

ISSN 1810-634X

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 79 N° 3
JULIO - SETIEMBRE 2013



INSTITUCIÓN CIENTÍFICA FUNDADA EN 1933

LIMA, PERÚ

SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ
CONSEJO DIRECTIVO
(marzo 2013 - marzo 2015)

| | |
|--------------------------------|---------------------------------------|
| Presidente | : Dr. Mario Ceroni Galloso |
| Past Presidente | : Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo |
| Vice-Presidente | : Dra. Ana María Muñoz Jáuregui |
| Secretario General | : Quím Farm. Juan José León Cam |
| Tesorera | : Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo |
| Secretario del Consejo | |
| Directivo | : Mg. Alberto Corzo Lucioni |
| Directora de Biblioteca | : Quím. Farm. Gabriela Soriano Chávez |
| Director Administrativo | : Quím. Neptalí Ale Borja |
| Vocales | : Dr. José Róger Juárez Eyzaguirre |
| | : Ing. Quím. Ana María Osorio Anaya |
| | : M.Sc. Graciela Untiveros Bermúdez |
| | : Quím. Farm. Nora Herrera Hernández |
| | : Mg. Hólmer Helí LezamaVigo |
| | : Dr. Juan Manuel Parreño Tipián |
| | : Mg. Juan Edmundo Estrada Alarcón |

Comisión de Economía y Finanzas

Presidente: Dr. Róger Juárez Eyzaguirre

Comisión de Publicaciones

Presidenta: 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

Presidenta : Ana María Muñoz Jáuregui

Editor en Jefe : Luis Valles Fernández

Miembros : Ana Valderrama Negrón
Julio Santiago Contreras

Comité Consultivo

Beyer, Lothar

Universidad de Leipzig - Alemania

Calvo Buendía, Eduardo

Univ. Nac. Mayor de San Marcos - Perú

García Herbosa, Gabriel

Universidad Burgos - España

Gamboa Fuentes, Nadia

Pontificia Universidad Católica del Perú

Guija Poma, Emilio

Universidad Científica del Sur - Perú

Muñoz Jáuregui, Ana

Universidad San Martín de Porres

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

Gutiérrez Correa, Marcel

Universidad Nacional Agraria La Molina - Perú

Guzmán Duxtán, 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 79

JULIO - SETIEMBRE 2013

N°3

En el Perú: N° suelto S/.15

Suscripción anual: S/. 60.00

En el extranjero: Suscripción anual: \$50.00

CONTENIDO
(Vol 79 N° 3 - 2013)

- *Editorial* 193

Trabajos originales

- Preparación y caracterización de películas de quitosano despolimerizado y reticulado con tripolifosfato de sodio, por Max Carlos Salazar, Ana Valderrama Negrón. 195

- Purificación de ADN genómico a partir de hojas, raíces y neumatóforos de *Mauritia flexuosa* “aguaje”, por Juan Carlos Castro Gómez, Gino Andersson Navarro Jiménez, Luis Alexander Cerdeira Gutiérrez, Marianela Cobos Ruiz. 209

- Efecto de la madurez en los componentes de valor comercial (taninos y goma) de tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, por Marianela Melo Ferrari, Patricia Glorio Paulet y Gladys Tarazona Reyes. 218

- Determinación del contenido de plomo en sangre proveniente de la policía de tránsito femenina de las unidades Centro y Sur de Lima Metropolitana, por Graciela Arosquipa Aguilar, Elvito Villegas Silva. 229

- Caracterización química y evaluación antioxidante de frutos y raíces de *Euterpe oleracea* y *Euterpe precatória*, por Víctor Sotero, Martha Maco, Claudia Merino-Zegarra, Elías Vela, Éricka Dávila, Dora García. 236

- Síntesis de nuevos complejos de oxovanadio (IV) de potencial actividad insulinoimética con ligandos cumarina-3-ácido carboxílico y derivados sustituidos, por Paloma Salas Fernández, Nora Alvino De La Sota, Carla Galli Rigo-Righi. 243

- Equilibrio de biosorción de plomo (II) y caracterización mediante FT-IR y SEM-EDAX en pectina reticulada proveniente de cáscaras de naranja, por Víctor R. García Villegas, Neptalí Ale Borja, Enrique G. Guzmán Lezama, Andrea G. Yipmantin Ojeda, Holger J. Maldonado García. 256

Enseñanza de la Química

- Síntesis y caracterización RMN 1D y 2D de derivados oxigenados de la 1- fenil-3- metil-2- pirazolin-5-ona y su potencial capacidad ligante, por Sergio Zamorano, Juan Camus. 265

Artículo de Revisión (review)

- Quinoxalinas como potenciales agentes *Antimycobacterium tuberculosis*: una revisión, por Mery Santivañez-Veliz, Elsa Moreno-Viguri, Antonio Monge y Silvia Pérez-Silanes. 272

INFORMACIONES

A. De la Sociedad Química. 286

B. Otras informaciones. 287

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 30 soles 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/. 120,00

Cuando todos los autores no son socios: S/. 200,00

Si entre los autores hay socios y no socios: S/. 150,00

Si los autores residen en el extranjero US \$ 110,00

Cuando el número de autores es superior a 3 se añadirá, además, S/. 30,00 por cada autor en exceso.

