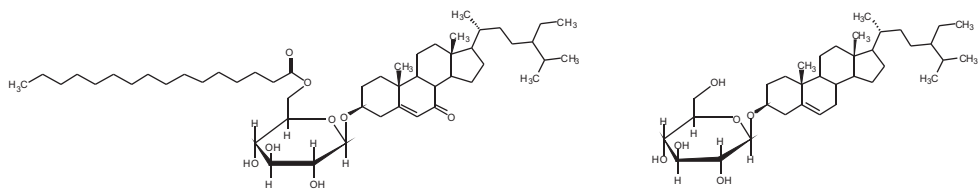
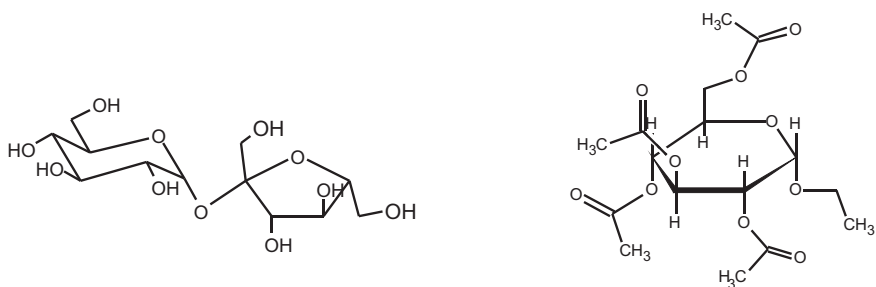
3-β-hidroxi-5-eno-7-cetona III

*p*-hidroxibenzaldehído IV. Ácido *p*-hidroxibenzoico V

Sitosterol acilglicosilado VI

sigue ...

... viene

7-oxositosterol acilglicosilado **VII**Sitosterol glicosilado **VIII**Sacarosa **IX**2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-etil-glucosa **X****Figura 2.** Estructuras de las moléculas aisladas de los túberos de *D. spruceanum*.

Compuesto VI.- Se obtuvo 55,3 mg de un sólido amorfo blanco; fue identificado por comparación con la literatura¹⁶, señales de carbonos metilénicos en 122 y 140 ppm, similares a los carbonos de la molécula **I** (tabla 2). Las absorciones en 79 y 101 ppm sugieren que el sitosterol está glicosilado, pues el valor de 101 ppm es característico de carbono anomérico; las señales 73,6; 76,1; 70,3; 73,6 y 63,2 ppm sugieren que el azúcar que está enlazada al sitosterol es glucosa, y en adición, las señales del espectro de RMN ¹³C (tabla 2) presenta 174 ppm, característico de carbonilo de éster. Junto con la absorción en 29 ppm de carbono metilénico sugiere que el azúcar está esterificado con un ácido graso. Con la intención de determinar el número de carbonos del ácido graso, transesterificamos¹¹ la molécula **VI**; el éster del ácido graso fue analizado por CG-EM y nos proporcionó la cadena de 16 carbonos (ácido palmítico); el espectro de RMN ¹³C no presenta más carbonos insaturados que los indicados arriba. Comparados con la literatura¹⁶ se concluye que se trata del sitosterol acilglicosilado, llamado también sitoindoside¹⁷.

Compuesto VII.- Fueron aislados 15,1 mg de un sólido amorfo blanco; los desplazamientos químicos observados en el RMN ¹³C sugieren que es un esteroide glicosilado; señales de los carbonos metilénicos en 126,1; 165,5; y 202,6 ppm análogos a los carbonos 5,6 y 7 de la molécula **III** (tabla 2) y de la literatura¹³; absorciones en 78,5 y 101,6 ppm, al igual que el compuesto anterior (VI), sugiere que la molécula está enlazada a un azúcar, y por las señales en 73,4; 76,2; 70,7; 76,2; y 63,7 ppm sugieren que es glucosa. El espectro de RMN ¹³C presenta la señal en 174,3 ppm, característico del carbonilo de un éster, junto con la absorción en 29

ppm de carbono metilénico, sugiere que el azúcar está esterificado con ácido graso; y para determinar el número de carbonos del ácido graso, transesterificamos¹¹ la molécula VII; el éster del ácido graso fue analizado por CG-EM y nos proporcionó que la cadena de carbonos es de 16 carbonos (ácido palmítico), el espectro de RMN ¹³C no presenta más carbonos insaturados que los indicados arriba; concluyendo que estamos frente a 7-oxo-sitosterol acilglicosilado.

Compuesto VIII.- Fueron aislados 7,2 mg de un sólido blanco amorfo; el espectro de RMN ¹H presenta absorciones características de un esteroide glicosilado, como un triplete ancho en 5,34 ppm que indica la presencia de un hidrógeno olefínico (H-6); un doblete en 4,36 ppm con *J* 7,8 Hz, que indica el hidrógeno anomérico en posición β; varios multipletes entre 3,13 - 3,86 ppm, señales de los 7 hidrógenos del azúcar enlazado al esteroide. El espectro de RMN ¹³C (tabla 2) presenta señales de carbono metilénicos en 141,34 y 122,59 ppm; la absorción de un carbono anomérico en 102,04 ppm, una señal de carbono carbonílico en 79,70 ppm y las señales de los carbonos del azúcar en 77,56; 77,16; 74,58; 71,22 y 62,49 ppm que, confrontando con la literatura¹⁸, concluimos que esta molécula es sitosterol glicosilado.

Con intención de identificar los compuestos más polares que hacen parte de los residuos de acetato de etilo y metanol-agua, fue acetilado y se encontró que el compuesto mayoritario es etilglucosa, y revisando la literatura¹⁹, encontramos que acetilando con anhídrido acético y piridina, el grupo OH del carbono anomérico al reaccionar a este método de derivatización forma el grupo OCH₂CH₃; además de acetilar como se pretendía los otros grupos OH del azúcar, como mostramos en la estructura X en la figura 2.

Compuesto X.- Fueron aislados 47,2 mg de un sólido marrón amorfo; el espectro de RMN ¹H presenta las siguientes señales, δ 5,21 *t* *J* 9,6 Hz del H-3; δ 5,1 *t* *J* 9,9 Hz del H-4, δ 4,9 *dd* *J* 9,9; 8,0 Hz del H-2; un doblete en 4,5 ppm del hidrógeno anomérico con *J* 8,1 Hz del H-1 lo que indica que está en posición β; δ 4,3 *dd* *J* 12; 4,5 Hz del H-6; δ 4,1 *dd* *J* 12,3; 2,5 Hz del H-6'; δ 3,92 *dq* *J* 9,9; 7,2 Hz del H-7; δ 3,7 m del H-5; δ 3,6 *dq* *J* 9,9; 7,2 Hz del H-7'; 4 singletes en 1,93; 1,95; 1,97 y 2,0 ppm correspondientes a los 4 acetatos y un triplete en 1,3 ppm del H-8 de CH₃ del grupo etil; el espectro de RMN ¹³C presenta 4 señales características de carbonilos de los acetatos en la región de 169,2-170,5 ppm; 4 picos de CH₃ también de los acetatos en la región de 20,4-20,5 ppm, un pico en 100,4 ppm característico de carbono anomérico; señales en 71,2; 71,6; 68,4; 72,8 y 61,9 ppm correspondientes a los carbonos C-2, C-3, C-4, C-5 y C-6, la señal en 65,5 ppm corresponde al grupo CH₂ del grupo etil y la señal en 14 ppm al grupo CH₃ del grupo etil.

CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico del tubero de *D. spruceanum* de las fracciones apolares, condujo al aislamiento de ocho metabolitos secundarios; dentro de estos compuesto ya conocidos y aislados en otras plantas, como mostramos por la comparación de los desplazamientos químicos, con la literatura correspondientes para la identificación de los mismos, excepto el compuesto VII, ya que es la primera vez que fue aislado de una planta y reportado en la literatura.

En el transcurso del trabajo fue encontrado que *D. spruceanum* produce sacarosa, además de los metabolitos secundarios; también fue encontrado glucosa como carbohidrato mayoritario de los residuos polares que, al reaccionar a una acetilación, formó el compuesto etilglucosa.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES del gobierno Brasileiro, por la beca concedida durante el periodo de 2000-2002 para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mayo, S.J.; Bogner, J.; Boyce, P.C. The Genera of Araceae, Royal Botanic Gardens, Kew, 1997, 370 pp.
2. Zhu, G.; Croat, T.B., Revision of *Dracontium* (Araceae), 2004, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 2004, 91(4), 593-667.
3. Lovera, A.; Bonilla, C.; Hidalgo, J.; Efecto Neutralizador del Extracto Acuoso de *Dracontium lorentense* (jergón sachá) Sobre la Actividad Letal Del Veneno de *Bothrops atrox*; *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 2006, 23(3), 177-181.
4. Teixeira, J.B.; Contribución al Estudio Farmacognóstico de *Dracontium lorentense* Krause (jergón sachá) tesis de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú, 1993.
5. Arévalo, V.G., Las Plantas Medicinales y su Beneficio en la Salud Shipibo-Conibo (Ediciones Asociación Interétnica de Desarrollo de la Selva Peruana A. I.D.E.S.A., 1994, Pag. 264.
6. Desmarchelier, C.; Gurni, A.; Ciccía, G.; Guilietti, A.M.; Ritual and Medicinal Plants of the Ese'ejas of the Amazonian Rainforest (Madre de Dios, Perú). *Journal of Ethnopharmacology* 1996, 52, 45-51.
7. Desmarchelier, C.; Repetto, M.; Coussio, J.; Llesuy S.; Ciccía, G. Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity (TAR) of Medicinal Plants Used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru). *International Journal of Pharmacognosy*, 1997, 35(4), 288-296.
8. Houghton, P.J.; Osibogum, I.M. Flowering Plants Used Against Snakebite. *Journal of Ethnopharmacology* 1993, 39, 1-29.
9. Loayza, S.G. Pharmacognostic studies on Plants used by the Shipibo-Conibo from the Peruvian Amazon. Licenciante Thesis, Faculty of Pharmacy, Uppsala University, 1990.
10. Benavides, A.; Napolitano, A.; Bassarello, C.; Carbone, V.; Gazzero, P.; Malfitano, A.; Saggese, P.; Bifulco, M.; Piacente, S.; Pizza, C.; Oxylipins from *Dracontium spruceanum*. *Journal of Natural Products*, 2009, 72, 813-817.
11. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 3º Ed. IMESP, IOE, V.I, 1985, 266.
12. Holland, H.L.; Diakow, P.R.P.; Taylor, G.J. ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Some C-19-Hydroxy, C-5,6-epoxy, C-24-ethyl and c-19-norsteroids. *Canadian Journal of Chemistry* 1978, 56, 3121-3127.
13. Kovganko, N.V.; Kashkan, Z.N.; Borisov, E.V.; Batura, E.V., ¹³C NMR Spectra of β-Sitosterol Derivatives with Oxidized Ring A and B, *Chemistry of Natural Compounds* 1999, 35(6), 646-649.
14. Silva, D.H.S. Constituintes Químicos de *Iryanthera sagotiana* e *Iryanthera lancifolia* Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo 1997.
15. Scott, N.K. Carbon-13 Magnetic Resonance of Biologically Important Aromatic Acids. I. Chemical Shifts of Benzoic Acid and Derivatives. *Journal of American Chemical Society* 1972, 94 (24), 8564-8568.

16. Pei-Wu, G.; Fukuyama, Y.; Rei, W.; Nagawa, K., An Acylated Sitosterol Glucoside from *Alisma Plantago-aquatica*, *Phytochemistry* 1998, 27 (6) 1895-1896.
17. Ghosal, S.; Saini, S.K.; Sitoindosides I and II, Two New Anti-ulcerogenic Sterylacylglucosides from *Musa paradisiacal*, *Journal of Chemical Research*, 1984, 110
18. Matida, A.K.; Rossl, M.H.; Blumenthal, E.E.A.; Schuquel, I.T.A.; Malheiros, A.; Vidotti, G.J. 3- β -O- β -D-glucopyranosylsitosterol in species of Labiatae, Verbenaceae and Apocynaceae, *Anais da Associação Brasileira de Química*, 1996, 45(3), 147-151.
19. Huber, Von G.; Rossi, A. Über Tribenzyl-D-glucofuranoside, eine neue Gruppe Von Heilmitteln auf dem Kohlenhydratgebiet; *Helvetica Chimica Acta*, 1968, 51(6), 1185-1202.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL PISCO PERUANO MEDIANTE VOLTAMETRÍA CÍCLICA

Adolfo La Rosa Toro G.^a Fredy Vigo López^a, Golfer Muedas Taipe^a

RESUMEN

El pisco es uno de los productos de origen peruano que ha incrementado su demanda en los últimos años. El pisco legítimo, como un producto destilado de la fermentación de la uva muestra actividad antioxidante, atribuido a la presencia de derivados fenólicos, contenidos en las uvas. La voltametría cíclica es una técnica rápida y de alta sensibilidad mediante la cual es posible evaluar la actividad antioxidante de algunas muestras naturales debido a su respuesta electroactiva. El presente trabajo emplea la técnica de voltametría cíclica como un método de identificación de la autenticidad del pisco evaluando su actividad antioxidante, comparándola con el método de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Se evaluaron muestras de pisco legítimo y adulterado obtenidas en el mercado nacional.

Palabras clave: Pisco, antioxidante, potencial de oxidación, voltametría cíclica.

ASSESSMENT OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PERUVIAN PISCO THROUGH CYCLIC VOLTAMMETRY

ABSTRACT

Pisco is a peruvian beverage which has increased its demand over the last years. Legitimate pisco is a distilled product of the fermentation of grapes; due to this, it shows antioxidant activity attributed to the presence of phenolic derivatives (which are contained in grapes). Cyclic voltammetry is a rapid and high sensitivity technique; this characteristic allows this technique for evaluating the antioxidant activity of some natural samples due to its electroactive response. This technique is used in this research project as a method for identifying the authenticity of pisco by evaluating its antioxidant activity. Results obtained by cyclic voltammetry are then compared with the method of neutralization of free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Samples of legitimate and adulterated pisco obtained in the national market were evaluated.

Key words: Pisco, antioxidant, oxidation potencial, cyclic voltammetry.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se están realizando numerosas investigaciones en busca de antioxidantes naturales con la finalidad de ser empleados en la industria de alimentos, cosméticos y atención de la salud con el objetivo de prevenir, aliviar y/o curar procesos degenerativos que ocurren como consecuencia de actividad de los radicales libres en nuestro organismo¹. El pisco es un producto con identidad peruana que ha incrementado su venta en forma significativa; sin embargo, la estrategia de comercialización no considera su importante contribución como

^a Laboratorio de Electroquímica Aplicada, Facultad de Ciencias.
Universidad Nacional de Ingeniería.
Casilla: 31-316. Av. Túpac Amaru 210, Rímac, e-mail: toro@uni.edu.pe

fuelle de antioxidantes naturales. Los antioxidantes son sustancias que retardan el inicio y disminuyen la velocidad de oxidación de las sustancias oxidables en el organismo. Por el modo de acción, los podemos clasificar como: primarios (interrumpen la reacción en cadena generando un radical menos activo) y secundarios (o preventivos)².

Los antioxidantes fenólicos ocupan una situación privilegiada, pues son excelentes donadores de electrones o de hidrógeno y, además, sus radicales intermediarios son relativamente estables³.

Los trabajos previos, realizados por otros autores, indican que los componentes presentes en los vinos son en su mayoría de origen fenólico⁴⁻⁷. La acción antioxidante de los compuestos fenólicos destacados en el vino es beneficiosa para la salud ya que aportan protección contra la agresión de los radicales libres de nuestro organismo, y que en condiciones aeróbicas conduce a la degradación oxidativa no controlada de moléculas biológicas trascendentales para la vida. Asimismo, el pisco, al ser un producto derivado de la fermentación controlada de la uva, presenta actividad antioxidante debido a los derivados fenólicos provenientes principalmente del proceso fermentativo⁸. El contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los mismos es dependiente de muchos factores, entre ellos: el tipo de uva, proceso de fermentación, temperatura del proceso de destilado⁹, pureza del pisco, etc. Por lo que el análisis de contenido de antioxidantes puede ser un buen indicador de la legitimidad y calidad del pisco.

