ISSN 1810-634X

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 78 Nº 3
JULIO - SETIEMBRE 2012

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 Soriano 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
	: M.Sc. Graciela Untiveros Bermúdez
	: Quím Farm. Nora Herrera Hernández
	: Mg. Patricio Muñoz Huillcas

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

Comisión de Publicaciones
Presidente: Dra. Ana María Muñoz Jáuregui

Comisión de Actuaciones Científicas
Presidenta: M.Sc. Graciela Untiveros Bermúdez

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 : Ana María Muñoz Jaúregui
Editor en Jefe : Luis Valles Fernández
Miembros : Ana Valderrama Negrón
Julio Santiago Contreras

Comité Consultivo

Beyer, Lothar
Universidad de Leipzig - Alemania
Calvo Buendía,
Univ. Nac. Mayor de San Marcos - Perú
García Herbosa, Gabriel
Universidad Burgos - España
Gamboa Fuentes, Nadia
Pontificia Universidad Católica del
Guija Poma, Emilio
Universidad Científica del Sur - Perú
Muñoz Jáuregui, Ana
Universidad San Martín de
Lock Sing, Olga
Pontificia Universidad Católica del Perú
Santiago Contreras, Julio
Facultad de Quím. e Ing. Quím.
UNMSM - 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
Guitiérrez Correa, Marcel
Universidad Nacional Agraria La Molina - Perú
Guzmán Duxtan, Aldo
Facultad de Quím. e Ing. Quím. UNMSM - Perú
Alarcón Cavero, Hugo Arturo
Facultad de Ciencias. UNI - Perú

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

Sede: Av. Nicolás de Araníbar 696 Santa Beatriz – Lima 01
Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú
Teléfono (511) 472-3925 Fax: (511) 265-9049
e-mail: **revsqp@gmail.com / sqperu@gmail.com**
Portal web: **www.sqperu.org.pe**

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

Vol 78 **JULIO - SETIEMBRE 2012** **N°3**

En el Perú: N° suelto S/.15 Suscripción anual: S/. 60.00 En el extranjero: Suscripción anual: $50.00

CONTENIDO
(Vol 78 N° 3 - 2012)

- *Editorial* 159

Trabajos originales

- Purificación de una lectina tipo C del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*, por Mercedes Palomino, Fanny Lazo, Julio Delgadillo, Ruperto Severino, Armando Yarlequé. 161

- Preparación de nanopartículas de magnetita por los métodos sol-gel y precipitación: Estudio de la composición química y estructura, por Gino Picasso, Jaime Vega, Rosario Uzuriaga, Gean Pieer Ruiz. 170

- Evaluación del potencial de adsorción de cobre, cadmio y cinc del musgo *Sphagnum maguellanicum*, proveniente de Junín, Perú, por Rafaela Elías-Letts, Diego Ugarte La Torre, Raúl Loayza – Muro, David Condori, Rosario Rojas, Marco Piñatelli. 183

- Biological activities of. 13,28 – epoxyoleanane triterpene saponins from two peruvian Myrsinaceae, by Cynthia Girardi, Pedro G. Vásquez- Ocnin, Denis Castillo, Michel Sauvain, Rosario Rojas, Nicolás Fabre, Mohamed Haddad. 188

- Estudio de la deshidroxilación en el óxido férrico hidratado, denominado limonita, por P. R. Palacios, L. De los Santos Valladares, A. Bustamante, J.C. González. 198

- Estudio de sapogeninas esteroidales de especies peruanas del género Dioscorea, por Holger J. Maldonado García; Enrique G. Guzmán Lezama; Sabino Márquez Cabezas; Alfredo Tupayachi; Joaquina Albán. 208

INFORMACIONES

A.- De la Sociedad Química del Perú

- XXVI Congreso Peruano de Química. 219
- Conferencias de los "Jueves Científicos" en la Sociedad Química del Perú. 219
- Cursos pre Congreso de Química. 220

B.- Otras informaciones 221

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 $ 100,00
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 $ 100,00
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 (este 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 arábiga 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. Deberían 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

La Nanotecnología en el Perú

La nanociencia y la nanotecnología están teniendo un desarrollo vertiginoso a nivel mundial, debido a la gran variedad de nuevas propiedades de la materia a la escala nanométrica que se están descubriendo y su relativa facilidad para incluirlos en dispositivos para aplicaciones específicas en los diferentes campos de la ciencia y la tecnología. Por dicha razón, los países desarrollados han invertido, e invierten, una gran cantidad de recursos, tanto materiales como humanos. Según un informe publicado por Lux Research del 2004, la inversión total en el sector de Nanotecnología en todo el mundo está repartida entre estados Unidos (35%), Asia (35%), Europa (28%) y el resto del mundo (2%). Se espera que, como resultado de toda esta inversión y esfuerzos, aproximadamente después del año 2015, la aplicación en masa de las nanotecnologías traerá cambios dramáticos en la economía y sociedad en general de toda la humanidad (Mundo Nano, 2011, 4(2), 65-71).

Como toda revolución tecnológica, la nanotecnología ofrece una oportunidad de desarrollo en la medida que sea asimilada, recreada y difundida por la sociedad. Por lo tanto, es necesario considerar de interés público la vinculación de los conocimientos sobre nanociencia y nanoteconología con la sociedad en general, para que ésta reconozca sus ventajas, sus potenciales riesgos, y con ello tenga más elementos para tomar sus decisiones. Esto es aún más importante en el caso de la clase política, pues sus resoluciones nos afectan a todos.

Latinoamérica está muy lejos, una vez más, de ser un protagonista en el mundo de las nanociencias y nanotecnología. Brasil, México y Argentina responden por casi la totalidad de artículos publicados en esta área. En el caso de Perú, desde hace un poco más de una década que algunos grupos de investigación iniciaron sus actividades en nanociencias con el apoyo de la cooperación internacional. Hoy podemos decir que el número de grupos de investigación se ha incrementado considerablemente, tal como pudo comprobarse en el reciente I Simposio Peruano de Nanotecnología, pero la mayor parte de estos grupos se concentra en Lima (Universidad Nacional de Ingeniería, Universidad Nacional Mayor de San Marcos y Pontificia Universidad Católica del Perú) y en mucha menor magnitud en Arequipa y Trujillo.

A la loable labor de las universidades para generar nuevos recursos humanos, hay que sumar las iniciativas para aglutinar a los diferentes grupos de investigación en estas áreas. Podemos mencionar principalmente a Spectra (http://www.spectraperu.org), “una comunidad de investigadores que tiene como objetivo mejorar las capacidades de cada uno de sus miembros para el beneficio de la sociedad, particularmente la sociedad latinoamericana y andina, en contacto y cooperación científica permanente con países del primer mundo”. Otra organización es la Red de Nanotecnología en el Perú (http://www.nanotecnologia.com.pe/), “integrada por investigadores del ámbito académico, instituciones publicas, privadas y ONG, la que promueve la investigación interinstitucional y multidisciplinaria de sus miembros, agrupa a especialistas en diversas áreas con el propósito de absolver consultas con fundamento técnico científico y difundir las actividades relacionadas con la nanotecnología en el Perú y el mundo”. Igualmente podemos mencionar las diferentes iniciativas para la creación de un Centro de Materiales, que esté al servicio de la comunidad científica de todo el Perú.

En el editorial del número 1 - 2012 de la Revista de la Soc. Quím. del Perú, se hizo un análisis de la enseñanza de la química en el Perú, concluyendo con la urgente mejora (en contenidos y número de horas) de la educación científica. Esto es mucho más cierto para el caso de la nanociencias y nanotecnología. Se requiere no solamente crear programas de licenciatura, maestría y doctorado específicamente en estas disciplinas, sino también introducir a los estudiantes en estas áreas, iniciando desde la educación básica y media. Ni el Ministerio de Educación, ni las correspondientes instancias de los gobiernos regionales (ahora se está implementando la descentralización de la educación) no incluyen en los planes de estudio temas relacionados con nanociencia y nanotecnología. Cabe mencionar que, por ejemplo, en el Proyecto Educativo Nacional al 2021, elaborado por el Consejo Nacional de Educación, no existe una sola mención a las palabras nanociencia y nanotecnología (Mundo Nano, 2011, 4(2), 65-71). Si seguimos con este modelo educativo se cumplirá el dicho: “La historia la escriben los vencedores, y las revoluciones tecnológicas las disfruta el mundo desarrollado”.

Julio César Santiago Contreras

Recibido el 24-07-2012
Aprobado el 16-08-2012

PURIFICACIÓN DE UNA LECTINA TIPO C DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Lachesis muta*

Mercedes Palomino[a], Fanny Lazo[a], Julio Delgadillo[a], Ruperto Severino[b], Armando Yarlequé[a*]

RESUMEN

A partir del veneno de la serpiente *Lachesis muta*, que habita en la amazonía peruana, se purificó y determinó las propiedades bioquímicas de una proteína no enzimática denominada lectina Tipo C. La purificación se logró a través de un único paso cromatográfico utilizando una columna de DEAE-Sephadex A-50 equilibrada con buffer acetato de amonio 0,1 M pH 5. La lectina fue reconocida debido a su capacidad para aglutinar glóbulos rojos humanos *in vitro*; por lo que se trata de una hemoaglutinina. La proteína en estudio fue purificada 3,6 veces y representó el 3,5 % del contenido proteico total del veneno. El análisis por PAGE-SDS, demostró que la lectina se encontraba al estado homogéneo con una masa molecular de 27, 5 kDa y 14,3 kDa en su forma reducida. La lectina fue inhibida en su actividad por la lactosa (1,56 mM), seguida de galactosa, arabinosa, sacarosa y glucosa. En cambio, no se registró inhibición con maltosa, manosa y fructosa. La capacidad hemoaglutinante de la lectina también fue inhibida por EDTA, seguida de DTT y 2-mercaptoetanol a distintas concentraciones; la inhibición causada por EDTA (0,125 - 0,5 mM), fue anulada por los iones Ca^{+2}, Mg^{+2} y Mn^{+2}. Los resultados indican que la proteína purificada es una lectina tipo C, la cual es una potente hemoaglutinina.

Palabras clave: Hemoaglutininas, veneno, serpiente, *Lachesis muta*

PURIFICATION OF A LECTIN TYPE C FROM THE VENOM OF *Lachesis muta* PERUVIAN SNAKE

ABSTRACT

A lectin type C was purified and researching its biochemical properties from the venom of *Lachesis muta* Peruvian snake . Purification was performed through a unic chromatographic step using a DEAE-Sephadex A-50 column, equilibrated with 0,1 M ammonium acetate pH 5 buffer. A lectin was recognized for its capacity *in vitro* to agglutinating human red cells. This protein was purified 3,6 folds and it represents 3,5 % of the total protein into the venom. It had 27,5 kDa and 14,3 kDa of molecular weight in non reduction and reduction conditions, respectively, using a PAGE-SDS analysis. It was strongly inhibited by the lactose (1,56 mM) followed by galactose, arabinose, sacarose and glucose. While maltose, mannose and fructose were not inhibitors. Hemagglutinating activity was inhibited by EDTA, DTT and ME too using different concentrations. However inhibition produced by EDTA (0,125-0,5 mM) was abolished by Ca^{+2}, Mg^{+2} and Mn^{+2} ions. These results showed that this purified protein is a lectin type C, with a potent hemagglutinin activity

Key words: Hemagglutinins snake, venom, *Lachesis muta*

[a*] Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM, Av. Venezuela Cuadra 34 s/n, Lima- 1. e-mail: ayarleque48@gmail.com

[b] Laboratorio de Zoología de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM.

INTRODUCCIÓN

Lachesis muta, también conocida como "Shushupe", es el vipérido de mayor longitud de América, pudiendo alcanzar de 3 a 4 m[1], habita la región tropical y sub tropical desde Costa Rica hasta el sur de Brasil. En el Perú es la segunda responsable de accidentes ofídicos[2]. El veneno de *Lachesis muta* posee diferentes componentes enzimáticos que han sido aislados y caracterizados desde la década del 70. Dentro de ellos se encuentra la enzima similar a trombina, fosfolipasa A, exonucleasa, L-aminoácido oxidasa, proteasas [3] y hialuronidasa[4] . Tales enzimas están implicadas en el proceso de envenenamiento causando edema, hemorragia, hipotensión, desórdenes en la coagulación sanguínea, y necrosis [3]. Sin embargo, se han encontrado componentes no enzimáticos del tipo de las lectinas, incluyendo el veneno de *Lachesis muta stenophyrs* de centroamérica[5,6].

Las lectinas encontradas en venenos de serpientes pertenecen a la superfamilia de lectinas del tipo C[7], las cuales son proteínas dependientes de calcio para interactuar con carbohidratos, que se encuentran extracelularmente; presentan puentes disulfuros y no poseen un ligando sacárido típico[7] . Sin embargo, se han purificado y caracterizado un gran número de lectinas a partir de venenos de serpientes[5,6,8]. Estas proteínas pertenecen a la familia de lectinas tipo C y poseen una región conservada denominada dominio de reconocimiento de carbohidratos (CDR)[9] . Pueden dividirse en dos grandes grupos: 1) lectinas tipo C verdaderas, aquellas que se unen a carbohidratos y son dependientes de calcio y 2) proteínas similares a lectinas tipo C, aquellas que contienen un CDR pero que no se unen a carbohidratos ni son dependientes de calcio [10].

Estas proteínas son capaces de aglutinar *in vitro* glóbulos rojos de diferentes orígenes incluyendo aquéllos obtenidos de humanos[11]; presentan actividad edemática, actividad mitogénica sobre linfocitos, y pueden inducir agregación plaquetaria; ocasionan alteraciones renales o son capaces de activar neutrófilos[11].

A pesar de exhibir diferentes actividades biológicas, las lectinas tipo C verdaderas, son consideradas como proteínas no tóxicas[12] y por lo tanto presentan un potencial biotecnológico que ha estado siendo evaluado en los últimos años. En ese sentido, recientemente, se purificó y caracterizó la lectina del veneno de *Bothrops leucurus* encontrándose que esta proteína posee una actividad antimicrobiana efectiva contra bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis y Bacillus subtilis* [13].

Por lo tanto, el presente trabajo ha tenido como objeto la exploración y purificación de una lectina procedente del veneno de *Lachesis muta* del Perú para su ulterior caracterización.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Se empleó veneno de *Lachesis muta* de especímenes adultos procedentes de Pucallpa-Dpto. de Ucayali y mantenidos en cautiverio en el Serpentario "Oswaldo Meneses" del Museo de Historia Natural de la UNMSM. El veneno obtenido, fue liofilizado y conservado a 4 °C .

Cuantificación proteica

Se realizó por el método de absorción ultravioleta a 280 nm y por el método de Lowry *et al.*, modificado por Loayza *et al.*[14], usando como proteína estándar albúmina sérica bovina.

Actividad hemoaglutinante (AH)

El método usado fue el de Ogilvie y Gartner, 1984[15] . En cada pocillo de una placa de microtitulación con fondo "V", se colocaron 50 µL de solución TCS (Tris 0,01 M, $CaCl_2$

2 mM, NaCl 0,5 M) a pH 7 y luego se agregó 50 µL de veneno o proteína purificada al primer pocillo de cada fila, procediéndose a efectuar diluciones sucesivas ½ para los demás pocillos de cada fila. Por último, 50 µL de solución al 3% de glóbulos rojos humanos del grupo O Rh^+ fueron añadidos a cada pocillo de las placas. Las lecturas se realizaron luego de una hora de incubación a temperatura ambiente. Los resultados fueron clasificados en hemoaglutinación completa, incompleta y no hemoaglutinación. Esta prueba, así como todas las pruebas de hemoaglutinación, en adelante fueron realizadas por triplicado y el título (última dilución que exhibe hemoaglutinación completa) hallado es un promedio de los tres resultados obtenidos.

Purificación de la lectina

50 mg de veneno de *L. muta* fueron disueltos en buffer acetato de amonio 0,1 M pH 5,0 y luego de separar los restos insolubles por centrifugación, la muestra fue aplicada a una columna de intercambio aniónico DEAE-Sephadex A-50 (38 x 1,1 cm) previamente equilibrada con el mismo buffer. Se colectó fracciones de 1 mL con un flujo de 10 mL/hora. La elución de la proteína retenida en la columna se realizó adicionando NaCl 0,3 M. Se determinó el contenido proteico y la actividad hemoaglutinante de todas las fracciones colectadas.

Evaluación de la pureza y determinación del peso molecular

La lectina purificada fue evaluada por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (PAGE-SDS) en ausencia y presencia de 2-mercaptoetanol (ME), de acuerdo al método de Laemmli (1970)[16]. El peso molecular se determinó usando como marcadores: albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

Efecto de carbohidratos

Se evaluó D-galactosa, D- manosa, D- maltosa, L- arabinosa, D-fructosa, D-lactosa y D-sacarosa sobre la actividad hemoaglutinante. Se realizaron diluciones seriadas de los carbohidratos con concentraciones finales en el pocillo desde 200 hasta 0,05 mM. Luego se adicionó 1 µg de lectina purificada, cantidad que produce hemoaglutinación completa. Ambos componentes, azúcar más lectina, fueron incubados a 37 ºC por 20 minutos e inmediatamente se añadió glóbulos rojos al 3%. Se halló la cantidad mínima necesaria de cada azúcar para inhibir una hemoaglutinación completa. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Efecto de agentes reductores y quelantes

Se evaluaó los efectos del 2-Mercaptoetanol (ME), ditiotreitol (DTT) y EDTA sobre la actividad hemoaglutinante de la lectina de *L. muta.* Se realizó diluciones seriadas de los agentes en placas de microtitulación: EDTA (0,75 - 2 mM), (ME) y DTT (0,75 – 10 mM). Se reemplazó la solución TCS (Tris 0,01M, $CaCl_2$ 2 mM, NaCl 0,5M) por solución TS (Tris 0,01 M, NaCl 0,5 M pH 7,3) en los ensayos que contenían EDTA. La lectina más el agente respectivo fueron incubados por 20 minutos a 37 ºC e inmediatamente se añadió glóbulos rojos al 3%.

Efecto de agentes químicos

De manera similar a la descrita para los agentes reductores, se realizó diluciones de iodoacetato y glutatión (0,75 – 10 mM). Enfrentándolas contra 1 µg de lectina por 20 minutos a 37 ºC.

Efecto de iones divalentes

Se preparó mezclas que contenían EDTA (0,125, 0,250 y 0,5 mM), iones divalentes bajo la forma de cloruros (0,05 – 1,5 mM) y lectina (1 µg). Se halló la concentración mínima (CMR) de cada ion capaz de reconstituir la AH anulada por EDTA.

RESULTADOS Y DISCUSION

Purificación de la lectina y peso molecular

Al fraccionar el veneno de *L. muta* en DEAE-Sephadex A-50, se obtuvo dos picos principales de proteína, eluídos isocráticamente, lo que representó el 55,2% de la proteína total. Luego de aplicar NaCl 0,3 M, eluyeron dos picos adicionales que representaron el 44,8 %. La lectina correspondió al último pico obtenido en este paso (figura 1).

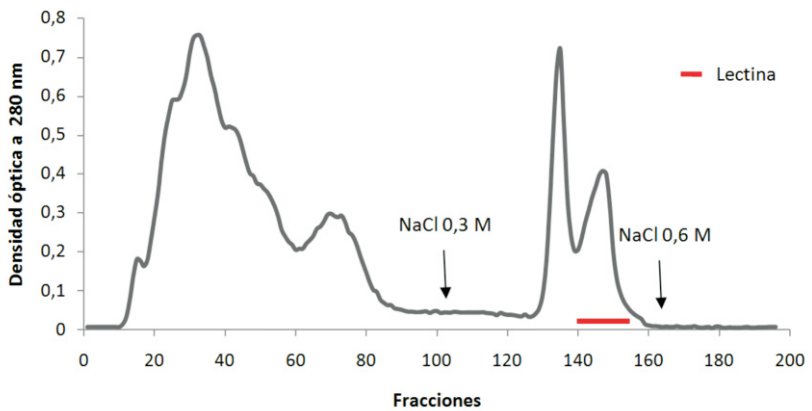


Figura 1: Purificación de la lectina de *Lachesis muta* en DEAE-Sephadex A-50 utilizando buffer acetato de amonio 0,1 M pH 5,0 a un flujo de 10 mL/hora. Se colectaron fracciones de 1 mL.

La actividad hemoaglutinante aumentó de 27,1 para la muestra inicial de veneno a 97,8 para la lectina purificada, lo que equivale a una purificación de 3,6 veces (tabla 1).Los títulos fueron: 1056 para el veneno y 64 para la lectina purificada (figura 2 , tabla 1). Con esta metodología se recuperó 1,74 mg de lectina purificada que representa el 3,50%

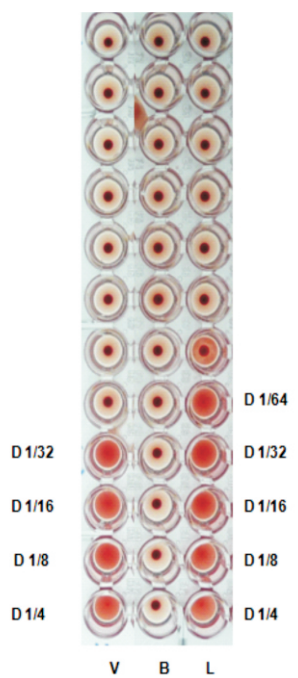


Figura 2: Actividad hemoaglutinante de la lectina de *L. muta*. El veneno se trabajó a partir de una dilución 1/33 y la muestra de lectina corresponde al último pico del perfil cromatográfico. El título del veneno es 1056 (32x33). V: veneno, B: blancos, L: lectina.

Tabla 1: Cuadro de purificación de la lectina de *Lachesis muta* utilizando DEAE-Sephadex A-50.

Paso	Proteína		Volumen	Título	Unidades Totales de actividad	AE	Purificación
	Mg	%					
Veneno	50	100	1,35	1056	1425,6	27,1	1
DEAE-Sephadex A50	1,74	3,48	2,66	64	170,2	97,8	3,6

Título: Recíproco de la última dilución que exhibe una hemoaglutinación completa.
Unidades totales de actividad: Volumen total x Título. AE: Unid. Tot. de actividad/ mg proteína.

El presente trabajo es el primer reporte para el país sobre la detección y purificación de una lectina contenida en el veneno de *Lachesis muta.*

Al analizar la lectina por PAGE-SDS, se encontró una única banda proteica tanto en condiciones reductoras y no reductoras . En cuanto al peso molecular, corresponde a 14,3 kDa en condiciones reductoras y 27,5 kDa en condiciones no reductoras.

En 1980, Gartner *et al* [17], aislaron una proteína del veneno de *Bothrops atrox* capaz de aglutinar glóbulos rojos de diferentes orígenes. Ellos la denominaron trombolectina, proteína clasificada dentro de la gran familia de lectinas debido a que su actividad aglutinante se inhibía en presencia de carbohidratos. Luego de este primer reporte, se han purificado y caracterizado varias lectinas a partir de venenos de vipéridos, crotálidos y elápidos [5].

En el presente trabajo, se ha purificado una lectina a partir de veneno liofilizado de *Lachesis muta*. Se trata de una proteína ácida, capaz de adherirse al DEAE-Sephadex A-50 y con un punto isoeléctrico menor a 5. Estos resultados son comparables a los obtenidos para la lectina de *Lachesis muta* aislada a partir de un veneno comercial.

Las lectinas tipo C verdaderas de venenos de serpientes, suelen purificarse empleando columnas de cromatografía de afinidad que contengan lactosa o galactosa como grupo de unión[9,11,12]; sin embargo, en esta investigación se ha logrado la purificación de una lectina verdadera empleando DEAE-Sephadex A-50 y eluyendo la proteína atrapada en el sistema con una solución de NaCl 0,3M. Hasta la fecha, ninguna lectina ofídica había sido purificada al estado homogéneo, mediante un solo paso cromatográfico; ya que más bien este tipo de metodología es común al trabajar con lectinas vegetales; tal es el caso de la lectina aislada mediante una columna de DEAE-Sephadex a partir de semillas de *Eugenia uniflora L.*[18].