Si el trabajo es enviado del extranjero, será US \$ 15,00 más por cada autor en exceso.

Por exceso de correcciones de estilo se cobrará después de la segunda, un mínimo de S/. 30,00.

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/. 120,00

When all the authors are not partners: S/. 200,00

If among the authors there are partners and non partners: S/. 150,00

If the authors reside abroad US \$ 110,00

When the number of authors is superior at 3 it will be paid, also, US \$ 15,00 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 arábica seguido de punto. A continuación se coloca la leyenda que explique su significado. La numeración y leyenda en una tabla, cuyo formato debe ser básico 1, se colocan en la parte superior a diferencia de las figuras y los esquemas que se ubican en la parte inferior. Las figuras deben ser originales y de alta resolución.
8. Las tablas, fotos, figuras y esquemas deben estar incluidos en el documento de Microsoft Word.
9. Las referencias, se citan en el texto correlativamente como superíndice. El número de estas referencias no debe ser excesivo. Deberían fluctuar entre 7 y 15. La sección Referencias se escribe con tamaño de fuente 14, centrado y **en negrita**. Las abreviaturas de las revistas se escribirán según el Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) y List of Journals Indexed in Index Medicus. (<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html>) Las referencias citadas se escribirán con el tamaño de fuente 10 y se seguirá el estilo de Vancouver.

Editorial

PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO DESPOLIMERIZADO Y RETICULADO CON TRIPOLIFOSFATO DE SODIO

Max Carlos Salazar^{1*}, Ana Valderrama Negrón¹

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la preparación y caracterización de películas de quitosano (CS) reticuladas con tripolifosfato de sodio (TPP), preparadas por el método de evaporación del solvente. Inicialmente se estudió la despolimerización del quitosano con nitrito de sodio con el fin de obtener diferentes pesos moleculares del polímero utilizado, logrando conseguir así quitosanos de 554,22kDa y 133,37kDa de masa molar. Posteriormente se preparó y caracterizó películas de quitosano reticuladas con TPP, evidenciando la interacción puente hidrógeno con el polianión mediante técnicas FTIR, SEM, TG. También se realizó estudios de hinchamiento, con el objetivo de identificar el tipo del modelo cinético que permite explicar dicho fenómeno en estas películas.

Palabras clave: Quitosano, tripolifosfato de sodio, despolimerización

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF DEPOLYMERISED CHITOSAN FILMS AND CROSSLINKED WITH SODIUM TRIPOLYPHOSPHATE

ABSTRACT

This work has studied the preparation and characterization of chitosan films (CS) crosslinked with sodium tripolyphosphate (TPP), prepared by the solvent evaporation method. Initially we studied the depolymerization of chitosan with sodium nitrite to get different polymer molecular weights in the used polymer. For example, we obtained chitosans of 554.22kDa and 133.37kDa of molecular weight. Afterward, prepared and characterized chitosans films crosslinked with TPP, evidently the hydrogen bridge interaction with the polyanion through IR, SEM, TG; also was performed swelling studies, with the objective of identified the type of kinetic model in which enable explain said phenomenon in these films.

Keywords: Chitosan, sodium tripolyphosphate, depolymerization

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM), también llamadas de liberación controlada, ha suscitado gran interés en la industria farmacéutica. Se trata de dispositivos que aportan mejores pautas posológicas, mejor perfil farmacocinético e incluso reducción de efectos adversos. De acuerdo con la Real Farmacopea Española¹, las FFLM son aquéllas en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas son diferentes a la de la forma farmacéutica de liberación

^{1*} Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos - LIBIPMET. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Ingeniería. Av. Túpac Amaru 210. Rímac, Lima-Perú. mcarloss@uni.pe

convencional, administrada por la misma vía. En ellas se introduce modificaciones en la formulación o en el proceso de producción con el fin de alterar la velocidad, el tiempo o el lugar de liberación del fármaco². De esta forma se puede alcanzar los niveles terapéuticos del fármaco en el lugar de acción y mantenerlos a lo largo del tiempo.

Actualmente, en la elaboración de sistemas de liberación controlada, se utilizan un gran número de polímeros, entre los que existen dos grandes grupos:

Polímeros naturales, como el colágeno, la albúmina o el quitosano.

Polímeros sintéticos, entre los que se distingue: Polímeros biodegradables, como los ácidos poliláctico, poliglicólico, y polímeros no biodegradables, como los ácidos poliacrílicos.

El quitosano es un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. Se trata de un copolímero de 2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucosa y 2-amino-2-desoxy- β -D-glucosa. Algunas de las propiedades funcionales del quitosano, tales como la biodegradabilidad, biocompatibilidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, capacidad hemostática, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, anticolesterolemica y antioxidante³, han promovido su utilización en varios campos distintos, como son agricultura, industria y medicina.

El término degradación de polímeros se refiere a los procesos inducidos por luz solar, calor y otros agentes atmosféricos que conducen a una modificación de la estructura del polímero. Un polímero puede tener diversos cambios físicos o químicos. En este trabajo se utilizará la degradación oxidativa, para poder obtener quitosano con menores masas moleculares.