En el presente trabajo se analiza el contenido de antioxidantes empleando los métodos de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), (figura 1) y el de voltametría cíclica; este último fue utilizado por otros autores como una técnica para la identificación de vinos¹⁰⁻¹².

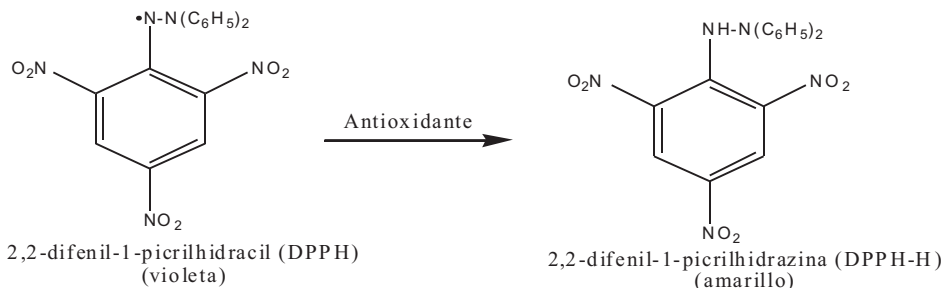


Figura 1. Reacción química entre el radical DPPH y la especie antioxidante

Actualmente, la única prueba de autenticidad de los piscos es el procedimiento de la Norma Técnica N° 211.001:2006 que involucra varios requerimientos de análisis físicos y químicos. El presente trabajo demuestra que la evaluación de la actividad antioxidante puede diferenciar en forma concluyente el pisco legítimo frente a otros adulterados (licores de fantasía). La evaluación de la actividad antioxidante se realiza aplicando dos métodos: el método electroquímico, mediante la voltametría cíclica (VC) y el método químico, mediante la neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y reactivos

Muestras de pisco:

S_A y S_B = Pisco legítimo de origen artesanal de la zona de Mala - Perú

S_C y S_D = Pisco de marcas registradas

S_E y S_F = Pisco adulterado

Reactivos: El radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), la rutina y los solventes utilizados fueron de grado *para análisis*. Asimismo, se utilizó un buffer de fosfato de sodio 0,07 M de pH 7,2/EtOH 1:1 (v/v).

Los voltagramas (VC) fueron obtenidos utilizando un potenciostato PGSTAT 12 equipado con SCAN GEN que opera bajo el sistema GPES 4.9 Eco Chemie B. V. con un sistema de tres electrodos compuesto de carbón vítreo (electrodo de trabajo), platino (electrodo auxiliar) y Ag/AgCl/KCl 3M (electrodo de referencia).

En el análisis de antioxidantes empleando el método de neutralización de radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) se utilizó el espectrofotómetro UV-Visible LABMED.

Métodos

Voltametría cíclica (VC)

Mediante la técnica de VC es posible la evaluación del potencial rédox de los compuestos electroactivos (fenólicos) mediante un barrido de potencial en un rango previamente definido. La muestra de pisco (4 mL), fue adicionada a 40 mL de una mezcla de etanol y buffer de fosfato de sodio 0,07 M de pH 7,2 (1:1). La solución resultante fue purgada con gas N_2 manteniendo la atmósfera inerte durante todo el proceso. Se obtuvo los voltagramas (VC) realizando un barrido de potencial desde -1,00 V hasta 0,92 V a una velocidad de 100 mV/s. El carbón vítreo fue pulido antes de cada experimento utilizando una lija N° 1200 y alúmina en polvo de 0,3 micras de Buehler micropolish. La reproducibilidad del potencial del pico voltamétrico es del orden de $\pm 0,01$ V, dependiendo del pretratamiento de la superficie del electrodo. Para cada muestra de pisco se han obtenido varios voltagramas obteniéndose así los picos de potencial de oxidación característicos; además, se realizó la voltametría cíclica del estándar de rutina para corroborar la exactitud del método electroquímico.

Neutralización del radical libre DPPH

El método a emplear es el de neutralización del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), en este caso, la solución del reactivo de DPPH es de color violeta y presenta un máximo de absorbancia a 515 nm.

La reacción química consiste en que el radical libre DPPH sustrae un átomo de hidrógeno proveniente de un donador (antioxidante); producto de este cambio se desarrolla un cambio de color, de violeta a amarillo, como resultado de la disminución de la concentración del radical libre; esta intensidad fue leída en el espectrofotómetro después de un tiempo de 30 minutos de reacción. La muestra de pisco utilizada, previa a la reacción con DPPH, fue diluida con etanol absoluto en la relación de volúmenes de 1:10. Luego 1250 μ L de la solución obtenida se mezcla con 500 μ L de DPPH 0,3 mM.

La evaluación de la actividad antioxidante se expresa como porcentaje, y se determina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%AA = 100 - \left\{ \frac{(Am - Ab)100}{Acontrol} \right\}$$

Donde,

- $\% AA$: Porcentaje de actividad antioxidante
 A_m : Absorbancia de la muestra
 A_b : Absorbancia del blanco
 $A_{control}$: Absorbancia del reactivo DPPH

La relación $(A_m - A_b)/A_{control}$ nos indica el exceso de DPPH que no ha reaccionado con los compuestos antioxidantes en la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de muestras empleando el método de voltametría cíclica (VC)

Todos los voltagramas fueron obtenidos en solución de Buffer de fosfato de sodio 0,07 M, pH 7,2/EtOH 1:1 (v/v); empleando electrodo de trabajo de carbón vítreo (GC), electrodo auxiliar de platino y electrodo de referencia de Ag/AgCl (KCl 3 M), la velocidad de barrido empleada fue de 100 mV/s.

En la figura 2 se presenta el voltagrama del electrodo de GC obtenido en la solución buffer (blanco) que se utiliza como electrolito de fondo para el análisis de las muestras. En el gráfico, en el rango de potencial entre -0,80 a 0,60 V, no se observa reacciones redox significativas, constituyendo una buena línea base para la evaluación de la actividad antioxidante de las muestras de pisco.

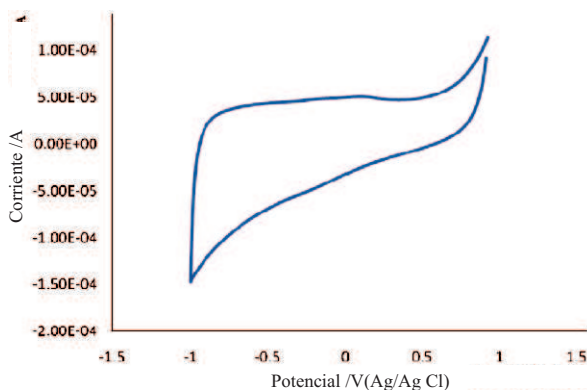


Figura 2. Voltagrama cíclico de la solución electrolítica: buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

Los voltagramas de las figuras 3 y 4 corresponden a las muestras S_A y S_B (pisco de origen artesanal) y las figuras 5 y 6, muestran los voltagramas de las muestras S_C y S_D (pisco de marcas registradas). En todos los casos los voltagramas muestran la formación de dos picos de corriente consecutivos en el barrido de potenciales en sentido anódico. El primer pico aparece entre -0,082 y -0,076 V y el segundo pico de oxidación entre 0,094 y 0,132 V, ambos asignables a la oxidación de los compuestos fenólicos característicos de las sustancias antioxidantes. En el barrido en sentido catódico se observa los correspondientes picos de reducción de las sustancias previamente oxidadas. En la figura 7 se presenta el voltagrama correspondiente a la rutina, un antioxidante tipo flavonoide que se encuentra presente en las uvas y frutas cítricas¹³.

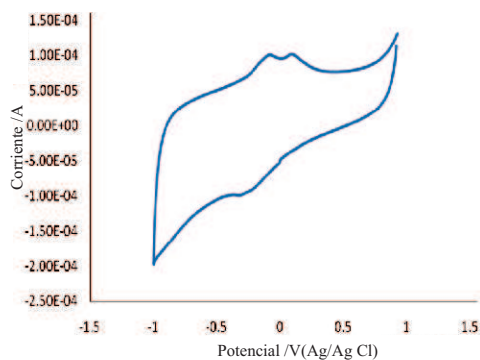


Figura 3. Voltagrama cíclico de la muestra S_A en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

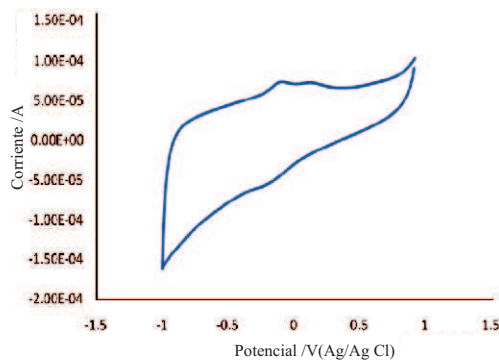


Figura 4. Voltagrama cíclico de la muestra S_B en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

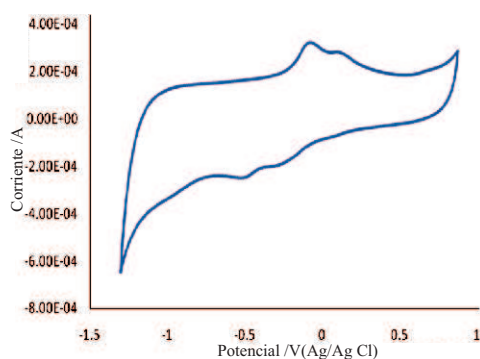


Figura 5. Voltagrama cíclico de la muestra S_C en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

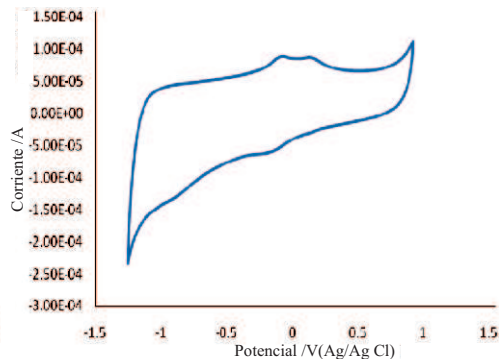


Figura 6. Voltagrama cíclico de la muestra S_D en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

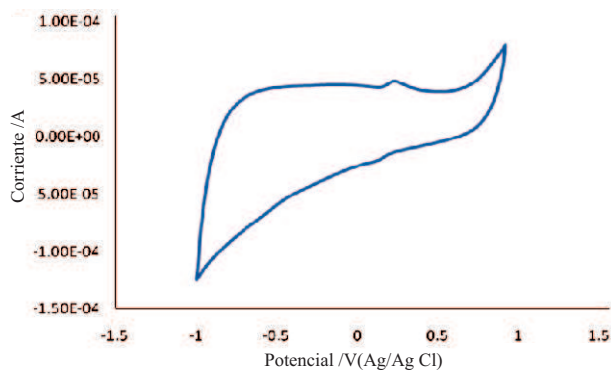


Figura 7. Voltagrama cíclico de la rutina en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

En la tabla 1 se presenta los potenciales de oxidación y sus correspondientes picos anódicos de las muestras de pisco legítimo y los de rutina (0,227 V); este último utilizado con fines comparativos.

Tabla 1. Potenciales de oxidación de muestras de pisco legítimo medidos bajo condiciones estándar*

Muestra	Pico 1 E_{pa1} (V vs. Ag/AgCl)	Pico 2 E_{pa2} (V vs. Ag/AgCl)	E descomposición E_{desc} (V vs. Ag/AgCl)
S _A	-0,082	0,094	-0,260
S _B	-0,077	0,125	-0,236
S _C	-0,082	0,096	-0,264
S _D	-0,076	0,132	-0,249
rutina	0,227	----	0,140

* Condiciones estándar: Buffer de fosfato de sodio 0,07 M de pH 7,2/EtOH 1:1 (v/v); electrodo de trabajo y auxiliar de carbono cristalino (GC) y electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl 3 M; velocidad de barrido: 100 mV/s.

En la tabla 2 se presenta el área integrada de los picos de oxidación de las muestras de piscos S_A y S_B (figuras 8 y 9) el cual es proporcional a la altura de pico (cantidad de corriente). La muestra S_A presenta mayor área por lo que presenta una mayor capacidad antioxidante en comparación de la muestra S_B.

Tabla 2. Área y corriente de los picos de oxidación de muestras de piscos legítimos

Muestra	Área	Potencial inicial (V)	Potencial final (V)	Corriente inicial (A)	Corriente final (A)
S _A	1,47E-04	-0,41	0,44	5,66E-05	7,60E-05
S _B	0,69E-04	-0,41	0,44	4,85E-05	6,64E-05

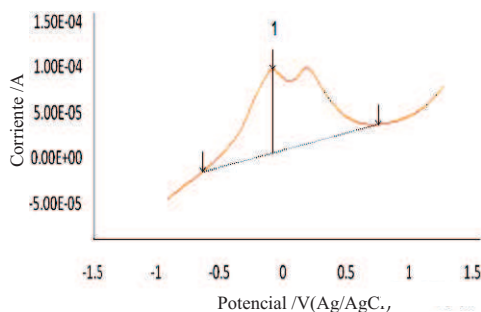


Figura 8. Altura de picos de oxidación de la muestra S_A

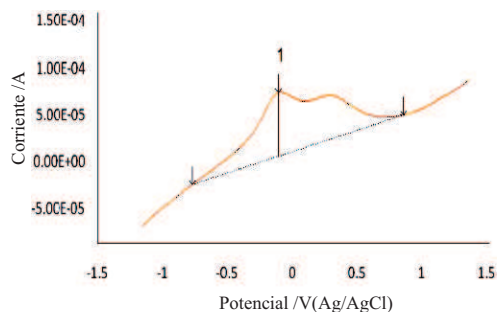


Figura 9. Altura de picos de oxidación de la muestra S_B

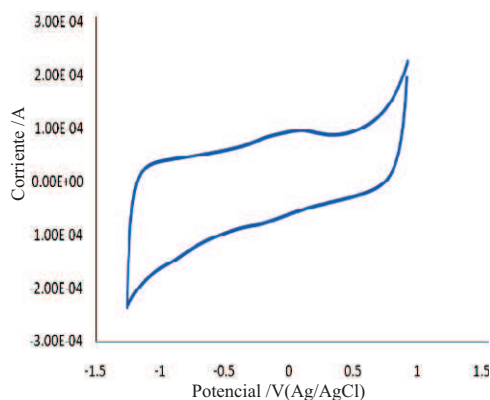


Figura 10. Voltograma cíclico de la muestra S_E en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

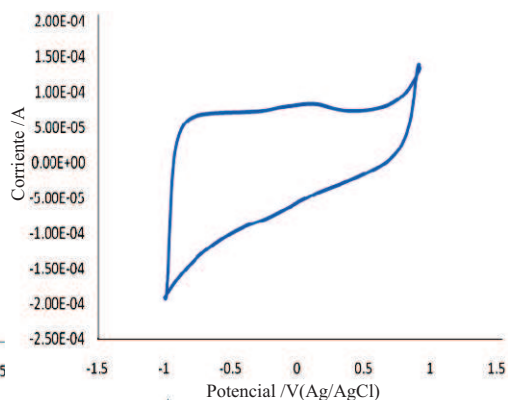


Figura 11. Voltograma cíclico de la muestra S_F en buffer de fosfato (pH 7,2)/EtOH 1:1 (v/v)

Las figuras 10 y 11 muestran los voltagramas de las muestras de piscos adulterados: S_E y S_F . En los gráficos no se observan picos de oxidación asignables a procesos redox debido a la ausencia de componentes electroactivos (antioxidantes).

Análisis de muestras empleando el método de neutralización del radical libre DPPH

Se ha utilizado el método de neutralización del radical libre DPPH con la finalidad de verificar los resultados obtenidos empleando el método electroquímico.

Se ha analizado las muestras de pisco legítimo S_A y S_B , pisco adulterado S_F y etanol absoluto.