La lectina de *Lachesis muta* aislada en la presente investigación, es un homodímero de 27,5 kDa donde cada subunidad presenta un peso de 14,3 kDa. Los monómeros se disociaron en presencia del agente reductor 2-mercaptoetanol lo que sugiere la presencia de al menos un puente disulfuro intercatenario. Este comportamiento es usual en las lectinas ofídicas estando los pesos en su forma dimérica entre 28 kDa, como la trombolectina [17], y 32 kDa, como la

lectina de *Bothrops insularis* [19]. A pesar de que las lectinas tipo C verdaderas suelen ser diméricas, la estructura cristalográfica de la lectina de *Crotalus atrox* (RSL) muestra una estructura decamérica, con dos pentámeros arreglados simétricamente[20].

Efecto de mono y disacáridos en la actividad hemoaglutinante

Al evaluar el efecto de carbohidratos sobre la actividad hemoaglutinante de la lectina en estudio se encontró que cinco de los carbohidratos probados (lactosa, galactosa, arabinosa, sacarosa y glucosa) son capaces de inhibir la hemoaglutinación y por ende son reconocidos por la lectina. En cambio, no se observó efecto alguno en los ensayos con maltosa, manosa y fructosa, empleando concentraciones de hasta 200 mM (tabla 2).

Tabla 2: Inhibición de la actividad hemoaglutinante por carbohidratos

Carbohidrato	CMI *
Lactosa	1,56
D-(+)-Galactosa	3,13
L (+) Arabinosa	8,33
Sacarosa	50
D-(+)-Glucosa	100
Maltosa	NI
D-Manosa	NI
D-(-)-Fructosa	NI

* Concentración mínima inhibitoria (mM): dilución donde se deja de observar una hemoaglutinación completa.

NI: No se encontró inhibición.

Las lectinas tipo C verdaderas son capaces de reconocer carbohidratos y se les considera calcio dependientes por presentar un dominio conservado para el ion[9]. Poseen un peso molecular de 30 kDa en promedio y está formada por dos subunidades idénticas unidas por un puente disulfuro. Cada una de estas subunidades presenta un dominio de reconocimiento de carbohidrato CRD, de aproximadamente 115-120 aminoácidos con 32 posiciones conservadas distribuidas a intervalos fijos, sobresaliendo cuatro cisteínas que forman dos puentes disulfuros intracatenarios.

Los experimentos presentados, en esta investigación muestran que la lactosa, a una concentración de 1,56 mM, es capaz de inhibir totalmente la actividad hemoaglutinante y si comparamos este efecto con el de la sacarosa, esta última sólo produce este efecto inhibidor a la concentración de 50 mm. Nótese que los valores de inhibición producida por la galactosa (3,1 mM) y la glucosa (100 mM) -que son los componentes de la lactosa- son distantes entre sí y el que más se acerca a la lactosa es el de la galactosa, por lo que puede deducirse que este monosacárido juega el rol más importante en la inhibición al integrarse en la molécula de la lactosa. En cambio, el otro disacárido estudiado, maltosa, no causa ningún efecto en la actividad hemoaglutinante.

A pesar de que la lectina en estudio puede reconocer más de un carbohidrato, exhibe mayor afinidad por la lactosa. El reconocimiento de carbohidratos recaería en los residuos de aminoácidos específicos dentro del CRD; por ejemplo, cuando la triada Glu^{185}-Pro^{186}-Asn^{187} (EPN) ubicada en la lectina de unión a la manosa de la rata es reemplazada por Gln^{185}-Pro^{186}-Asp^{187} (QPD), la proteína cambia su preferencia por manosa y se convierte en una proteína que une galactosa[21]. Este experimento es concordante con lo encontrado en las secuencias de lectinas tipo C de venenos ofídicos, donde la triada QPD se relaciona con proteínas que reconocen la galactosa.

Efecto de quelantes, iones divalentes y otros agentes químicos

La AH causada por 1 µg de la lectina de *L. muta* es fuertemente inhibida por el EDTA, ME y DTT (tabla 3). El rango de EDTA capaz de inhibir completamente la AH es 0,125 - 0,5 mM. El ME causó inhibición desde 2,5 a 10 mM; mientras que el DTT inhibe la AH a concentraciones menores a 0,75 mM. Por otro lado, agentes como yodoacetato y glutation tuvieron un efecto negativo sobre los glóbulos rojos humanos a las concentraciones de 5 y 10 mM. Concentraciones inferiores no mostraron efecto alguno sobre la AH.

Tabla 3: Inhibición de la actividad hemoaglutinante por agentes reductores y quelantes.

AGENTE	Inhibición
EDTA	0,125 mM - 0,5 mM
2-ME	2,5 mM - 10 mM
DTT	0,75 mM - 10 mM

Los ensayos para reconstituir la AH inhibida por EDTA mostraron que los iones calcio, magnesio y manganeso son capaces de reconstituir dicha actividad con valores diferentes de CMR (tabla 4).El menor valor para reconstituir la actividad hemoaglutinante se obtuvo con el ion calcio (0,1 mM) mientras que con manganeso se requirió 1 mM para restablecer la HA.

Tabla 4: Comparación de la reconstitución de la actividad hemoaglutinante causada por calcio, magnesio y manganeso.

ION	CMR*
Calcio	0,1mM
Magnesio	0,5mM
Manganeso	1mM

* Concentración mínima para reconstituir la hemoaglutinación completa en pocillos que contenían EDTA 0,125; 0,25 y 0,5 mM.

La actividad hemoaglutinante de la proteína purificada fue inhibida por EDTA,DTT y ME; así como por cinco carbohidratos diferentes. Además, la AH previamente anulada por EDTA fue reconstituida por los iones calcio, magnesio y manganeso. Estos resultados muestran una dependencia de iones divalentes, especialmente calcio, para el reconocimiento del carbohidrato involucrado en la actividad hemoaglutinante.

Como ya se ha mencionado, las lectinas tipo C verdaderas tienen como característica resaltante el ser dependientes de iones calcio; he aquí el origen de la "C" que llevan en su nominación. Por muchos años los experimentos se limitaron a probar la reconstitución de la actividad hemoaglutinante por iones calcio, sin evaluar ningún otro ion divalente. Sin embargo, la actividad hemoaglutinante de la lectina de *Bothrops jararacussu* es reconstituida no sólo en presencia de iones calcio, sino también al emplear magnesio y manganeso[11]. Esta situación es idéntica a la encontrada para la lectina de *Lachesis muta* en esta investigación, siendo por tanto estas dos lectinas capaces de actuar en presencia de otros iones que no sean calcio.

Respecto a este punto, sería interesante realizar estudios cristalográficos con lectinas en presencia de iones divalentes diferentes a calcio para entender lo que sucede en estos nuevos escenarios.

CONCLUSIONES

- Los resultados de este trabajo muestran en primer lugar, la presencia de proteínas no enzimáticas como la lectina tipo C purificada, la cual es una proteína ácida, homodimérica, dependiente de calcio y con un peso molecular de 27,5 kDa en condiciones no reductoras. La lactosa es el principal disacárido inhibidor de la AH y por tanto el de mayor afinidad por el sitio de reconocimiento de la lectina. Su dependencia de calcio fue establecida usando agentes quelantes y su reconstitución por este ion divalente, mostrándose, además, que otros iones como magnesio y manganeso son capaces de restablecer la actividad a concentraciones mayores.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Consejo Superior de Investigaciones (CSI) del Vicerrectorado de Investigación (VRI) de la UNMSM por el apoyo financiero brindado. Uno de los autores (Palomino, M.) obtuvo su Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga con parte de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Meneses O. Los animales venenosos y sus peligros. Lima-Perú: Instituto de Salud Pública 1974; (2):3-4
2. Zavaleta A. Mordedura de serpiente (ofidismo): Un problema de salud en el Perú. *Rev Med Hered* 2004;15(2):61-63
3. Yarlequé A. Las serpientes peruanas y sus venenos. Lima Perú: Fondo Editorial UNMSM; 2000.
4. Hurtado L, Lerma R, Rodríguez E, Yarlequé A. Aislamiento y algunas propiedades bioquímicas de una hialuronato glicanohidrolasa del veneno de la serpiente Lachesis muta "Shushupe". *Rev Soc Quim Perú 2007*; 73 (4): 226-234.
5. Aragón-Ortiz F, Brenes-Brenes JR, Gubensek F. Characterization of a lectin-like protein isolated from *Lachesis muta* snake venom. *Rev Biol Trop* 1989; 37(1): 79-83.
6. Aragón-Ortiz F, Mentele R, Auerswald EA. Amino acid sequence of a lectin-like protein from *Lachesis muta stenophyrs* venom. *Toxicon* 1996; 34(7):763-769.

7. Gartner TK, Ogilvie ML. Isolation and characterization of three Ca^{2+} dependent beta-galactoside specific lectins from snake venoms. *Biochem J.* 1984; 224:301-307.
8. Gómez Leiva MA, Aragón-Ortiz F. Purification and some properties of a hemagglutinating protein mutina from bushmaster *Lachesis muta* snake venom. *Rev Biol Trop* 1986; 34(1): 49-53
9. Drickamer K. Two Distinct Classes of Carbohydrate-recognition Domains in Animal Lectins. *J Biol Chem* 1988; 263: 9557-9560.
10. Lu Q, Navdaev A, Clemetson JM, Clemetson KJ. Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationships and effects on haemostasis. *Toxicon* 2005; 45: 1089-1098.
11. Carvalho DD, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC. Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *IUBMB* Life 1998; 44: 933–938.
12. Lomonte B, Rojas G, Gutierrez JM, Ramirez G. Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake Bothrops godmani (Godmann's pit viper). *Toxicon* 1990; 28; 75-81.
13. Nunes ED, de Souza MA, Vaz AF, Santana GM, Gomes FS, Coelho LC. et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from Bothrops leucurus snake venom. *Comp Biochem Physiol* B 2011; 159: 57-63.
14. Loayza S, Morante Y, Campos S, Yarlequé A. Enzimas proteolíticas en el veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta* y *Bothrops atrox*. *Rev Soc Quím Perú* 1985; 52(3):151-163.
15. Ogilvie ML, Gartner TK. Identification of lectins in snake venoms. *J Herpetol 1984; 18 (3): 285-290.*
16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-685.
17. Gartner TK, Stocker K, Williams DC. Thrombolectin: a lectin isolated from Bothrops atrox venom. *FEBS Lett* 1980; 117: 13-16.
18. Oliveira MD, Andrade CA, Santos-Magalhães NS, Coelho LC, Teixeira JA, Carneiro-da-Cunha MG. et al. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Lett Appl Microbiol* 2008; 46(3):371-376.
19. Guimarães-Gomes V, Oliveira-Carvalho AL, Junqueira-de-Azevedo IL, S Dutra DL, Pujol-Luz M, Castro HC. et al. Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. *Arch Biochem Biophys* 2004; 432(1):1-11.
20. Walker JR, Nagar B, Young NM, Hirama T, Rini JM. X-ray crystal structure of a galactose-specific C-type lectin possessing a novel decameric quaternary structure. *Biochemistry* 2004; 43(13):3783-92.
21. Drickamer K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. *Nature* 1992; 360(6400):183-6.

Recibido el 18-06-2012
Aprobado el 25-07-2012

PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA POR LOS MÉTODOS SOL-GEL Y PRECIPITACIÓN: ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ESTRUCTURA

Gino Picasso[a*], Jaime Vega[a], Rosario Uzuriaga[a], Gean Pieer Ruiz[a]

RESUMEN

En este trabajo se ha preparado muestras nanoparticuladas basadas en magnetita por los métodos sol-gel y precipitación. En el primer caso se aplicaron 2 variantes: por crecimiento del sol a partir de precursor nitrato y etilenglicol como disolvente y agente reductor y por hidrólisis forzada y control estérico a partir de precursor sulfato y citrato de sodio. En el segundo caso se ha empleado como precursor sulfato de hierro, hidróxido de amonio como agente precipitante y etilenglicol como surfactante. Las muestras se han caracterizado mediante las técnicas de difracción de rayos X (XRD), adsorción-desorción de N_2 (método BET) y espectroscopía Mössbauer. Los resultados de los difractogramas XRD indicaron la formación mayoritaria de la especie magnetita que se evidenció por la presencia de los picos característicos en las siguientes posiciones: 30,06 º, 35,42 º; 62,55 º. El valor del área superficial promedio medida por la técnica BET de las muestras de magnetita fue entre 40 a 50 m^2/g con una isoterma tipo IV correspondiente a una superficie mesoporosa. El espectro Mössbauer de la muestra de magnetita obtenido por sol-gel y realizado a temperatura ambiente detectó la presencia de 2 sextetos conformados por 2 sitios: uno octaédrico (Fe^{2+}, Fe^{3+}) y otro tetraédrico (Fe^{3+}). El tamaño de grano de las muestras de magnetita se estimó a partir del tamaño de la cristalita según la ecuación de Scherrer y de la superficie específica, obteniéndose un diámetro medio en el rango de 2 a 20 nm.

Palabras clave: Nanopartículas de magnetita, sol-gel, precipitación

SYNTHESIS OF NANOPARTICLES OF MAGNETITE BY SOL-GEL AND PRECIPITATION METHODS: STUDY OF CHEMICAL COMPOSITION AND STRUCTURE

ABSTRACT

In this work, nanoparticles based on magnetite have been prepared by sol-gel and precipitation methods. In the first case two variants have been applied: by growing of sol starting from nitrate precursor and ethylene glycol as dissolvent and to control the reduction process and force hydrolysis and steric control prepared from ferrum sulfate precursor and sodium citrate. In the second case the starting material was sulfate precursor, amonium hydroxide as precipitaing agent and ethylene glycol as surfactant. The samples have been characterized by X-ray diffraction technique (XRD), adsorption-desorption of N_2 (BET equation model) and Mössbauer spectroscopy. XRD patterns of all samples showed typical peaks of magnetite which were detected in the following positions: 30,06 º, 35,42 º, 62,55 º. Average specific surface quantified by BET method was ranging from 40 to 50 m^2/g with

[a*] Laboratorio de Investigación de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Rímac, Lima- Perú. e-mail: gpicasso@uni.edu.pe

isotherm type IV corresponding to mesoporous surface. Mössbauer spectra of sample prepared from sol-gel (gel growing) carried out at home temperature detected the presence of 2 sextets consisting in 2 type of sites: first one due to octaedric positions (Fe^{2+}, Fe^{3+}) and the second one due to tetraedric positions (Fe^{3+}). Grain size of magnetite samples, evaluated by Scherrer equation and specific surface area, was ranging from 2 to 20 nm.

Key words: Nanoparticles of magnetite, sol-gel, precipitation

INTRODUCCIÓN

La magnetita (Fe_3O_4) en forma nanoparticulada ha encontrado diversas aplicaciones en el campo de la biomedicina: en fenómenos como la hipertermia y el transporte selectivo de fármacos, ambos de prometedor futuro en la terapia del cáncer, en el mejoramiento por contraste de las imágenes por resonancia magnética, en la reparación de tejidos, como portador de drogas, en la separación celular, en la reducción de la toxicidad de los fluidos biológicos, entre otros[1-5]. Diversos óxidos nanoestructurados basados en magnetita han resultado ser buenos dispositivos para la manufactura de materiales magnéticos, películas de protección sensibles, catalizadores, pigmentos. De manera particular, la magnetita ha sido usada en aplicaciones biomédicas como un trazador para la reparación de tejidos, para el mejoramiento de las propiedades de fármacos, detección temprana de algunos carcinomas, entre otros[6-8].

Por otro lado, diferentes sistemas electroquímicos se han usado en la determinación de trifenilos y derivados, por ejemplo electrodos químicamente modificados con fibras de carbón, usando también electrodos de oro soportado en complejos de fullerenos así como fibra de vidrio y pasta de carbono[9-11]. Sin embargo, muchas de estas tecnologías son poco accesibles y bastante costosas para su aplicación en gran escala. El uso de sensores más simples basados en polímeros impresos depositados sobre magnetita e incorporados con pasta de carbón podría modificar sustancialmente la detección de colorantes en especial el trifenilmetano, para su posterior degradación.

La investigación de la magnetita nanoparticulada como componente principal de sensores y su interacción con polímeros de impresión molecular (MIP's) para la detección de colorantes es interesante desde el punto de vista ambiental[12-15]. La aplicación de polímeros sintéticos altamente estables, como los MIP's, en la detección de colorantes, incrementa sustancialmente la selectividad de los sensores químicos por las propiedades de reconocimiento molecular selectivo; ello es debido a que los sitios de reconocimiento dentro de la matriz del polímero son complementarios al analito en la forma y posición de los grupos funcionales[16]. Algunos de estos polímeros tienen altas selectividades y constantes de afinidad, comparables con los sistemas de reconocimiento que ocurren naturalmente, tales como anticuerpos monoclonales o receptores. La impresión molecular es un método poderoso para preparar sitios de reconocimiento sintético con selectividad predeterminada para varias sustancias como compuestos trifenilmetanos muy aplicados en la industria textil como precursor de tintes y esmaltes para el teñido de algodón, seda y otras fibras[17, 18].

En los últimos años se han empleado diversos métodos de preparación de la magnetita como sol-gel, precipitación, spry pirólisis considerando algunos parámetros experimentales como la temperatura de reacción, concentración inicial de los reactivos, tiempos de residencia, velocidad de agitación, pH de la solución, tipo de surfactante, entre otras[12-14]. En particular, el efecto de la presión en la síntesis de las nanopartículas ha sido objeto de estudio por el método de coprecipitación[15].

El interés de este trabajo se centra en la preparación de nanopartículas de magnetita como soporte de MIP's para aplicaciones como sensor de colorantes y para aplicaciones biomédicas en la detección temprana de algunas enfermedades. En este primer avance se presenta la preparación de la magnetita por el método sol-gel y precipitación, usando diferentes precursores. La relación de las variables de preparación con las características estructurales de la magnetita obtenida es el objetivo principal de este trabajo.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales de partida

Los materiales de partida fueron los siguientes:

1.- nitrato de hierro III, $Fe(NO_3)_3.9H_2O$ (99% pureza Merck, pf=404,00 g/mol).
2.- etilenglicol, $OHCH_2CH_2OH$ (99,5% pureza Merck, pf=62,082 g/mol).
3.- sulfato de hierro (II), $Fe(SO_4).4H_2O$ (97% pureza Merck, pf=224 g/mol).
4.- sulfato de hierro (II), $Fe(SO_4).7H_2O$ (91% pureza Merck, pf=278 g/mol).
5.- hidróxido de amonio, NH_4OH (80% pureza Merck, pf=35 g/mol).
6.- ácido oleico, $C_{18}H_{34}O_2$ (99% pureza Merck, pf=282 g/mol).
7.- citrato de sodio, $C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$ (Merck, pf=294,10 g/mol).
8.- hidróxido de sódio, NaOH (Merck, pf=40,01 g/mol).
9.- nitrato de sódio (Merck, pf=84,99 g/mol).
10.- nitrato de potasio KNO_3 (Merck, pf=110,11 g/mol).

En este trabajo se ha sintetizado la magnetita por dos métodos: sol-gel y precipitación. En el método sol-gel la magnetita se forma a partir de un sol de metal para luego formar el gel por crecimiento controlado del tamaño de partícula, seguimiento del pH, estabilización del tamaño de partícula, entre otros factores. Se puede partir de soluciones de Fe^{2+} o de Fe^{3+}. Para obtener la magnetita, la oxidación del Fe^{2+} o la reducción del Fe^{3+} debe ser un proceso controlado para obtener la relación molar apropiada de Fe^{2+}/Fe^{3+} en la espinela inversa. En el método de preciptación, la magnetita se forma a través de la formación de sales de oxo-hidróxido de hierro mediante la agregación lenta y controlada de iones HO^- a partir de un agente precipitante. A continuación se describe de manera detallada los procedimientos empleados para la preparación de la magnetita por el método sol-gel [19-22] y por precipitación[23-24].

Preparación de la magnetita por sol-gel

Por crecimiento del sol

El precursor metálico usado para la preparación de las nanopartículas de óxido de hierro fue nitrato de hierro III, $Fe(NO_3)_3.9H_2O$. Se disolvió 14 g de $Fe(NO_3)_3.9H_2O$ en 55g de etilenglicol, empleado como disolvente y agente reductor[21]. El sol resultante se calentó a 80ºC por 2 horas en atmosfera inerte (flujo de N_2) bajo agitación continua. Al finalizar este proceso, el sol formado se calentó a 110ºC hasta la evaporación total del líquido y el secado total del gel. Una vez obtenido el sol seco, se calcinó a una temperatura a 300ºC bajo atmósfera inerte por 2 horas para mantener la presencia del Fe^{2+} en la espinela. Se dejó enfriar durante 2 h en el recipiente manteniendo el ambiente inerte.

Por hidrólisis forzada

El precursor metálico empleado para la preparación de las nanopartículas de óxido de hierro fue sulfato de hierro II, $FeSO_4.7H_2O$. Se disolvió 0,91 g de KNO_3 (usado como oxidante

intermedio) y 0,26 g de NaOH (usado como agente precipitante) en 90ml de agua destilada en un balón de tres bocas y se mezcló con una solución de Fe^{2+} que se formó a partir de la mezcla de 0,21 g de $FeSO_4.7H_2O$ en 10ml 0,01M H_2SO_4 en atmósfera inerte para obtener una oxidación controlada; esta mezcla se agitó durante 2 horas[19]. Luego se calentó a 90ºC sin agitación por 24h para después dejarlo envejecer por 24h más. Después del envejecimiento se ha formado la espinela sólida que se dejó enfriar en baño de hielo, acelerando la separación. Finalmente, el precipitado se separó del líquido con un imán por decantación. El sólido obtenido fue lavado tres veces en un baño de agua por ultrasonido y se dejó secar a 60ºC por tres días.

Por control estérico

El precursor metálico empleado para la preparación de las nanopartículas de óxido de hierro fue sulfato de hierro II ($FeSO_4.7H_2O$). Se disolvió 0,29 g de citrato de sodio $C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$ (usado como surfactante), 0,16 g de NaOH (agente precipitante) y 17 g de $NaNO_3$ (controlante de la fuerza iónica) en 19ml agua destilada; la mezcla se calentó a 100ºC hasta formar una solución translúcida y se mezcló con 1 ml de solución 0,1M $FeSO_4.7H_2O$; la solución obtenida fue calentada a 100ºC por 1h[20]. Se enfrió luego a temperatura ambiente, se separó el sólido obtenido con un imán y se decantó. Finalmente se redisolvió varias veces en agua destilada por ultrasonido y se dejó secar a 60ºC por tres días.

Se repitió el proceso variando la concentración del precursor $FeSO_4.7H_2O$ para 0,05M y 0,2M para observar el efecto de la concentración inicial del precursor y el tamaño de partícula en las propiedades magnéticas como se ha comprobado en la literatura[22].

Preparación de la magnetita por precipitación

Los precursores metálicos usados para la preparación de las nanopartículas de óxido de hierro fue $Fe_2(SO_4)_3.5H_2O$ y $Fe(SO_4).7H_2O$. La preparación de las nanopartículas por el método de precipitación consiste básicamente en la precipitación a partir de sulfato de Fe (II) y sulfato de hierro (III) usando NH_4OH (100ml) como agente precipitante en constante agitación durante 1h a 90°[23-24]. Luego se lavó el precipitado y se secó a temperatura ambiental. Posteriormente se añadió 100 ml de ácido oleico (usado como primer surfactante) a una temperatura de 80°C durante 2 horas. Se procedió luego a lavar y secar por 1 día a temperatura ambiental. Se añadió finalmente 30 ml de etilenglicol (usado como segundo surfactante) gota a gota y 30 ml de H_2O destilada[23]. Se dejó envejecer por 1 día a temperatura ambiental para luego lavar el precipitado con agua destilada, secarlo o a 90 ºC y calcinarlo a 200 ºC durante 1 h.

El uso de hidróxido de amonio como agente precipitante fue debido a que presenta una solubilidad elevada e implica condiciones de alcalinidad (pH > 11) por la formación de OH^- :

$$NH_3 + H_2O \text{ ----------> } NH_4^+ + OH^-$$

Esta base genera los iones OH^- de una manera lenta ($Kd=1,8.10^{-5}$) permitiendo obtener una nucleación homogénea con la formación de los oxo-hidróxido de hierro, evitando la agregación de cúmulos desordenados y, por tanto, controlando la velocidad de reacción.