El carácter filmogénico del quitosano dio lugar a una de las primeras aplicaciones investigadas de este polímero natural. Es posible formar películas de quitosano con buenas propiedades físicas y mecánicas a partir de sus disoluciones en ácidos diluidos, tales como fórmico, acético o propiónico. Las propiedades filmogénicas del quitosano se deben a la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los grupos amino e hidroxilo de sus cadenas. A pH ácido, estos enlaces de hidrógeno se disocian debido a la protonación de los grupos amino y se produce un rápido hinchamiento de la película. Durante el proceso de hinchamiento se produce la incorporación del líquido en el interior de la matriz, producto de la diferencia de potencial químico del disolvente dentro y fuera de ella, provocando una dilatación de la misma; este fenómeno es estudiado mediante modelos matemáticos de difusión, denominados leyes de Fick.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales:

Quitosano (CS), suministrado por Sigma - AldrichChemistry, (Irlanda); tripolifosfato de sodio (TPP), suministrado por Sigma - AldrichChemistry, (USA); nitrito de sodio (G.A.), hidróxido de sodio (G.A.), ácido clorhídrico (G.A), cloruro de sodio (G.A.).

Obtención de quitosano despolimerizado:

El quitosano despolimerizado se obtuvo mediante degradación oxidativa utilizando nitrito de sodio. Se preparó una solución de 1% (m/v) de quitosano en 1% (m/v) de ácido acético. Se adicionó NaNO_2 0,1M tal que la relación de moles entre el quitosano y el nitrito fue de 0,01. Posteriormente se mantuvo en reacción durante 3h con agitación constante. La recuperación del quitosano despolimerizado se realizó con hidróxido de sodio, llevando la solución hasta pH=8, posteriormente se hizo un lavado con agua. Finalmente se recuperó el quitosano por centrifugación a 1000rpm por 5min, y secado en estufa a 45°C, hasta peso constante.

Obtención de películas de quitosano:

Las películas de quitosano cargadas con antocianinas se obtuvieron por el método de evaporación del solvente. Se preparó una solución de quitosano al 1% (p/v) en ácido acético 1%(v/v) y se añadió 0,1g de extracto de antocianinas en polvo. Para esto se pesó 1,0g del polímero y la cantidad indicada de la antocianina y se disolvieron en 25mL de ácido acético 1%(v/v), con agitación constante durante 4h.

Se colocaron 25mL de solución en una superficie de acrílico de 10,0x10,0cm² que fue nivelada horizontalmente. Se llevó el soporte con la solución a una estufa a 45°C durante 24h. Se retiró la película seca de la superficie del soporte. Se sumergió la película preparada en 100mL de solución de TPP 5% durante un tiempo determinado (0,5 a 4h). Finalmente, se secó la película en una estufa a 60°C durante 30min para luego ser almacenada en un desecador.

Caracterización de películas de quitosano:**Determinación del grado de desacetilación**

Se pesó 200mg de quitosano, posteriormente se adicionó 5mL de HCl 1,0 M, hasta disolver la muestra completamente. Se agregó 450mL de NaCl 0,001 M, y se llevó a agitación para lograr una solución uniforme. La solución anterior se tituló conductimétricamente con 60mL de NaOH 0,1M estandarizado. La titulación se realizó descargando 0,5mL de NaOH 0,1M, anotando las lecturas del conductímetro.

Determinación del peso molecular

Se determinó por viscosimetría, utilizando un buffer de 0,1M de CH₃COOH en 0,02M de NaCl a 30°C, en diferentes concentraciones de quitosano. Se midió la densidad de las soluciones utilizando un picnómetro con brazo lateral, y la viscosidad, utilizando un viscosímetro de Oswald; mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada se determinó el peso molecular.

$$[\eta] = KM_v^a \quad (1)$$

En esta ecuación, $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca, M_v es el peso molecular promedio viscosimétrico y K y a son dos constantes que dependen de la naturaleza del polímero.

Espectroscopía infrarroja (FTIR)

Se obtuvo los espectros de infrarrojo del quitosano en forma de películas con un Magna-IR 750 (Nicolet) por el método de transmisión (Unidad de Espectroscopía de Infrarrojo, Laboratorio de Espectroscopía Molecular, Instituto de Química, Universidad de São Paulo, (Brasil). Las muestras se midieron con un beamsplitter de KBr y un detector DTGS de KBr entre 400 y 4000 cm⁻¹. Se midió las muestras de películas de quitosano a 4cm⁻¹ con 128 acumulaciones.

Estudios de morfología

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) se obtuvieron en el Laboratorio de Películas delgadas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería. Las muestras de películas, se adhirieron con una cinta de doble haz adhesivo sobre los portamuestras cilíndricos.

Las muestras se metalizaron con Au utilizando un recubridor de oro (Electron Microscopy Science, EMS-550). Se empleó un microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo Philips 505.