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 3, sólo las muestras de pisco legítimo S_A y S_B muestran actividad antioxidante. Las muestras de pisco adulterado, así como de etanol absoluto, muestran porcentajes negativos, indicando que en estas dos últimas muestras no contiene antioxidantes.

Tabla 3. Porcentaje de actividad antioxidante de muestras de piscos A, B, F y etanol al 43 % obtenida por variación de la absorbancia a 515 nm

Muestras	Absorbancia de blanco	Absorbancia de muestra	% Actividad Antioxidante
S_A	0,646	0,452	30,03
S_B	0,646	0,527	18,94
S_F	0,646	0,891	-37,94
Etanol 43 %	0,746	0,904	-21,03

En la tabla 4 se presenta los resultados comparativos de la actividad oxidante de ambos métodos, con el objetivo de normalizar los valores. Los resultados se presentan como la razón de la actividad oxidante de las muestras S_A y S_B

Tabla 4. Análisis comparativo de la actividad antioxidante de las muestras de piscos A, B, F obtenido por los métodos de neutralización de radical DPPH y voltametría cíclica

Muestras Relación S _A /S _B	Antioxidante DPPH	Antioxidante Voltametría
S _A /S _B	1,58	2,12

CONCLUSIONES

- En el análisis electroquímico por voltametría cíclica, el perfil voltamétrico obtenido de las muestras de pisco legítimo (S_A-S_D) presenta un comportamiento similar, la formación de dos picos de oxidación. El primer pico aparece entre -0,082 y -0,076 V y el segundo pico de oxidación entre 0,094 y 0,132 V, revelando la presencia de más de un compuesto antioxidante. La comparación con el perfil voltamétrico de muestras de pisco adulterado revelan que estos últimos no presentan ninguna señal de oxidación.
- Según el análisis químico por DPPH, las muestras de pisco legítimo presentaron un porcentaje de actividad antioxidante positivo mayor a 18,94 %, mientras que las muestras de pisco adulterado mostraron un porcentaje de actividad antioxidante negativa (-37,94 %), lo que indica la ausencia de compuestos antioxidantes.
- De acuerdo a la tabla 4, los resultados obtenidos mediante el método de DPPH y VC, son cercanos entre sí, mostrando que la voltametría cíclica es una buena alternativa para la identificación del pisco legítimo y cuantificación de su actividad antioxidante.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Laboratorio de Investigación en Electroquímica Aplicada y al Instituto de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, por el apoyo brindado para la realización y presentación del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Castillo P, Lock O. *Rev Soc Quím Perú* 2005; 71 (4): 227-236.
- 2 Lock Sing O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales. Lima: Fondo editorial PUCP; 1994.
- 3 Chávez R, Plaza A, Lock O. *Revista de Química* 1996; 10 (1): 71-101.
- 4 Ksenzhek O, Petrova S. *Electroanalysis* 2007; 19 (2-3): 389-392.
- 5 Ángeles MA. *Eur Food Res Technol* 2003; 216: 445-448.
- 6 Ángeles MA. *J. Agric. Food Chem* 2002; 50 (11): 3112-3115.
- 7 Shleev S V. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2004, 40 (3): 304-309.
- 8 Kanner J, Frankel E, Granit R, German B, Kinsellatss J. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 42: 64-69.
- 9 Larrauri J, Ruperez P, Saura-Calixto F, *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 1390-1393.
- 10 Born M, Carrupt P, Zini R, Brée F, Tillement J, Hostettmann K, Testa B. *et al. Helvetica Chimica Acta* 1996; 79: 1147-1158.
- 11 Kook L, Mbwambo Z, Chung HaSook, Luyengi L, Gamez E, Mehta R, Kinghorn D, Pezzuto J. *et al. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 1998; 1: 35-46.
- 12 Zielinska D, Wiczowski W, Konrad Piskula M. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 3524-3531.
- 13 Makhotkina O, Kilmartin P. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2009; 633: 165-174.

COMPUESTOS FENÓLICOS, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, CONTENIDO DE RESVERATROL Y COMPONENTES DEL AROMA DE 8 VINOS PERUANOS

Rodrigo Salazar^a, Giovana Espinoza^b, Candy Ruiz^b,
María de Fátima Fernández^b, Rosario Rojas^{*a,b}

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo conocer las propiedades fisicoquímicas, actividad antioxidante, componentes del aroma y contenido de resveratrol y quercetina de 8 vinos peruanos. Se encontró que las densidades relativas de los vinos están dentro del rango de 0,9916 a 1,0174 g/mL, mientras que los valores de pH varían de 3,18 a 3,97. Mediante métodos espectrofotométricos se pudo cuantificar la concentración de fenoles totales (2374,25 a 3610,43 mg/L), flavonoides totales (1869,19 a 3138,85 mg/L) y antocianinas totales (102,64 a 317,50 mg/L). Por medio de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) se pudo detectar la presencia del compuesto *trans*-resveratrol en 6 de los 8 vinos peruanos evaluados. El vino Tabernero Malbec-Merlot contiene la mayor concentración de dicho compuesto ($0,56 \pm 0,03$ µg/mL) y, además, es el que presenta la mejor actividad antioxidante en el test de DPPH. Por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se pudo determinar que los compuestos volátiles de mayor concentración en el aroma de los vinos fueron el ácido sórbico, feniletanol, ácido propanoico y monoetil éster del ácido butanodioico.

Palabras clave: vinos, *trans*-resveratrol, actividad antioxidante, quercetina, flavonoides.

PHENOLIC COMPOUNDS, ANTIOXIDANT ACTIVITY, RESVERATROL CONTENT AND VOLATILE COMPONENTS OF 8 PERUVIAN WINES

ABSTRACT

The aim of this investigation was to evaluate some physicochemical properties, the antioxidant activity, the aroma components and resveratrol and quercetin contents of 8 Peruvian wines. We found that the density of the selected wines was in the range of 0,9916 – 1,0174 g/mL, while the pH values were between 3,18 and 3,97. Spectrophotometric methods were used to determine the concentrations of total phenolics (2374,25 – 3610,43 mg/L), flavonoids (1869,19 – 3138,85 mg/L) and anthocyanins (102,64 – 317,50 mg/L). The compound *trans*-resveratrol was detected by means of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) on 6 of the 8 Peruvian wines selected for the present study. The Tabernero Malbec-Merlot wine had the highest concentration of this compound ($0,56 \pm 0,03$ µg/mL) and the best antioxidant activity on the DPPH test. GC-MS studies on the aroma of the

^a Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú, rosario.rojas@upch.pe

^b Unidad de Investigación en Productos Naturales. Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia.

evaluated wines showed that the major compounds were sorbic acid, phenylethyl alcohol, propanoic acid and ethyl hydrogen succinate.

Key words: wines, trans-resveratrol, antioxidant activity, polyphenols, quercetin, flavonoids.

INTRODUCCIÓN

El vino es un licor que se obtiene por fermentación del jugo de uva.¹ Su consumo está asociado a la disminución del riesgo coronario y prevención de enfermedades crónicas asociadas al estrés oxidativo (arterioesclerosis, artritis, demencia, cáncer).^{2,3} Las propiedades beneficiosas del vino aparentemente se deben a su capacidad antioxidante por su alto contenido de compuestos fenólicos.

Se ha demostrado que algunos compuestos fenólicos presentes en el vino, como el resveratrol, ácido gálico y quercetina, tienen actividades contra alergias, inflamación, hipertensión, artritis y carcinógenos.⁴

El *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es producido naturalmente por la especie *Vitis vinifera* en respuesta a situaciones de estrés, tal como son las infecciones microbianas e irradiación UV. Esta fitoalexina es usada para el tratamiento de varias enfermedades, incluyendo la dermatitis, gonorrea, fiebre, hiperlipidemia, arterioesclerosis e inflamaciones.⁵ Otro de los compuestos importantes en el vino es la quercetina, un flavonol que se genera ampliamente en plantas y tiene una presencia significativa en el vino tinto.⁶

Hasta principios del siglo XX el olor del vino se atribuía a una sola sustancia, el “ácido enántico”; con los avances de la tecnología se ha llegado a identificar a más de 1000 compuestos en el aroma; sin embargo, aún no se tiene una tarjeta de identidad para cada tipo de vino.¹ Hasta la fecha, no se han reportado trabajos previos sobre los compuestos volátiles de vinos peruanos.

En el presente trabajo, además de evaluar la actividad antioxidante, el contenido total de fenoles, flavonoides, antocianinas y quercetina en 8 vinos peruanos, se puso énfasis en determinar el contenido de resveratrol y la composición química de sus aromas, con el objetivo de contribuir al desarrollo futuro de protocolos de control de calidad.

PARTE EXPERIMENTAL

Aparatos.

Espectrofotómetro Shimadzu Uv/Vis 1240. Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC), Elite LaChrom: bomba L-2130, detector DAD L-2455, Software EZChrom Elite Client/Server versión 3.2. La columna analítica utilizada fue Purospher® STAR RP-18e (250 mm x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula). Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 7890A* acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies 5975*. Se empleó una columna capilar polar HP-FFAP (30 m x 250 µm x 0,25 µm).

Reactivos.

1,1-difenil-2-picril-hidrazilo, Folin-Ciocalteu y quercetina fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, mientras que *trans*-resveratrol fue gentilmente donado por el Dr. Fabricio Medina-Bolívar, profesor asociado del Arkansas Biosciences Institute, Arkansas State University.

Muestra.

Se analizaron 8 vinos peruanos de los cuales 6 fueron adquiridos en cadenas de supermercados en Lima y 2 en el valle de Lunahuaná. En la tabla 1 se muestran los vinos adquiridos según las variedades de uvas utilizadas en su elaboración, marca y lugar de procedencia.

Determinación de la densidad relativa.

Para determinar la densidad de los vinos, se utilizó un picnómetro con termómetro incorporado. Se calculó la densidad del vino de la siguiente manera:

$$\text{Densidad vino} = \left[\frac{P.P. \text{ vino} - P.P. \text{ vacío}}{P.P. \text{ agua} - P.P. \text{ vacío}} \right] \times \text{Densidad H}_2\text{O}$$

Donde P.P. es el peso del picnómetro lleno con la muestra (agua o vino).

Tabla 1. Procedencia y tipos de vinos peruanos escogidos para el estudio

Variedad	Región	Marca	Tipo	No. Lote
Malbec-Merlot	Ica	Tabernero	Tinto	31109
Borgoña	Cañete	Santiago Queirolo	Semi-Seco	NP*
Borgoña	Lunahuaná	La Casa na del Valle	Tinto	NP*
Quebranta	Lunahuaná	La Casona del Valle	Tinto	NP*
Tannat	Ica	Santiago Queirolo	Tinto	A08-D-10909
Shiraz	Cañete	Santiago Queirolo	Tinto	A02-D-260508
Rubi Red-Grenache -Malbec	Río Chillón	E. Copello	Tinto/Semi -Seco	8909.1
Malbec-Tannat-Syrah	Ica	Tacama	Tinto	NP*

*No presenta número de lote

Determinación del pH.

Se tomó 30 mL de cada vino en un matraz erlenmeyer de 50 mL y se midió el pH con un potenciómetro (Hanna Instruments) calibrado en el rango de 4 a 7.

Determinación de compuestos fenólicos.

Se aplicó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Gracia *et al.*⁷ Se utilizó una curva de calibración de ácido gálico cuyo rango de concentraciones fue de 2 a 4 mg/L. Las muestras de vinos fueron diluidas al 2% con H₂O mili-Q. Las absorbancias respectivas fueron medidas a 760 nm en un espectrofotómetro. Los vinos fueron analizados por triplicado y los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico/L de vino.

Determinación de flavonoides.

El contenido de flavonoides en 1 mL de vino sin diluir fue determinado mediante el ensayo colorimétrico con AlCl₃ propuesto por Ivanova *et al.*⁸ Para la cuantificación se elaboró una curva de calibración de quercetina a concentraciones entre 180 a 360 mg/L. Las lecturas de absorbancia fueron realizadas en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 510 nm. El contenido de flavonoides totales fue expresado como mg de quercetina por litro de vino.

Determinación de antocianinas totales.

La determinación de antocianinas totales se hizo usando el método propuesto por Di Stefano *et al.*⁹, descrito por Ivanova *et al.*⁸ Se mezcló 200 µL de cada vino con 4 ml de una solución de

etanol/H₂O/HCl conc. (70:30:1) e inmediatamente después se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro. Debido a la falta del estándar malvidin-3-glucósido, el contenido total de antocianinas se calculó usando la siguiente ecuación propuesta por Di Stefano:

$$TA_{540\text{ nm}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = A_{540\text{ nm}} \times 16,7 \times d$$

Donde: $A_{540\text{ nm}}$ es la absorbancia a 540 nm y d es la dilución del vino.

Determinación de quercetina y *trans*-resveratrol.

Las concentraciones de quercetina y resveratrol en los vinos fueron determinadas por HPLC bajo las condiciones cromatográficas del método propuesto por Lamuela-Raventós *et al.*¹⁰ El flujo fue de 1,5 mL/min y la fase móvil consistió de una mezcla de eluyente A (1% de ácido acético en agua) y eluyente B (1% de ácido acético en acetonitrilo) bajo la siguiente condición de gradiente: 10 min, 82% A : 18% B; 10 min, 60% A : 40% B; 10 min, 100 % A. Longitud de onda de monitoreo: resveratrol a 306 nm y quercetina a 370 nm.

Las muestras fueron pasadas por un filtro Whatman 0,45 μm y luego inyectadas directamente al HPLC.

Se realizaron las curvas estándar para resveratrol y quercetina, cuyos rangos de concentración fueron de 0,06 - 3 ppm y 0,1 - 5 ppm, respectivamente. Las determinaciones por HPLC fueron realizadas por triplicado.

Componentes del aroma.

Se utilizó el método descrito por Ortega *et al.*¹¹ En un tubo de centrifuga de 15 mL se colocó 4,5 g de (NH₄)₂SO₄, 3 mL de vino, 7 mL de H₂O mili-Q y 1 mL de diclorometano. Se agitó cada tubo por 1 hora y luego se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos. Luego de la visualización de 2 fases, se inyectó la fase de diclorometano en el GC-MS. La temperatura del horno del cromatógrafo de gases se mantuvo a 60 °C por 3 minutos, para luego iniciar un gradiente de temperatura (4 °C/min) hasta alcanzar 170 °C, manteniendo esta temperatura final por 12 minutos. El gas de arrastre usado fue helio a un flujo de 0,6 ml/min. El volumen de inyección fue 3 μL con un split ratio 1:5.

Actividad antioxidante (test de DPPH).

Se usó la técnica descrita por Ávalos *et al.*³ para determinar la actividad antioxidante de los vinos. Las mezclas de reacción estaban compuestas de 1,5 ml de DPPH (3,6 mg/100mL etanol) y 0,1 mL de las muestras de vino diluidas en un rango de concentración de 0,5 a 16%.

La mezcla de reacción fue leída a los 30 minutos en un espectrofotómetro a 517 nm.

Para calcular la actividad antioxidante de los vinos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \left(\frac{AC - AM - AB}{AC} \right) \times 100$$

Donde AM es la absorbancia de la muestra + DPPH, AB es la absorbancia del blanco (muestra + etanol) y AC es la absorbancia del blanco del reactivo (DPPH + etanol).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La densidad relativa de los vinos estudiados se encontró en el rango de 0,9916-1,0174 g/cm³. Los valores de pH encontrados están dentro del rango de 3 a 4, siendo el vino Borgoña (SQ) el de pH más ácido (tabla 2).

Tabla 2. Algunas características fisicoquímicas de los vinos estudiados

Marca (variedad)	Color	pH	Densidad (g/mL)
Tabernero (M/M)	Tinto	3,56	0,9969
Santiago Queirolo (Borgoña)	Rosado	3,18	1,0174
La Casona del Valle (Borgoña)	Violeta	3,89	1,0165
La Casona del Valle (Quebranta)	Violeta	3,97	1,0041
Santiago Queirolo (Tannat)	Rojo	3,61	0,9922
Santiago Queirolo (Shiraz)	Tinto	3,82	0,9916
E. Copello (RR/G/M)	Rojo tinto	3,38	1,0165
Tacama (M/T/S)	Violáceo	3,62	0,9936

En la tabla 3 se resume los contenidos totales de compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas obtenidos por métodos espectrofotométricos para los 8 vinos estudiados; así como sus actividades antioxidantes cuantificadas mediante el test de DPPH.