Las condiciones de preparación de las muestras de magnetita se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Lista de muestras basadas en nanopartículas de magnetita preparadas en este trabajo

Muestra	Precursor[1]	Tiempo de envejecimiento (h)/ método de preparación[2]	Tratamiento térmico (°C), $d_{cristalita}$ (nm)
VG-1	$Fe(NO_3)_3.9H_2O$ 14 g en 55 g EG	42 s-g (crec.sol)	300 por 2 h, 20,6
VG-2	$Fe(NO_3)_3.9H_2O$ 14 g en 55 g EG	30 s-g (crec.sol)	80 por 2 h
VG-3	$Fe(NO_3)_3.9H_2O$ 14 g en 55 g EG	28 s-g (crec.sol)	300 por 2 h, 15,9
JP-1	$FeSO_4.7H_2O$ Solución 0,1M	24 s-g (hid.for.)	90 por 24 h, 13,5
JP-2	$FeSO_4.7H_2O$ Solución 0,1M	24 s-g (con.es.)	100 por 1 h, 1,9
JP-3	$FeSO_4.7H_2O$ Solución 0,05M	24 s-g (con.es.)	100 por 1 h, 3,3
JP-4	$FeSO_4.7H_2O$ Solución 0,2M	24 s-g (con.es.)	100 por 1 h
CU-1	$FeSO_4.7H_2O$ $Fe_2(SO_4)_3.5H_2O$ Ac. oleico y EG	90 pr	200 por 1 h, 14,2
CU-2	$FeSO_4.7H_2O$ $Fe_2(SO_4)_3.5H_2O$	90 pr	90 por 1 h, 14,9
CU-3	$FeSO_4.7H_2O$ $Fe_2(SO_4)_3.5H_2O$ Ac. oleico	80 pr	200 por 1 h, 14,3

[1] EG: etilenglicol,

[2] **s-g:** sol-gel, **crec.sol.:** crecimiento del sol, **hid.for.:** hidrólisis forzada, **con.es.:** control estérico, **pr:** precipitación, **$d_{cristalita}$(nm):** diámetro de la cristalita en nm. Se utilizó solución amoniacal como agente precipitante

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización

Análisis por difracción de rayos X (XRD)

Para la identificación cristalográfica de las muestras se utilizó la técnica de difracción de rayos X (XRD). El equipo utilizado fue un difractómetro RIGAKU Modelo Miniflex, con tubo de cobre y filtro de níquel, con 30 kV y 15 mA. El equipo está provisto de un ánodo rotatorio. Se usó un monocromador de grafito con el objeto de seleccionar la radiación CuK del ánodo de cobre y se ha trabajado con ángulos de barrido entre 5 y 100º a una velocidad de 0,04 º/s.

El tamaño medio de los granos cristalinos fue calculado a partir del análisis de los picos de difracción más intensos mediante la ecuación de Debye-Scherrer:

$$d = \frac{k\lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \qquad (1)$$

Donde **d** es el tamaño medio de grano cristalino o cristalita (Å), λ es la longitud de onda de la radiación incidente CuK_α igual a 1,5418 Å, **k** es una constante que toma el valor de 0,9 (previamente calibrada en el equipo a partir de muestras patrón de tamaño de grano conocido), β es la anchura del pico a la mitad de su intensidad máxima (en radianes) y θ es el ángulo de difracción para dicha intensidad.

En general, las muestras sintetizadas han mostrado mayoritariamente los picos característicos de la espinela inversa del Fe_3O_4 en las posiciones angulares: 30,06 º, 35,42 º; 62,55 º (JCPDS – Internacional Centre for Diffraction Data Nº 33-0664) como se observa en la figura 1. La temperatura de calcinación no ha afectado sustancialmente la cristalinidad en las dos series de muestras y la definición de la fase magnetita se ha obtenido a bajas temperaturas: 50-90 ºC durante la etapa del envejecimiento y secado. Esto también ha sido observado en otros trabajos[3, 24]. A la temperatura de 80 ºC (muestra VG2) se observa, además de los picos característicos a la magnetita, la presencia de un pico a 33º que puede atribuirse a la fase α-hematita, pero a medida que aumenta la temperatura, los picos son más definidos como se aprecia al comparar las muestras VG2 y VG3; la primera tratada a 80 ºC por 2 h y la segunda a 300ºC por 2 h y las muestras CU1 y CU2, la primera calcinada a 200 ºC por 2 h y la segunda a 90ºC por 1 h.

La influencia del método de preparación en la cristalinidad ha sido importante como se observa en la figura 2 al comparar las muestras de la serie CU, VG con los de la serie JP; esta última realizada por el método sol-gel, control estérico, usando citrato de sodio como estabilizante que ha permitido la formación de granos más pequeños: 1,9 nm para JP2 y 3,3 nm para JP3. En las muestras de la serie JP, el tratamiento térmico a 100 ºC, partiendo de Fe^{2+}, ha permitido la oxidación parcial a Fe^{3+} para formar la espinela inversa, además de controlar la velocidad de los procesos de nucleación. La adsorción de los polímeros estabilizantes en los sitios de crecimiento ha permitido controlar el crecimiento de tamaño de partícula.

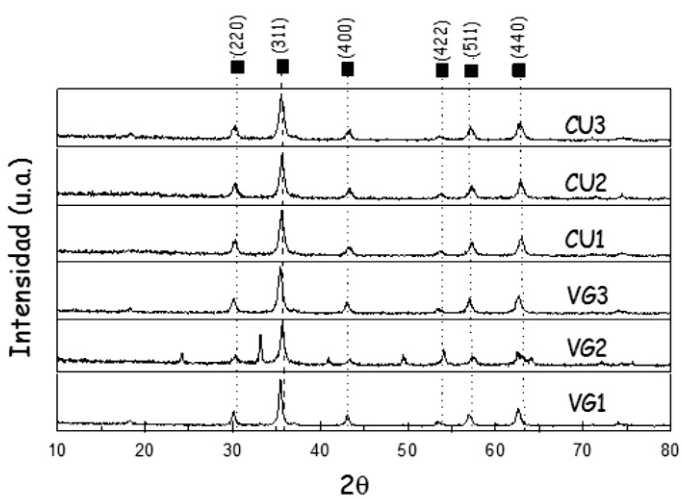


Figura. 1. Efecto de la temperatura de calcinación en los difractogramas de las muestras basadas en magnetita

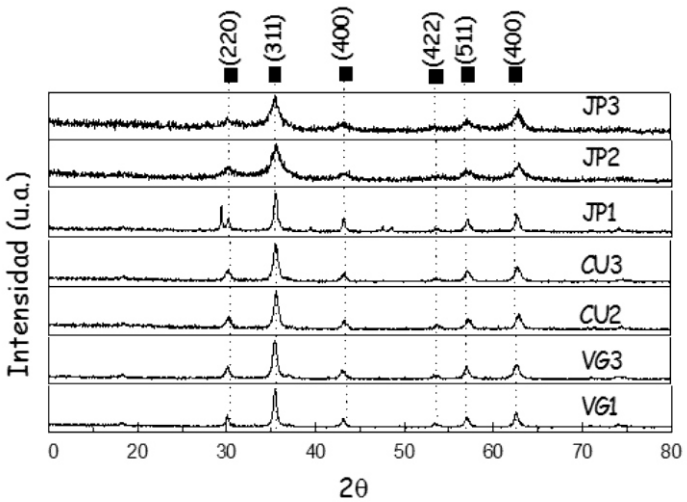


Figura. 2. Efecto del método de preparación en los difractogramas de las muestras basadas en magnetita

Análisis por adsorción-desorción de N_2 (superficie BET)

Para la medición de la superficie específica y tamaño de poro se usó el equipo Micromeritics GEMINI-VII serie t del Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias (UNI), que permite el registro de la isoterma de adsorción en todo el rango de presiones parciales P/P_0. Se utilizó N_2 como gas de análisis (gas N_2, 99% AGA) y nitrógeno líquido (PRAXAIR) con punto de ebullición a -195,79 °C como refrigerante para la condensación del N_2. El área BET se calculó en el rango de presiones P/Ps entre < 0,05 a 0,33> correspondiente a la adsorción de una monocapa. Los puntos de equilibrio se midieron siguiendo el programa GAS MICROMERITICS con un total de 50 puntos y con un tiempo de equilibrio en cada punto de 7 s. Previo a la adsorción, las muestras fueron desgasificadas al vacío durante 2 h a 250 °C con el propósito de eliminar el agua y las impurezas superficiales. A partir del valor de la superficie BET, se ha calculado de manera aproximada el tamaño medio de las nanopartículas como lo sugiere el trabajo de Murbe et al.[3], mediante la siguiente expresión: $d_{BET} = 6000/\rho A_s$ donde: A_s es la superficie total específica (m^2/g) y ρ es la densidad de la magnetita igual a 5,072 (g/cm^3).

En la figura 3 se pueden observar las isotermas correspondientes a las muestras VG1, VG3 y CU2; las dos primeras preparadas por sol-gel (crecimiento del sol) y la segunda, por precipitación y en la tabla 2 los valores correspondientes de la superficie específica. De acuerdo al perfil de las isotermas, todas corresponden al tipo IV según la clasificación IUPAC con presencia de histéresis y que describen a un sólido mesoporoso. Las muestras VG1 y VG3 presentan poros de tipo laminar mientras que para la muestra CU2 un tipo cuello de botella considerando la mayor histéresis observada. La magnetita preparada por todos los métodos ha presentado un diámetro medio entre 17 y 30 nm con menor tamaño relativo para la muestra preparada por precipitación, probablemente debido a la acción antiaglomerante del etilenglicol.

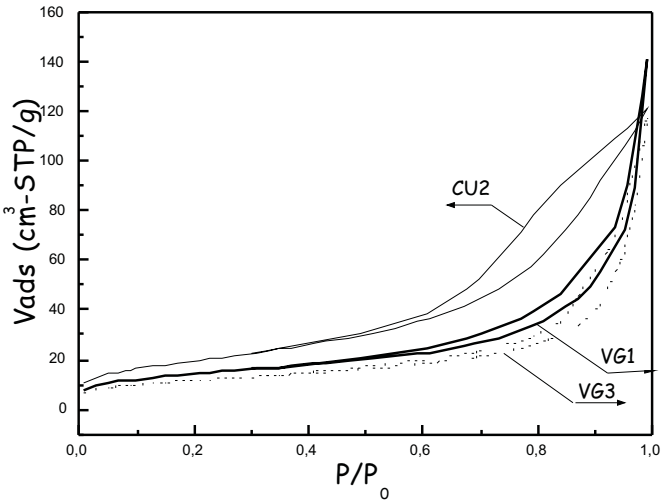


Figura. 3. Influencia del método de preparación en la magnitud de la superficie BET y forma de la isoterma de adsorción

Tabla 2. Lista de las magnitudes de la superficie total, de la superficie mesoporosa y del diámetro medio (d_{BET}) de las muestras VG1, VG3 y CU2

Muestra	**Método preparación**	**S_{meso} (m^2/g)**	**S_{total} (m^2/g)**	**d_{BET} (nm)**
VG1	sol-gel	49,2	49,5	23,9
VG3	sol-gel	40,1	40,4	29,3
CU2	precipitación	70	70,2	17,1

Espectroscopía Mössbauer

Para el análisis por espectroscopía Mössbauer se contó con el servicio de espectroscopía Mössbauer de la Facultad de Ciencias Físicas de la UNMSM. Se usó la técnica convencional en la modalidad de transmisión, con señal sinusoidal y una fuente de ^{57}Co en la matriz de rodio. Se utilizó 25 mg de muestra en polvo en un portamuestra de 1,0 cm de diámetro interno. La velocidad se calibró usando un patrón de hierro metálico con un campo magnético hiperfino de 33 T.

El espectro Mössbauer medido a temperatura ambiente de la muestra VG3 y de las muestras CU1 y CU2 se presentan en las figuras 4 y 5, respectivamente. Los perfiles del espectro Mössbauer en las muestras son similares. A temperatura ambiental el espectro Mössbauer de la magnetita presenta dos componentes magnéticos uno para cada sitio A y B como se muestra en las figuras. El sexteto del campo magnético mayor corresponde al sitio A (tetraedral) y el de campo menor corresponde al sitio B (octaedral). Las líneas de los sitios B son más anchas que

la de los sitios A. Este fenómeno ha sido explicado como un "efecto de salto de electrón", es decir, que los cationes de Fe^{+2} y Fe^{+3} en los sitios B octaedrales intercambian electrones con frecuencia suficientemente rápida que afecta el ancho de línea. El espectro Mössbauer a temperatura de ambiente de la magnetita contiene 3 componentes espectrales: uno para el Fe (III) en los sitios A, otro para el Fe(II)Fe(III) en los sitios B y un tercero para el Fe(III), en exceso de los sitios B.

Para la muestra VG3 se ha realizado un análisis de los parámetros hiperfinos (tabla 3). El modelo empleado para los ajustes Mössbauer considera la presencia de un sitio paramagnético (doblete) con una área de 3,6% y cinco sitios magnéticos (sextetos). El sitio paramagnético que es asignado a un sitio de Fe^{2+} que puede estar localizado en la estructura octaedral de un mineral de Fe. Los sitios magnéticos con campos magnéticos hiperfinos B_{hf} = 48,57 T y B_{hf} = 45,66 T, son atribuidos a los sitios tetrahedral y octahedral de la magnetita (Fe_3O_4), respectivamente, con una área de absorción resonante total relativa de 79,2%. Este resultado indica que no se trata de una magnetita bien cristalizada y/o con posible sustitución isomórfica; además, fue necesario incluir otros tres sitios magnéticos que contienen aproximadamente un 18% del área relativa total. Los valores de los parámetros hiperfinos están listados en la tabla 3.

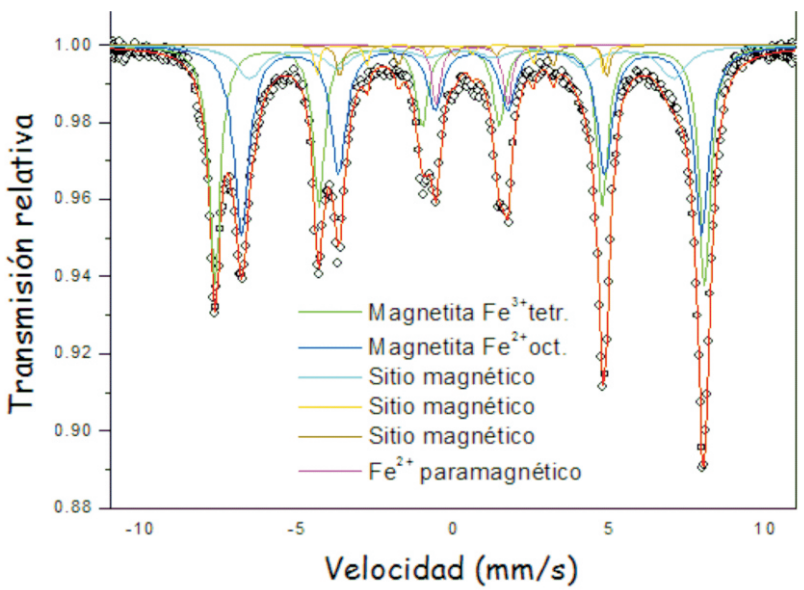


Figura. 4. Espectro Mössbauer a temperatura ambiente de la muestra VG3

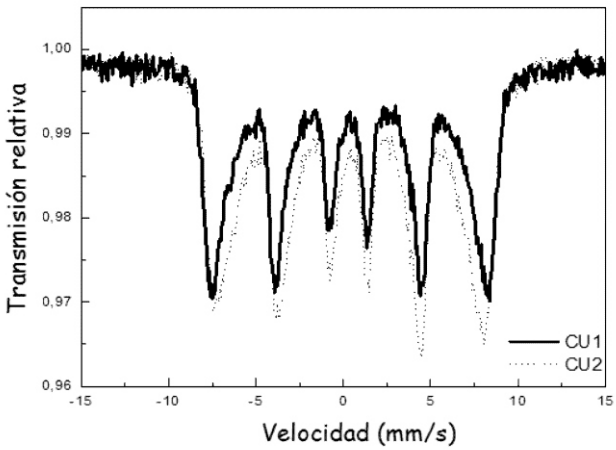


Figura. 5. Espectro Mössbauer a temperatura ambiente de las muestras CU1 y CU2

Tabla 3. Parámetros detectados por la técnica Mössbauer a temperatura ambiente de la muestra VG3

Asignación	**δ (mm/s)**	**2ε (mm/s)**	**ΔEq (mm/s)**	**B_{hf} (T)**	**A(%)**
Fe^{2+} paramagnético	0,595	-----	2,289	-----	3,60
Magnetita Fe^{3+} (tetrahédrico)	-----	0,220	-0,029	48,66	38,70
Fe^{2+} (octaédrico)	-----	0,580	-0,004	45,66	40,50
Fe magnético	-----	0,242	0,023	42,13	12,28
Fe magnético	-----	0,060	0,341	28,5	2,08

δ: desplazamiento isomérico, Δ**Eq**: división del cuadripolo $\mathbf{B_{hf}}$: campo magnético hiperfino, **A(%)** -presencia cuantitativa de iones en %

Finalmente, la muestra JP2 presentó un espectro Mössbauer diferente a los de las series VG y CU, como se aprecia en la figura 6. Este consiste en un doblete y no en un sexteto y se puede atribuir al tamaño nanoparticulado de la magnetita que ha modificado la configuración de la distribución de los sitios tetraedral y octaedral de los iones Fe^{2+} y Fe^{3+}, respectivamente. Se confirma entonces los resultados del análisis XRD obtenidos para la muestras JP2 con diámetro medio de 2 nm (tabla 1). Aunque el espectro Mössbauer permite determinar la distribución atómica de la magnetita, también puede estimar el tamaño de la partícula considerando el efecto de un campo magnético externo en la distribución electrónica de la magnetita.

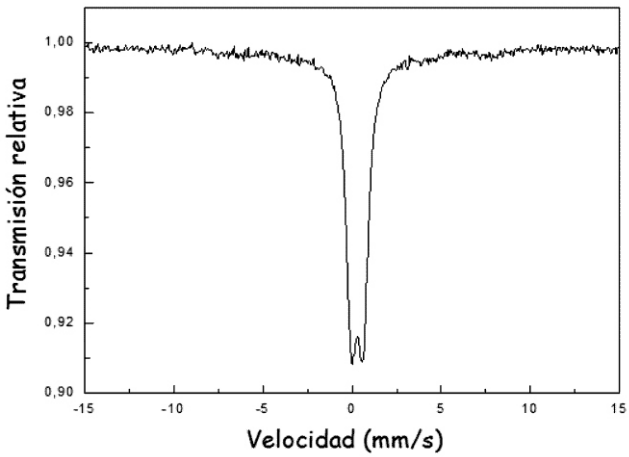


Figura. 6. Espectro Mössbauer a temperatura ambiente de la muestra JP2

CONCLUSIONES

- La influencia del método de preparación de la magnetita en la cristalinidad ha sido importante. Las muestras preparadas por el método sol-gel, control estérico, usando citrato de sodio como estabilizante, ha permitido la formación de granos más pequeños mientras las preparadas por sol-gel, hidrólisis forzada partiendo de Fe^{2+}, ha permitido la oxidación parcial a Fe^{3+} para formar la espinela inversa.
- El análisis XRD de las muestras sintetizadas mostraron la presencia mayoritaria de la magnetita en todos los materiales, presentando mayor cristalinidad las muestras calcinadas respecto a sus homólogas envejecidas a temperaturas menores a 100 ºC. El tamaño medio del grano fue afectado por el método de preparación empleado siendo el método sol-gel (hidrólisis forzada), el que permitió obtener granos entre 2 y 3 nm. Las dimensiones de grano obtenidas por el método de precipitación fueron en promedio del orden de 10 a 20 nm.
- La superficie específica de todas las muestras, medida por la técnica BET, estuvo en el rango de 40 a 70 m^2/g y la forma de la isoterma de adsorción obtenida fue del tipo IV según la clasificación IUPAC, que corresponde a una superficie mesoporosa.
- El espectro Mössbauer obtenido de las muestras de las series VG y CU a temperatura ambiental detectó la presencia de 2 sextetos conformados por 2 sitios: uno octaédrico (Fe^{2+}, Fe^{3+}) y otro tetraédrico (Fe^{3+}) confirmando la formación de la espinela inversa, característico de la magnetita pero con presencia de impurezas de Fe magnético. La muestra JP2, preparada por sol-gel (hidrólisis forzada), presentó un doblete en lugar de un sexteto, que fue atribuido al tamaño pequeño de las nanoparticulas sintetizadas del orden de 2 nm.

AGRADECIMIENTO

Se agradece a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería por la ayuda económica concedida para este trabajo durante el año 2011.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yang X., Chen L., Han B., Yang X., Duan H., Preparation of magnetite and tumor dual-targeting hollow polymer microspheres with pH-sensitivity for anticancer drug-carriers, *Polymer* 51*,* 2010; 2533-2539.
2. Yazdania F., Edrissi M., Effect of pressure on the size of magnetite nanoparticles in the coprecipitation synthesis, *Materials Science and Engineering* B 171, 2010; 86-89.
3. Murbe J., Rechtenbach A., Synthesis and physical characterization of magnetite nanoparticles for biomedical applications, *Materials Chemistry and Physics* 110, 2008; 426-433.
4. Li Z., Kawashita M., Araki N., Mitsumori M., Hiraoka M., Doi M., Magnetite nanoparticles with high heating efficiencies for application in thehyperthermia of cancer, *Materials Science and Engineering* C 30*,* 2010; 990-996.
5. Grande Antonio H., Nanotecnologíay nanopartículas magnéticas: la física actual en lucha contra la enfermedad, *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (esp.),* vol. 101, Nº. 2, 2007; pp 321-327.
6. Alexiou C, Diehl D, Henninger P, Iro H, Rockelein R, Schmidt W, Weber H, A high field gradient magnet for magnetic drug targeting. IEEE Trans. *Applied Supercond,* 2006; 16(2): 1527-1530.
7. Bedanta S, Kleemann W, Supermagnetism. Journal of physics.D, Applied physics, 42(1). ID: 65. Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2009; 54(5): 631.
8. Fukumori Y, Ichikawa H, Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Adv. Powder Technology,* 2006; 17(1): 1.
9. Oliveira Mariana C.Q., Lanza Marcos R.V, Tanakac Auro A., Taboada Sotomayor P., Flow injection analysis of paracetamol using a biomimetic sensor as a sensitive and selective amperometric detector, *Anal. Methods*, 2010; 2, 507-512.
10. Moreira Luiz Fernando, de Vasconcelos Lanza M.R., Tanaka A.A., Taboada Sotomayor M.P., Selective UV-filter detection with sensors based on stainless steel electrodes modified with polyaniline doped with metal tetrasulfonated phthalocyanine films, *Analyst 134,* 2009*;* 1453-1461.
11. Jacometo Castilho T., Taboada Sotomayor M.P., Kubota Lauro Tatsuo, Amperometric biosensor based on horseradish peroxidase for biogenic amine determinations in biological samples, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37, 2005*;* 785-791.
12. Valero-Navarro A., Medina-Castillo A., Fernández-Sánchez J., Fernández-Gutiérrez A., Synthesis of a novel polyurethane-based-magnetic imprinted polymer for the selective optical detection of 1-naphthylamine in drinking water, *Biosensors and Bioelectronics,* v. 26, Issue 11, 2011; p. 4520-4525.
13. Qiang Yu, Shubo Deng, Gang Yu, Selective removal of perfluorooctane sulfonate from aqueous solution using chitosan-based molecularly imprinted polymer adsorbents, *Water Research,* volume 42, Issue 2008; 12, p. 3089-3097.