Análisis termogravimétrico:

Se llevó a cabo a partir de 5mg de muestra (película) con el uso del programa de calentamiento del equipo SDT Q600 V8.3 Build 101, perteneciente al Instituto de Química de São Carlos, USP – Brasil, donde se utilizó un intervalo de temperatura desde 30 hasta 1000°C, con una velocidad de calentamiento de 10 grado/min y un flujo de aire seco de 50mL/min.

Se calculó la primera derivada (dm/dT) a las curvas calorimétricas obtenidas, para determinar la temperatura de máxima velocidad de descomposición.

Grado de hinchamiento:

El hinchamiento de las películas se llevó a cabo en PBS a pH 6,5. Se utilizó para ello muestras de películas con una superficie de 10x10cm² y que no contenían principio activo.

Se pesó el fragmento de película en una placa Petriy se anotó su peso exacto; se añadió 50mL de medio atemperado y en un agitador magnético a 37°C y 100 rpm. A intervalos de tiempos predeterminados, la película se extrajo, de forma rápida y cuidadosa, dejándola secar ligeramente sobre un papel de filtro para eliminar el exceso de líquido. Se pesó y se volvió a introducir en la placa. El grado de hinchamiento (W) se determinó mediante la siguiente expresión (2):

$$W = \frac{M - M_0}{M_0} \quad (2)$$

donde M es el peso a tiempo t y Mo el peso a tiempo cero. Posteriormente estos valores se utilizaron en el análisis cinético.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN**Despolimerización del quitosano**

El quitosano a trabajar posee las siguientes características (tabla 1.)

Tabla 1. Resultados de caracterización de quitosano (CS)

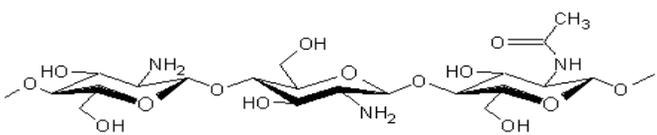
| Análisis | Resultado experimental | |
|-------------------------|---------------------------|------------------------|
| Grado de desacetilación | Conductimetría 78, 87% | Infrarrojo 80, 16 % |
| Masa molecular | 554 ,22kDa | |
| Estructura | | |

Con la finalidad de obtener oligómeros y materiales de bajo peso molecular basados en este biopolímero, se realiza la despolimerización del quitosano; ésta es un área de mucho interés actual por diversas razones. Una de ellas se sustenta en que varios derivados de bajo peso molecular muestran mayor solubilidad en medios acuosos de pH neutro que sus homólogos de

mayor tamaño. Las soluciones de quitosano que podríamos obtener sólo están limitadas por su viscosidad, es decir, ahora podemos preparar soluciones más concentradas.

Se despolimeriza el quitosano con nitrito de sodio mediante un mecanismo de degradación oxidativa. Gracias al poder oxidativo del nitrito es posible conseguir rupturas en los enlaces glucosídico del quitosano, generando así cadenas poliméricas más cortas que llevan a la disminución del peso molecular del quitosano. Se resumen los resultados de la caracterización del quitosano despolimerizado en la siguiente (tabla 2).

Tabla 2. Resultados de caracterización de quitosano despolimerizado (CSD-II)

| Análisis | Resultado experimental | |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Grado de desacetilación | Conductimetría 94, 96% | Infrarrojo 81, 78 % |
| Masa molecular | 133, 37 kDa | |
| Estructura |  | |

Caracterización de películas de quitosano

Las películas fueron cargadas en el momento de la preparación de las mismas, adicionando una determinada cantidad de antocianinas antes del procedimiento de secado.

En el campo de la farmacia, las películas de quitosano podrían ser utilizadas para el recubrimiento de comprimidos y como sistemas de liberación controlada de fármacos. En los últimos años, el uso de películas de quitosano para el tratamiento de heridas e infecciones cutáneas ha suscitado un gran interés puesto que se puede administrar el fármaco de forma localizada y sostenida en el sitio de acción. Además, el carácter antimicrobiano y cicatrizante del quitosano aporta propiedades favorables a los sistemas de liberación de uso tópico.

El objetivo del trabajo ha sido la obtención, por el método de evaporación del solvente, de películas de quitosano para el posterior encapsulamiento de antocianinas.

Una de las características importantes observadas en el proceso de reticulación de una película de quitosano, es el cambio de color observado en éstas al ser sumergidas en la solución de TPP (figura 2); en el proceso adquieren una coloración blanca, no traslúcida y no removible al ser enjuagado con agua. Esta característica sólo se presenta mientras la película permanezca húmeda, luego del proceso de secado la película vuelve a adquirir la tonalidad amarillenta y traslúcida, característica de las películas de quitosano. Esta observación nos lleva a la suposición de que dicha coloración es debido a una interacción intermolecular entre el reticulante (TPP) y la matriz polimérica (quitosano); la permanencia de dicha coloración, después del enjuague con agua con el fin de remover TPP sin interaccionar, refuerza esta hipótesis.