Tabla 3. Contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de 8 vinos

Marca (variedad)	Ácido gálico (mg/L)	Quercetina (mg/L)	Antocianinas totales (mg/L)	Concentración efectiva media (% v/v) de actividad antioxidante
Tabernero (M/M)	3117,66 ±0,84	3039,73±0,33	180,03±4,79	1,83±4,80
Santiago Queirolo (Borgoña)	2556,91±0,75	1869,19±0,94	102,64±2,09	7,40±0,72
La Casona del Valle (Borgoña)	3610,43±1,04	2692,42±0,42	173,36±4,80	2,72±1,33
La Casona del Valle (Quebranta)	3257,85±0,89	2848,88±0,37	179,09±6,11	2,53±1,67
Santiago Queirolo (Tannat)	3572,20±1,03	3087,24±0,32	219,66±2,31	4,35±0,58
Santiago Queirolo (Shiraz)	2990,22±0,79	2823,48±0,38	115,73±1,32	9,25±1,93
E. Copello (RR/G/M)	2374,25±0,83	2154,25±0,70	213,69±4,33	2,83±0,07
Tacama (M/T/S)	3321,57±0,92	3138,85±0,31	317,50±1,16	4,70±0,02

La concentración de los compuestos fenólicos de los vinos estuvo en el rango de 2370 a 3610 mg/L, siendo los vinos La Casona del Valle (Borgoña) y Santiago Queirolo (Tannat) los de más alto contenido. Muñoz *et al.*⁴ observaron en otros vinos peruanos concentraciones entre 627 a 3321 mg/L de fenólicos totales, mientras que Ivanova *et al.*⁸ obtuvieron valores más bajos (entre 1119 y 1515 mg/L de contenido fenólico total) en vinos serbios.

La concentración de flavonoides totales estuvo en el rango de 1870 a 3139 mg/L, con el vino Tacama (M/T/S) presentando el mayor contenido de dichos compuestos. Asimismo, el vino Tacama (M/T/S) fue el que presentó la mayor concentración de antocianinas (317,50 mg/L). En general, son los vinos tintos los que presentan la mayor cantidad de antocianinas, tal como reportan los estudios de Ivanova *et al.*⁸ (237 a 267 mg/L) y Radovanovic *et al.*¹² (205,88 a 1940,28 mg/L).

El flavonoide quercetina posee propiedades antioxidantes ya reconocidas en estudios previos,³ por lo que es importante cuantificar su presencia por métodos analíticos como la cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Como se puede observar en la tabla 4, todos los vinos estudiados presentaron niveles detectables de dicho compuesto, siendo el vino Santiago Queirolo (Shiraz) el que presentó la mayor concentración ($3,23 \pm 0,29$ µg/mL). Muñoz *et al.*⁴, obtuvieron valores similares del contenido de quercetina en otros vinos peruanos ($0,19-7,74$ µg/mL).

Tabla 4. Contenido de *trans*-resveratrol y quercetina en 8 vinos peruanos

Marca (variedad)	Resveratrol \pm DS (µg/mL)	Quercetina \pm DS (µg/mL)
Tabernero (M/M)	0,56 \pm 0,03	2,71 \pm 0,13
Santiago Queirolo (Borgoña)	0,11 \pm 0,01	0,47 \pm 0,06
La Casona del Valle (Borgoña)	0,08 \pm 0,01	2,57 \pm 0,07
La Casona del Valle (Quebranta)	0,11 \pm 0,02	2,39 \pm 0,21
Santiago Queirolo (Tannat)	No detectable	0,16 \pm 0,01
Santiago Queirolo (Shiraz)	0,28 \pm 0,01	3,23 \pm 0,29
E. Copello (RR/G/M)	No detectable	0,24 \pm 0,15
Tacama (M/T/S)	0,38 \pm 0,01	0,17 \pm 0,04

El compuesto *trans*-resveratrol es de gran interés en la salud humana debido al efecto benéfico que tiene en la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares en los consumidores moderados de vino.² Estudios hechos por Lamuela-Raventós *et al.*,¹⁰ obtuvieron concentraciones de *trans*-resveratrol entre 0,60 y 8 µg/mL en vinos de España, mientras que los vinos italianos estudiados por Careri *et al.*⁵ mostraron valores de 0,56 a 2,63 µg/mL. No existen estudios previos sobre el contenido de resveratrol en vinos peruanos. En el presente estudio, 2 de los 8 vinos escogidos no mostraron niveles detectables de dicho compuesto, mientras que en los restantes se observaron valores relativamente bajos (tabla 4). El vino Tabernero (M/M) fue el que presentó el mayor contenido de *trans*-resveratrol ($0,56 \pm 0,03$ µg/mL).

En general, los vinos con mayor concentración de compuestos fenólicos presentan mayor actividad antioxidante *in vitro*. El vino Taberbero (M/M), que presentó una alta concentración de compuestos fenólicos y el mayor contenido de resveratrol, fue el que mostró mayor actividad antioxidante (tablas 3 y 4).

El estudio de los compuestos volátiles de los vinos por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) mostró como componentes principales al etil-succinato, ácido sórbico, feniletanol y ácido propanoico (tabla 5).

El monoetil éster del ácido butanodioico se forma de manera lenta durante la fermentación del vino y sirve como conservante del vino ante la formación de bacterias.¹³ El ácido sórbico es un aditivo utilizado en los vinos como preservativo por sus propiedades antimicrobianas, antifúngico y antibacteriano. El feniletanol es un alcohol que además de poseer propiedades antimicrobianas, presenta un olor aromático a rosas. El ácido propanoico es utilizado como preservativo e inhibe a mohos y bacterias.¹⁴

Esta es la primera investigación que reporta el contenido de *trans*-resveratrol y los componentes del aroma de vinos producidos en el Perú.

Tabla 5. Componentes del aroma de los 8 vinos peruanos

Compuestos	t _R (min.)	% en la muestra (áreas relativas)							
		Borgoña (La Casona del Valle)	Borgoña (SQ)	Quebranta (La Casona del Valle)	RR/G/M. (E.Copelo)	Tannat (S Q)	Shiraz (S Q)	M M (Taberbero)	M/T/S Tacama /S)
3- Hidroxi-2-butanona	4,49	--	--	--	--	--	--	--	12,7
2-Hidroxipropanoato de etilo	5,42	8,3	5,0	9,2	39,5	27,6	34,4	29,8	27,9
Ácido acético	8,10	2,2	--	2,2	0,7	--	--	--	--
2,3-Butanodiol	10,20	--	--	--	--	--	4,3	--	--
?- Butirolactona	12,60	2,5	--	3,7	0,7	1,9	4,3	1,7	--
Dietil éster del ácido succínico	13,37	--	3,8	1,2	2,3	9,8	11,4	6,5	6,9
Etil éster del ácido isovalérico	16,74	--	--	--	--	1,0	--	--	1,0
1,2,4,5-Tetraetil-ciclohexano	18,02	0,6	--	--	--	--	--	--	--
Alcohol bencilico	18,45	0,9	--	0,7	1,3	--	--	--	--
2-Feniletanol	19,16	18,5	23,6	18,5	9,1	23,1	31,4	28,7	23,1
Dietil éster del ácido hidroxibutanodioico	22,29	--	2,6	--	--	--	--	--	--
Ácido octanoico	22,48	--	--	--	0,5	--	1,6	--	--
Ácido sórbico	24,94	58,2	44,7	57,3	25,4	7,9	--	--	--
5-Oxotetrahydro furan-2-carboxilato de etilo	26,82	--	--	--	--	0,1	--	--	--
Ácido n-decanoico	26,92	--	--	--	1,8	--	1,3	--	--
2,4-Diterbutilfenol	27,65	1,1	--	0,6	0,4	1,2	1,6	--	0,7
2,5-Dihidrotiofeno	28,99	1,0	--	--	--	--	1,5	--	--

sigue ...

...viene

N-Aminopirrolidina	28,99	--	--	0,8	0,3	--	--	--	--
Monoetil éster del ácido butanodioico	29,90	6,8	13,7	5,7	12,9	25,9	8,1	33,3	27,6
Ácido dodecanoico	31,02	--	--	--	1,3	--	--	--	--
5-Hidroximetil)furfural	32,80	--	6,6	--	0,5	--	--	--	--
Ácido tetradecanoico	36,41	--	--	--	3,5	1,7	--	--	--

CONCLUSIONES

El análisis de la composición química de los vinos peruanos evaluados mostró una concentración de fenoles totales dentro del rango de 2374,25 a 3610,43 mg/L; una concentración de flavonoides totales de 1869,19 a 3138,85 mg/L, y una concentración de antocianinas totales de 102,64 a 317,50 mg/L. En general, los vinos tintos presentaron un mayor contenido de compuestos fenólicos y mayor actividad antioxidante que los vinos rosados. Se ha podido detectar por medio de HPLC la presencia del compuesto *trans*-resveratrol en 6 de los 8 vinos peruanos evaluados. El vino Tabernero (Malbec-Merlot) contiene la mayor concentración de dicho compuesto ($0,56 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$) y además, es el que presenta la mejor actividad antioxidante en el test de DPPH. En el análisis del aroma de los vinos por GC-MS se encontró que los compuestos volátiles que están en mayor concentración son el ácido sórbico, feniletanol, ácido propanoico y etil-succinato. Esta metodología podría ser usada como un elemento adicional para el control de calidad de los vinos.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Francisco Medina-Bolívar del Arkansas Biosciences Institute, Arkansas State University por la donación del estándar *trans*-resveratrol.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cedrón María, <http://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=103> (último acceso 28 de febrero 2011).
2. V. Katalinic, M. Milos, D. Modun, I. Music, M. Boban. *Food Chemistry*, **2004**, 86,593-600.
3. Ávalos Llano. <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2002/08-Exactas/E-014.pdf>. (último acceso 26 febrero 2011).
4. AM. Muñoz, A. Fernández, F. Ramos, C. Alvarado-Ortiz. *Rev. Soc. Quím. Perú.*, **2007**, 73, 30.
5. M. Careri, C. Corradini, L. Elviri, I. Nicoletti, I. Zagnoni. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 5226.
6. A.S. Mayer, M. Heinonen, E.N. Frankel. *Food Chem.*, **1998**, 61, 71.
7. Gracia Nava Manuel Alejandro, http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQ_Garcia_Nava.pdf (último acceso 4 de enero 2011).
8. V. Ivanova, M. Stefova, F. Chinnici. *J. Serb. Chem. Soc.*, **2010**, 75, 45.
9. R. Di Stefano, M.C. Cravero. *L'enotecnico Ottobre*, **1989**, 110, 81.

10. R. M. Lamuela-Raventós, A. I Romero-Pérez, A. L. Waterhouse, M. C. De la Torre-Boronat. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, *43*, 281.
11. C. Ortega, R. López, J. Cacho, V. Ferreira. *J. Chromatogr. A.*, **2001**, *923*, 205
12. B. Radovanović, A. Radovanović. *Molecules*, **2010**, *15*, 4213.
13. T. Somers, G. Ziemelis. *J. Sci Food Agric.*, **1985**, *36*, 1275.
14. A. Tromp, W. Agenbach. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **1981**, *2*, 1.

STUDIES ON MERCURY(II), NICKEL(II) AND LEAD(II) BIOLOGICALLY IMPORTANT BINARY COMPLEXES WITH α -AMINO BUTYRIC ACID IN SOLUTION

Brij Bhushan Tewari^{1*}

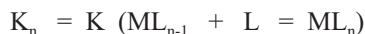
ABSTRACT

Complexation reactions of α -aminobutyric acid with mercury(II), nickel(II) and lead(II) have been studied in solution phase using a paper ionophoretic technique. This method is based on movement of a spot of metal ion in an electric field at various pHs of background electrolyte. A plot of pH versus mobility was used to obtain information for binary complexes and to calculate its stability constants. The stability constants of the ML^+ and ML_2 binary complexes of metal(II) α -aminobutyric acid have been found to be $(8.59 \pm 0.01; 6.93 \pm 0.05)$, $(6.83 \pm 0.03; 5.38 \pm 0.07)$ and $(4.42 \pm 0.02; 2.72 \pm 0.03)$ (logarithm stability constant values) for the mercury(II), nickel(II) and lead(II) complexes, respectively at ionic strength 0.1 M ($HClO_4$) and a temperature of 35°C.

Key words: Ionophoretic technique, mercury(II) complexes, nickel(II) complexes, lead(II) complexes, α -aminobutyric acid, stability constant.

INTRODUCTION

For a mononuclear binary complex, if a central atom (central group) M (the 'metal') and a ligand L have been defined, then in the following expressions K_n is the stepwise formation constant, and β_n is the cumulative formation constant for the complex ML_n . They can both be referred to as stability constants (stepwise and cumulative)¹.



Data on the complexation of biologically significant metal ions and bioactive ligands α -aminobutyric acid give insight into many physicochemical processes. Nickel classified as beneficial metal and mercury as well as lead as toxic metal, respectively. Mercury(II), nickel(II) and lead(II) are well known for their medicinal applications and toxicity²⁻⁷. α -Aminobutyric acid ($C_4H_9NO_2$) is a naturally occurring amino acid, which do not occur in proteins. It is found in animal and plant tissues. It has significant application in biological systems⁸⁻¹⁰.

The paper electrophoretic technique usually suffers from a number of defects. Temperature during electrophoresis, capillary flow on paper, electro-osmosis and adsorption affect the mobility of charged moieties¹¹. The present technique is almost free from these destroying factors and very convenient in use. It gives results in fair agreement with accepted literature values.

Communications^{12, 13} from our laboratory described a new method for the study of metal complexes. A search of the literature indicated few reports on Ni(II) α -aminobutyric acid

^{1*} Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences, University of Guyana, PO Box: 101110, Georgetown, Guyana, Tel: 592-222-4926, Fax: 592-222- 3596 , E-mail: brijtew@yahoo.com

binary complexes and no report on Hg(II) / Pb(II) α -aminobutyric acid complexes. In view of this, an attempt was made to establish the optimum conditions for metal(II) α -aminobutyric acid complex formation. In addition, the present paper describes a paper electrophoretic method for the determination of the stability constants of these complexes.

EXPERIMENTAL

Instruments

A Systronics (Naroda, India) paper electrophoresis equipment horizontal – cum vertical type, model 604, has been used. The apparatus consisted of a PVC moulded double tank vessel. In our laboratory significant change to the instrument has been made. Two hollow rectangular plates covered with thin poly (vinyl chloride) sheets have been used through which thermostated water is run for controlling the temperature. The tanks were closed with a transparent PVC moulded lid. The whole assembly is tight, which prevents moisture changes, which may upset the equilibria in a paper strip. This assembly design thus keeps to a minimum the disturbing effects of evaporation from the unwanted liquid flow in the paper. Each electrolyte tank contains a separate electrode chamber. The auxiliary unit is specially designed to operate either in voltage mode or in current mode.

An Elico (Hyderabad, India) model L₁₋₁₀ having glass and calomel electrodes assembly and working on 220 Volts/50 Hz established a. c. mains, was employed for pH measurements.

Chemicals

Mercury(II), nickel(II) and lead(II) perchlorate solutions were prepared by preliminary precipitation of metal carbonates from a 0.1 M solution of sodium carbonate (AnalaR grade, BDH, Poole, UK). The precipitates were thoroughly washed with boiling water and treated with calculated amounts of 1 % perchloric acid. The resulting mixture was heated to boiling on a water bath and then filtered. The metal content of the filtrates were determined and final concentration was kept at 0.005 M^{14,15}. The position of the Ni²⁺ spots on the paper at the end of the experiment was detected using ammonical dimethylglyoxime (DMG), that of Pb²⁺ detected by 0.1 % solution of 1-(2-pyridylazo) – 2- naphthol (PAN) (Merck, Darmstadt, Germany) in ethanol, that of Hg²⁺ detected using hydrogen sulphide in water. The 0.005 M glucose (BDH, AnalaR) solution was prepared in water and used as an indicator for the correction due to electroosmosis. 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 solution of sodium hydroxide, when a black spot was formed.