14. Alizadeh T., Akhoundian M., A novel potentiometric sensor for promethazine based on a molecularly imprinted polymer (MIP): The role of MIP structure on the sensor performance, *Electrochimica Acta,* v. 55*,* Issue 2010; 10, p. 3477-3485.
15. Abdalla M.A., Jaafar M.H., Al-Othman Z.A., Alfadul S.M., Ali Khan M., New route of preparation and characterization of magnetite nanoparticles, *Arabian Journal of Chemistry,* v. 4, Issue 2, 2011; p. 235-237.
16. Fajaroh F., Setyawan H., Widiyastuti W., Winardi S., Synthesis of magnetite nanoparticles by surfactant-free electrochemical method in an aqueous system, *Advanced Powder Technology*, 23, 2012; p. 328-333.
17. Galeotti F. Bertini F., Scavia G., Bolognesi A. A controlled approach to iron oxide nanoparticles functionalization for magnetic polymer brushes, *Journal of Colloid and Interface Science,* v. 360, 2, 2011; p. 540-547.
18. Shen Wu, Aizhi Sun, Fuqiang Zhai, Jin Wang, Wenhuan Xu, Qian Zhang, Alex A. Volinsky, Fe_3O_4 magnetic nanoparticles synthesis from tailings by ultrasonic chemical co-precipitation, *Materials Letters*, v. 65, Issue 12, 2011; p. 1882-1884.
19. Xu, Haibin Yang, Wuyou Fu, Kai Du, Yongming Sui, Jiuju Chen, Yi Zeng, Minghui Li, Guangtian Zou, Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by sol–gel method, *J. Magnetism and Magnetic Materials* 309*,* 2007; p. 307-311.
20. Itoh Hiroyuki, Sugimoto Tadao, Systematic control of size, shape, structure, and magnetic properties of uniform magnetite and maghemite particles, *J. Colloid and Interface Science* 265*,* 2003; 283-295.
21. Da Costa G.M., De Grave E., De Bakker P.M., Vandenberghe R.E., Synthesis and characterization of some iron oxides by saol.gel, *J. Solid State Chemistry* 113*,*1994; 405-412.
22. Vergés M Andrés, Costo R., Roca A.G., Marco J.F., Goya G.F., Serna C.J., Morales P.M., Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain–multidomain limit, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 41*, 2008;* 134003.
23. Jiwon Lee, Tetsuhiko Isobe, Mamoru Senna, Magnetic properties of ultrafine magnetite particles and their slurries prepared via *in-situ* precipitation, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 109, 1996; p. 121-127.
24. Wang Xuman, Zhang Caining, Wang Xiaoliang, Gu Hongchen, The study on magnetite particles coated with bilayer surfactants, *Applied Surface Science* 253, 2007; p. 7516-7521.

Recibido el 02-07-2012
Aprobado el 15-08-2012

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE ADSORCIÓN DE COBRE, CADMIO Y CINC DEL MUSGO *Sphagnum maguellanicum* PROVENIENTE DE JUNÍN, PERÚ

Rafaela Elías-Letts[a*], Diego Ugarte La Torre[a], Raúl Loayza-Muro[a], David Condori[b], Rosario Rojas[b], Marco Piñatelli[c]

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de adsorción de Cu, Cd y Zn de una matriz del musgo *Sphagnum maguellanicum*, preparada a partir de partículas de musgo de 8 y 0,5 mm de diámetro. Los valores de remoción fueron de 19,3 mg/g para Cu, 12,5 mg/g para Cd y 10,3 mg/g para Zn, los cuales estuvieron relacionados al tamaño de partícula. Los altos niveles de adsorción fueron obtenidos en un sistema dinámico, en contraste con la exposición estática. Estas diferencias se atribuyen a las características químicas del musgo y a las condiciones de su hábitat.

Palabras clave: Adsorción, metales, sphagnum, contaminación, musgo

EVALUATION OF COPPER, CADMIUM AND ZINC BIOSORPTION BY *Sphagnum maguellanicum* MOSS FROM JUNÍN, PERÚ

ABSTRACT

The aim of this investigation was to determine the adsorption capacity of Cu, Cd and Zn of a matrix of the moss *Sphagnum maguellanicum* prepared from moss particles with a diameter of 8 and 0.5 mm. The values of metal removal, 19.3 mg/g for Cu, 12.5 mg/g for Cd and 10.3 mg/g Zn were related to the particle size. The highest removal of metal ions was obtained in the dynamic system in contrast with the static exposure. These differences are attributed to the chemical properties of the moss and its habitat conditions.

Key words: Adsorption, metals, sphagnum, pollution, moss

INTRODUCCIÓN

En el Perú contamos con ingentes recursos naturales que requieren ser estudiados; entre ellos están las especies nativas, muy apreciadas por los lugareños de cada zona debido a sus propiedades terapéuticas. La fuente de estudio en este caso es el musgo *Sphagnum maguellanicum*, un musgo que crece en forma abundante en zonas húmedas a más de 3500 msnm. En los distritos de Comas, Curimarca, Pampa Hermosa, Palca, Huasahuasi y otros, en el departamento de Junín, existen unas 50,000 hectáreas cubiertas por el musgo, las cuales son manejadas por unas 20 comunidades campesinas. El *S. maguellanicum* presenta un pH ácido

[a] Laboratorio de Ecotoxicología, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
[b] Unidad de Investigación en Productos Naturales, Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.
[c] Inkamoss.
[*] Autor de correspondencia: rafaela.elias@upch.pe
Av. Honorio Delgado 430, San Martín de Porres, Lima, Perú, Tel +51 1 3190000 Anexo 2714.

y tiene la propiedad de absorber agua hasta 20 veces su peso y adsorber diversos iones metálicos. Debido a estas propiedades es utilizado principalmente como sustrato para el cultivo de orquídeas. Otros usos comprenden el almacenaje de frutas y flores, como material aislante, etc. En los últimos años se observa un mayor énfasis en el estudio de los procesos de adsorción de metales pesados de las aguas de desecho, utilizando adsorbentes de origen biológico.[1,2] Estudios previos indican que el musgo, en su forma natural, es capaz de adsorber metales.[3,4] Por otro lado, estudios con quitosano demuestran que con una mayor área superficial de partícula se asegura la disponibilidad de más sitios de adsorción.[5] Nuestro trabajo propone una disminución del tamaño de partícula del musgo *S. maguellanicum* para alcanzar una mayor capacidad de adsorción de metales. El monitoreo biológico de metales y su remoción del agua, podría ser mayor que la tradicional determinación físico-química, usando matrices biológicas, como el musgo.[6] El musgo *S. maguellanicum* podría ser un eficiente acumulador de metales pesados, debido a su pH ácido y a una gran capacidad para fijar cationes.[7]

El procesamiento del musgo para su exportación es simple, ya que éste se cosecha a mano, se seca en tendales, se prensa y se empaca para ser comercializado, principalmente a Japón, China y Estados Unidos. El precio del producto exportado es bajo (aproximadamente 3 dólares/kg). El Perú está incrementando cada año la exportación de *Sphagnum*. Según el programa Sierra Exportadora, en los últimos 3 años se exportaron unas 60 TM, mientras que en el primer trimestre del 2009 el volumen de exportación fue mayor a 20 TM. Estos incrementos en los volúmenes de exportación hacen peligrar la perdurabilidad del recurso natural. Existe un plan de manejo de aprovechamiento del *Sphagnum* en comunidades campesinas, donde se extrae en concordancia con la ley forestal y de fauna silvestre. Sin embargo, en el departamento de Junín y en otros donde existe la especie, no se cuenta con un mapa de su distribución geográfica o delimitación natural, y se desconoce la situación actual de las turberas y tremedales, la cantidad aprovechable y la capacidad de extracción.

La presencia de metales pesados en aguas subterráneas y superficiales puede ser resultado de actividades antropogénicas,[8] las cuales son responsables de forma directa e indirecta del incremento de los niveles de estas sustancias en el ambiente.[9] En general, los organismos vivos requieren cantidades trazas de algunos de estos elementos, pudiendo tener efectos perjudiciales si se encuentran en concentraciones excesivas.

La remoción de metales pesados por medio de procesos tales como el intercambio iónico (resinas) y la adsorción (carbón activado), es una alternativa eficiente. Sin embargo, el uso de estos materiales convencionales puede resultar prohibitivo en muchas situaciones debido a los altos costos asociados a su adquisición, implementación y operación.[10] Es por esta razón que, durante las últimas décadas, diversas investigaciones se han centrado en la búsqueda de adsorbentes no convencionales de bajo costo, tanto de origen industrial como agrícola, que permitan reemplazar el carbón activado y las resinas de intercambio en el tratamiento de aguas residuales. Entre los materiales de origen agrícola considerado promisorio para la remoción de metales pesados de aguas residuales, se encuentra el musgo del género *Sphagnum*. Entre sus principales ventajas está su bajo costo, ya que requiere poco procesamiento, y su relativa abundancia en algunas zonas del país.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

El musgo usado en el estudio fue recolectado en el departamento de Junín (3500 msnm). La especie se sometió a limpieza, separación de las partes utilizables y se procesó con un equipo Moulinex obteniendo partículas de 8; 4; 2; 1 y 0,5 mm de diámetro.

Ensayo de retención de agua

En esta etapa se evaluó los cuatro tamaños de partículas generadas. Se pesó 1 g del musgo y se colocó en beakers de vidrio con 200 mL de agua destilada. El tiempo de exposición fue de 72 horas, luego de lo cual las muestras fueron filtradas con papel Whatman Nº1 y se recuperó el agua libre, determinando por diferencia de volúmenes el agua retenida por el musgo. Este ensayo fue repetido 5 veces.

Ensayo de retención de metales en sistema estático y dinámico

En estos ensayos se usaron los tamaños de partícula de 0,5 y 8 mm, por ser los que mostraron mayor capacidad de retención de agua. Para los ensayos en sistema dinámico se colocó 1 g del musgo en beakers de vidrio de 200 mL con 200 mL de la solución del metal. Los metales usados fueron cadmio, cobre y cinc en concentraciones de 100 mg/L usando como fuente las sales $3CdSO_4.8H_2O$, $CuSO_4.5H_2O$ y $ZnSO_4.7H_2O$, respectivamente. Las muestras se mantuvieron expuestas durante 72 horas, luego de lo cual fueron filtradas con papel Whatman Nº 1 y se recuperó el agua libre. La concentración de metales en el filtrado fue determinada por ICP-MS (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo), determinando por diferencia de concentraciones los metales retenidos en el musgo. Los ensayos en sistema dinámico fueron realizados de manera similar al sistema estático, salvo que en este caso el musgo fue expuesto a agitación constante de 100 rpm. Ambos ensayos fueron repetidos 5 veces.

Análisis estadístico

La diferencia entre tratamientos fue determinada mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un test posterior de Tukey y un intervalo de confianza de 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las partículas obtenidas muestran uniformidad en su tamaño (90% de una muestra al azar mantienen el tamaño de partícula estimado). El ensayo de retención de agua en una gradiente de tamaños de partícula del musgo generaron los resultados expuestos en la figura 1, donde se observa una mayor capacidad de retención de agua en las muestras de musgo con un particulado de 8 mm (81,6 mL) y 0,5 mm (86,5 mL) El ANOVA muestra diferencias significativas (P<0,0001) entre todos los tratamientos a excepción del particulado de 8 mm vs 2 mm y 1 mm vs 0,5 mm, donde no se encontraron diferencias.

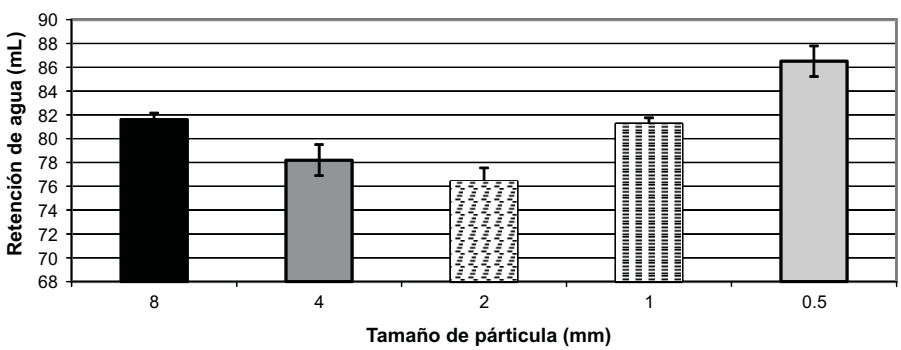


Figura 1. Retención de agua en el musgo *Sphagnum maguellanicum*

La exposición del musgo en un sistema estático generó diferencias significativas (P<0,0001) en la capacidad de retención de metales con respecto al dinámico, produciendo este último mayores valores, para cobre (19,3 mg/g) y Cd (12,5 mg/g) (figura 2). Los datos obtenidos muestran una mayor capacidad del musgo en sistema dinámico adsorbiendo 19,3 mg/g de cobre, 12,5 mg/g de cadmio y 10,3 mg/g de cinc.

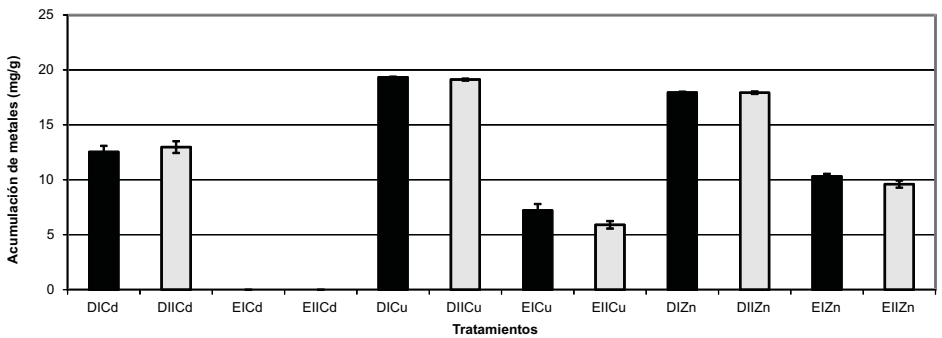


Figura 2. Acumulación de metales (mg/g) en musgo con dos tratamientos particulados y exposición estática y dinámica. Barras negras =partículas de 8 mm; barras grises =partículas de 0,5 mm. El sistema dinámico es representado por (D) y el estático por (E).

En todos los casos el ANOVA muestra diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.0001), menos en la comparación entre los sistemas dinámicos en relación al tamaño de partículas para los tres metales.

Anicic y col.[11] evaluaron la capacidad de acumulación de diversas especies, reportando lo siguiente para: *Sphagnum girgensohnii, Sphagnum girgensohnii, Sphagnum capillifolium, Sphagnum spp.* valores de acumulación de Cu de 2,4; 1 ¸4; 2 ¸3; y 1 ¸5 (ug/g^{-1} de peso seco); Cd 0 ¸18; 0 ¸3; 0 ¸38; y 0 ¸27 y Zn 20; 36; 83 y 26 (ug/g^{-1} de peso seco), respectivamente. Estos valores resultan significativamente más bajos que los obtenidos con *Sphagnum maguellanicum*, permitiendo sugerir una mayor capacidad del musgo de nuestro estudio como más eficiente y con un mayor rendimiento para la remoción de metales pesados.

CONCLUSIONES

- De acuerdo con nuestros objetivos iniciales, el musgo particulado de 0,5 mm muestra una mayor capacidad de retención de agua y muestra una correspondencia con una mayor adsorción de metales, principalmente cobre.
- El aumento de la superficie de exposición y la mayor exposición de los centros activos para la adsorción de metales se ven favorecidas por el flujo de las partículas, obteniendo una mayor adsorción en un sistema dinámico frente a un sistema estático.
- La evaluación de *Sphagnum maguellanicum* como matriz para retener metales, muestra un significativo grado de adsorción favorecido por una exposición dinámica de las partículas.
- El tamaño de la partícula influye favorablemente en la retención de metales pesados particularmente metales catiónicos, atribuyéndoles esta característica a las propiedades químicas del musgo como a las condiciones del habitad donde es cultivado**.**

- Estas propiedades hacen de este musgo un potencial recurso ambiental con aprovechamiento en el monitoreo de aguas contaminadas con metales pesados así como para el tratamiento de aguas impactadas por metales.
- Por ello sugerimos continuar con las evaluaciones a una escala mayor con la implementación de pilotos en campo y la evaluación del impacto de factores químicos y ambientales que puedan influir en el rendimiento de este musgo para capturar metales.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de investigación fue llevado a cabo gracias al auspicio del FINCyT (Proyecto 118-10-FINCyT-PITEI-2010: Desarrollo de productos con valor agregado a partir del *Sphagnum* (musgo blanco) proveniente de comunidades de la región de Junín).

BIBLIOGRAFÍA

1. Volesky, B., Holan, Z.R. *Biosorption of heavy metals. Biotechnology. Program*. 1995; 11, 235-250.
2. Seki, H., Suzuki, A.J. Kinetic study of metal biosorption to a brown alga, *Kjellmaniella rassiforia*. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2002; 246, 259-262.
3. Fine, P., Scagnossi, A., Chen, Y., Mingelgrin, U. Practical and mechanistic aspects of the removal of cadmium from aqueous systems using peat. *Environmental Pollution*. 2005; 138, 358-367.
4. Ringqvista, L., Holmgrenb, A., Born, I. O. Poorly humified peat as an adsorbent for metals in wastewater. *Water Research*. 2002; 36, 2394–2404.
5. Flores, J.A., Navarro, A.E., Ramos, K.P., Chang, L., Neptali, A., Ly, M., Maldonado, H. J. Adsorción de Cu(II) por quitosano en polvo y perlas de gel. *Revista de la Sociedad Química del Perú. 2005; 71, 17-25.*
6. Glooschenko, W.A., Nabil, A. Atmospheric deposition of arsenic and selenium across canada using sphagnum moss as a biomonitor. *Science of the Total Environment.* 1988; *73, 269-275.*
7. Clymo RS. Ion exchange in *Sphagnum* and its relation to bog ecology. *Annals of Botany*. 1963; 27, 309-324.
8. Dal Bosco, S.M., Jimenez, R.S., Carvalho, W.A. Removal of toxic metals from wastewater by Brazilian natural scolecite. *Journal of Colloid and Interface Science. 2005;* 281, 424-431.
9. Santos, M.J., de Oliveira, E. Heavy metals removal in industrial effluents by sequential adsorbent treatment. *Advances in Environmental Research. 2003;* 7, 263-272.
10. Kobya, M., Demirbas, E., Senturk, E. Ince, M. Adsorption of heavy metal ions from aqueous solutions by activated carbon prepared from apricot stone. *Bioresource Technology. 2005;* 96, 1518–1521.
11. Anicić, M., Tasic, M., Frontasyeva, M.V., Tomasević, M., Rajsić, S., Mijić, Z., Popović. A. Active moss biomonitoring of trace elements with ***Sphagnum girgensohnii*** moss bags in relation to atmospheric bulk deposition in Belgrade, Serbia. *Environmental Pollution* 2009; 157, 673–679.

Recibido el 24-07-2012
Aprobado el 04-09-2012

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF 13, 28-EPOXYOLEANANE TRITERPENE SAPONINS FROM TWO PERUVIAN *MYRSINACEAE*

Cynthia Girardi[a], Pedro G. Vásquez-Ocmin[b], Denis Castillo[b], Michel Sauvain[a,c], Rosario Rojas[b], Nicolás Fabre[a], Mohamed Haddad[a,c*]

ABSTRACT

Two known 13,28-epoxy-oleanane triterpene saponins (**1**) and (**2**), were isolated from the 95% ethanolic extract of the roots of *Myrsine coriaceae* and *Myrsine andina*. Their structures were deduced by combined spectral analysis and chemical evidences based on data reported in the literature. Compounds **1** and **2** were evaluated *in vitro* against different cellular models such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes, six human cancer cell lines (Hs683, T98G, U251, HT29, MCF7, SKMEL28) and two murine cell lines (CT26 and B16F10). Compound **1** was found to exhibit antileishmanial activity (IC_{50} = 16 µg/mL) whereas compound **2** was inactive (IC_{50} > 50 µg/mL). Furthermore, compound **1** exhibited stronger inhibition activity on human cancer cells (IC_{50} = 15 µg/mL) and on murine cell lines (IC_{50} = 10 µg/mL) than compound **2** (IC_{50} > 82 and 42 µg/mL, respectively**)**. As the only difference between **1** and **2** is due to a substitution of an aldehyde group by a hydroxymethyl moiety, these results showed the crucial role of the aldehyde function at C-30 for the cytotoxicity. In contrast, none of the tested compounds revealed activity against *M. tuberculosis*.

Key words: Saponins, Myrsinaceae, leishmaniasis, tuberculosis

RESUMEN

Dos saponinas triterpénicas de tipo 13,28-epoxi-oleanano (**1**) y (**2**), han sido aisladas a partir del extracto etanólico al 95% de las raíces de *Myrsine coriaceae* y *Myrsine andina*. Las estructuras fueron establecidas mediante la combinación de técnicas espectrales y evidencias químicas con datos reportados en la literatura. Los compuestos **1** y **2** fueron evaluados con ensayos biológicos *in vitro* frente a diferentes modelos celulares, tales como *Mycobacterium tuberculosis***,** amastigotes axénicos de *Leishmania amazonensis* , macrófagos extraídos del peritoneo de ratón, seis líneas celulares de cáncer humano (Hs683, T98G, U251, HT29, MCF7, SKMEL28) y dos líneas de células murinas (CT26 y B16F10). El compuesto **1** mostró una buena actividad antileishmania (IC_{50} = 16 µg/mL) mientras que el compuesto **2** no mostró actividad alguna (IC_{50}> 50 µg/mL). Por otra parte, el compuesto **1** mostró una mayor actividad de inhibición de las células cancerosas humanas (IC_{50} = 15 µg/mL) y en líneas celulares de ratón (IC_{50} = 10 µg/mL) que el compuesto **2** (IC_{50}> 82 y 42 µg/mL, respectivamente). Como la única diferencia entre **1** y **2** se debe a una sustitución de un grupo aldehído por un grupo hidroximetilo, estos resultados demuestran el papel esencial de la función aldehído en C-30

[a] Université de Toulouse, UPS, UMR152 (Laboratoire de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement), 118, rte de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France.

[b] Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

[c] IRD; UMR-152 ; Mission IRD Casilla 18-1209 Lima, Perú.

para la citotoxicidad. En contraste, ninguno de los compuestos ensayados reveló actividad frente a *M. tuberculosis*.

Palabras clave: Saponinas, Myrsinaceae, leishmaniasis, tuberculosis

INTRODUCTION

Infectious diseases such as leishmaniasis and tuberculosis (TB), commonly being considered as neglected diseases, are prevalent in Third World countries. Because most of the affected population live in developing countries and cannot afford existing drugs, both diseases have been ignored by pharmaceutical industry. Leishmaniasis is a parasitic protozoal disease caused by parasites belonging to the genus *Leishmania*, occurring in subtropical and tropical regions. An estimated 12 million people are infected worldwide in 88 countries with an annual incidence of about 2–3 million.[1,2] Clinically, leishmaniasis occurs in visceral, cutaneous and mucocutaneous forms, 90% of the latter occurring in Bolivia, Brazil and Peru. It is a major public health problem in tropical and subtropical regions for which development of drug resistance by the parasites has worsened this problem. In the absence of effective vaccines, chemotherapy still plays a critical role in treating this disease.[3]

As far as TB is concerned, this is a common and in some cases deadly infectious disease, caused by an important intracellular pathogen *Mycobacterium tuberculosis. This disease* causes 2 million deaths per year worldwide, with 98% occurring in developing countries. One of the highest incidence rates in the Americas occurs in Peru.[4,5] Current standard treatments for tuberculosis include antibacterial drugs such as Rifampin and Isoniazid, which require between six to twelve month-therapies to fully eliminate *Mycobacterium* from the body. As very few treatments are available, there is an urge to discover new treatments with less toxicity and low manufacturing costs.

Cancer, responsible for 7.6 million deaths worldwide in 2008 with approximately 70% occurring in low- and middle-income countries, represents another major health issue.[6] In such countries.[7a-d] including Peru,[8] some plant extracts are used to combat various types of cancers and provide evidence that plants represent a major reservoir within which we may identify novel anticancer drugs.[9a-c]

In the course of our investigations on compounds with pharmacological properties and since it has been shown that the 13,28-epoxy bridge in the saponin skeleton was putatively assigned as crucial for antileishmania activity,[10] we carried out a literature search in order to find saponins showing the same structural features as the Maesabalides. These compounds, possessing a 13,28-epoxy-oleanane bridge and isolated previously from *Maesa balansae* (Myrsinaceae),[11] have been shown to possess potent and highly specific *in vitro*[12] and *in vivo*[13] antileishmania activity. Vermeersch *et al.*, (2009)[14] reviewed all those saponins from Myrsinaceae, Primulaceae, Aceraceae and Icacinaceae families possessing a completely saturated pentacyclic triterpene skeleton and a 13,28-epoxy bridge, in which C(28) was a methylene or a hydroxymethylene group, excluding the C(28) carbonyl derivatives. For all the studied plants, a clear correlation was found between the presence of close analogue 13,28-epoxy-oleanane triterpene saponins and a potent and selective antileishmania activity. Furthermore, Aegicerin, an oleanane-type pentacyclic triterpene skeleton with this 13,28-epoxy bridge, has shown a consistently high level of activity against a large panel of both sensitive and resistant strains of *M. tuberculosis*[15].