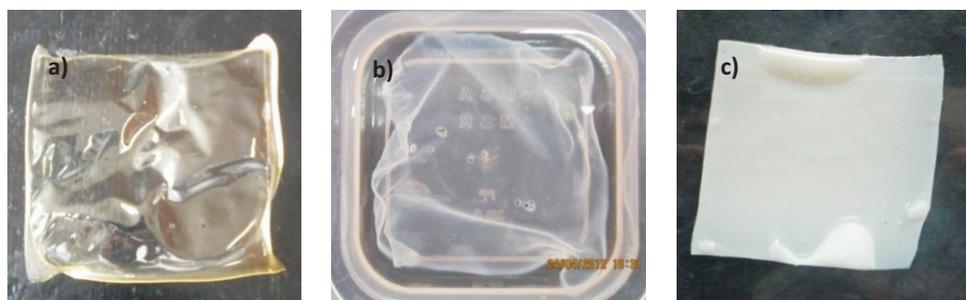


Figura 2. Películas de quitosano a) antes de la reticulación b) durante la reticulación c) después de la reticulación

Espectroscopía infrarroja

En la figura 3 se observa los espectros correspondientes a las películas de quitosano CDP1 y CDP3 (peso molecular de 133,37kDa). A partir de estos espectros se puede observar en el espectro de quitosano/TPP que el pico vinculado a las amidas a 1653cm^{-1} desaparece; además, se muestra un pico a 1632cm^{-1} atribuido a la vibración de flexión de la amina de quitosano; ésta ha sufrido un corrimiento hacia mayores frecuencias debido a una interacción externa con otra molécula. También se muestra otro nuevo pico a 1540cm^{-1} , el cual está atribuido a la vibración de tensión del grupo de la amina protonada. El espectro también mostró picos a 1206cm^{-1} y 1151cm^{-1} correspondientes al enlace P=O y R-O-P-O. Xu *et al*⁵, Knaul *et al*⁶, y Wang *et al*⁷ observaron resultados similares en su estudio de la formación de nanopartículas de quitosano y películas de quitosano tratados con fosfato. Otro pico importante que podemos observar es el de 889cm^{-1} atribuido al enlace P O P.

Otra característica importante que no podemos dejar de mencionar es el corrimiento nuevamente observado en el pico del grupo amínico, desplazándose de 3376 a 3212cm^{-1} ; este fenómeno nos indica claramente una interacción externa en este grupo; en este caso, dada la naturaleza del reticulante, se trata de un puente hidrógeno entre la amina y el oxígeno del tripolifosfato.

En esta figura se puede apreciar con bastante claridad que existe diferencia entre los principales picos de las películas de quitosano y las que aparecen en el quitosano reticulado, corroborando nuestra hipótesis de interacción puente hidrógeno.

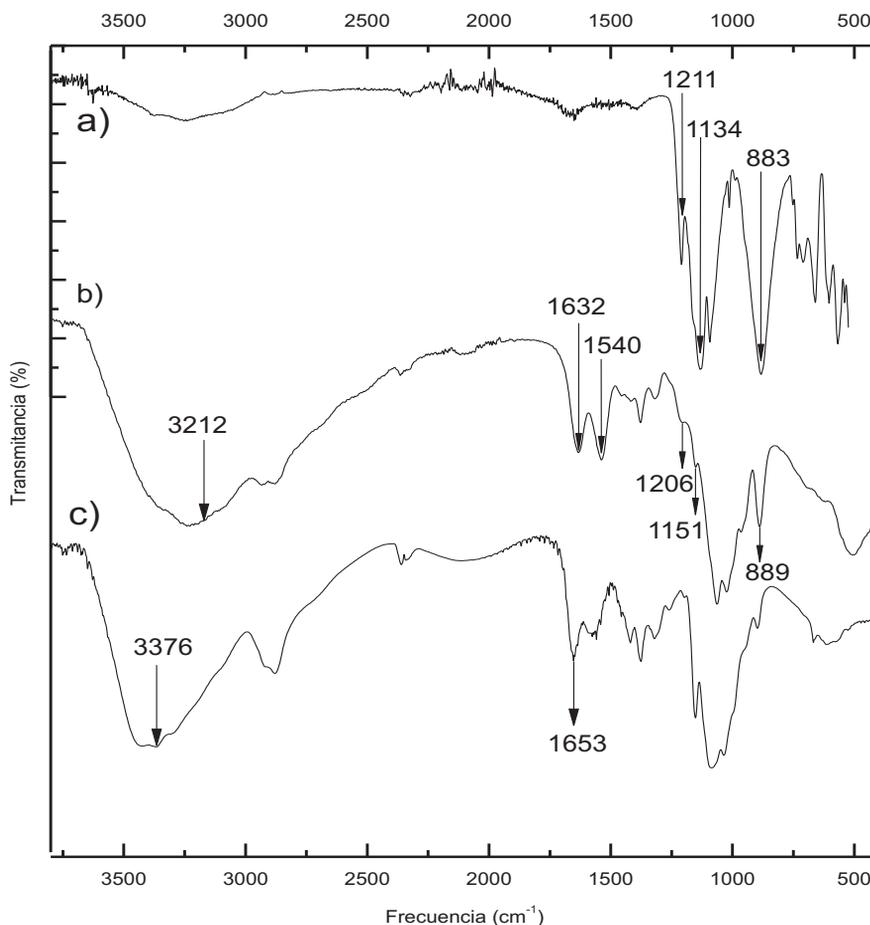


Figura 3. Espectro FTIR de a) tripolifosfato de sodio, b) película de quitosano despolimerizado/TPP CDP3 y c) película de quitosano despolimerizado CDP1