Background electrolyte(BGE)

Stock solution of 5.0 M perchloric acid was prepared from its 70 % solution (SDS, AnalaR grade). 2.0 M sodium hydroxide and 0.5 M α -aminobutyric acid (BDH, Poole, UK) solutions were prepared. The background electrolyte used in the study of binary complexes were 0.1 M perchloric acid and 0.1 M α -aminobutyric acid. The system was maintained at various pHs by the addition of sodium hydroxide.

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 l pipette and then mounted on the insulated plate. Each of the two electrolyte vessels were filled with 150 ml of BGE solutions containing 0.1 M perchloric acid and 0.01 M α -aminobutyric acid. 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 into the plates to keep the temperature constant. The lid was then placed on the instrument to make it air tight. It was left for 10 minutes to insure wetting of strips. Subsequently a direct 240 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, the ionic strength being maintained at 0.1 M. 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 (7.5 V/cm); t = time for electrophoresis. The speed of the metal ions / complex ions are reported with pH values. A plot of mobility against pH curve for metal(II) α -aminobutyric acid is shown in figure 1.

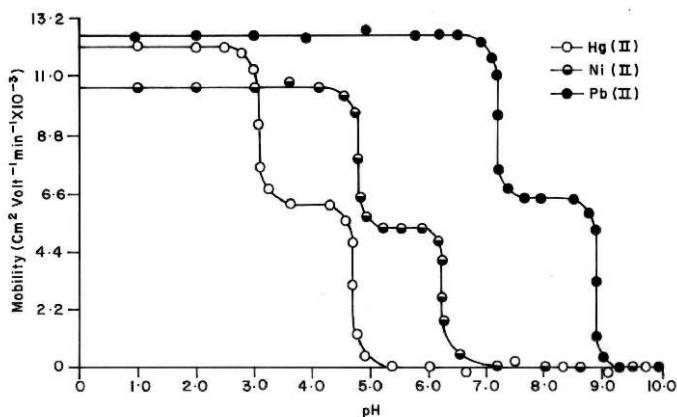


Figure 1. Mobility curve for the metal(II) – α -aminobutyric acid systems. \circ = Hg(II) – α -aminobutyric acid; \bullet = Ni(II) – α -aminobutyric acid, \bullet = Pb(II) – α -aminobutyric acid. Background electrolyte = 0.1 M perchloric acid and 0.01 M α -aminobutyric acid. pH was maintained by addition of sodium hydroxide. Concentration of Hg^{2+} , Ni^{2+} and Pb^{2+} = 0.005 M. Ionic strength = 0.1 M. Temperature = 35° C. The paper strips were spotted with 0.1 μ l of sample solutions and glucose (for making osmotic corrections).

RESULTS

The plot of overall electrophoretic speed of metal spot against pH gives a curve with a number of plateaus (figure 1). A constant speed over a range of pH is possible only when a particular complex species is overwhelmingly formed. Thus every plateau is indicative of formation of a certain complex species. The first one in the beginning corresponds to a region in which metal ions are uncomplexed. This region of low pH, concentration of $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COOH}$ species of α -aminobutyric acid is maximum and this species is non-complexing. Beyond this range, metal ion spots have progressively decreasing mobility, complexation of metal ions should be taking place with anionic species of α -aminobutyric acid whose concentration increases progressively with the increase of pH. Figure 1 shows three plateaus with Hg(II), Ni(II) and Pb(II) metal ions. Hence all three metal ions form two complexes with α -aminobutyric acid anion. It is therefore assumed that the anionic species $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-$ of α -aminobutyric acid has complexed with the metal ions to form different complexes.

Figure 1 reveals that Hg^{2+} , Ni^{2+} and Pb^{2+} metal ions form their first complex movements towards negative electrode. Hence, one $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-$ must have combined with Hg^{2+} , Ni^{2+} and Pb^{2+} metal ions to give $[\text{Hg}\{\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}\}]^+$, $[\text{Ni}\{\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}\}]^+$ and $[\text{Pb}\{\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}\}]^+$ complex cations, respectively. With further increase of pH, mobility in all three metal ions decreases giving rise to third plateau with zero mobility indicates its neutral nature.

The third plateau in each case is due to (1:2) metal – ligand complex. Hence, two $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-$ must have combined with Hg^{2+} , Ni^{2+} and Pb^{2+} to give $[\text{Hg}\{\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}\}_2]$, $[\text{Ni}\{\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}\}_2]$ and $[\text{Pb}\{\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}\}_2]$ neutral metal complexes. In view of the above observation, the complexation of metal ions with α -aminobutyric acid anion may be represented as:



where M^{2+} is Hg^{2+} , Ni^{2+} and Pb^{2+} metal cation; $[\text{L}^-]$ is the α -aminobutyric acid anion; K_1 and K_2 first and second stability constants, respectively.

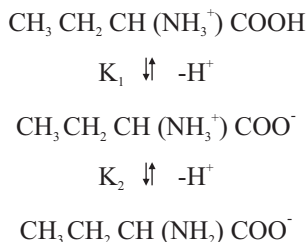
The metal spot on the paper is thus a combination of uncomplexed metal ions, 1:1 and 1:2 metal complexes. The spot is moving under the influence of electric field and the overall mobility U is given by equation (3)¹⁶.

$$U = \frac{u_{0,0} \beta_{0,0} + u_{1,0} \beta_{1,0} [\text{L}] + u_{2,0} \beta_{2,0} [\text{L}]^2 + \dots + u_{1,1} \beta_{1,1} [\text{HL}] + u_{2,1} \beta_{2,1} [\text{HL}]^2 + \dots + u_{2,1} \beta_{2,1} [\text{H}_2\text{L}] + u_{2,2} \beta_{2,2} [\text{H}_2\text{L}]^2 + \dots}{\beta_{0,0} + \beta_{1,0} [\text{L}] + \beta_{2,0} [\text{L}]^2 + \beta_{1,1} [\text{HL}] + \beta_{2,1} [\text{HL}]^2 + \beta_{2,1} [\text{H}_2\text{L}] + \beta_{2,2} [\text{H}_2\text{L}]^2 + \dots} \quad (3)$$

where $u_{0,0}$ equals speed of uncomplexed metal ion, $u_{1,0}$ equals speed of complex formed by the combination of one unprotonated anionic ligand with metal ion and $u_{x,p}$ equals speed of the metal complex formed by the combination of x anions containing, p , protons each. β 's equals overall stability constant of the different metal complexes formed in the interaction. On taking into consideration different equilibrium above equation transformed into following useful form

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

where u_0 , u_1 and u_2 equals mobilities of uncomplexed metal ion, 1:1 metal complex and 1:2 metal complex, respectively. Equation (4) has been used for calculating stability constant of complexes metal ions with α -aminobutyric acid. For calculating first stability constant, K_1 , the region between first and second plateau is pertinent. The overall mobility, U , will be equal to the arithmetic mean of mobility of uncomplexed metal ion, u_0 and that of the first complex u_1 , at a pH where $K_1 = 1/CH_3CH_2CH(NH_2)COO^-$. The dissociation constant of pure α -aminobutyric acid ($K_1 = 10^{2.30}$; $K_2 = 10^{9.63}$) is determined from same paper electrophoretic technique. The dissociation of pure α -aminobutyric acid can be represented as:



With the help of dissociation constants, the concentration of α -aminobutyric acid anion $[L^-]$ is determined for the pH, using following equation.

$$[L^-] = \frac{[L_T]}{1 + [H] / K_1 + [H]^2 / K_1 K_2} \quad (5)$$

where $[L_T]$ equals total concentration of α -aminobutyric acid (0.01 M); K_1 and K_2 equals first and second dissociation constants of pure α -aminobutyric acid. By knowing the concentration of α -aminobutyric acid anion $[L^-]$, K_1 can be calculated ($K_1 = 1/[L^-]$). The stability constant, K_2 of second complex can be calculated by taking into consideration, the region between second and third plateau of mobility curve. These calculated values are given in table 1.

Table 1. Stability constants of binary complexes of Hg(II), Ni(II) and Pb(II) with α -aminobutyric acid.

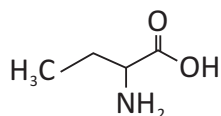
Metal ion	Complexes	Stability constant	Logarithm stability constant value *
Mercury(II)	ML ⁺	K ₁	8.59 ± 0.01
	ML ₂	K ₂	
Nickel(II)	ML ⁺	K ₁	6.93 ± 0.05
			6.83 ± 0.03
	ML ₂	K ₂	(5.37 ± 0.02) ¹⁹
			5.38 ± 0.07
Lead(II)			(4.41 ± 0.04) ¹⁹
	ML ⁺	K ₁	4.42 ± 0.02
	ML ₂	K ₂	2.72 ± 0.03

Ionic strength = 0.1 M; temperature = 35° C; M = metal cations (Hg²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺); ligand = α -aminobutyric acid; α -aminobutyric acid anion = CH₃CH₂CH(NH₂)COO⁻

*Literature values are given in parentheses.

DISCUSSION

It is observed from table 1 that stability constants are approximately similar to literature values. The slight deviation in the values obtained from different sources is mainly due to the difference in temperature, ionic strength and experimental conditions used by different workers. The stability constants metal complexes can be very easily calculated by this technique. The present technique is limited to charged species and the precision of the method is not as high as other physicochemical methods. However, uncertainty in the result is $\pm 5\%$. It is not felt that it can replace the most reliable methods although it is a new approach worth developing. The molecular structure of α -aminobutyric acid is given below.

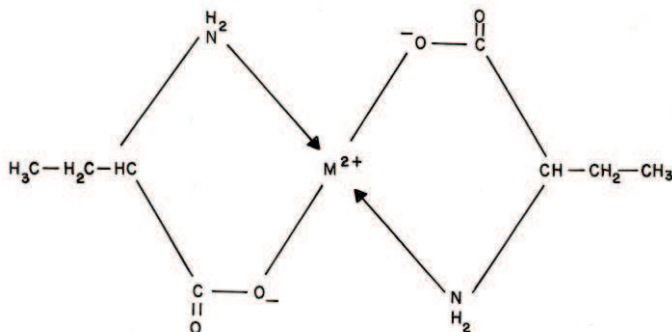


It is also observed from table 1 that first and second stability constants of ML and ML₂ complexes followed the order.



The values of K₂ are found to be lower in comparison in K₁ in each case, this may be due to the decrease in coordinating tendency of ligand with higher state of aggregation^{17,18}. High stability constant values of the mercury(II) α -aminobutyric acid complexes indicate strong bonding between the mercury(II) cation and the α -aminobutyric acid anion. Whilst low stability constant values of lead(II) α -aminobutyric acid complexes indicate weak bonding between

the lead(II) cation and α -aminobutyric acid anion. The proposed structure for the ML_2 complexes may be given as:



CONCLUDING REMARKS

Following conclusions can be shown from the present study.

- Mercury(II), nickel(II) and lead(II) are significant for biological systems but as such they are toxic, the α -aminobutyric acid may be used to reduce the level of these metal ions in the biological systems.
- Mercury(II) α -aminobutyric acid and lead (II) α -aminobutyric acid couples are found to have maximum and minimum stability constant values, respectively.
- ML_2 binary complexes are found to have low stability constant values and less stable in comparison to ML^+ complexes.
- The present ionophoretic technique is very helpful in finding that complex system is formed or not, and if formed its stability constants can also be determined.
- Stability constants of metal complexes can be very easily calculated by this technique, of the present paper electrophoretic technique has significant advantages over the other physicochemical methods reported in chemical literature for the determination of stability constants of metal complexes.

REFERENCES

1. A. D. McNaught and A. Wilkinson (eds), Compendium of Chemical Terminology (IUPAC Orange Book No. 11), 2nd edition, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1997.
2. A. Shokrallahi, M. Ghaedi and M. Shamsipur, *Quim. Nova.* **32(1)**, 153 (2009).
3. S. K. Das, A. R. Das and A. K. Guiha, *Environ. Sci. Technol.* **41**, 8281 (2007).
4. N. E. Okoronkwo, J. C. Igwe and I. J. Okoronkwo, *Afr. J. Biotechnol.*, **6(4)**, 335 (2007).
5. S. Ong, E. Toorisaka, M. Hirata and T. Hano, *ScienceAsia*, **36**, 204 (2010).
6. K. Mounika, B. Anupama, J. Pragathi and C. Guyanakumari, *J. Sci. Res.*, **2(3)**, 513 (2010).
7. C. M. Dobson, *Nature*, **432**, 824 (2004).
8. K. R. Wagoner and C. Czajkowski, *J. Biol. Chem.*, **285**, 14187 (2010).
9. Z. Corte and R. Venta, *Clin. Chem. Lab Med.*, **48(1)**, 99 (2010).

10. J. P. White, J. Prell, V. K. Ramachandran and P. S. Poole, *J. Bacteriol.*, **191(5)**, 1547 (2009).
11. D. J. Shaw, *Electrophoresis*, Academic Press, London, 1969.
12. B. B. Tewari, *J. Chem. Eng. Data*, **55(5)**, 1779 (2010).
13. B. B. Tewari, *Metal Ions in Biology and Medicine*, (eds. Ph. Collery, I. Maynard, T. Theophanides, I. Khassanora, T. Collery), John Libbey, Eurotext, Paris, **10**, 511 (2008).
14. A. I. Vogel, *Text Book of Quantitative Inorganic Analysis, including Elementary Instrumental Analysis*, 4th edition, Longman, London, UK, 1978.
15. I. M. Kolthoff and R. Belcher, *Volumetric Analysis*, Vol. 3, Interscience Publishers Inc., New York, USA, 1957.
16. V. Jokl, *J. Chromatogr.* **6**, 432 (1964).
17. J. D. Joshi, *Indian J. Chem.* **21**, 446 (1982).
18. J. D. Joshi, P. K. Bhattacharya, *J. Indian Chem. Soc.* **57**, 336 (1980).
19. A. E. Martell and R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, Vol. **1**, Amino Acids, Plenum Press, New York, 1974, p. 6.

AISLAMIENTO DE ÁCIDO ÚSNICO Y PARIETINA DE *Caloplaca saxicola* HOFFM

Olivio Castro Mandujano^{1*}, Ana Pastor de Abram¹, Ingrid E. Collantes Díaz²

RESUMEN

En el presente trabajo se investigó la *Caloplaca saxicola* (Hoffm.), recolectada cerca de la laguna de Chinchaycocha (Carhuamayo - Cerro de Pasco), a una altitud de 4100 msnm. A 240 gramos de muestra, se sometió a una extracción acetónica por maceración; se procedió a separar diversos componentes del extracto, empleando la cromatografía en columna, con el sistema cloroformo-acetona aumentando la cantidad de acetona; luego, las fracciones obtenidas se purifican empleando técnicas cromatográficas y recristalizaciones. Finalmente, se elucidaron y se determinaron las estructuras de los sólidos obtenidos, analizando sus espectros de IR, RMN ¹H, RMN ¹³C y EM; éstos son: ácido úsnico y parietina.

Palabras clave: Liquen, *Caloplaca saxicola*, ácido úsnico, parietina.

ISOLATION OF THE USNIC ACID AND PARIETIN OF THE *Caloplaca saxicola* HOFFM

ABSTRACTS

In the present work there was investigated the *Caloplaca saxicola* (Hoffm.), gathered near Chinchaycocha's lagoon (Carhuamayo - Cerro de Pasco), to an altitude of 4100 msnm. To 240 grams sample, it surrendered to an extraction acetonic for maceration; one separated diverse components of the extract, using the chromatography in column, with the system chloroform - acetone increasing the quantity of acetone; then, the obtained fractions they purified using chromatographic techniques and recrystallizations. Finally, they were elucidated and there decided the structures of the obtained solids, analyzing his spectra of IR, ¹H NMR, ¹³C NMR, and MS; these are: usnic acid and parietin.

Key words: Lichen, *Caloplaca saxicola*, usnic acid, parietin.