In this article, we report the isolation and structure elucidation of two known triterpenoid saponins, Ardisiacrispin B (**1**) and Ardisicrenoside A (**2**), previously isolated from several Myrsinaceae plants.[16,17] Both compounds were found to possess the 13,28-epoxy bridge previously demonstrated as crucial for antileishmanial activity *in vitro*[12] and *in vivo*.[13] We

evaluated their activity *in vitro* against *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes alongside other pathogenic cellular model, e.g. *Mycobacterium tuberculosis*, as well as two mouse and six human cancer cell lines.

To the best of our knowledge, this is the first report of the isolation of saponins from the *Myrsine andina* (Mez.) Pipoly and *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult

EXPERIMENTAL

General

Optical rotations were measured on a Perkin–Elmer 241 polarimeter with a sodium lamp (k = 589 nm) in a 1 cm microcell. The structures of the isolated compounds were identified by nuclear magnetic resonance (NMR; Bruker Avance 500 equipped with a TBI z-gradient 5 mm probe). ^{1}H NMR (500 MHz), ^{13}C NMR (125 MHz), and 2D-NMR analysis in C_5D_5N; NMR experiments were performed at 298 K using standard pulse sequences. Chemical shifts () are given in ppm relative to TMS with coupling constant (*J*) reported in Hz. ESI-MS (positive and negative-ion mode) spectra were recorded on an ion trap LCQ Finnigan spectrometer. Column chromatography and medium-pressure column chromatography were performed on silica gel 60 SDS 70–200 m and 6–35 m, respectively. TLC was carried out on precoated silica gel 60 F254 aluminium plates (Merck). Spots were detected under UV (254 and 366 nm) before spraying with diphenylborate reagent or a vanillin sulfuric solution followed by heating the plate at 110 °C. All solvents were spectral grade or distilled from glass prior to use.

Plant material

The roots of *Myrsine andina* (Mez.) Pipoly and *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult were collected near Oxapampa, Chacos, Peru by M. Haddad, C. Amasifuen, J. Mateo, J. Perea in July 2009, and identified by the botanists J. Mateo and C. Amasifuen. A voucher specimen of each (3472 and 1207, respectively) were deposited at the National Herbarium of the San Marcos University in Lima, Peru (UNMSM).

Extraction and isolation

The air-dried and powdered roots of *Myrsine andina* and *Myrsine coriacea* (500 g and 300 g, respectively) were exhaustively macerated with 95% EtOH (3 x 3 L) at room temperature to yield 29.1 g and 52.8 g of crude extract after evaporation of the solvent in vacuo, respectively. Both residues were dissolved in the least amount of MeOH and the solution was diluted with tenfold amount of diethyl-ether to precipitate 2 g and 2.3 g of crude saponin mixture, respectively, and then partitioned with *n*-BuOH saturated with H_2O (3 x 500 mL). The combined *n*-BuOH extract was evaporated under vacuum to dryness to afford the n-BuOH layer residue (1.1 g and 1 g, respectively). The saponin rich precipitates (1.1 and 1 g, respectively) were collected by filtration and fractionated by successive MPLC (silica gel 60, (15–40 μm), $CHCl_3$–MeOH–H_2O 7.5:2.5:0.25 and $CHCl_3$ – MeOH – H_2O 8:2:0.25) to yield **1** and **2**.

Compound 1: Ardisiacrispin B

White amorphous powder. ^{1}H-NMR (C_5D_5N, 500 MHz) and ^{13}C-NMR (C_5D_5N, 125 MHz), (tables 1); ESI-MS (positive-ion mode) *m/z* 1097 $[M + Na]^+$, ESI-MS (negative-ion mode) *m/z* 1073 $[M – H]^-$, 927 $[(M – H) – 146]^-$, 765 $[(M – H) – 146 – 162]^-$, 603 $[(M – H) – 146 – 162 – 162]^-$, and 471 $[(M – H) – 146 – 162 – 162 – 132]^-$.

Compound 2: Ardisicrenoside A

White amorphous powder. ^{1}H-NMR (C_5D_5N, 500 MHz) and ^{13}C-NMR (C_5D_5N, 125 MHz), (tables 1); ESI-MS (positive-ion mode) *m/z* 1099 $[M + Na]^+$. ESI-MS (negative-ion mode) *m/z* 1075 $[M – H]^-$, 929 $[(M – H) – 146]^-$, 767 $[(M – H) – 146 – 162]^-$ and 605 $[(M – H) – 146 – 162 – 162]^-$.

Table 1. NMR Spectroscopic data of aglycon and sugar moieties of compounds **1** and **2.**

Aglycone	**1**		**2**		Sugar	**1**		**2**	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C		δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	0.81, 1.61	38.9	0.79, 1.61	38.9	Ara 1	4.95	104.2	4.94	104.2
2	1.82, 1.99	26.3	1.81, 1.98	26.4	2	4.59	80.6	4.58	80.5
3	3.13 br d (9.0)	88.8	3.11 br d (9.2)	88.8	3	4.49	72.2	4.49	72.0
4	-	39.5	-	39.5	4	4.58	74.4	4.58	74.4
5	0.62	55.4	0.62	55.4	5	3.79, 4.39	63.4	3.79, 4.40	63.4
6	1.37, [b]	17.7	1.38, [b]	17.7	Glc-1	5.37 d (7.5)	105.2	5.37 d (7.7)	105.2
7	1.49, [b]	34.3	1.50, [b]	34.1	2	4.07	76.2	4.07	76.2
8	-	44.0	-	42.4	3	4.29	77.9	4.23	77.9
9	1.22	50.1	1.23	50.3	4	4.22	71.5	4.13	71.6
10	-	36.7	-	36.7	5	4.06	77.8	4.06	77.9
11	1.70, nd	18.8	1.39, 1.72	18.9	6	4.38, [b]	62.6	4.38, 4.49	62.4
12	1.52, 1.94	32.1	1.46, 2.10	32.7	Glc-1'	5.23 d (7.5)	102.9	5.24 d (7.4)	102.9
13	-	86.1	-	86.3	2'	4.28	77.7	4.28	77.0
14	-	42.3	-	44.4	3'	4.19	79.4	4.20	79.4
15	1.24, 2.15	36.6	1.50, 2.24	36.8	4'	4.13	71.6	4.14	71.6
16	4.20	77.7	4.20	76.9	5'	3.79	78.2	3.60	77.6
17	-	43.9	-	44.4	6'	4.29, 4.45	62.4	4.30, 4.46	62.3
18	2.06	50.9	1.85	50.9	Rha-1	6.41 br. *s*	101.5	6.42 br. *s*	101.4
19	2.82, nd	33.1	2.03, 2.76	33.2	2	4.50	72.5	4.73	72.2
20	-	48.2	-	36.6	3	4.68	72.4	4.69	72.6
21	2.52, 2.66	30.3	1.68, 2.59	32.4	4	4.25	79.0	4.28	74.6
22	1.55, nd	32.1	1.67, 1.87	31.5	5	5.05	69.2	5.04	69.2
23	1.15	27.5	1.14	27.5	6	1.79	18.2	1.80	18.7
24	1.10	16.3	1.00	16.3					
25	0.80	16.3	0.80	16.2					
26	1.26	18.3	1.31	18.3					
27	1.52	19.6	1.58	19.5					
28	3.15, 3.57	77.5	3.30, 3.60	77.7					
29	1.00	23.9	1.33	28.8					
30	9.60	207.3	3.74, 3.99	65.7					

[a] ^{1}H (500 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) data of **1** and **2** in C_5D_5N. The assignments were based on DEPT, ^{1}H , ^{1}H-COSY, TOCSY, NOESY, HMQC and HMBC experiments.

[b] Not determined.

Bioassays

Compounds **1** and **2** were evaluated against *L. amazonensis* axenic amastigotes *in vitro*[18] and against *M. tuberculosis in vitro*[15]. Two independent experiments were carried out to determine the *in vitro* growth inhibitory activity of compounds **1** and **2** in cancer cell lines. This growth inhibitory activity was determined by means of the sulforhodamine B (SRB) assay method and the MTT colorimetric assay, respectively, as detailed previously.[19a-b; 20a-d]

RESULTS

Extraction of the roots of *Myrsine andina* (Mez.) Pipoly and *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult and purification of the extract as described in the experimental section yielded compounds **1** and **2**. The elucidation of their structures was performed mainly by 500 MHz NMR analysis, including 1D- and 2D-NMR (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC), and mass spectrometry.

Compound **1** was obtained as a white crystalline powder with molecular formula $C_{53}H_{86}O_{22}$, which was determined by analysis of the MS data. Its positive ESI-MS showed the pseudomolecular ion peak at *m/z* 1097 $[M + Na]^+$. This was confirmed from its negative ion ESI-MS that showed the quasimolecular ion peak at *m/z* 1073 $[M - H]^-$. Other fragment ion peaks were observed at *m/z* 927 $[(M - H) - 146]^-$, 765 $[(M - H) - 146 - 162]^-$, 603 $[(M - H) - 146 - 162 - 162]^-$, and 471 $[(M - H) - 146 - 162 - 162 - 132]^-$ corresponding to the successive loss of one deoxyhexosyl, two hexosyl and one pentosyl moieties, respectively.

Of the 53 carbons in the ^{13}C-NMR spectrum (pyridine-d_5), 30 were assigned to the triterpenoid skeleton and 23 to the oligosaccharide moiety. Among the 30 carbons of the triterpene skeleton in the ^{13}C-NMR spectrum, 6 were assigned to the methyl carbons at δ_C 16.3, 16.3, 18.3, 19.6, 23.9 and 27.5 ppm, and the methyl protons were identified by the HSQC experiments at δ_H 1.10, 0.80, 1.26, 1.52, 1.00 and 1.15 ppm, respectively. Two methine carbons bearing oxygen were found at δ_C 88.8 and 79.4 ppm. The structural assignment was initiated from the long-range coupling networks observed between the methyl protons and the adjacent carbons from the HMBC experiments. Extensive NMR analysis (*table 1*) showed that the aglycone was an oleanane skeleton with an oxygen bridge between Agly- 13 (δ_C 86.1) and Agly-28 (δ_C 77.5). This was confirmed by comparison of the NMR data with known spectral data for structurally related compounds.[11,21,22]

The HMBC correlations between two angular methyl groups at δ_H 1.10 (3H, *s*, Me(24)) and δ_H 1.15 (3H, *s*, H–C(23)) with δ_C 88.8 (C(3)) confirmed the location of the first secondary alcoholic function at Agly-3. The absolute configuration of Agly-3 and Agly-16 was determined from a NOESY experiment: cross-peaks at δ_H 3.13 (1H, *d*, *J* = 9.0, Agly-3)/ δ_H 0.62 (1H, br. *d*, *J* = 12.0, Agly-5), and δ_H 4.20 (1H, br. *s*, Agly-16)/ δ_H 1.26 (3H, *s*, Me(26)), confirmed the absolute configuration of the aglycone. Based on these findings, the aglycone was identified as 3β,16α dihydroxy-13β,28-epoxyoleanane.

The ^{1}H-NMR spectrum of **1** displayed signals for four anomeric protons at δ_H 4,94 (d, *J* = 4,27 Hz), 5,24 (d, *J* = 7,91 Hz), 5,37 (d, *J* = 7,63 Hz), 6.41 (H, br. s), which correlated with the carbon signals at δ_C 104.2, 102.9, 105.2, and 101.5, respectively, in the HSQC spectrum.

The ring protons of the monosaccharide residues were assigned starting from the anomeric protons by means of the COSY, TOCSY, HSQC, and HMBC NMR plots (table 1), and the sequence of the oligosaccharide chains was obtained from the HMBC and NOESY experiments. All the protons within each spin system were delineated using COSY with the aid of TOCSY and NOESY spectra. After assignments of the protons, the ^{13}C-NMR resonances of each sugar unit were identified by HSQC and further confirmed by HMBC. HPTLC of the acid hydrolysate of **1** in comparison with reference sugars, NMR data of related structures[11,21] lead to the identification of the four monosaccharide units as β-D-glucose (Glc x2), one α-L-arabinose (Ara), and one α-L-rhamnose (Rha). The COSY and TOCSY spectra confirmed the presence of the one α-rhamnopyranosyl (Rha) from their typical pattern in the COSY spectrum[23,24] and the α-configuration of this latter was also confirmed by observation of NOESY correlations between δ_H (Rha-1), δ_H (Rha-3), and δ_H (Rha-5). This information was confirmed by the δ_C (Rha-1) non-splitting pattern of rhamnose unit and the three-bond HMBC correlations from δ_H (Rha-1) to δ_C (Rha-3) and δ_C (Rha-5) indicated that its anomeric H-atom was equatorial, thus possessing an α-configuration in the $^1C_4$ form.[25]

The relatively large $^3J_{H\text{-}1,H\text{-}2}$ values of the Glc (7.5–7.8), indicated a β anomeric orientation for the Glc.[26]

A cross peak observed in the NOESY spectrum at δ_H 4.94 (1H, d, *J* = 4.27, Ara-1)/ $_H$ 3.13 (1H, br. *d*, *J* = 9.0, Agly-3), revealed a substitution at C(3) of the aglycon by an arabinosyl moiety. This was confirmed by a correlation observed in the HMBC spectrum between an anomeric signal at δ_H 4.94 (1H, d, *J* = 4.27, Ara-1) and δ_C 88.8 (Agly-3) and by the reverse correlation at δ_H 3.13 (1H, br. *d*, *J* = 9.0, Agly-3) and δ_C 104.20 (Ara-1). The HMBC correlation between

δ_H 5,37 (d, J = 7,63 Hz, Glc-1), and δ_C 80.6 (Ara-2) and the reverse correlation at δ_H 4.59 (1H, m, Ara-2) and (C) 105.2 (Glc-1) indicated that Glc was linked to C(2) of Ara. This was also confirmed by a NOESY cross peak between δ_H 5,37 (d, J = 7,63 Hz, Glc-1) and δ_H 4.59 (1H, m, Ara-2). Furthermore, the HMBC correlation between δ_H 5.23 (1H, *d*, J = 7.91, Glc-1')) and δ_C 74.4 (Ara-4), together with the reverse correlation at δ_H 4.58 (1H, *m*, Ara-4) and δ_C 102.9 (Glc-1')) and the NOESY correlation between δ_H 5.23 (1H, *d*, J = 7.5, Glc-1') and δ_H 4.58 (1H, *m*, Ara-4) established the (14) linkage between Glc' and Ara. The substitution of the glucopyranosyl moiety at the δ_H Glc-2') position by a rhamnopyranosyl residue was deduced according to the reverse correlations in the HMBC spectra at δ_H 6.41 (1H, br. *s*, Rha-1)/ δ_C 77.7 (Glc-2') and δ_H 4.28 (1H, *m*, Glc-2')/ δ_C 101.5 (Rha-1)), together with the additional NOESY cross-peaks at δ_H 6.41 (1H, br. *s*, Rha-1)/ δ_H 4.28 (1H, *m*, Glc-2').

On the basis of the above results, the structure of **1** was elucidated as 3-β-Oα-l-rhamnopyranosyl (1→2)-β-D-glucopyranosyl (1→3)-[β-D-glucopyranosyl (1→2)]-β-d-arabinopyranosyl}-16α-hydroxy-13β,28-epoxy-oleanane.

Compound **2** was obtained as a white crystalline powder with molecular formula $C_{53}H_{88}O_{22}$ that was determined by analysis of the MS data. Its positive ESI-MS showed the pseudomolecular ion peak at *m/z* 1099 $[M + Na]^+$. This was confirmed from its negative ion ESI-MS that showed the quasimolecular ion peak at *m/z* 1075 $[M - H]^-$. Other fragment ion peaks were observed at *m/z* 929 $[(M – H) – 146]^-$, 767 $[(M – H) – 146 – 162]^-$ and 605 $[(M – H) – 146 – 162 – 162]^-$ corresponding to the successive loss of one deoxyhexosyl and two hexosyl, respectively.

Of the 53 carbons in the ^{13}C-NMR spectrum (pyridine-d_5), 30 were assigned to the triterpenoid skeleton and 23 to the oligosaccharide moiety.

Among the 30 carbons of the triterpene skeleton in the ^{13}C-NMR spectrum, 6 were assigned to the methyl carbons at δ_C 16.2, 16.3, 18.3, 19.5, 27.5 and 28.8 ppm, and the methyl protons were identified by the HSQC experiments at δ_H 0.80, 1.00, 1.31, 1.58, 1.14 and 1.33 ppm, respectively. Two methine carbons bearing oxygen were found at δ_C 88.8 and 76.9 ppm. The structural assignment was initiated from the long-range coupling networks observed between the methyl protons and the adjacent carbons from the HMBC experiments. Extensive NMR analysis (*table 1*) showed that the aglycone was an oleanane skeleton with an oxygen bridge between Agly-13 (δ_C 86.3) and Agly-28 (δ_C 77.7). This was confirmed by comparison of the NMR data with known spectral data for structurally related compounds.[11,21,22]

The HMBC correlations between two angular methyl groups at δ_H 1.00 (3H, *s*, Me-24) and δ_H 1.14 (3H, *s*, Me-23) with δ_C 88.8 (Agly- 3) confirmed the location of the first secondary alcoholic function at C(3). The absolute configuration of Agly-3 and Agly- 16 was determined from a NOESY experiment: cross-peaks at δ_H 3.11 (1H, *d*, J = 9.2, Agly-3)/ δ_H 0.62 (1H, br. *d*, J = 12.0, Agly-5), and δ_H 4.20 (1H, br. *s*, Agly- 16)/ δ_H 1.31 (3H, *s*, Me(26)), confirmed the absolute configuration of the aglycone. Based on these findings, the aglycone was identified as 3β,16α dihydroxy-13β,28-epoxyoleanane.

Table 2. Antimycobacterial (MIC μg/mL) and antiprotozoal (IC_{50} μM) activity.

Compounds	*M. tuberculosis*		*L. amazonensis amastigotes*
	$H_{37}Rv$	MDR	
1	> 25	> 25	16.0
2	> 25	> 25	> 50
Anf.[a]	-	-	0.2
Inh.[b]	0.125	32.0	-

[a]Amphotericin B. [b]Isoniazid.

Experiments were conducted on axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis* (strain MHOM/BR/76/LTB-012) according to Estevez *et al.*[16] The experiment has been carried twice with 4 replicates per experimental condition

Evaluation of the antimycobacterial activity *in vitro* was performed using the TEMA method[17] against MDR and sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis*. The experiment has been carried once with 6 replicates per experimental condition

The ^{1}H NMR spectrum of **2** displayed signals for four anomeric protons at δ_H 4.94 (d, J = 4.27 Hz), 5.24 (d, J = 7.42 Hz), 5.37 (d, J = 7.71 Hz), 6.42 (1H, br. s), which correlated with the carbon signals at δ_C 104.2, 102.9, 105.2, and 101.4, respectively, in the HSQC spectrum.

The ring protons of the monosaccharide residues were assigned starting from the anomeric protons by means of the COSY, TOCSY, HSQC, and HMBC NMR plots (table 1), and the sequence of the oligosaccharide chains was obtained from the HMBC and NOESY experiments. All the protons within each spin system were delineated using COSY with the aid of TOCSY and NOESY spectra. After assignments of the protons, the ^{13}C-NMR resonances of each sugar unit were identified by HSQC and further confirmed by HMBC. HPTLC of the acid hydrolysate of **2** in comparison with reference sugars, NMR data of related structures[11, 21] lead to the identification of the four monosaccharide units as β-D-glucose (Glc x2), one α-L-arabinose (Ara) and one α-L-rhamnose (Rha). The COSY and TOCSY spectra confirmed the presence of the one α-rhamnopyranosyl (Rha) from their typical pattern in the COSY spectrum[23,24] and the -configuration of this latter was also confirmed by observation of NOESY correlations between Rha-1, Rha-3, and Rha-5'. This information was confirmed by the Rha-1 non-splitting pattern of rhamnose unit and the three-bond HMBC correlations from H– Rha-1 to Rha-3 and Rha-5 indicated that its anomeric H-atom was equatorial, thus possessing an -configuration in the $^1C_4$ form.[25]

The relatively large $^3J_{H\text{-}1,H\text{-}2}$ values of the Glc (7.5–7.8), indicated a β anomeric orientation for the Glc[26].

The ^{1}H- and ^{13}C-NMR signals of **2** assigned from 2D-NMR spectra were almost superimposable on those of **1**, except for the disappearance of the signals corresponding to the aldheyde group (δ_C 207.3, C-30) replaced by a hydroxymethyl function (δ_C 65.7) (table 1).

On the basis of the above results, the structure of **2** was elucidated as 3-β-Oα-l-rhamnopyranosyl (1→2)-β-D-glucopyranosyl (1→3)-[β-D-glucopyranosyl (1→2)]-β-d-arabinopyranosyl}-16α-hydroxy-30-hydroxymethyl-13β,28-epoxy-oleanane.

Compounds **1** and **2** were evaluated *in vitro* against different cellular models such as *Mycobacterium tuberculosis*[15], *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes[16], mouse peritoneal macrophages, six human cancer cell lines (Hs683, T98G, U251, HT29, MCF7, SKMEL28) and two murine cell lines (CT26 and B16F10) (table 3).

Table 3. *In vitro* growth inhibition determined in 2 mouse and 6 human cancer cell lines.

Compounds	IC_{50} growth inhibitory concentrations (μM) after 72 h of treatment of human cancer cells with the compounds						
	Hs683	**T98G**	**U251**	**HT-29**	**MCF-7**	**SKMEL-28**	**m**
1	19	22	17	6	22	7	15
2	38	> 100	55	> 100	> 100	> 100	> 82

Compounds	IC_{50} growth inhibitory concentrations (μM) after 72 h of treatment of murine cancer cells with the compounds		
	CT-26.WT	**B16F10**	**m**
1	15	4	10
2	44	40	42

These experiments have been carried out in the Laboratory of Toxicology – Faculty of Pharmacy – Université Libre de Bruxelles (Brussels, Belgium) using the MTT colorimetric assay to determine the IC_{50} growth inhibitory concentrations of compounds **1** and **2** in 2 mouse (CT-26.WT and B16F10) and 6 human cancer cell lines. These cell lines included the Hs683 oligodendroglioma (obtained from the American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA; code HTB-138), the T98G glioblastoma (ATCC code CRL-1690), the U251 glioblastoma (ECACC code 09063001), the HT-29 colon cancer (ATCC code HTB-38), the MCF-7 breast cancer (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen [DSMZ], Braunschweig, Germany; code ACC115), the SKMEL-28 melanoma (ATCC code HTB-72), the CT26.WT colon cancer (ATCC code CRL-2638) and the B16F10 melanoma (ATCC code CRL-6475). The experiment has been carried once with 6 replicates per experimental condition.

Compound **1** was found to exhibit antileishmanial activity (IC_{50} = 16 μg/mL) whereas compound **2** was inactive (IC_{50} > 50 μg/mL). Furthermore, compound **1** exhibited stronger inhibition activity on human cancer cells (IC_{50} = 15 μg/mL) and on murine cell lines (IC_{50} = 10 μg/mL) than compound **2** (IC_{50} > 82 and 42 μg/mL, respectively**)**. As the only difference between **1** and **2** is due to a substitution of an aldehyde group by a hydroxymethyl moiety, these results showed the crucial role of the aldehyde function at C-30 for the cytotoxicity. The possibility remains that this growth inhibitory activity is related to compound **1** and **2** mediated cytotoxic effects on the parasites' host cell itself. One possible explanation previously raised to explain the cytotoxicity of such saponins on macrophages is that saponins are amphiphilic and induce the formation of micelles, which can be easily taken up by phagocytic cells.[27]

Although other triterpenes have been shown to exhibit antibacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, this was not the case for saponins **1** or **2** (IC_{50} > 25 μM). Literature reports that the presence of a carbonyl group at the C-16 position of a triterpene would be crucial to exhibit anti-mycobacterial activity. For example, protoprimulagenin A, bearing a hydroxyl moiety at C-16, displays no antibacterial activity whereas aegicerin, having almost the same structure but with a carbonyl group at C-16, exhibits marked antibacterial activity against a large number of resistant *Mycobacterium* strains.[15]

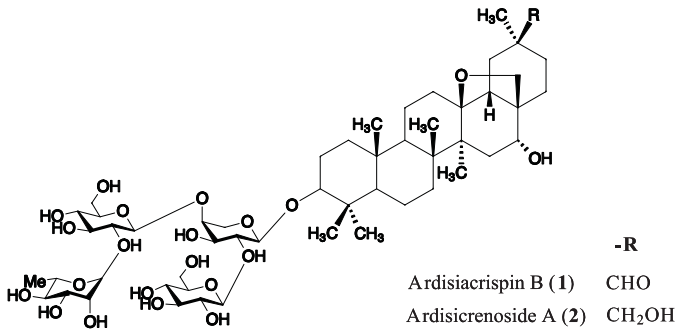


Figure 1. Chemical structures of compounds **1** and **2**.