Estudios de morfología

En la figura 4 se muestra las microfotografías de diferentes películas de quitosano; corresponden a la variación de la concentración de tripolifosfato utilizado en la reticulación de las películas, en concentraciones de 0; 2,5; 5,0; 7,5 y 10%, respectivamente. La interacción puente de hidrógeno entre las aminas de las cadenas de quitosano con el oxígeno del tripolifosfato es homogénea, prácticamente, en toda su morfología; esta observación nos hace pensar que la característica plana y homogénea de los filmes generan una interacción puente de hidrógeno entre la superficie de la película de quitosano con el tripolifosfato de manera homogénea, es decir, sin acumulaciones debido a imperfecciones o irregularidades en la superficie; esta fenómeno empieza con el hinchamiento del film, su hidratación y posterior

interacción, lográndose formar una pequeña capa de complejo quitosano/TPP; después de la pérdida de agua a causa del secado la película retoma la morfología inicial, debido a que el tripolifosfato no es lo suficientemente grande como para modificar la superficie del quitosano. A pesar de este fenómeno la presencia de la interacción se hace más notable en los demás análisis. Las partículas insolubles de la solución de quitosano son las mostradas en las figura 4 en las fotografías d) y e). En contraposición con esta afirmación a nivel macroscópico la interacción se puede asociar con el cambio de coloración en la película húmeda en el proceso de reticulación.

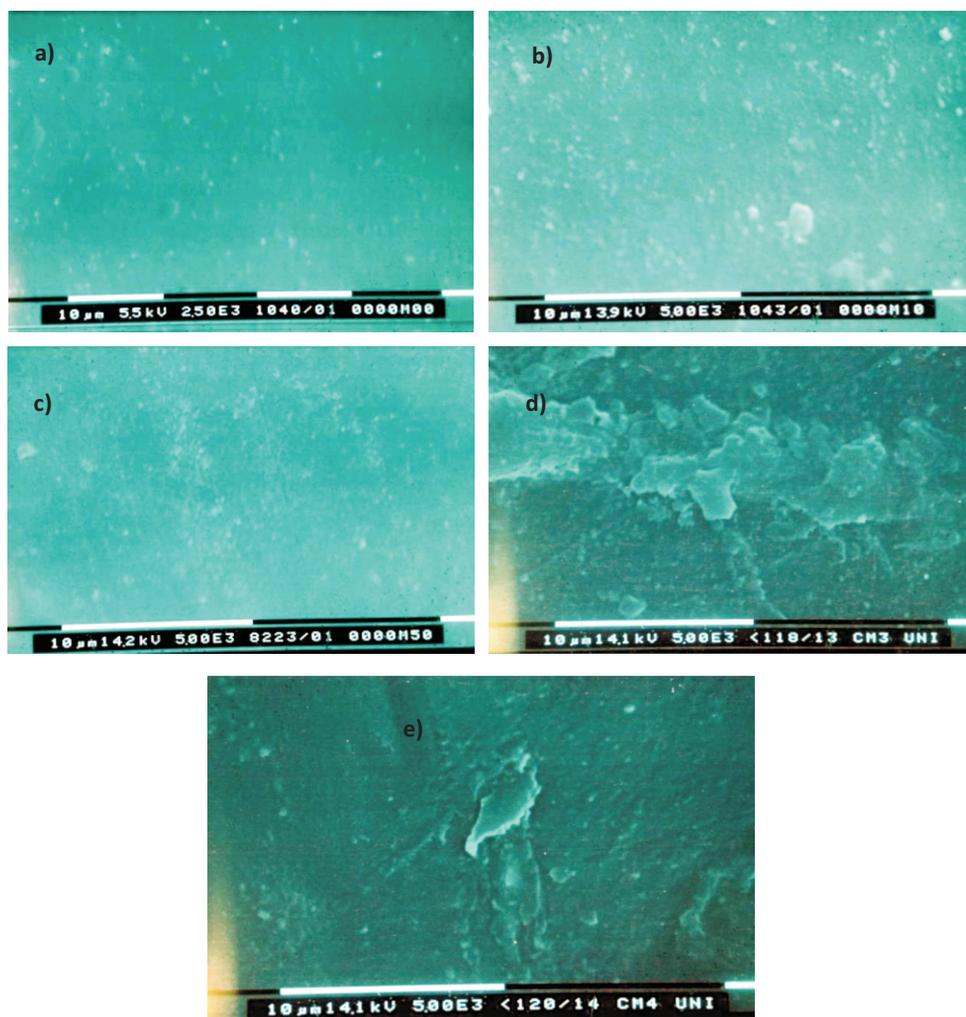


Figura 4. Microfotografías de Barrido Electrónico de películas de quitosano CS reticuladas a pH 6,5 con a) TPP 0%; b) 2,5%; c) 5,0%; d) 7,5% y e) 10% entrecruzadas durante una hora