INTRODUCCIÓN

El liquen es un organismo simbiótico conformado por un hongo y un alga; se estima que existen aproximadamente 18500 especies; pueden ser encontrados desde las regiones árticas hasta las tropicales, desde planicies hasta regiones montañosas y bajo condiciones acuáticas y desérticas. Se presenta sobre rocas, corteza, hojas de árboles, suelos, etc. Producen una gran variedad de metabolitos primarios como carbohidratos, aminoácidos y metabolitos secundarios (esteroides, terpenos, cromonas, xantonas, naftoquinonas, antronas, antraquinonas etc.). Muchos de ellos son característicos o propios de los líquenes; se les llama compuestos liquénicos, existiendo aproximadamente 1050 metabolitos secundarios ya identificados; ellos son agrupados de acuerdo al tipo de estructura, denominándose dépsidos, depsidonas, ácidos úsnicos y dibenzofuranos².

^{1*} Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias - Sección Química.
Av. Universitaria 1801, San Miguel, Lima 32, Perú ocastro@pucp.edu.pe.

² Laboratório de Extração da Universidade Paulista. Av. Paulista 900, Bela vista, C.E.P. 01310-100 São Paulo, Brasil.

Recientemente hay un gran interés en el teñido textil con pigmentos naturales por su alta compatibilidad y su no toxicidad. Las antraquinonas son compuestos empleados para estos fines; por ello, actualmente, se están realizando investigaciones en el cultivo de líquenes a partir de hongos³. En una investigación de la especie *Rumex crispus* fue aislado la antraquinona parietina, la cual tiene actividad antifúngica de 30 a 10 µg/mL, valor que la hace tan eficiente como el fenarimol y el polioxin⁴. El ácido úsnico es un metabolito secundario propio de líquenes; presenta actividad inhibidora de tumores; es analgésico, también se usa como conservante de cremas cosméticas⁵.

El artículo de revisión del género *Caloplaca*⁶ reporta el estudio de antraquinonas en 253 especies, de las cuales 226 de ellas reportan la presencia de parietina y sólo cinco presentaban ácido úsnico; en este estudio no estaba incluido la especie *C. saxicola*. El objetivo de este trabajo es abordar la identificación de los componentes mayoritarios del líquen *C. saxicola* porque hasta hoy en día no se encontró estudio fitoquímico de la especie en estudio.

PARTE EXPERIMENTAL

Colecta de la muestra y la identificación taxonómica

El líquen estudiado se encontró sobre piedras, en el distrito de Carhuamayo, provincia Cerro de Pasco, departamento de Junín, a una altitud de 4100 msnm, cerca de la laguna de Chinchaycocha. La determinación taxonómica (tabla 1) fue realizada por la Dra. Mónica T. Adler de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. *C. saxicola* (figura 1), pertenece a la familia Teloschisteaceae, la cual consiste de tres pequeños géneros: Teloschistes, Xanthoria y Fulgensia, y además, de un género amplio, llamado *Caloplaca* con más de 1000 especies reconocidas. El género *Caloplaca* tiene seis subgéneros: *Pyrenodesmia*, *Leproplaca*, *Gasparinia*, *Xanthocarpia*, *Gyalolechia* y *Caloplaca*⁷. La especie *C. saxicola* Hoffm., es un líquen crustáceo areolado en el centro y hacia los márgenes, formando lóbulos anaranjados; tiene apotecio circular, plano, sésil de 5 mm diámetro, con borde talino y epitecio anaranjado. Talo con córtex superior, heterómero con clorobionte *Trebouxia* sp. Apotecio lecanorino asca con ocho ascosporas elipsoidales; paráfisis con septos y ramificación en el ápice. Talo K + (púrpura). Habita en laderas pedregosas y cumbres rocosas⁸.

Tabla 1.- Identificación taxonómica de *C. saxicola*

Reino	Fungi
Clase	Lecanoromycetes
Familia	Teloschisteaceae
Género	<i>Caloplaca</i>
Especie	<i>Caloplaca saxicola</i> (Hoffm.)



Figura 1. Liquen *C. saxicola*.

Aislamiento del ácido úsnico y parietina

La muestra limpia, seca y molida (240 g), se sometió a una extracción acetónica por maceración por dos veces; el extracto fue concentrado en rotaevaporador hasta un volumen de 25 mL; luego fue concentrado con nitrógeno hasta sequedad (2,35 g), obteniéndose un extracto pastoso, el que fue sometido a cromatografía en columna, usando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil la mezcla de solventes cloroformo:acetona, con polaridad creciente en la siguiente proporción: 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, ..., 1:9, 0:10, se calculó 80 fracciones, las cuales fueron sometidas a cromatografía en capa delgada (sobre cromatofolios de sílica gel eluyendo con mezcla de solventes tolueno:acetato de etilo:ácido acético glacial (6:4:1) y se revela con una solución de metanol ácido al 10% con (ácido sulfúrico) seguida de calentamiento; fueron reunidas las fracciones desde 23 hasta 34 y desde 65 hasta 72 por separado, ya que contenían un solo compuesto cada una de ellas, después de sucesivas etapas de purificación se obtuvo dos compuestos cristalinos de color amarillo y naranja, respectivamente.

Determinación del punto de fusión

El punto de fusión del ácido úsnico fue determinado en un aparato Fisher-Johns.

Análisis por Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Los espectros de UV-Visible fueron registrados entre 250 – 700 nm en un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible, Lambda 2, L.A, Perkin Elmer. El solvente utilizado para diluir la muestra fue etanol de grado para análisis, de Merck.

Análisis Infra Rojo (IR)

Los espectros de IR fueron obtenidos con el Espectrómetro Infrarrojo, FT - IR, serie 1600, Perkin Elmer. Se prepararon pastillas de bromuro de potasio (KBr) que contenía una muestra al 3,5%.

Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)

Los cromatogramas fueron hechos en un cromatógrafo de marca Kontron HPLC 450 con detector UV 430 y autoinyector 360; fue usada como fase estacionaria una columna Spherisorb 5 ODS Kontron de 5µm, 250 x 4,6 mm a temperatura ambiente. La muestra fue inyectada (20 µL de 0,02mg/mL), solubilizada en acetona, usando como fase móvil el solvente A: agua bidestilada 1% H₃PO₄ y solvente B: MeOH 100%. La corrida para eluir los compuestos usó inicialmente Sol. B al 30% por 1minuto; después de 14minutos alcanzó el

70%; luego en los 15 minutos siguientes, llegó al 100% de sol, eluyendo 18 minutos adicionales. Los compuestos fueron detectados a 245nm.

Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear ^1H y de ^{13}C fueron registrados en un espectrómetro Varian INOVA DPX-300, operando a 300 y 75 MHz. Los espectros fueron obtenidos en CDCl_3 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

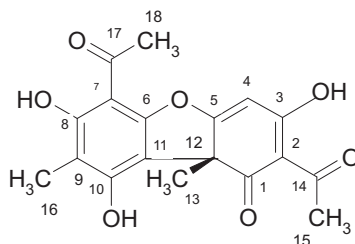


Figura 2. Estructura molecular del ácido úsnico.

Los cristales en forma de agujas de color amarillo (300 mg) provenientes de las reuñión de las fracciones 23-34 son solubles en CHCl_3 , poco soluble en MeOH y Me_2CO , con punto de fusión de 203-204°C. Estos datos preliminares indican que se trataría del ácido úsnico, ya conocido para los autores, figura 2. Se obtuvo un espectro de UV-Vis en etanol, figura 3; comparando este espectro con el de la literatura⁹ presenta concordantes máximos de absorbancia.

Este compuesto fue inyectado en un equipo CLAE, comparado con un patrón de ácido úsnico siguiendo el método establecido en la literatura¹⁰, la comparación con el patrón indicaba que se trataba del ácido úsnico con retención 28,103 min.

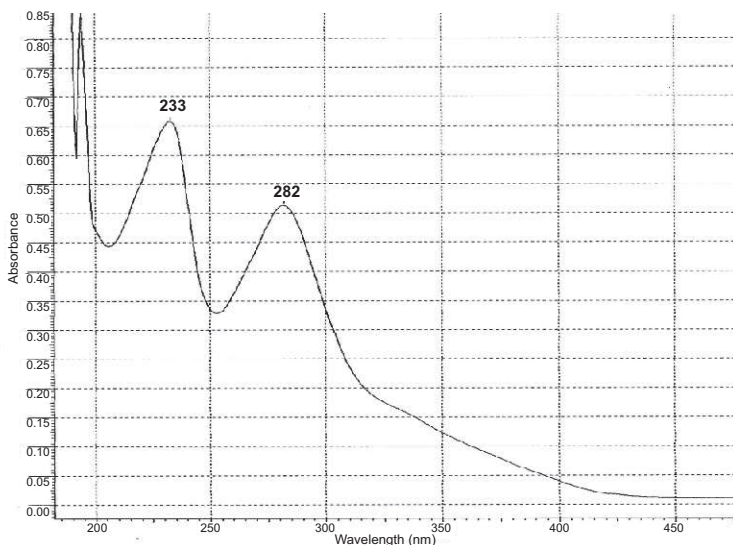


Figura 3. Espectro de UV-Vis del ácido úsnico.

El espectro de RMN ^1H (figura 4) presenta señales características de grupos metil con desplazamiento químico en 1,76 ppm del C-13; 2,09 ppm del C-16 y 2,67 ppm C-15 y C-18, una señal en 5,98 ppm del hidrógeno de C-4, las señales a 11,02 ppm del hidrógeno OH del C-10; 13,31 ppm del hidrógeno OH del C-8 y 18,84 ppm del hidrógeno del C-3, tabla 2, compara estos resultados con los de la literatura^{11,12,13}.

Tabla 2. Desplazamiento químico del espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C del ácido úsnico.

	^1H d (ppm)	^{13}C δ (ppm)		^1H δ (ppm)	^{13}C δ (ppm)
1	-	198,02	10	11,02 s	163,85
2	-	179,33	11	-	105,19
3	18,84 s	155,17	12	-	59,04
4	5,98 s	98,29	13	1,76 s	27,87
5	-	101,49	14	-	200,29
6	-	191,68	15	2,67 s	32,09
7	-	109,28	16	2,09 s	7,51
8	13,31 s	157,47	17	-	201,75
9	-	103,92	18	2,67 s	31,25

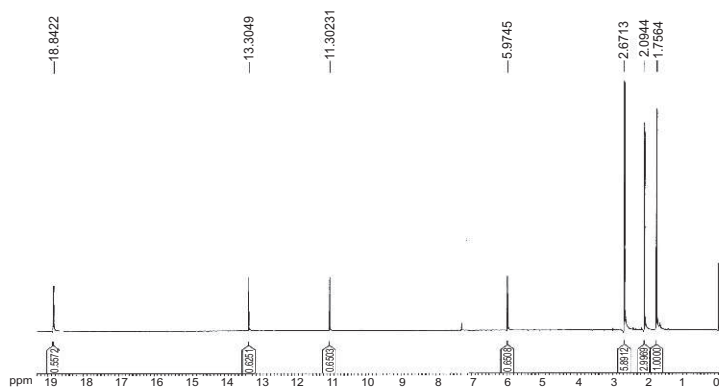


Figura 4. Espectros de RMN ^1H del ácido úsnico en CDCl_3 a 300 MHz

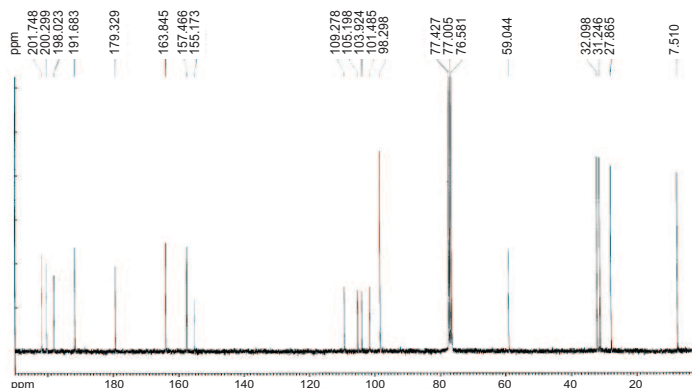


Figura 5. Espectros de RMN ^{13}C del ácido úsnico en CDCl_3 a 75 MHz.

El espectro de RMN ^{13}C (figura 5) presenta 18 carbonos, 4 de ellos de grupos metilos, uno está protegido en campo alto a 7,51 ppm de C-16; 27,87 del C-13; 31,25 del C-18; 32,09 ppm del C-15; un pico en 59,04 ppm, característicos de carbono cuaternario C-12; las señales de los grupos carbonilos en 198,02 ppm C-1; 200,29 ppm C-14 y 201,75 ppm C-17, tabla 2. El análisis espectroscópico confirma que el metabolito aislado es el ácido úsnico.

Los cristales con forma de agujas de color anaranjado (126 mg) provenientes de la reunión de las fracciones 65-72, son solubles en CHCl_3 , MeOH y Me_2CO . El espectro de UV-Vis (figura 6), en etanol (0,01%), dio valores de absorbancia máxima a 223, 251, 264, 287 y 433 nm, confirmando una estructura fuertemente conjugada.

En el espectro IR (en KBr), figura 7, se observan bandas de absorción a 3438 cm^{-1} OH, 3035 cm^{-1} vibración C-H aromático, 2921 cm^{-1} vibración asimétrica del CH_3 , 2844 cm^{-1} vibración simétrica de CH_3 , 1691 cm^{-1} C=O; 1630 cm^{-1} C=C conjugado; 1295 cm^{-1} y 1035 cm^{-1} alargamiento del C-O-C simétrico y antisimétrico¹⁶.

Este compuesto fue inyectado en un CLAE (el cromatograma obtenido es la figura 8) y fue comparado con un patrón de parietina siguiendo el método establecido por la literatura¹⁰; la comparación de los tiempos de retención ($31,732\text{ min}$) con el patrón, indicaba que se trataba de parietina (figura 9); lo que se comprobó con el análisis de los otros espectros.

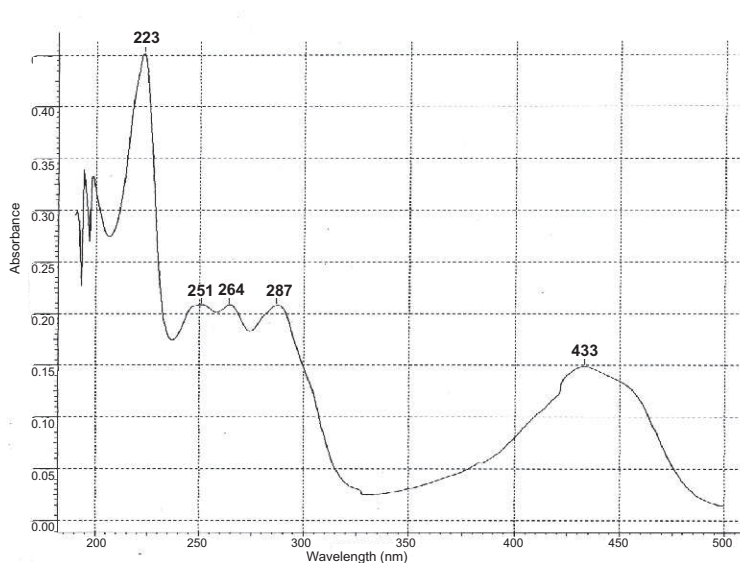


Figura 6. Espectro de UV-Visible de parietina en etanol (0,01%).