CONCLUSIONS

- In conclusion, the structures of two known 13,28-epoxy-oleanane triterpene saponins (**1**, **2**) isolated from two Peruvian Myrsinaceae, *Myrsine coriacea* and *Myrsine andina*, were elucidated. This is the first report of saponins isolation from these plants. The present study demonstrated that compound **1** displayed significant anti-tumor activities towards a broad spectrum of human cancer cells. Furthermore, we demonstrated the crucial role of the aldehyde function at C-30 for the cytotoxicity. Further experiments should be carried out in order to investigate their ability to induce apoptosis in different cancer cell lines. These results may be useful in the search for new compounds for cancer prevention and therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the FRB (Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité, France) for the financial support through a grant to Dr. M. Haddad (Project DIPERSAP). The authors thank Rodolfo Vasquez, Rocío Rojas, José Mateo and Juan Perea from the Missouri Botanical Garden of Oxapampa, Peru and Carlos Amasifuen, for their help to collect the plants for this project. We thank Dr. Nicolas Fabre from the University of Toulouse, France, for assistance in obtaining ^{1}H,^{13}C-NMR and MS spectra. We also thank Laetitia Moreno Y Banuls and Robert Kiss, PhD student and Director of Research, respectively, with the Fonds National de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS; Belgium) for performing the biological assays.

REFERENCES

1. Kedzierski L., Sakthianandeswaren A., Curtis J.M., Andrews P.C., Junk P.C., Kedzierska K., *Curr. Med. Chem.* 2009; 599-614.
2. Murray H. W., Berman J. D., Davies C. R., Saravia N. G., *Lancet* 2005, 366. 1561–1577 (2005).
3. Guerin P. J., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S. L., Desjeux P., Wasunna M. K., Brycerson A. D., *Lancet Infect. Dis*. 2002; 494–501.
4. Dye C., Scheele S., Dolin P., Pathania V., Raviglione M. C. *J. Am. Med. Assoc.* 1999; 282, 677-686.
5. Suarez P. G., Watt C. J., Alarcón E., Portocarrero J., Zavala D., Canales R., Luelmo F., Espinal M. A., Dye C. *J. Infect. Dis.* 2001; 184, 473-478.

6. http://www.who.int/cancer/en/
7. (a) Van Wyk B.E., Albrecht C. *J. Ethnopharmacol*. 2008; 119, 620-629. (b) Schreckinger M.E., Lotton J., Lila M.A., de Mejia E.G. *J. Med. Food* 2010; 13, 233-246. (c) Sati S.C., Sati N., Sati O.P. *Pharmacogn. Rev.* 2011; 5, 174-183. (d) Harlev E. , Nevo E., Lansky E.P., Lansky S., Bishayee A. *Anticancer Drugs* 2011, in press.
8. Gonzales G.F., Valerio L.G.Jr. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2006; *6*, 429-444.
9. (a) Cragg G.M., Newman D.J. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 100, 72-79. (b) Newman, D.J., Cragg, G.M. *Future Med. Chem.* 2009; 1, 1415-1427. (c) Pan L., Chai H.B., Kinghorn A.D. *Front Biosci.* 2*012; 4*, 142-156.
10. Germonprez N., Maes L., Van Puyvelde L., Van Tri M., Tuan D.A., De Kimpe N. *J. Med. Chem.* 2005; 48, 32-37.
11. Germonprez N., Van Puyvelde L., Maes L., Van Tri M., Tuan D.A., De Kimpe N. *Tetrahedron* 2004; 60, 219-228.
12. Maes L. Germonprez N. Quirijnen L. Van Puyvelde L. Cos P. Vanden Berghe D. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004a; 48, 2056-2060.
13. Maes L. Vanden Berghe D. Germonprez N. Quirijnen L. Cos P. De Kimpe N. Van Puyvelde L. Antimicrob. *Agents Chemother.* 2004b; 48, 130-136.
14. Vermeersch M. Foubert K. da Luz RI. Van Puyvelde L. Pieters L. Cos P. Maes L. *Phytother. Res.* 2009; 23, 1404-1410.
15. Rojas R., Caviedes L. Aponte J. C., Vaisberg A. J., Lewis W. H., Lamas G., Sarasara C., Gilman R. H., Hammond G.B. *J. Nat. Prod.* 2006; 69, 845-846.
16. Liu D.L., Wang N.L., Zhang, X., Yao X.S. *Helv. Chim. Acta* 2011; 94, 693-702.
17. Zhonghua J., Kazuo K., Taichi O., Muyun N., *Phytochemistry* 1994; 37, 1389-1396.
18. Estevez Y., Castillo D., Pisango T., Arevalo J., Rojas R., Alban J., Deharo E., Bourdy G., Sauvain M., *J. Ethnopharmacol.* 2007; 114. 254–259.
19. (a) Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J., Bokesch H., Kenney S., Boyd M. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990; 82, 1107-1112. (b) Boyd, M.R., Paull, K.D. *Drug Dev. Res.* 1995; 34, 91-109.
20. (a) Dumont P., Ingrassia L., Rouzeau S., Ribaucour F., Thomas S., Roland I., Darro F., Lefranc F., Kiss R. *Neoplasia* 2007; *9*, 766-776. (b) Ingrassia L., Lefranc F., Dewelle J., Pottier L., Mathieu V., Spiegl-Kreinecker S., Sauvage S., El Yazidi M., Dehoux M., Berger W., Van Quaquebeke E., Kiss R. *J. Med. Chem.* 2009; *52*, 1100-1114. (c) Van Goietsenoven G., Hutton J., Becker J.P., Lallemand B., Robert F., Lefranc F., Pirker C., Vandenbussche G., Van Antwerpen P., Evidente A., Berger W., Prévost M., Pelletier J., Kiss R., Kinzy T.G., Kornienko A., Mathieu, V. *FASEB J.* 2010; 24, 4575-4584. (d) Bruyère C., Genovese S., Lallemand B., Ionescu-Motatu A., Curini M., Kiss R., Epifano F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011; *21*, 4174-4179.
21. Apers S., De Bruyne TE., Claeys M., Vlietinck A.J., Pieters L.A., *Phytochemistry* 1999; 52, 1121-1131.
22. Manguro L.O., Okwiri S.O., Lemmen P., *Phytochemistry* 2006; 67, 2641-2650.
23. Massiot G., Lavaud C., Besson V. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1990; 127, 440-445.
24. Boughandjioua N., Lin R. C., Skaltsounis A. L., Seguin E., Tillequin F., Koch M. *Can. J. Chem.* 1992; 70, 1956-1965.
25. Chang X. L., Li W., Jia Z. H., Satou T., Fushiya S., Koike K., *J. Nat. Prod.* 2007; 70, 179–187.
26. Mimaki Y., Yokosuka. A., Hamanaka M., Sakuma C., Yamori T., Sashida Y., 2004. *J. Nat. Prod.* 2004; 67. 1511–1516.
27. Foubert K, Cuyckens F, Matheeussen A, Vlietinck A, Apers S, Maes L, Pieters L., *Phytochemistry* 2011; 72, 1414–1423.

Recibido el 13-08-2012
Aprobado el 06-09-2012

ESTUDIO DE LA DESHIDROXILACIÓN EN EL ÓXIDO FÉRRICO HIDRATADO DENOMINADO LIMONITA

P. R. Palacios[a], L. De Los Santos Valladares[b], A. Bustamante[a], J.C. González[c*]

RESUMEN

Completamos la caracterización del compuesto denominado limonita ($FeO[OH].nH_2O$) mediante el análisis térmico a temperaturas comprendidas desde temperatura ambiente hasta 1000ºC; así como el análisis de la composición química a través de medidas de dispersión de energía de rayos X y el estudio de las bandas de absorción en el infrarrojo en el rango de energías de 600 a 4000 cm^{-1}. Los resultados indican un marcado proceso endotérmico alrededor de 264 ºC, el cual corresponde al cambio de estructura de goetita ortorrómbica (*Pbnm*) a hematita romboédrica ($\overline{R}3c$). Además, se detecta tres puntos de inflexión en la pérdida porcentual de masa a las temperaturas de 50, 190 y 290ºC. Estos cambios están fuertemente relacionados con la deshidroxilación de la fase limonita a goethita, α-FeO(OH), y posteriormente a hematita, α-Fe_2O_3.

Palabras clave: óxido férrico hidratado, espectroscopía infrarroja, análisis termogravimétrico, análisis térmico diferencial.

STUDY OF THE DEHYDROXYLATION IN THE HYDRATED FERRIC OXIDE NAMED LIMONITE

ABSTRACT

We completed the previous characterization of the compound named limonite ($FeO[OH].nH_2O$) with the analysis of thermal behavior at temperatures from ambient to 1000°C, as well as their chemical analysis through the measurements of energy dispersive X-ray and the study in the infrared region in energy range from 600 to 4000cm^{-1}. The results show a sharp endotherm peak around 264°C, it corresponds to the structure change of the orthorhombic goethite (*Pbnm*) to rhombohedra hematite ($\overline{R}3c$) Moreover, we found three inflexion points in the percentage of mass loss at temperatures of 50, 190 and 290°C. These changes are closely related to the deshydroxylation of limonite to goethite, α-FeO(OH), phases and subsequently to hematite, α-Fe_2O_3.

Key words: hydrated ferric oxide, infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, differential thermal analysis.

INTRODUCCIÓN

Los minerales en fase sólida encontrados en los suelos de los andes peruanos están formados mayoritariamente por silicatos y óxidos metálicos[1,2]. Cuando dichos minerales entran en

[a] Laboratorio de Cerámicos y Nanomateriales, Facultad de Ciencias Físicas, UNMSM, Lima 1, Perú.

[b] Laboratório de Supercondutividade e Materiais Avançados, Departamento de Física Universidade Federal de Pernambuco 50670-901, Recife, Brasil.

[c*] Grupo de Investigación de Superficies, Intercaras y Láminas Delgadas, Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla – CSIC – Univ. Sevilla. Calle Américo Vespucio 49, Isla de la Cartuja. 41092 Sevilla, España. e-mail: juanc.gonzalez@icmse.csic.es

contacto con moléculas de agua, se produce en la superficie una activación de la interface sólido-líquido (óxido-agua). El proceso químico consiste en una hidrólisis de las moléculas de agua que dependen del carácter ácido o básico de los átomos superficiales de los óxidos y silicatos. Por lo tanto, los átomos del metal actúan como sitios ácidos de Lewis[3], aceptando electrones, mientras que los átomos de oxígeno actúan como sitios básicos de Lewis, cediendo electrones[3]. De esta manera en la interface sólido-líquido, las moléculas de agua se disocian generando: por un lado los aniones hidroxilo que se unen al metal, por otro lado, los iones de hidrógeno se acoplan a los oxígenos, como se esquematiza en la figura 1(a)-(c) para el caso de la superficie del óxido de silicio, SiO_2. Este proceso da lugar a la hidroxilación de la superficie de los óxidos metálicos y silicatos, en nuestro caso los óxidos férricos hidratados: limonita ($FeO[OH].nH_2O$) y goethita α-FeO(OH). La hidroxilación es una reacción química en la cual se introduce un grupo hidroxilo (OH) en el compuesto (figura 1c). Una vez hidroxilada la superficie del mineral, la humectación o el contacto con el agua produce disociación o protonación de la superficie del óxido y el silicato hidratado, generándose así una carga superficial. Por un lado, en los suelos con pH elevados (pH > 6) ocurre la disociación produciéndose carga negativa en la superficie, por otro lado en suelos con pH ácidos ocurre la protonación y la consiguiente aparición de una carga positiva, tal como es el caso de los suelos afectados por vertidos ácidos de las minas (pH < 3).

Además, es posible retirar los grupos OH de la superficie del compuesto a través de un proceso denominado deshidroxilación. Este proceso es la transformación estructural que conlleva a la destrucción de los grupos OH en la estructura, o a la pérdida del agua en el material cristalino, mediante un proceso de reducción que se puede conseguir a través de un proceso térmico.

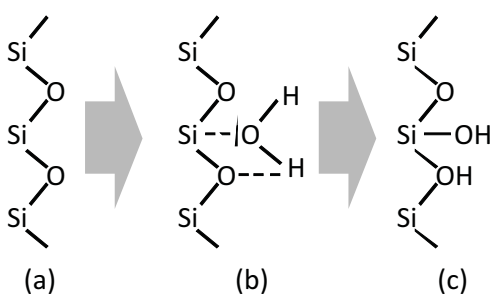


Figura 1. Esquema del proceso de hidroxilación, (a) superficie del óxido de silicio, (b) activación de la superficie con una molécula de H_2O, e (c) hidroxilación de la superficie.

Un buen ejemplo de un mineral naturalmente hidroxilado, es el compuesto denominado limonita, procedente de Taraco[4]. Dicho mineral, de variedad terrosa, perteneciente a la familia de los óxidos férricos hidratados cuya fórmula química es $FeO[OH].nH_2O$[5]. El contenido de moléculas de agua en este mineral proviene por adsorción o capilaridad a través de los poros o grietas de los granos; esto, debido a la exposición del mineral a un lugar húmedo o con mucha humectación, como clima lluvioso, cercanía de un río y presencia de neblina. Las potenciales aplicaciones industriales de la limonita se encuentran, por ejemplo, en pigmentos, recubrimiento cerámico, cosméticos, así como materia prima para la obtención de hierro. En todos estos casos interviene un proceso térmico y por ende la pérdida directa de grupos

hidroxilos (OH). Por lo tanto, es muy pertinente conocer su comportamiento a través de un análisis térmico, preferiblemente desde la temperatura ambiente hasta 1000ºC; así como también detectar las bandas de absorción en el infrarrojo de los óxidos férricos hidratados o anhidros a temperatura ambiente. En este trabajo se presenta dichos análisis los cuales son complementarios a su caracterización estructural reportados anteriormente[4].

PARTE EXPERIMENTAL

La muestra de limonita bajo estudio es la misma que se utilizó en el análisis estructural[4]. Las micrografías se obtuvieron a través de un microscopio electrónico de barrido (MEB) Phillips XL30, el cual tiene acoplado un detector de dispersión de energías de rayos X (EDX). Las medidas de absorción en el infrarrojo se realizaron a temperatura ambiente en un espectrofotómetro JASCO FT-IR-6200 en configuración de reflexión total atenuada. Los análisis de termogravimetría (ATG) y térmico diferencial (ATD) se realizaron en un analizador térmico simultáneo TG/ATD/CDB/TA Instruments Q600 bajo una atmósfera reactiva de aire. Se utilizó 14,41mg de muestra, la cual fue analizada en el intervalo de temperatura ambiente a 1000ºC, utilizando una razón de calentamiento de 10ºC por minuto. Para la obtención del termograma por ATD se aplicó el método estándar el cual consiste en usar uno de los dos crisoles de alúmina como referencia respecto al otro que contiene la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 2 muestra la imagen por MEB donde se observa el carácter granular de la muestra. Al retirar la muestra del haz de electrones no se observó ninguna transformación cromática del color amarillo característico de la fase limonita. Se observa, además, en la figura 2 la elección de cuatro partículas denotadas por las letras A, B, C y D a las cuales se realizó un análisis químico por dispersión de energía de rayos X. El tamaño de las partículas está en el orden de las micras a centenas de micras.

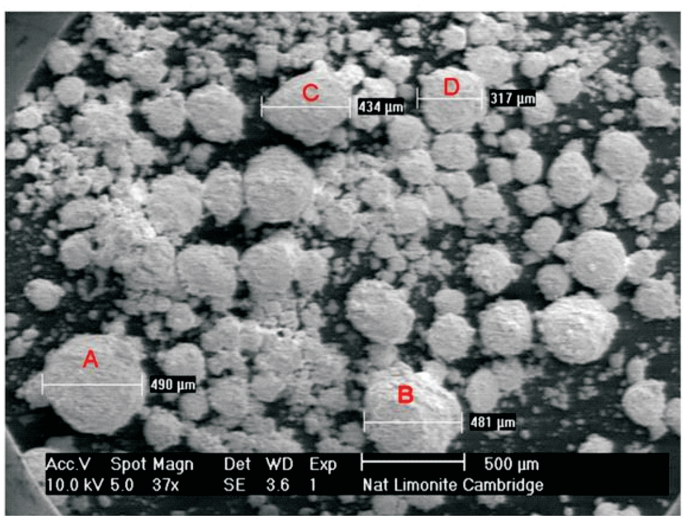


Figura 2. Micrografía por MEB de la muestra limonita.

Por otro lado, en la figura 3 se presenta los espectros de dispersión de energía de rayos X en el rango comprendido entre 0 a 7eV. Se observa claramente las señales de los elementos químicos Fe, O y Si, así como también una señal débil de aluminio (Al~1,5eV) que proviene de la alúmina (Al_2O_3) como impureza. Ésta señal se encuentra en el límite de detección del equipo. Las figuras 3(a)-(d) corresponden a los espectros de EDX de los granos A-D de la figura 2, respectivamente. Además, la figura 3(e) es el espectro de EDX correspondiente a toda la muestra bajo el haz de electrones a baja magnificación (37x).

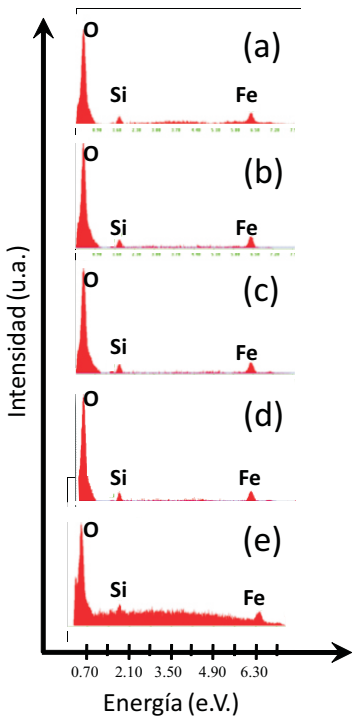


Figura 3. Espectros de Energía de Dispersión de Rayos X. (a)-(d) Para los granos mostrados en la figura 2, y (e) espectro completo de toda la muestra de la imagen de MEB.

La cuantificación de los elementos que componen el compuesto a través de su porcentaje en peso, como también atómico, se muestran en la tabla 1. Se puede observar que la mayor proporción se encuentra en los átomos de Fe y O, los cuales son los componentes principales del óxido férrico hidratado ($FeO[OH].nH_2O$). Además, estos átomos de Fe y O representan un 96% en peso del compuesto, resultado que era de esperarse por ser la limonita un óxido férrico hidratado. También la detección de la señal de silicio está en clara concordancia con los resultados[4] de difracción de rayos X donde se detectó trazas de SiO_2.

Tabla 1. Cuantificación de los elementos analizados por EDX.

Elemento	% Peso	% Atómico
Fe	64,89±1,20	35,62±0,99
O	31,59±0,69	60,52±0,66
Si	3,05±0,18	3,32±0,17

La figura 4 presenta el espectro de absorción en el infrarrojo. Los enlaces OH son muy fáciles de observar en el infrarrojo y nos servirán para caracterizar las bandas de absorción. Por encima de 1200cm^{-1} se detecta las bandas correspondientes a las moléculas de agua, las cuales se manifiestan a ~1600 cm^{-1} (δOH) y ~3100cm^{-1} (νOH) debido a la presencia de nH_2O moléculas que contiene el óxido férrico hidratado. La banda a 3100cm^{-1} es atribuible a la fuerte interacción que ocurre entre los hidroxilos de la limonita. Además, se observa la señal característica de CO_2 en ~2300cm^{-1} donde podemos argüir que dicha banda puede ser originada por el CO_2 circundante de la atmósfera (pues las medidas no se realizaron en vacío); u originadas por burbujas de CO_2 atrapadas entre los poros o grietas de los granos. Para poder descartar la presencia de CO_2 se necesita realizar la medida en vacío.

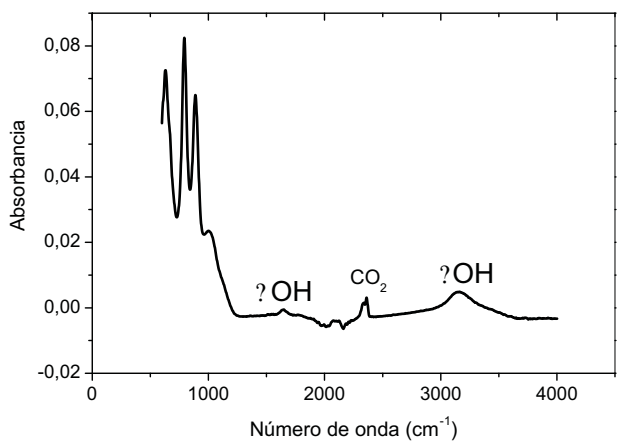


Figura 4. Espectro de absorción de la limonita mediante la espectroscopía FT-IR.

Por otro lado, las bandas correspondientes a los óxidos de hierro hidratado y anhidro se pueden observar a frecuencias por debajo de 1200cm^{-1}, las cuales se muestran en el ajuste realizado con gaussianas en la figura 5, y se encuentran descritos en la tabla 2. Notamos principalmente las bandas pertenecientes a la fase goetita[6] (α-FeO(OH)) con su vibración del enlace Fe-O en modo *stretching* (tensión) a 630cm^{-1}, y dos vibraciones de los enlaces Fe-O-H en modo *bending* (flexión) a 793 y 885cm^{-1}, además de la fase hematita[6] (α-Fe_2O_3) cuyas vibraciones del enlace Fe-O se presenta a 665 y 838cm^{-1}; también se observa la existencia de la fase maghemita[7] (γ-Fe2O3) con vibración del enlace Fe-O a 729cm^{-1}; sin embargo, es posible

que el hombro por debajo de la frecuencia de 630cm^{-1} el cual le hemos atribuido a la presencia de la fase magnetita[8] (Fe_3O_4) por su banda a 590cm^{-1}, quizás sea también una banda correspondiente a la fase maghemita la cual también se presenta a 590cm^{-1}, debido a que las medidas empiezan a la frecuencia de 600cm^{-1}. Además, la existencia de un hombro a 1120cm^{-1} correspondiente al cuarzo[9] (SiO_2) por su vibración Si-O-Si implica que éste se encuentra en forma libre y no está unida a la estructura de la limonita. Finalmente, los resultados obtenidos por la espectroscopía infrarroja son congruentes con los resultados obtenidos por EDX de la tabla 1.

Aunque en nuestro trabajo previo[4] no se detectó trazas de las fases α-Fe_2O_3, Fe_3O_4 y/o γ-Fe_2O_3 por difracción de rayos X ni por la espectroscopía μ-Raman a temperatura ambiente, estos nuevos resultados obtenidos por espectroscopía infrarroja no están en discordancia, por lo cual podemos argüir que dichas fases muy probablemente se encuentren como impurezas en el compuesto limonita, pero cabe mencionar dos situaciones: por una parte las posibles cantidades de material de dichos compuestos están por debajo del límite de detección de la difracción de rayos X, cuya resolución es del orden de milímetros. Por otro lado, la espectroscopía micro-Raman es una técnica espectroscópica con una resolución de micras y la intensidad de la señal Raman está directamente relacionada con el volumen de muestra que produce el esparcimiento Raman; entonces el tamaño de los dominios de las fases anteriormente expresadas sean de un orden mucho menor a las micras no siendo posible su detección al caer en el límite de detección de la técnica. Por lo tanto, hemos explotado la sensibilidad de la espectroscopía infrarroja a las vibraciones de los enlaces metal-oxígeno en la caracterización de los óxidos férricos hidratados y anhidros para complementar la caracterización del compuesto limonita.