Analisis termogravimétrico

Para poder estudiar y analizar los fenómenos existentes en la degradación térmica de una película de quitosano cargada y reticulada con tripolifosfato tenemos la figura 5. En la primera gráfica podemos observar una primera degradación entre la temperatura ambiente y 173°C correspondiente a la pérdida de agua; el segundo evento térmico comprendido entre 173 y 560°C corresponde la degradación de despolimerización de las cadenas de quitosano en la película, junto con la degradación parcial de las antocianinas. Podemos notar que la pérdida de oxígeno del tripolifosfato a una temperatura promedio de 112°C no se presenta ya que éste está protegido por el enlace de puente hidrógeno existente con las aminos del quitosano. También notamos que la segunda degradación de las antocianinas que ocurre a una temperatura promedio de 487°C ha sufrido un corrimiento ya que el tercer evento térmico de nuestra película presenta un intervalo de 560 a 700°C, que indica que la degradación de las antocianinas está térmicamente impedido por una fuerza de interacción intermolecular; este último fenómeno nos hace pensar que el ambiente electronegativo generado por la deslocalización de electrones en la estructura de la antocianina sufre una interacción con las aminas protonadas del quitosano, generando así un corrimiento en dicho evento térmico. El último evento presentado comprende de 700 a 927°C que según el espectro de quitosano debió ocurrir a 618°C, aproximadamente; ahora nos confirma la existencia de la interacción de puente hidrógeno entre las aminas de quitosano y el oxígeno de tripolifosfato; una vez quebrada la interacción, la materia restante se degrada mediante una termooxidación.

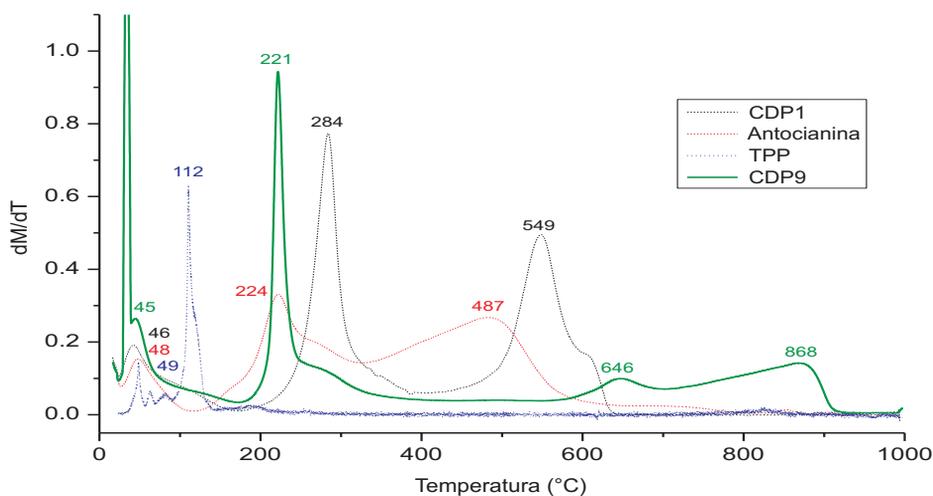


Figura 5. Termograma de película de quitosano despolimerizado.

Estudio de hinchamiento

El hinchamiento de las películas de quitosano entrecruzadas con TPP dependerá del pH del medio de liberación, ya que las interacciones electrostáticas existentes entre ambos polianiones están controladas por el pH del medio. Se estudió el efecto de la concentración de TPP, el tiempo de entrecruzamiento y el espesor sobre el hinchamiento de las películas sin antocianinas en PBS a pH 6,5. El hinchamiento se determinó por la ecuación 1.

Efecto de la concentración de tripolifosfato:

En la figura 6 se muestra que las películas de quitosano despolimerizado poseen un comportamiento similar. La película no entrecruzada presentó un grado de hinchamiento de 0,66; mientras que las películas reticuladas con soluciones de TPP al 1, 2, y 5% (p/v) presentaron un grado de hinchamiento más bajo, 0,48; 0,47 y 0,48, respectivamente. Por lo tanto, podemos concluir que el entrecruzamiento de las películas con polianiones da lugar a un bajo grado de hinchamiento, y este hecho favorecerá el control de la liberación de compuesto encapsulado. Por otra parte, el hinchamiento no fue significativamente distinto; los valores son prácticamente los mismos para las concentraciones estudiadas. Esto resultados nos indican que la reticulación con diferentes concentraciones de TPP dio lugar a una matriz lo suficientemente entrecruzada como para no permitir la entrada de agua.