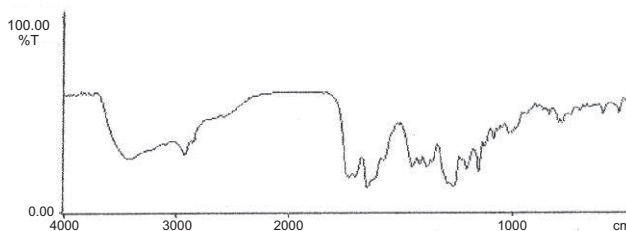


Figura 7. Espectro infra rojo de parietina

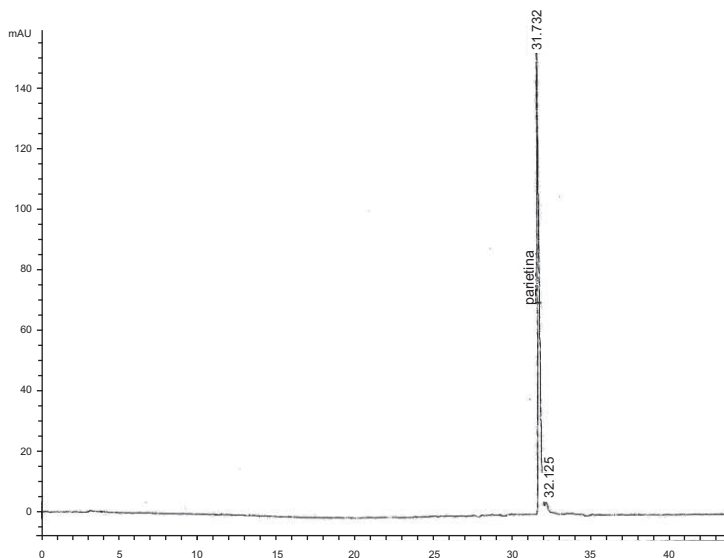


Figura 8. Cromatograma de CLAE de parietina

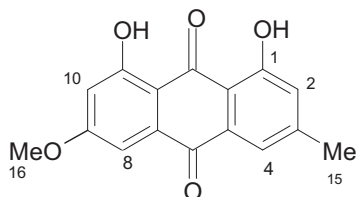


Figura 9. Estructura molecular de parietina.

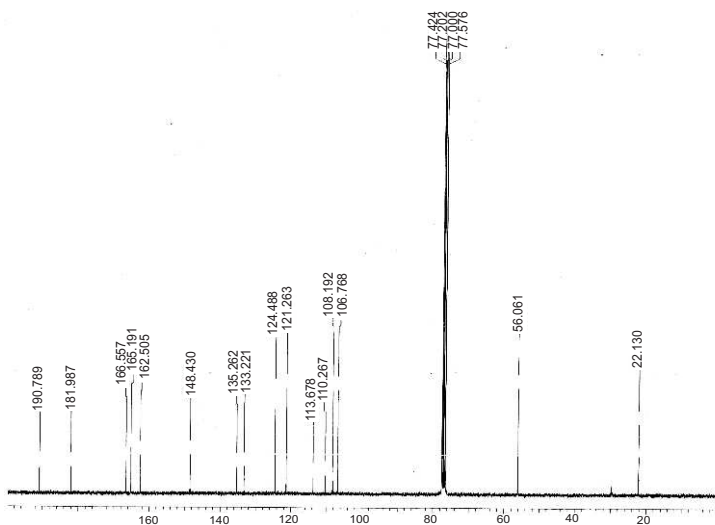
El espectro de RMN ^{13}C (figura 10) presenta 16 carbonos: a 22,13 de CH_3 a 56,06 ppm de metoxilo C-16; 190,79 ppm y 181,99 ppm característicos de carbonilos de cetona y 12 picos entre 167 y 106 ppm de carbonos aromáticos. Por esta información se propone que la estructura posea 2 anillos bencénicos, con sustituyentes CH_3 y OCH_3 , pudiendo ser una estructura derivada de antraquinona.

El espectro DEPT (figura 11) proporciona datos de carbonos enlazados directamente con hidrógenos; se confirma la propuesta del metilo y del metoxilo; se observa 4 carbonos aromáticos enlazados a hidrógenos y 10 carbonos cuaternarios; los desplazamientos químicos 124,49; 121,26; 133,22; 135,26 ppm son carbonos CH y a 22,13 y 56,06 ppm se asignan a CH_3 y OCH_3 , respectivamente. Las señales a 162,51; 148,43; 133,22; 181,99; 135,26; 166,56; 165,19 ppm corresponden a carbonos cuaternarios. Se propone que el metabolito aislado corresponde a parietina. La comparación con datos bibliográficos lo confirma y esta antraquinona se llama 1,8-dihidroxi-6-metoxi-3-metil-9,10-antraquinona.

Tabla 3. Desplazamientos químicos en espectro de RMN ^1H y RMN ^{13}C de parietina.

	^1H δ (ppm)	^{13}C δ (ppm)	DEPT		^1H δ (ppm)	^{13}C δ (ppm)	DEPT
1	-	162,51	C	10	-	106,77	CH
2	7,08 <i>d</i> , 1,5	124,49	CH	11	-	165,19	C
3	-	148,43	C	12	-	110,27	C
4	7,62 <i>d</i> , 1,2	121,26	CH	13	-	190,79	C
5	7,36 <i>d</i> , 2,4	133,22	C	14	-	113,68	C
6	-	181,99	C	15	2,45 <i>s</i>	22,13	CH ₃
7	6,68 <i>d</i> , 2,4	135,26	C	16	3,94 <i>s</i>	56,06	OCH ₃
8	-	108,19	CH	OH-C-1	12,12 <i>s</i>	-	-
9	-	166,56	C	OH-C-11	12,31 <i>s</i>	-	-

En el espectro RMN ^1H (figura 12) se observan las señales: CH₃ en 2,45 ppm singlete (*s*); (OCH₃) a 3,94 ppm (*s*); también se observa la presencia de 4 hidrógenos aromáticos a 6,68 ppm **H** de C-10 duplete (*d*), con constante de acoplamiento (*J*) de 2,4 Hz; 7,08 ppm **H** de C-2 *d* con *J* de 1,5 Hz; 7,36 ppm **H** de C-8 *d* con *J* de 2,4 Hz, y 7,62 ppm **H** de C-4 *d* con *J* de 1,2 Hz; estos 4 hidrógenos presentan multiplicidad de hidrógenos acoplado en meta y dos singletes, correspondiente al grupo OH en 12,12 ppm del C-1 y 12,31 ppm del C-11, como mostramos en la tabla 3, donde se observaron los hidrógenos con sus respectivas multiplicidades; la comparación de estas señales con parietina disponibles en la literatura^{16,17,18}, permitió verificar que se trataba del mismo compuesto.

**Figura 10.** Espectro de RMN ^{13}C de parietina en CDCl_3 , 75MHz.

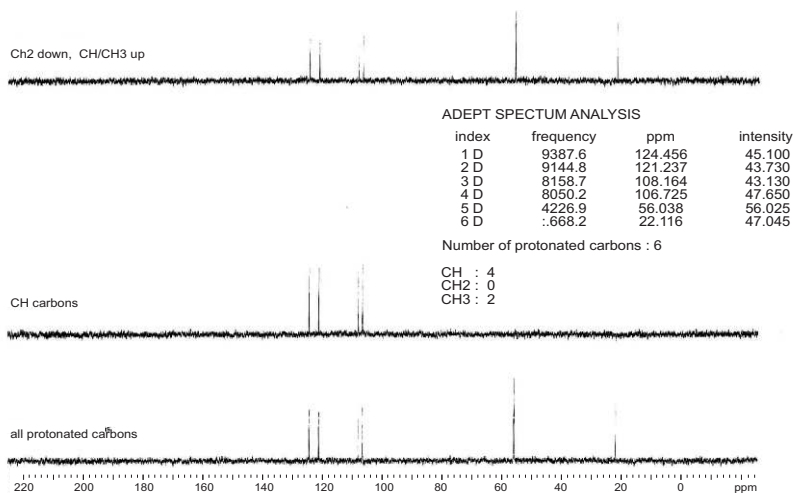


Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C - DEPT de parietina.

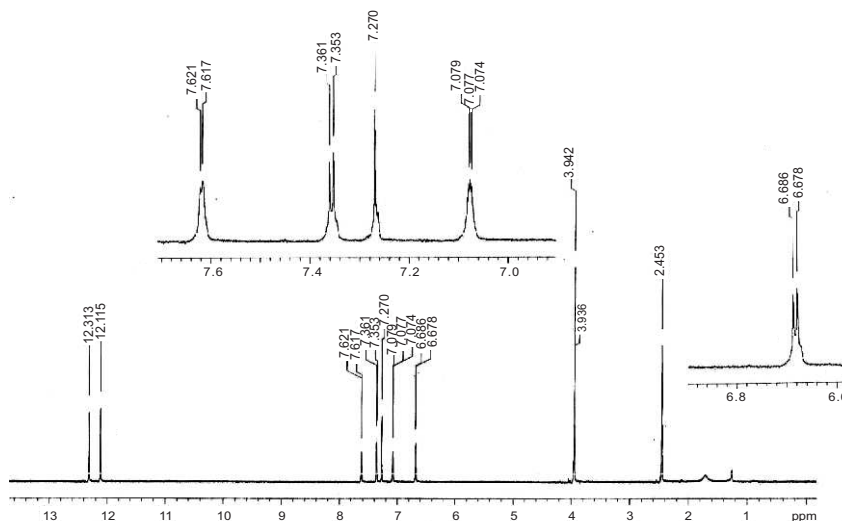


Figura 12. Espectro de RMN ^1H de parietina en CDCl_3 a 300 MHz.

CONCLUSIONES

Hasta el momento, el líquen *Caloplaca saxicola* Hoffm. no presenta ningún estudio fitoquímico. En este artículo presentamos el aislamiento e identificación por técnicas espectroscópicas de los compuestos mayoritarios presentes: el ácido úsnico (300mg) y la antraquinona parietina (126mg); estos compuestos han sido por primera vez reportados.

El aislamiento de los metabolitos tuvo un rendimiento de 12,77% para el ácido úsnico y 5,36% para la antraquinona parietina.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada gracias a la colaboración de la Dra. Mónica T. Adler, de la Universidad de Buenos Aires, Argentina, por la identificación botánica del líquen estudiado y al Dr. John Elix de la Universidad Nacional de Australia por los análisis de HPLC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Molnár, K.; Farkas, E, Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review, *Zeitschrift für Naturforsch C*, (2010), 65c, 157-173.
2. Honda, N.K.; Vilegas, W.; A Química dos Liqueños, *Química Nova*, (1998), 21, 110 - 124.
3. Nagia, F.A.; El-Mohamedy, R.S.R., Dyeing of Wool with Natural Anthraquinone Dyes from *Fusarium oxysporum*, *Dyes and Pigments*, (2007), 75, 550-555.
4. Choi, G.J.; Lee, S.W.; Jang, K.S.; Kim, J.S.; Cho, K.Y.; Kim, J.C.; Effects of Chrysophanol, parietin, and nepodin of *Rumex crispus* on Barley and Cucumber Powdery Mildews; *Crop Protection*, (2004), 23, 1215-1221.
5. Huneck, S.; The Significance of Lichens and their Metabolites; *Naturwissenschaften*, (1999), 86, 559-570.
6. Santesson, J.; Anthraquinones in *Caloplaca*; *Phytochemistry*, (1970), 9, 2149-2166.
7. Sochting, U. ; Lutzoni, F. ; Molecular Phylogenetic Study at the Generic Boundary between the Lichen-Forming Fungi *Caloplaca* and *Xanthoria* (Ascomycota, Teloschistaceae); *Mycological Research*, (2003), 107(11), 1266–1276.
8. Ramírez, A.; Cano, A.; Líquenes de Pueblo Libre, una localidad andina en la Cordillera Negra (Huaylas, Ancash, Perú); *Revista Peruana de Biología*, (2005), **12(3)**, 383- 396.
9. Stocker-Wörgötter, E.; Elix, J.A.; Grube, M.; Secondary Chemistry of Lichen-forming Fungi: Chemosyndromic Variation and DNA-analyses of Cultures and Chemotypes in the *Ramalina farinaceae* Complex; *The Bryologist*, (2004), 107(2), 152-162.
10. Feige, G.B. ; Lumbsch, H.T. ; Huneck, S. ; Elix, J.A. ; Identification of Lichen Substances by a Standardized High-performance Liquid Chromatographic Method , *Journal of Chromatography*, (1993), 646, 417-427.
11. Rashid, M.A.; Majid, M.A.; Quader, M.A.; Complete NMR Assignments of (+)-usnic acid, *Fitoterapia*, (1999), 70, 113-115.
12. König, G.M.; Wright, A.D.; ¹H and ¹³C-NMR and Biological Activity Investigations of Four Lichen-derived Compounds; *Phytochemical Analysis*; (1999), 10, 279-284.
13. Castro Mandujano, O.N.; Aislamiento del ácido úsnico de *Flavoparmelia caperata* y su determinación cuantitativa por Espectroscopía UV, en Diez Líquenes; *Revista de la Sociedad Química del Perú* (2010), 76 (4), 389-399.
14. Scott A.I., Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products, The Macmillan Company, (1964), pag. 288.
15. Chu, X.; Sun, A.; Liu, R.; Preparative Isolation and Purification of Five Compounds from the Chinese Medicinal Herb *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc by High-speed Counter-current Chromatography; *Journal of Chromatography A*, (2005), 1097, 33-39.
16. Edwards, H.G.M.; Newton, E.M.; Wynn-Williams, D.D.; Coombes, S.R.; Molecular Spectroscopic Studies of Lichen Substances 1: Parietin and Emodin; *Journal of Molecular Structure*; (2003), 648, 49-59.
17. Manojlovic, I.; Bogdanovic-Dusanovic, G.; Gritsanapan, W.; Manojlovic, N.; Isolation and Identification of Anthraquinones of *Caloplaca cerina* and *Cassia tora**; *Chemical Paper*, (2006), 60(6), 466-468.
18. Smetanina, O.F.; Kalinovskii, A.I.; Khudyakova, Y.V.; Slinkina, N.N.; Pivkin, M.V.; Kuznetsova, T.A.; Metabolites from the Marine Fungus *Eurotium repens*; *Chemistry of Natural Compounds*, (2007), 43(4), 395-398.

INFORMACIONES

A. De la Sociedad Química del Perú

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

- **Tratamiento de muestras, disolución y análisis cualitativos para determinar el mejor método para su cuantificación**, dictada por la Quím. Dora Inés Delmas Robles, Docente de la Facultad de QIQ de la UNMSM, con experiencia de más de 30 años en docencia en el área de Química Analítica Clásica, el día jueves 17 de marzo del 2011.
- **El agua y la salud**, dictada por la Dra. Imelda Soriano Lindo, Médico-Cirujano, egresada de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el día martes 22 de marzo del 2011.
- **AGUAmiga: los niños, el agua, la ciencia y el desarrollo sostenible**, dictada por la Dra. María Luisa Castro de Esparza, Química de la UNMSM, Director ejecutivo de los proyectos AQUAtox y AGUAmiga en Argentina, Brasil, Uruguay y Colombia, el día martes 22 de marzo del 2011.
- **Nuevos alcances de la bioquímica molecular para la identificación de adulterantes, transgénicos y para la evaluación de propiedades funcionales en las investigaciones con alimentos**, dictada por la PHD Patricia Glorio Paulet, el día jueves 31 de marzo del 2011.
- **El agua y la salud humana**, dictada por la Dra. Rosa María Lazo Velarde, Médico colegiada, Especialista en Salud Ocupacional, el día jueves 7 de abril del 2011.
- **Degradación fotocatalítica de colorantes**, dictada por el M.Sc. Quím. Alberto Corzo Lucioni, Magíster en Química de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, el día jueves 14 de abril del 2011.
- **Síntesis, caracterización y actividad biológica del complejo Cu/Quinina**, dictada por la Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón, Docente de la Universidad Nacional de Ingeniería, Coordinadora de la Escuela Profesional de Química, el día jueves 2 de junio del 2011.

Ceremonia de instalación del nuevo Consejo Directivo periodo 2011-2013

El pasado viernes 18 de marzo del presente, en nuestro local institucional, se llevó a cabo la ceremonia de instalación del nuevo Consejo Directivo periodo 2011-2013. Juramentó en el cargo de Presidente la Ing. Flor de María Sosa Masgo.

Discurso memoria

Señores Past-Presidentes Dr. Leonidas Unzueta Romero, Dr. José Amiel Pérez, Dr. Fernando Quevedo Ganoza, Dra. Olga Lock Sing, Dr. Juan José León Cam; ex directivos de la Sociedad Química del Perú. Señores representantes de Instituciones Científicas y Académicas, Sres. Miembros de la Sociedad Química del Perú, Sras. y Sres.