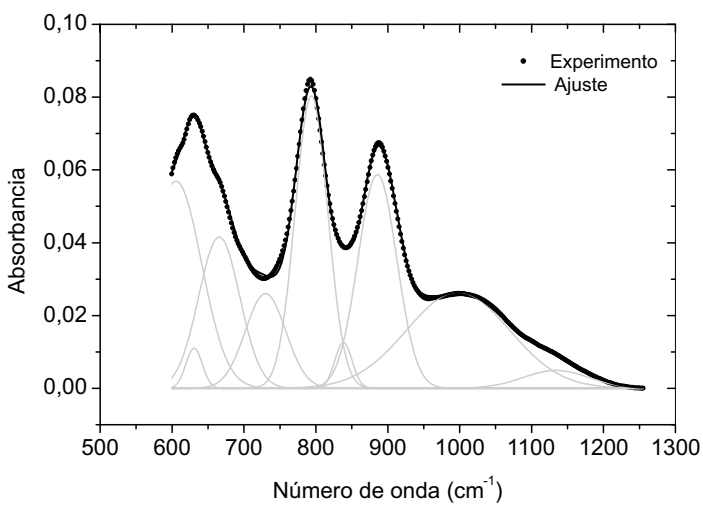


Figura 5. Espectro de absorción ajustado en el rango de 600 a 1250cm^{-1}.

Tabla 2. Resultado del ajuste del espectro de infrarrojo

Compuesto	Frecuencia (cm^{-1})	Vibración	Referencia
Fe_3O_4	605	Fe-O	8
α-FeO(OH)	630	Fe-O	6
α-Fe_2O_3	665	Fe-O	6
γ-Fe_2O_3	729	Fe-O	7
α-FeO(OH)	793	Fe-O-H	6
α-Fe_2O_3	838	Fe-O	6
α-FeO(OH)	885	Fe-O-H	6
α-Fe_2O_3	1000	Fe-O	6
SiO_2	1120	Si-O-Si	9

En la figura 6 se presenta los análisis térmicos- gravimétricos y diferencial. El análisis termo-gravimétrico (ATG) muestra una pérdida total de peso de aproximadamente 13% hasta los 1000ºC. Se ha dividido la curva de ATG en cuatro partes, representando la parte (i) el inicio de la deshidroxilación con la pérdida de moléculas de agua en la superficie o grietas de la fase limonita convirtiéndose a la fase goethita con una inflexión en la curva a 50ºC. La parte (ii) se interpreta como una continua deshidroxilación de la fase goethita por la pérdida continua de agua retenida por capilaridad en los poros con una segunda inflexión a 190ºC. La parte (iii) revela la transformación de fase de la estructura goethita a la estructura hematita con una tercera inflexión a 290 ºC en clara concordancia con los resultados[4] de difracción de rayos X y μ-Raman. Finalmente, la parte (iv) nos muestra la fase hematita con una señal que no se estabiliza por el reordenamiento o movilidad de los átomos de oxígeno en la estructura en el rango de 300 a 1000ºC, lo cual se traduce en un ensanchamiento del perfil de la hematita[10] en la difracción de rayos X. Asimismo, en la curva del análisis térmico diferencial (ATD) exhibe un doble pico en correspondencia con el proceso de deshidroxilación y un posterior decrecimiento lineal del peso hasta los 1000ºC.

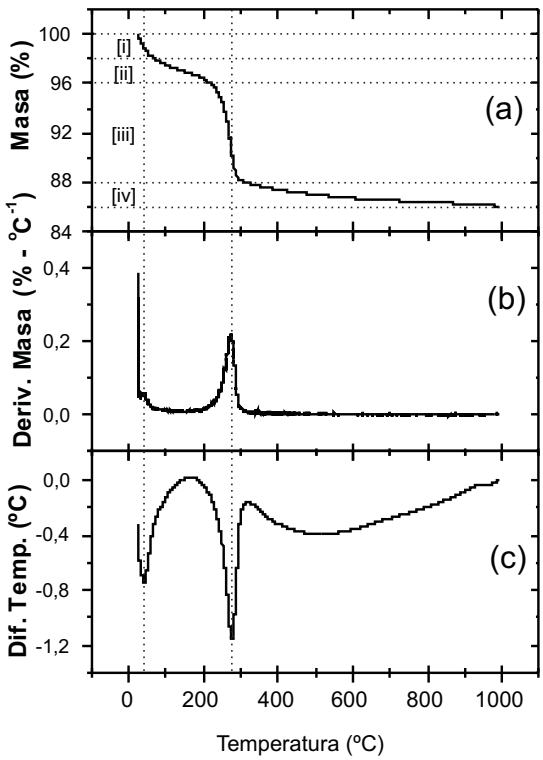


Figura 6. (a) Curva termo-gravimétrica, (b) derivada de la curva TG, y (c) análisis térmico diferencial (ATD).

Además, debemos señalar que en la curva de ATD se muestra un intenso pico endotérmico entre 210 y 300ºC y otro menor entre 30 y 60ºC. El pico más intenso representa la deshidroxilación de la fase goethita para formar la hematita, mientras el primero es la transformación total de la limonita en goethita. La temperatura de descomposición del pico se ha encontrado a 264ºC con una pérdida en peso en el ATG de ~ 8%. Entonces como resultado del proceso de deshidroxilación del compuesto limonita se produce la destrucción de los grupos OH en la estructura y su posterior transformación estructural de la fase goethita con grupo espacial ortorrómbico (*Pbnm*) a la fase hematita de grupo espacial romboédrico[11] ($\overline{R}3c$), por lo cual proponemos las ecuaciones (1) y (2) que describen la deshidroxilación de la fase limonita y la fase goethita, respectivamente, convirtiéndose posteriormente en la fase α-Fe_2O_3.

$$\alpha FeO(OH).nH_2O \xrightarrow{\Delta} \alpha FeO(OH) + nH_2O \uparrow \qquad (1)$$

$$2\alpha FeO(OH) \xrightarrow{\Delta} \alpha Fe_2O_3 + H_2O \uparrow \qquad (2)$$

Esta pérdida de los enlaces de agua se traduce entonces en un incremento en la porosidad, área superficial y densidad, esta última reflejada en la tabla 3. Por lo tanto, durante el proceso de deshidroxilación de la limonita (goethita) además de producirse la pérdida de los grupos OH, se incrementa la porosidad, área superficial, y finalmente un incremento en la densidad del material.

Tabla 3. Densidad de los elementos bajo estudio.

Compuesto	Densidad(g/cm^3)	Referencia
Limonita	3,65	5
Goetita	4,26	12
Hematita	5,26	13

La temperatura de descomposición de la fase goethita encontrada en este trabajo (264ºC) es menor en comparación con los reportados por Schwertmann[14] a 385ºC, Swany[15] a 337ºC y F. O'Connors[16] a 300ºC, indicando que el tamaño de partículas es menor a las másicas. Esto es debido a que los valores altos de temperaturas de descomposición está asociada con la calidad de la fase, es decir, una fase goethita altamente cristalina. La detección de una menor temperatura de descomposición encontrada en este estudio es indicativa de una pobre estructura cristalina de la fase goethita por el continuo proceso de deshidroxilación.

CONCLUSIONES

- El análisis elemental de EDX-MEB confirma la presencia de hierro, oxígeno y silicio, en menor medida aluminio (1,5eV), señal que proviene de la alúmina (Al_2O_3) como impureza en el compuesto, además del SiO_2. Los cambios por proceso térmico del óxido férrico hidratado a un óxido férrico anhidro han sido revelados a través de un fuerte proceso endotérmico cuyo máximo se encuentra a 264ºC. Los resultados del análisis térmico nos han permitido proponer ecuaciones que describen cualitativamente el proceso de deshidroxilación. El proceso de deshidroxilación del compuesto limonita va acompañado de una transformación de fase, aumento de la porosidad y un incremento de la densidad del óxido férrico.

AGRADECIMIENTO

A. Bustamante agradece a la Ing. Julieta Cabrera por las muestras cedidas. L. De Los Santos Valladares agradece al Programa Nacional de Pos-Doctorado CAPES- PNPD/2011 de Brasil. Finalmente, JC González agradece al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España) por su contrato JAE-Doc (2009-2012) en el Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla – CSIC – Universidad de Sevilla.

BIBLIOGRAFÍA

1. Xavier Domènech, José Peral P. Química ambiental de sistemas terrestres. Cap. 2. Pág. 39. Ed. Reverté S. A. 2006.
2. Martín Cantera C, Córdoba García R, Jane Julio C, Nebot Adell M, Galán Herrera S, Aliaga M et. al. *J Am Chem Soc* 1997; 109 (19): 744-748.
3. Trujillo C, Peña V. *Rev. Inv. Fis. 2000; 3: 32*
4. Smart L, Moore E. Química del estado sólido: una introducción. Cap.5, pág. 191. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana. 1995.
5. Palacios P R, Bustamante A, González J C. *Rev. Inv. Fis*. 2010; 13: 101302102.
6. Mollfulleda Borrell J. Minerales: descripción y clasificación. Pag. 247. Ed. Omega S.A. 1996.
7. Zic M, Ristic M, Music S. *J. Mol. Struct*. 2007; 834-835: 141.
8. Janzen C, Roth P, Rellinghaus B. J. *Nanoparticle Res. 1999; 1: 163.*
9. Shu Z, Wang S. *Journal of Nanomaterials. doi:10.1155/2009/340217.*
10. Klevenz M, Wetzel S, Möller M, Pucci A. *Appl. Spect*. 2010; 64: 298.
11. Pourghahrani P, Forssberg E. *Int. J. Miner. Process* 2006; 79: 106.
12. Blake R L, Hessevick R E, Zoltai T, Finger L. *Am. Mineralogist* 1966; 51: 123.
13. Powder Diffraction File 01-081-0464
14. Powder Diffraction File 01-086-2368
15. Schwertmann U, Schulze D G, Murad E. *Soil Sci. Soc. Am. J*. 1982; 46: 869.
16. Swany Y K, Kar B B, Mohanty J K. *Hydrometallurgy* 2003; 69: 89.
17. O´Connors F, Cheung W H, Valix M. *Int. J. Miner. Process* 2006; 80: 88.

Recibido el 05-06-2012
Aprobado el 06-09-2012

ESTUDIO DE SAPOGENINAS ESTEROIDALES DE ESPECIES PERUANAS DEL GÉNERO DIOSCOREA

Holger J. Maldonado García[a,b], Enrique G. Guzmán Lezama[a,b*],
Sabino Márquez Cabezas[a], Alfredo Tupayachi[c], Joaquina Albán[d]

RESUMEN

Las especies peruanas del género Dioscorea, pueden ser utilizadas como fuente de sapogeninas, a partir de las cuales se sintetizan hormonas esteroidales.

Se emplearon rizomas frescos, procedentes de muestras recolectadas de diferentes localidades de los departamentos de San Martín, Loreto, Ucayali y Cusco. Estos fueron sometidos a procesos de licuación, hidrólisis ácida, a partir de la cual se obtiene un residuo insoluble, el que se sometió a extracción con éter de petróleo a 60 – 70ºC, obteniéndose cristales de color blanco. Éstos fueron separados y purificados por cromatografía en capa fina y en columna de sílica gel.

El porcentaje de sapogeninas no fue mayor al 2%, y por sus propiedades físico-químicas, y sus espectros de IR, RMN - ^{1}H y de masas, se concluye que el compuesto obtenido corresponde a diosgenina.

Palabras clave: Dioscorea, sapogeninas, diosgenina, cromatografía, espectros.

STEROIDAL SAPOGENINS STUDY OF PERUVIAN SPECIES OF THE GENUS DIOSCOREA

ABSTRACT

The peruvian species of genus dioscorea may be used as a source of sapogenins from which the steroid hormones are synthesized.

The fresh rhizonce used coming from samples croped from different places of San Martin, Loreto, Ucayali and Cuzco regions. They were put in liquefaction process and acid hydrolysis, and starting from that is obtained and insoluble residue; which is subjected to extraction with petroleum ether at 60 -70ºC getting finally white crystales. After that they were separated and purified by fine layer cromatographic and in silice gel column.

The percentage of sapogenins was not greater then 2% and in according of its physicochemical propierties and IR, ^{1}H-NMR and mass spectra on deduced that the obtained compound is a diosgenin.

Key words: Dioscorea, sapogenins, diosgenin, cromatography, espectra.

INTRODUCCIÓN

En el Perú, la investigación de los recursos vegetales constituye un reto para nuestro desarrollo, como: la búsqueda de materias primas de alto contenido en proteínas para la

[a] Sección de Química, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima 31.
[b] Facultad de Quim. e Ing. Quim., Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima 1.
[c] Museo de Historia Natural - Universidad San Antonio de Abad del Cusco.
[d] Museo de Historia Natural Javier Prado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
[*] enrique.guzman@upch.pe

alimentación, fuente de colorantes, antioxidantes, repelentes e insecticidas naturales, de principios de actividad anticonceptiva; todo esto, ligado a una larga tradición cultural donde el uso artesanal de esta riqueza vegetal y la medicina tradicional ocupan un lugar importante en el mantenimiento del bienestar y del estado de salud de nuestra población. De estos recursos el género Dioscorea, familia Dioscoreaceae, es una fuente de sapogeninas esteroidales que se encuentran en la planta como saponinas. La diosgenina es un precursor de muchos esteroides de actividad farmacológica y es obtenida comercialmente de dioscorea; entre las 600 especies conocidas de dioscorea, se encontró que las más promisorias eran: *D. spiculiflore* (México), *D. mexicana* (México), *D. floribunda* (México), *D. composita* (México y Guatemala), *D. tokoro* (Japón), *D. balcánica* (Europea), *D. belizensis* (América Central), *D. deltoidea* (India) y *D. prazeri* (India). [1,2]

En el Perú existen alrededor de 52 especies descritas desde el punto de vista botánico, las cuales son reportadas, desde el punto de vista químico, dos especies*: D. stelgenienia* y *D. decorticans*[3,4] .

En los estudios realizados sobre sapogeninas esteroidales, la diosgenina es la más ampliamente usada en la industria de anticonceptivos; fue descubierta en 1936 por Fujii y Matsukawa[5], pero fue recién en 1943 que Russell E. Maker y colaboradores descubren el potencial de las sapogeninas extraídas de plantas para la semisíntesis de estas hormonas[2] .

Esta investigación está orientada al estudio fitoquímico de las especies silvestres del género Dioscorea como fuente de sapogeninas esteroidales, que posteriormente podría contribuir al desarrollo socio-económico de una determinada región, donde se podrían cultivar las especies seleccionadas que tengan valor comercial.

Estudio botánico del género *Dioscorea linneo*

Las especies del género Dioscorea son conocidas en diferentes países con denominaciones diversas, tales como "ñames", "iñames" y "yan"; en nuestro país una especie comestible, *D. trífida* se conoce con el nombre de "Sachapapa", "cosh-cush yam". Este género tiene muchas especies, la mayoría tropicales y varias distribuidas en áreas subtropicales e incluso existen unas pocas especies alpinas. Las especies tropicales crecen en forma silvestre, tanto en África, Asia y Oceanía como en América[6] .

De las 52 especies peruanas de dioscorea[7], se han estudiado 22, de las cuales sólo se han identificado 16 especies (tabla 1), cuya posición sistemática es la siguiente: división: Fanerógamas; subdivision: Angiospermas; clase: Monocotiledóneas; orden: Liliales; género: Dioscorea.

PARTE EXPERIMENTAL

Identificación de las especies de dioscorea

Las especies fueron identificadas por la bióloga Joaquina Alban del Museo de Historia Natural Javier Prado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos y el biólogo Alfredo Tupayachi del Museo de Historia Natural, Universidad San Antonio de Abad del Cuzco.

Determinación del contenido de sapogeninas esteroidales

Los principios de esta técnica se basan en los procesos de maceración, hidrólisis y extracción.

Método de extracción

Las raíces de las muestras se cortaron en trozos pequeños y se maceraron con un peso igual de agua en una licuadora por 5 minutos. Se tomaron 100 gr. de muestra macerada, se colocaron en una cápsula de porcelana de 250 ml y se llevó a una estufa a 100 (±2)°C, durante 12 horas para la determinación del peso seco. Una segunda muestra macerada de 100 gr es utilizada para la

hidrólisis, colocándola en un balón de 500 ml al que se adicionaron 115 ml de solución de HCl 3 ,5 N hasta obtener una normalidad final de entre 1 ,9 – 2 ,1N. La mezcla se hirvió a reflujo durante 4 horas, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó 250 ml de solución de bicarbonato de sodio 1 ,9 N poco a poco hasta neutralidad; se filtró la mezcla al vacío en un embudo Buchner, el residuo sólido que quedó se lavó de 8 a 10 veces con volúmenes de 50 ml de agua destilada, y luego, el residuo se secó en una estufa entre 65 – 75 (± 2)°C durante 12 horas o a 105ºC durante 4 horas. El residuo se colocó en un cartucho de papel filtro, el cual se introdujo en el interior de un extractor Soxhlet de 100 ml de volumen, realizándose la extracción con éter de petróleo, durante 20 horas a una temperatura de 60 – 79°C, recibiendo la solución en un balón de 125 ml. Terminada la extracción, el volumen de solvente se redujo a 10 ml y se dejó reposar a temperatura ambiente por varias horas, obteniéndose de este modo cristales de color blanco o blanco amarillento, que fueron lavados con éter frío, secados y recristalizados en acetona.

Método de separación y purificación cromatográfica

Cromatografía preparativa de capa fina

El extracto crudo de sapogeninas obtenido se examinó por cromatografía preparativa en cromatofolios y cromatoplacas de sílica gel 60 (0 ,25 mm de espesor), utilizando diferentes mezclas de solventes, obteniéndose una buena separación con la mezcla de solventes cloroformo – etanol (99 : 1 v/v). Los componentes del extracto crudo de sapogeninas fueron localizados en el cromatograma por aspersión con una solución de ácido sulfúrico al 50% y calentando a 100ºC hasta desarrollo del color característico. También se usó como revelador una solución de tricloruro de antimonio en cloroformo, y el reactivo de Lieberman – Burchard (con calentamiento a 110ºC).

Cromatografía analítica de capa fina

Los componentes del extracto crudo fueron separados por cromatografía analítica de capa fina en cromatofolios de sílica gel 60 F_{254} (espesor 0 ,2 mm) y en cromatoplacas de sílica gel 60 F_{254} con zona de concentración, usando como mezcla de solventes cloroformo-etanol (99 : 1 v/v). Las bandas de los diferentes componentes del extracto crudo de sapogeninas fueron localizadas en el cromatograma con luz utravioleta, y separados en forma independiente.

Cromatografía en columna

Se empleó la cromatografía en columna para la purificación completa de los diferentes componentes del extracto crudo de sapogeninas, previamente separadas por cromatografía analítica de capa fina. Se utilizó dos columnas de vidrio: una de 15 mm de diámetro interno por 60 cm de longitud, y otra de 16 mm de diámetro interno por 75 cm de longitud, empacadas con sílica gel 60 (partículas de 0,2 – 0,5 mm, 30 – 70 mesh ASTM), y usando como eluyente la mezcla cloroformo – etanol (99: 1 v/v).

Las muestras se aplicaron disueltas en cloroformo en volúmenes de 0,5 – 2 ml, y se eluyó con la mezcla ya mencionada a una velocidad de 20 gotas por minuto. Se recolectaron 120 fracciones de 2 ml cada una, en un colector de fracciones. La pureza de cada fracción recolectada se verificó por cromatografía analítica de capa fina.

Identificación espectroscópica

Para la identificación y determinación estructural de la diosgenina se utilizaron los siguientes equipos espectroscópicos:

Espectrofotómetro infrarrojo Perkin Elmer 577: laboratorio de química de la Pontificia Universidad católica del Perú.

Espectrómetro de resonancia magnética nuclear de 300 MHz Bruker: departamento de química de la Universidad de Nottingham - Inglaterra.

Espectrómetro de masa MM7070E: departamento de química de la Universidad de Nottingham - Inglaterra.

RESULTADOS Y DISCUCIÓN

Determinación del porcentaje de peso seco:
El porcentaje de peso seco de los rizomas de las especies del género Dioscorea, se determina de la siguiente manera:

$$\% \ p_{ms} = \frac{(p_{mh} - h)}{p_{mh}} \times 100$$

p_{mh} : Peso de la muestra húmeda
h : Peso de agua
p_{ms} : Porcentaje de peso seco de la muestra

Determinación del porcentaje de sapogeninas esteroidales
El porcentaje en peso del contenido de sapogeninas esteroidales extraídas de los rizomas de las especies del género Dioscorea, se calcula de la siguiente manera:

$$\% \ se = \frac{p_{so}}{p_{ms}} \times 100$$

se : sapogeninas esteroidales.
p_{so} : peso de sapogenina obtenida.
p_{ms} : peso de muestra seca

En los estudios cromatográficos de extractos de sapogeninas esteroidales se aislaron dos fracciones, una de un punto de fusión de 61ºC (la cual no fue estudiada), y otra de 204 - 207ºC que dio una coloración rosada con el reactivo de Lieberman – Burchard característico del anillo ciclopentanofenantreno de las sapogeninas esteroidales (tabla 2).

Espectro IR
cm^{-1} : 3400, 2920, 1630, 1440 – 1450, 1370, 1240 – 1250, 1040 – 1060, 975, 900, 790 – 870.

Espectro ^{1}H-RMN
ppm : 0,79 (singulete), 0,79 (doblete) J 6 ,0 Hz , 0,97 (doblete) J 7,0 Hz, 1,03 (singulete), 3,37 (triplete), J 10,9 Hz, J grande, J grande 3,45 (doblete, doblete, doblete), J 10,9 Hz, J 4,0 Hz, J 1,5 Hz, 3,50 (multiplete), 4,41 (cuadruplete), J 7,5 Hz 5.35 (doblete), J 5,2 Hz

Espectro de masas $C_{27}H_{42}O_3$
Masa molecular espectroscópica: 414,3134; Masa molecular experimental: 414,3078
Masa (m/z) - % Intensidad relativa: 414 (5,87%), 342 (16,37%), 300 (21,54%), 282 (44,28%), 271 (26,62%), 139 (100,00%) .

Tabla 1. Presencia de sapogeninas esteroidales por especies de acuerdo a la zona, hábitat y ecología

Especie	Zona de recolección	Hábitat y ecología	Presencia de sapogeninas esteroidales
1. *Dioscorea acantogene Rusby*	Dist. Zapatero Prov. Lamas Dpto. San Martín	En relieve inclinado. Bosque secundario en regeneración.	Negativo
	Dist. Zapatero Prov. Lamas Dpto. San Martín	Bosque secundario en regeneración, 10 años.	Negativo
2. *Dioscorea trifida L.*	Dist. Calzada Prov. Moyobamba Dpto. San Martín	Planta cultivada en área experimental del CIPA.	Negativo
	Prov. Pucallpa Dpto. Ucayali	Planta cultivada	Negativo
3. *Dioscorea rumicoides* Grises	Próximo al río Cumbaza. Dist. Tarapoto Prov. San Martín Dpto. San Martín	Bosque secundario. Bordes de caminos. Suelos arenosos. Relieve plano. Bosque seco tropical.	Negativo
4. *Dioscorea syringitolia* Kuntl y Scham	Dist. Cusco Prov. Huallaga Dpto. San Martín	Bosque seco tropical.	Negativo
5. *Dioscorea samydea* Marth ex. Grises	Caserío Barranca Prov. Huallaga Dpto. San Martín	Bosque secundario en regeneración, 10 años.	Positivo
	Queb.Aguashiyacu Prov. San Martín Dpto. San Martín	Bordes de camino	Positivo
	Queb. Valencia Prov. Huallaga Dpto. San Martín	Bordes de camino Bosque seco tropical. Bosque secundario en regeneración.	Positivo
	Dist. Caspizapa Prov. San Martín Dpto. San Martín	Bosque en regeneración.	Positivo
6. *Dioscorea dodecanura* Vell	Queb. Tioyacu Caserío Barranca Prov. Huallaga Dpto. San Martín	Bordes de camino a la quebrada de Tioyacu	Negativo
7. *Dioscorea amarantoides* Pres1 var. *Decorticans* (Press1) Uline	Colina Zapatero Dist. Zapatero Prov. Lamas	Bosque secundario en regeneración por 5 años y en ladera de colina. Zona de vida: Bosque seco tropical.	Positivo

sigue ...