Esta noche es sumamente grata para mí y tiene un significado muy especial el culminar un periodo presidiendo el Consejo Directivo de la SQP e iniciar uno nuevo gracias a la confianza depositada por ustedes en mi persona para dirigir a nuestra institución por dos años más.

Permítanme hacer un pequeño resumen de las actividades realizadas durante el periodo marzo 2009 - marzo 2010.

Jornadas

En Junio del 2010 se llevaron a cabo las X Jornadas de Bromatología y Nutrición, las cuales tuvieron, el nombre: “Teresa Blanco Blasco de Alvarado-Ortiz”. En aquella oportunidad, las Jornadas se realizaron en la ciudad de Huacho y fueron organizadas conjuntamente con la Universidad José Faustino Sánchez Carrión y presididas por la Dra. Ana María Muñoz Jáuregui. Este evento contó con la participación de distinguidos profesionales investigadores e invitados nacionales e internaciones, alcanzando un éxito notable.

Aniversario de la Revista de la SQP

Se celebró el septuagésimo quinto aniversario de la Revista de la SQP, que se mantiene ininterrumpida en su edición, y regular e inalterable en su alto contenido científico. Actualmente, su oportuna publicación se la debemos al M.Sc. Luis Valles Fernández, editor permanente, y al Dr. Mario Ceroni Galloso, Presidente de la Comisión de Publicaciones.

Conferencias

Nuestras Conferencias de los Jueves Científicos han ido creciendo tanto en temas como en concurrencia; y podemos decir que tenemos un público cautivo conformado esencialmente por jóvenes, futuros profesionales. Durante este periodo, se han dictado 40 conferencias, contando con la presencia de destacados profesionales especialistas en las áreas involucradas.

Los temas tratados en las conferencias han sido variados y han satisfecho las expectativas de los participantes. Sería extenso mencionar cada una de ellas, mas hemos de remarcar siempre la desinteresada participación de cada uno de los ponentes. Las materias cubiertas se extendieron a una amplia gama que incluyen la química ambiental, la química de coordinación, la nanociencia, la nanotecnología, la quimiometría, la química del cemento, productos naturales, la electroquímica, la gastronomía molecular, entre otros. Asimismo, cubrieron aspectos muy interesantes, tales como: “Qué se necesita para ser un químico exitoso”, “Qué rol cumple la Química Cuántica en el desarrollo de la Química moderna”, “Contribuciones de la Química Inorgánica a la Medicina”, entre otros. Agradezco a la Comisión de Actividades Científicas por su invaluable y constante dedicación, la cual está presidida por la Dra. Ana María Muñoz y conformada por la Ing. Carmen Rodríguez Best y la Ing. Ana María Osorio.

Cursos

Igualmente, se han dictado los siguientes cursos:

- *Curso Taller: “Buenas prácticas de laboratorio (BPL) para el manejo seguro de sustancias y residuos químicos”. A cargo del Mg. Jorge Eduardo Loayza Pérez. 10, 12 y 14 de agosto del 2009.*

- “Actualización en tópicos selectos de química”, desarrollado por Catedráticos de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM. 26 de octubre al 6 de noviembre del 2009.
- “Actualización en tópicos selectos de química”. Expuesto por catedráticos de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM. 1 al 12 de febrero del 2010.
- Curso Taller: “Seguridad en el Laboratorio Químico e identificación de peligros y evaluación de riesgos (IPER)”. Expuesto por el Ing. Guillermo Jaramillo Carpio. 19 y 26 de junio del 2010.
- “Buenas prácticas de laboratorio”. Excelente participación de la Quím. Angélica Rodríguez Best. 30 de octubre del 2010.
- “Enfoque moderno de la química básica en el año internacional de la química”. Desarrollado por catedráticos de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM. 17 al 22 de enero del 2011.

Por otro lado, debo agradecer a la Presidenta de la División de Educación Química, Ing. Ana María Osorio, por su constante trabajo en la organización de cursos para profesores de Educación Secundaria.

La SQP participó, además, en el XVIII Encuentro Científico Internacional de Verano, ECI2011v. Así, el 6 de enero de este año, organizó conjuntamente con el Colegio de Químicos del Perú, la sesión del “Año Internacional de la Química”.

Congresos nacionales

Por otro lado, como es costumbre cada dos años, en el año 2010 se organizó el XXV Congreso Peruano de Química, “Ing. M.Sc. Dionisio Ugaz Mont”, presidido por el Dr. Mario Ceroni Galloso, el cual se llevó a cabo en el Centro Cultural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con la asistencia de 350 personas entre alumnos, docentes universitarios, profesionales y socios. Se desarrollaron 33 conferencias paralelamente en tres ambientes. En esta ocasión contamos con la participación de distinguidos profesionales investigadores e invitados nacionales e internaciones. Recordemos que una Mesa Redonda sobre Legislación e Investigación en Productos Naturales se realizó en el Congreso de la República. Hemiciclo de Raúl Porras Barrenechea, con la asistencia de congresistas y el Ministro del Ambiente.

Se desarrollaron 4 cursos durante el Congreso y uno antes del mismo. Paralelamente al Congreso, se realizó la exposición de equipos y servicios de las empresas en el evento QUIMITEC 2011 que estuvo a cargo de la Ing. Ana María Osorio. Nuestro más profundo agradecimiento y felicitaciones al Dr. Mario Ceroni y a todo su Comité Organizador por el trabajo desplegado en la organización de dicho evento.

Gracias a lo exitoso que resultó el evento se adquirió algunos equipos de cómputo para la Institución.

XXIX Congreso Latinoamericano de Química-CLAQ 2010

Realizado del 27 de setiembre al 01 de octubre en Cartagena de Indias, Colombia. La Sociedad estuvo representada por una delegación de 22 miembros acompañando a la Secretaria Ejecutiva de la FLAQ y Past-Presidenta de la SQP, Dra. Olga Lock Sing.

Licencia de funcionamiento

Debido a las gestiones de nuestro Director Administrativo, Quím. Neptalí Ale Borja, la SQP ya cuenta con su licencia de funcionamiento. Siendo ésta una preocupación de anteriores directivas, hoy es una realidad.

Captación de nuevos socios

La Comisión de captación de socios presidida por el Ing. Manuel Otiniano realizó un trabajo encomiable y gracias a ello se logró la inscripción de nuevos integrantes a nuestra institución.

Administración y economía

Quiero extender nuestra gratitud al Dr. José Amiel Pérez, por su infatigable labor como Presidente de la Comisión de Economía y Finanzas.

Año Internacional de la Química

El año 2011 ha sido declarado por la ONU como el Año Internacional de la Química. Ello nos llevó a nombrar una comisión presidida por la tenaz Dra. Olga Lock para establecer un calendario de las actividades que se llevarán a cabo durante este año.

Estoy convencida de que entre los miembros del Consejo Directivo hay más posibilidades de versatilidad, creatividad y entusiasmo, que las que ellos mismo pudieran creer. Esto me anima a seguir en el nuevo Consejo Directivo, en la dinámica de crecimiento de la difusión de la ciencia química. De esta manera, la SQP podrá ser visualizada como lo que realmente es: una gran riqueza del país, por la noble labor de sus integrantes que, lógicamente, afecta positivamente en su actividad difusora de investigación e información química.

Espero que cuando llegue el momento de efectuar el nuevo balance de la tarea realizada, podamos estar todos satisfechos y orgullosos de haber contribuido al desarrollo y difusión de la química en nuestro país, y éste a su vez, esté satisfecho y orgulloso de su Sociedad Química y de su Consejo Directivo.

Muchas gracias a todos ustedes, cuya presencia es evidencia del respaldo y confianza necesarios para llevar a cabo nuestra tarea.

Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo

Presidente SQP



Nuevo Consejo Directivo 2011-2013

Comisiones del Consejo Directivo periodo 2011-2013

Comisión de Economía y Finanzas. Presidente: Dr. José Amiel Pérez

Comisión de Publicaciones. Presidente: Dr. Mario Ceroni Galoso

Comisión de Actuaciones Científicas. Presidente: Dra. Ana María Muñoz Jáuregui

“Ceremonia de Reconocimiento a la Trayectoria de la Mujer en el Campo de la Química”

El “Año Internacional de la Química 2011”, coincide con el centenario del Premio Nobel otorgado a Marie Curie por sus aportes a la química. En este contexto, la Sociedad Química del Perú llevó a cabo, el pasado 5 de mayo, en el Auditorio “José Faustino Sánchez Carrión” del Congreso de la República, la “Ceremonia de reconocimiento a la trayectoria de la mujer en el campo de la Química”.

Se hizo entrega de una placa recordatoria a nueve damas que han destacado por su trayectoria profesional. En el área de la Química: Dra. Lucía Pozzi Escot de Herold, Quím. Carmen Ruiz de Pardo y Quím. Angélica Best de Rodríguez; en el área de Químico-Farmacéutico: Dra. Bertha Pareja Pareja, Dra. Teresa Blanco Blasco de Alvarado-Ortiz y Dra. Teresa Cocchella Vera; en el área de Ingeniería Química: Ing. Quím. Carmen Catter de Bueno, Ing. Quím. Carmen Sinfón de Torres y Dra. Olga R. Lock Sing de Ugaz. Nuestras más sinceras felicitaciones para estas nueve profesionales.

Este evento contó con el auspicio de Coca Cola Servicios del Perú, N'Reps S.R.L. (D'Marco), L'oreal Perú S.A., Ajinomoto del Perú. Asimismo, expresamos nuestro agradecimiento a la congressista Dra. Fabiola Palomino, por las facilidades para el uso del Auditorio.



Homenajeadas: Derecha: Dra. Teresa Cocchella Vera, Dra. Bertha Pareja Pareja, Dra. Teresa Blanco Blasco de Alvarado-Ortiz, Quím. Angélica Best de Rodríguez, Ing. Flor de María Sosa (Presidente SQP), Dra. Olga Lock de Ugaz, Quím. Carmen Ruiz de Pardo, Ing. Quím. Carmen Catter Bueno y Ing. Quím. Carmen Sinfón de Torres.

Curso: “Gestión de sustancias químicas, manejo de reactivos, cálculos de los IPER y buenas prácticas de laboratorio”

Siendo la Química una Ciencia Experimental, cuya metodología se desarrolla en los laboratorios, es necesario contar con una serie de normas que eviten los accidentes y/o potenciales situaciones de gravedad en el ámbito de trabajo. Mediante estas normas documentadas se contribuye a la identificación sistemática de riesgos con el fin de estimar y valorar el sistema de trabajo en el laboratorio. Esta práctica, a su vez, conduce hacia la excelencia, no sólo en los servicios de laboratorio sino también en los resultados de un trabajo de investigación. Con la finalidad de poner a disposición del público interesado un tema de mucho interés, se llevó a cabo este curso, dictado por el Ing. Guillermo Jaramillo Carpio, realizado el 7 y 14 de mayo del 2011.

Convenio marco de cooperación interinstitucional entre la Sociedad Química del Perú y la Academia Nacional de Ciencias

Con el objetivo de realizar acciones conjuntas para el logro de sus fines institucionales, así como para contribuir al desarrollo de la actividad científica y tecnológica del país, en particular de la Química y la Ciencia de Materiales, se llevó a cabo la firma de este Convenio. Lo suscribieron el Presidente de la Academia Nacional de Ciencias, Dr. Roger Guerra-García Cueva y la Presidente de la **Sociedad Química del Perú, Ing. Flor de María Sosa Masgo**, el 1 de junio del presente año.

“Año Internacional de la Química”

En el marco de estas celebraciones, la Sociedad Química del Perú ha programado, en el mes de junio, el Ciclo de Conferencias: “La Química en sus diversas aplicaciones”.

- Química Ambiental: “Mitigación del calentamiento global mediante la gestión responsable y sostenible de sustancias químicas”, dictada por el Mg. Jorge Eduardo Loayza Pérez, el día 09 de junio del 2011.
- Química de Productos Naturales: “Desafíos y logros en la investigación de productos naturales”, dictada por la Dra. Olga Lock de Ugaz, el día 16 de junio del 2011.
- Química Alimentaria: “Química e inocuidad de los alimentos: una relación amor/odio”, dictada por el Dr. Fernando Quevedo Ganoza, el día 23 de junio del 2011.
- Bioquímica Molecular: “Genotipificación del virus de la hepatitis C”, dictada por la Mg. Ana Hurtado Alindes, el día 24 de junio.
- Nanotecnología: “El aporte de la química en el desarrollo de la nanotecnología”, dictada por la Ing. Ana María Osorio, el día 30 de junio del 2011.

Foro Internacional sobre “La Química y el desarrollo sostenible”

En el marco de las celebraciones del “Año Internacional de la Química”, hemos unido esfuerzos con la Sociedad Nacional de Industria, UNESCO, Universidades, Colegios Profesionales, Ministerio del Ambiente - MIMAM, Ministerio de Energía y Minas -MINEM, Ministerio de Educación, Ministerio de la Producción y la Academia Peruana de Ciencias para la organización del Foro internacional sobre “La Química y el desarrollo sostenible”, que se realizará del 19 al 21 de octubre del presente año, en nuestra ciudad capital. El objetivo principal de este evento, es sensibilizar al público en general, acerca del aporte de la Química al desarrollo sostenible y al bienestar humano. El Comité Organizador está presidido por la Dra. María Luisa Castro de Esparza.

Sensible pérdida:

Con profundo pesar comunicamos el fallecimiento del socio:

- Químico Félix García Mesones

La Sociedad Química del Perú, expresa sus más sentidas condolencias a sus familiares y amigos por tan irreparable pérdida.

B. Otras informaciones

Rector de la UNMSM, Dr. Pedro Cotillo Zegarra

El pasado 31 de mayo, en el Salón General del Centro Cultural de San Marcos, el doctor Pedro Cotillo Zegarra asumió el cargo de Rector de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con la presencia de la comunidad sanmarquina, encabezada por su antecesor el doctor Luis Fernando Izquierdo Vásquez. En este acto el Dr. Cotillo expresó que su gestión tendrá como objetivos estratégicos generales: la formación integral y competitiva de los estudiantes para que sean líderes en su especialidad; contar con una plana docente de alto nivel; enfatizar la investigación científica, tecnológica y humanística.

La Sociedad Química del Perú expresa sus sinceras felicitaciones al Dr. Pedro Cotillo Zegarra, por su reciente elección como Rector de la Universidad Decana de América para el periodo 2011-2016. Asimismo, saludamos la designación de la Dra. Antonia Castro Rodríguez, como Vicerrectora Académica (e) y al Dr. Bernardino Ramírez Bautista, como Vicerrector de Investigación (e).

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

SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

SOCIOS HONORARIOS

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)



43 rd IUPAC World Chemistry Congress
46 th IUPAC General Assembly
70 th CQPR Annual Conference and Exhibition
July 30 to August 7, 2011

“Chemistry Bridging Innovation Among the Americas and the World”

The Colegio de Quimicos de Puerto Rico is hosting the 2011 IUPAC World Congress on July 30 - August 7, 2011 at the Puerto Rico Convention Center. We are working in the development of the general program and related activities associated with the event.

Seven Nobel Laureates will be joining us as Plenary Speakers



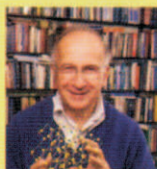
Aaron Ciechanover
Nobel Laureate 2004



Richard R. Ernst
Nobel Laureate 1991



Robert H. Grubbs
Nobel Laureate 2005



Roald Hoffmann
Nobel Laureate 1981



Mario J. Molina
Nobel Laureate 1995



Richard R. Schrock
Nobel Laureate 2005



Ada E. Yonath
Nobel Laureate 2009

Mark your calendars now and plan to celebrate
with us at IUPAC 2011!



Sponsorships available

Call for Symposia is still open



International Year of
CHEMISTRY
2011

I U P A C

Advancing Worldwide Chemistry

Sponsors:



Agilent Technologies



Information: www.iupac2011.org or email: info@iupac2011.org