... viene

8. *Dioscorea amarantoides* Pres1. var. Pendula	Queb. Valencia a 5 km. Bellavista Prov. Huallaga Dpto. San Martín	Bordes de camino Bosques secundarios en regeneración por 5 años. Bosque seco tropical.	Positivo
9. *Dioscorea aff glandulosa* Klasts ex. Knuth	Loc. Pucalobo Dist. Banda de Shilcayo Prov. San Martín Dpto. San Martín	Bordes de camino Bosque seco tropical	Positivo
10. Dioscorea aff moyobambensis Knuth	Loc. Pucalobo Dist. Banda de Shilcayo Prov. San Martín Dpto. San Martín	Bordes de camino Bosque seco tropical	Positivo
11. Dioscorea amarontoides Pres1 var. Cruminifera	Loc. Pucalobo Dist. Banda de Shilcayo Prov. San Martín Dpto. San Martín	Bordes de camino Bosque seco tropical	Positivo
12. Dioscorea sp (1) (material botánico escaso)	Loc. Pucalobo Dist. Banda de Shilcayo Prov. San Martín Dpto. San Martín	Bordes de camino Bosque seco tropical.	Negativo
13. Dioscorea sp (2) (material botánico escaso)	Caserío Barranca Prov. Huallaga Dpto. San Martín	Bosque seco tropical.	Negativo
14. Dioscorea sp (3) (Ferruño)	Comunidad Witota de Pucarquillo Prov. Iquitos Dpto. Loreto	Bosque tropical de suelo arenoso arcilloso	Positivo
15. Dioscorea monodelpha Griebs	Valle Pumahuanca Prov. Urubamba Dpto. Cusco	Vegetación de monte arrollada en asociaciones de rapanea.	Negativo
16. Dioscorea sp (4)	Prov. Pucallpa Dpto. Ucayali	Bosque seco tropical, zona de cultivo.	Negativo
17. Dioscorea sp (5)	Prov. Yurimaguas Dpto. Loreto	Bosque seco tropical	Positivo
18. Dioscorea aff vargassi	Vía Cusco– Calce - Urubamba Localidad Valle de Huaraz. Dpto. Cusco	Debajo de rocas, voluble en cardiospermun, suelos 2930 m.s.n.m.	Negativo

sigue ...

... viene

19. *Dioscorea coríacea H.*	Localidad: Estación Biológica De Hiuñay – Huayna Camino Al Complejo Arqueológico de Huiñay – Huayna Santuario Histórico de Machu-Picchu. Prov. Urubamba Dpto. Cusco	Bosque húmedo voluble entre chasquea y olira. Altitud; 2700 msnm	Positivo
20. *Dioscorea bulbigera L.*	Localidad: Inmediaciones de Aranjuez a 7 km. de la ciudad de Quillabamba. Prov. La Convención. Dpto. Cusco	Voluble en cafetales, llegando de 2,5 a 3 m.	Positivo
21. *Dioscorea incayensis*	Localidad: Intipunco y Huiñay Guayana– Camino Inca Santuario Histórico de Machu – Picchu. Prov. Urubamba Dpto. Cusco	Suelos humosos al borde de bosque húmedo. Altitud: 2550 m.s.n.m.	*
22. *Dioscorea sp* (6)	Localidad: Pueblo De Aguas Calientes, vía Cusco – Quillabamba. Dpto. Cusco.	Suelos humosos entre roquedales tubérculos de 0,30 m. de profundidad, voluble en miconia.	Positivo

* El material recolectado no fue suficiente para realizar el análisis químico.
sp: Especie no identificada

Tabla 2. Resultados del análisis físico - químico

Especie	**% Humedad**	**% Muestra seca**	**% Sapogeninas esteroidales**
D. acanthogene Rusby	87,18	12,82	--
D. trifida L.	83,35	16,65	--
D. rumicoidea Grises	85,58	14,42	--
D. syringifolia Knuth y Shan	86,38	13,62	--
D. dodecaneura Vell	89,13	10,87	--
D. monodelpha Griebs	93,92	6,08	--
D. samydea Perth ex Grises	74,64	25,36	0,6488
D. amarantoides Pres1	84,68	15,32	0,8740

sigue ...

... viene

var. Pendula (Poepping) Knuth			
D. aff. glandulosa	47,70	52,30	1,0615
Klartz ex Knuth			
D. amarantoides Pres1	84,91	15,09	1,7484
D. amarantoides Pres1	88,20	11,80	1,7520
var. decorticans			
(Pres1) Uline			
D. aff. Moyobambensis	62,00	38,00	1,8431
Knuth			
D. aff. Vargasssi	93,92	6,08	--
D. coriacea	95,53	4,47	0,7824
D. bulbigera	86,65	13,35	0,4643
D. incayensis Knuth	*	*	*
D. sp. (1)	86,12	13,88	--
D. sp. (2)	82,37	17,63	--
D. sp. (3)	87,01	12,99	2,0210
D. sp. (4)	86,45	13,55	Positivo
D. sp. (5)	83,67	16,33	0,0850
D. sp.(6)	86,32	13,43	1,0805

* El material recolectado no fue suficiente para realizar el análisis físico - químico.
sp: Especie no identificada

Información física, química y espectroscópica del compuesto aislado

Pruebas físicas: Punto de fusión: 204 – 207ºC**;** cristales de color blanco; soluble en éter de petróleo, cloroformo; poder rotatorio específico: $()_D$ = - 129º (cloroformo)
Sistema cloroformo – etanol (99 : 1 v/v).
Se comparó con la muestra patrón con el siguiente resultado: R_{-f}
Muestra : 0 ,3033
Patrón de diosgenina : 0 ,3034
Sistema benceno – acetato de etilo (4: 1 v/v).
Se comparó con la muestra patrón con el siguiente resultado: R_{-f}
Muestra : 0 ,3294
Patrón de diosgenina : 0 ,3295

Pruebas químicas: Con reactivo de Lieberman – Burchard se observa una coloración rosada característica del anillo de Ciclopentanoperhidrofenantreno de la sapogeninas esteroidales.
Los espectros IR de las sapogeninas esteroidales de las especies dioscorea (figura 1) muestran picos de absorción comunes para todas las muestras. Estas bandas características corresponden a 3400 cm^{-1} (estiramiento del O – H del C_3, a 2920 cm^{-1} (estiramientos del C - H del $C_{3,}$ - CH_3, - CH_3, - CH_2 -, - CH -), a 1630 cm^{-1} (enlace doble no conjugado: C = C, entre C_5 –

C_6), a 1440 – 1450 cm^{-1} (flexión C – H de – CH_3, -CH_2-, - CH-), a 1370 cm^{-1} (flexión O – H del C_3), a 1240 – 1250 cm^{-1} (estiramiento C–O–C del grupo éter: C_{16} – O – C_{22}), a 975 cm^{-1} (deformación del anillo ciclopentano), a 965 cm^{-1} (deformación del anillo III) y de 790 – 870 cm^{-1} (deformación de los anillos V y VI).

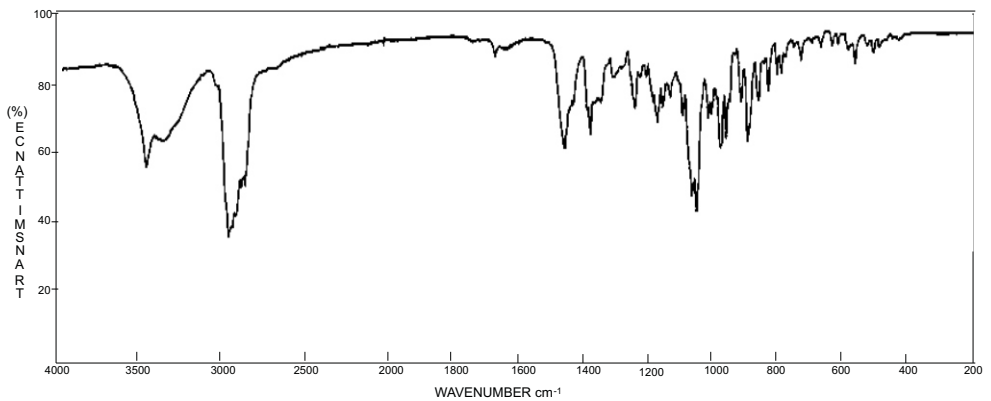


Figura 1: Espectro IR

El RMN - ^{1}H de 300 MHz de las sapogeninas esteroidales con respecto al espectro de la diosgenina patrón son superponibles (figura 2), presentan una zona de absorción entre 0 ,85 y 2 ,5 ppm que caracteriza al anillo ciclopentanoperhidrofenantreno de los esteroides, un doblete ancho integrado para un protón que resuena a 5.35 ppm con J 5 ,2 Hz que corresponde a H_6; una señal a 3 ,5 ppm integrada para un protón y resonando como multiplete corresponde a H_3. Un singulete integrado para 3 protones que corresponden a H_{19} a 1 ,03 ppm; otro singulete integrado para 3 protones que corresponde a H_{18} a 0 ,79 ppm; un doblete a 0 ,97 ppm con J 7 ,0 Hz resultado del acoplamiento de H_{22} con H_{20}, otro doblete a 0 ,79 ppm con J 6 ,0 Hz resultado del acoplamiento de H_{27} con H_{25} .

Haciendo uso de un modelo molecular para la fórmula de la diosgenina, se puede apreciar que los protones H_{17} y H_{16} deben necesariamente tener una relación cis; por esta razón, la señal integrada para un protón que resuena a 4 ,41 ppm como un cuadruplete con J 7 ,5 hz debe pertenecer a H_{16}, ya que al acoplar con los protones cis H_{17} y H_{15} (J 5 – 10 Hz), debe aparecer un triplete, el cual sufre una posterior partición, doblete, al acoplar H_{16} con H_{15} en posición trans, para originar el cuadruplete. La señal integrada para un protón y resonando como doblete, doblete, doblete a 3 ,45 ppm pertenece a H_{eq-26} que acopla con gem $H_{\alpha x-26}$ de J 10 ,9 Hz; con $H_{\alpha x}$ J de 4 ,0 Hz y un posterior acoplamiento a larga distancia con el protón H_{eq-24} de J 1 ,5 Hz. El triplete que resuena a 3 ,37 ppm e integrado para un protón corresponde a H_{x-26} de J 10 ,9 Hz que acopla con gem H_6 de J grande y también con $H_{\alpha x-25}$ de J grande.

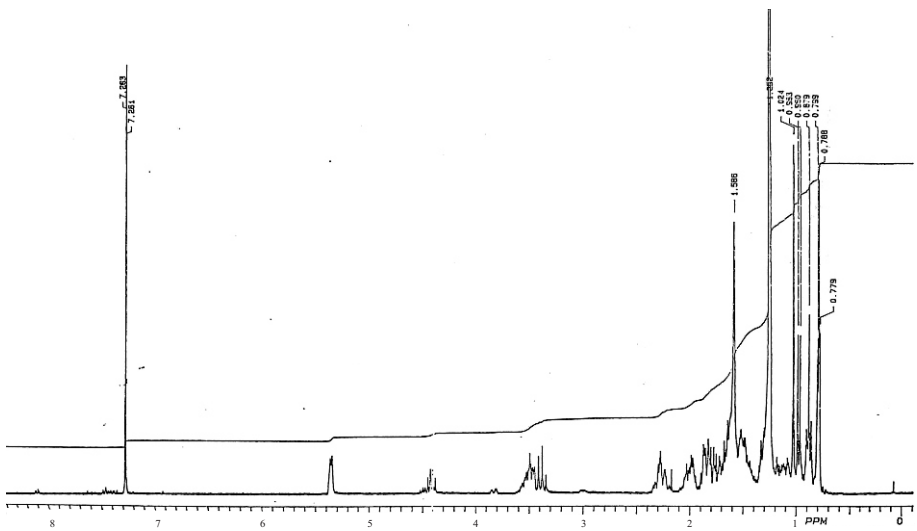


Figura 2: Espectro de ^{1}H-RMN

Los puntos de fusión de las sapogeninas esteroidales coinciden con el punto de fusión de la diosgenina (206ºC) y el valor de la masa espectroscópica es de 414 ,3134, el cual comparado con el valor experimental de 414 ,3078 (figura 3), demuestra que son idénticas.

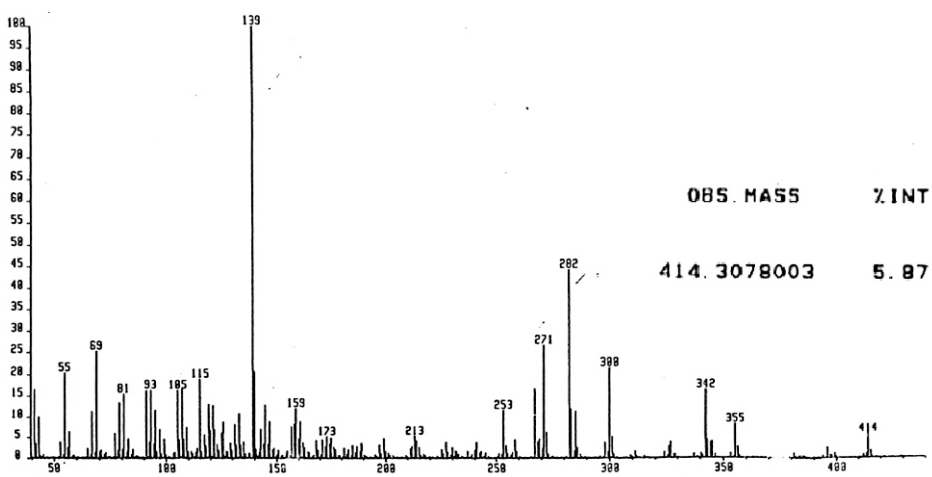


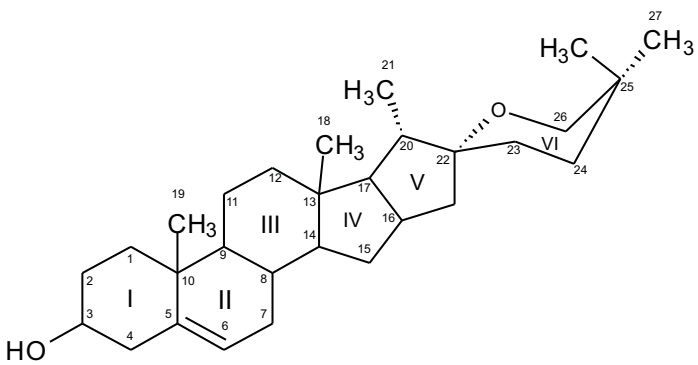
Figura 3: Espectro de masas

CONCLUSIONES

De las 52 especies del género Dioscorea descritos en el país, se estudiaron fitoquímicamente 22, de las cuales 16 fueron identificadas botánicamente.

El porcentaje de sapogeninas esteroidales no fue superior al 2%, y correspondió a la especie *Dioscorea sp.*, de nombre vulgar "Ferruño".

Las características espectroscópicas (IR, RMN, EM) y ciertas propiedades físico – químicas, demuestran que la sapogenina esteroidal aislada corresponde a la Diosgenina, cuya estructura es la siguiente:



AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Departamento de Química de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su apoyo logístico a la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Correll, D.; Schubert, D.; Gentry, H. y Wawley, V. The search for Plant Precursors of Cortisone. *Econ. Bot*. 1955; 9: 307–375.
2. Marker, R.E.; Wagner, R.B.; Ulshafer, P.R. et al. Steroidal Sapogenins. *JACS* 1947; 69: 2167–2230.
3. Choquesillo, P.F. Estudio Fitoquímico de la Dioscorea Decorticans. Resumen de trabajo, XIV Congreso Peruano de Química. Sociedad Química del Perú. 1985.
4. Martin, F. Species of dioscorea containing Sapogenin. *Econ. Bot.* 1969; 23: 373–379.
5. Marker, R.E. y Rohrmann, E. Diosgenin. *JACS* 1940; 62: 518 .
6. Williams, D. y Fleming, I. Spectroscopic Methods and Organic Chemistry. Mc Graw – Hill, London. 1980.
7. Mac Bride, J.F. *Publ. Field Mus. Nat. Hist. Bot. Ser*. 1956; 13: 1936–1961.

INFORMACIONES

A. De la Sociedad Química del Perú

XXVI Congreso Peruano de Química
(Mariano Eduardo de Rivero y Ustáriz)

El XXVI Congreso Peruano de Química "Mariano Eduardo de Rivero y Ustáriz", organizado por la Sociedad Química del Perú junto con la Universidad Nacional San Agustín, tendrá lugar en la ciudad de Arequipa, entre los días 17-19 de octubre del 2012.
Podemos informar que se tiene confirmada la presencia de los siguientes **conferencistas internacionales**: Raymundo Cea Olivares (México), Aurelio San Martín (Chile), Vicenzo de Feo (Italia), Manuel Norte (España), Ángel Gutiérrez Ravelo (España), Denise de Olivera Silva (Brasil), Juan Silva Ávalos (Chile), Dinorah Gambino (Uruguay), Isaac Marcos Cohen (Argentina), Patricio Rivera (Chile), Paula Díaz (Chile), Ángela Danil de Namor (Argentina), Gabriel Merino (México), Janz Alzate Morales (Chile), Julio Caballero (Cuba) y Carlos Cárdenas (Chile).

En cuanto a los **conferencistas nacionales** que expondrán en el Congreso se tiene a los siguientes: Mario Ceroni, Mercedes Puca, Alberto Garrido, Pedro Romero, Cristina Quispe, Juan Carlos Rueda, Teresa Blanco de Alvarado, Ana María Muñoz, William Tiznado, Ana María Osorio, Jorge Angulo, Eduardo Calvo y otros.

Respecto a las **Mesas Redondas** se tiene confirmadas las siguientes:

- Bioinorgánica.
- Educación Química.
- Nanotecnología.

Los cursos a realizarse paralelamente al Congreso son los siguientes:

- "Investigación en productos naturales y su aplicación a Isoprenoides" por Carlos Areche y Patricio Rivera.
- "Instrumentación química alternantiva" por Eduardo Montoya.
  "Aplicación del RMN en los polímeros" por Juan Carlos Rueda.
- "Técnicas de análisis de moléculas orgánicas con significación biológica" por Francisco Sobrino.
- "Tópicos Selectos en Química Teórica y Química Computacional" por William Tiznado.
- "Tecnologías limpias" por Mario Mallaupoma.

Mayor información puede encontrarse en el blog del Congreso:
xxv1congresoperuanoquimica2012.wordpress.com.

Conferencias de los "Jueves Científicos" en la Sociedad Química del Perú

- "La biodiversidad en nuestro país y las implicancias en este milenio", dictada por la Dra. Magdalena Pavlich, el día jueves 28 de junio del 2012.
- "Desarrollo del control biológico como parte del manejo integrado de plagas, con énfasis ecológico en el Perú", dictada por la M.Sc. Elizabeth Paola Dioses Núñez, el día jueves 5 de julio del 2012.

- "Liderazgo, acreditación y certificación profesional. Nuevos retos de la educación universitaria", dictada por el Dr. Q.F. José Aliaga Arauco, el día jueves 12 de julio del 2012.
- "Materiales porosos a partir de taninos y carbones minerales: síntesis, caracterización y aplicaciones", dictada por la Licenciada Vanessa Fierro, el día jueves 19 de julio del 2012.
- "Síntesis de nanopartículas de Au obtenidas por reducción de $HAuCl_4$", dictada por el M.Sc. Alberto Corzo Lucioni, el día 17 de agosto del 2012.
- "El profesor universitario en la sociedad del conocimiento", dictada por el Q.F. Mario Bolarte Arteaga, el día viernes 24 de agosto del 2012.
- "Requisitos técnicos de acceso para el mercado de EE.UU", dictada por la Lic. Viviana Scotto Zumaeta, el día viernes 7 de setiembre del 2012.

Cursos pre Congreso de Química

"Aplicaciones de la Espectroscopía FTIR en la Industria", dictado por la Quím. María Angélica Rodríguez Best, especialista en Química Analítica e Instrumentación; docente de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, realizado en la ciudad de Lima, los días 3 y 5 de julio. Este Curso tuvo como objetivo dar a conocer los avances y aplicaciones de la Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier en la industria y en la investigación, teniendo en consideración que es una técnica sencilla, no destructiva, económica y con diversas aplicaciones.

"Análisis por absorción atómica y manejo estadístico de los datos obtenidos", dictado por el Quím. Percy Y. López Jefe de Laboratorio de la Unidad de Servicios de Análisis Químico de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM, realizado del 28 de agosto al 7 de setiembre.

B. Otras informaciones

Premio "Medalla de Oro Hipólito Unanue" 2012

La Sociedad Química presentó la candidatura de la Dra. Teresa Blanco Blasco de Alvarado Ortiz, socia activa de nuestra Institución al "Premio "Medalla de Oro Hipólito Unanue" 2012, en la disciplina de Farmacia y Bioquímica. La Fundación "Instituto Hipólito Unanue", otorga este premio cada tres años, con el propósito de reconocer y enaltecer los méritos intelectuales, éticos, culturales, científicos, docentes y humanísticos de los profesionales de las Ciencias de la Salud. Quienes a través de sus actividades en el Perú hayan destacado por su meritoria labor en la profesión que ejercen, así como en su proyección social en bien de la comunidad. El Premio se confiere a los profesionales de las cuatro disciplinas de las ciencias de salud: Medicina, Cirugía, Odontología y Farmacia – Bioquímica.

Encuentro Científico Internacional 2012, ECI 2012i
"Olga Lock Sing de Ugaz"

La Ceremonia de Imposición de la Medalla a la Dra. Olga Lock Sing de Ugaz, epónimo del Encuentro Científico Internacional 2012, ECI 2012i, se llevó a cabo el día 31 de julio a las 10:00 horas en el Teatro de la Universidad Nacional de Ingeniería en una ceremonia bastante concurrida. La Dra. Lock ha sido Presidenta de la Sociedad Química del Perú en los periodos 1996-1997 y 1998-1999 y Presidenta de la Comisión Organizadora del XIX Congreso Peruano de Química (1995), del XXIV Congreso Latinoamericano de Química y XXI Congreso Peruano de Química (2000) y del Congreso Iberoamericano de Química (2008).

En reconocimiento a su labor promotora de la ciencia química en el país, la Sociedad Química del Perú organizó un ciclo de conferencias dentro del ECI 2012i, coordinada por el Dr. Mario Ceroni Galloso, el que se desarrolló en el auditorio del IPEN los días 1 y de 2 de agosto y que contó con la asistencia de un número apreciable de alumnos universitarios, profesionales y personas interesadas en la química.

Academia Nacional de Ciencias
Sesión de Instalación del Consejo Directivo 2012-2015

En ceremonia celebrada recientemente, la Academia Nacional de Ciencias, instaló el Consejo Directivo 2012-2015. presidido por el Dr. Ronald Woodman Pollitt.

Premio Nacional Loreal-Unesco-Concytec "Por la Mujer en la Ciencia"

La Sociedad Química presentó a la Dra. María del Rosario Sun Kou, nuestra socia, como candidata a este premio. Se doctoró en Química en la Universidad Universidad Complutense de Madrid. Hizo estudios post - Doctorales en el tema de adsorbentes, en la Universidad de Lovaina (Bélgica). Ha sido representante (Punto Focal) del Perú ante el CYTED y actualmente es miembro del Comité Directivo de la Federación Iberoamericana de Catálisis (FISOCAT). La línea de investigación que desarrolla se centra en el control de la calidad ambiental mediante el uso de adsorbentes obtenidos a partir de materias primas nacionales: arcillas, carbones, materiales lignocelulósicos, entre otros, que se han aplicado en la retención de metales pesados (Pb, Cd, Cr, Zn, As), adsorción de compuestos fenólicos, degradación de colorantes en efluentes líquidos.

Edición gráfica:
ESERGRAF
Jr. Tarma 115 - Lima
Telf.: 998-513-545 / 433-1908
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)

XXVI
Congreso Peruano de Química

17, 18 y 19 de octubre del 2012

Organizado por la Soc. Quím. del Perú

Lugar:

Universidad Nacional San Agustín, Arequipa