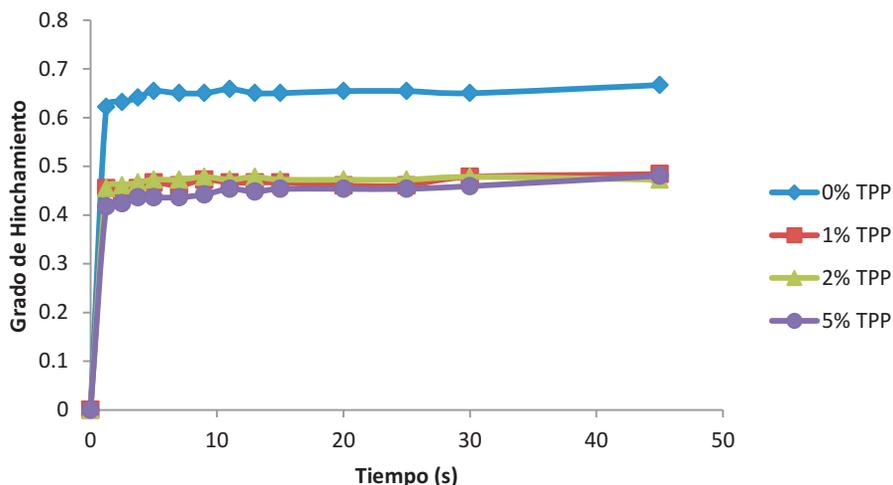


Figura 6. Grado de hinchamiento de las películas de quitosano despolimerizado (1% p/v) entrecruzadas con 0, 1, 2 y 5% (p/v) de TPP, en PBS (pH 6,5) a 37°C y 100rpm de agitación.

Efecto del tiempo de entrecruzamiento sobre el grado de hinchamiento.

La figura 7 muestra el hinchamiento de dos películas entrecruzadas con 1% (p/v) de TPP a pH 6,5 y sometidas a distintos tiempos de entrecruzamiento (0,5 y 1 hora). El grado de hinchamiento, para las películas sumergidas en la solución de TPP durante 0,5 y 1 hora fue de 0,56 y 0,48, respectivamente. Como se puede observar, un aumento del tiempo de entrecruzamiento provocó una ligera disminución del grado de hinchamiento, aunque no existen diferencias significativas entre los perfiles de hinchamiento..

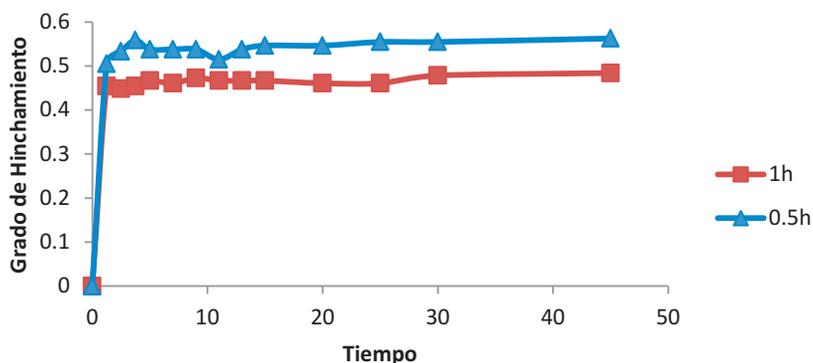


Figura 7. Grado de hinchamiento de las películas de quitosano despolimerizado (1% p/v) entrecruzadas con 1%(p/v) de TPP durante 0,5 y 1 hora, en PBS (pH 6,5) a 37°C y 100rpm de agitación.

Efecto del espesor de las películas sobre el grado de hinchamiento

En la figura 8 se puede apreciar el efecto del espesor en la reticulación de las películas; para eso se comparan dos películas, en las cuales se utilizó diferente volumen de solución de quitosano para prepararlas, 25 y 50mL, respectivamente.

Como se puede apreciar, la película de 25mLy 50mL poseen un grado de hinchamiento de 0,48 y 0,46 respectivamente; podemos deducir que la película con mayor volumen de solución debido al mayor espesor que posee demora un poco más en dejar pasar el agua al interior de la matriz que su homóloga más delgada; sin embargo los resultados no presentan diferencias significativas.

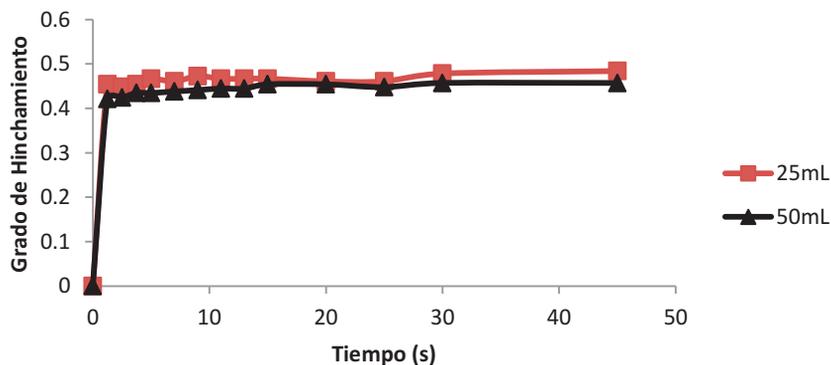


Figura 8. Grado de hinchamiento de las películas de quitosano despolimerizado 25mL (CDP3) y 50mL (CDP5) 1% p/v entrecruzadas con 1% (p/v) de TPP durante 1 hora, en PBS (pH 6,5) a 37°C y 100rpm de agitación.

Efecto del peso molecular de las películas sobre el grado de hinchamiento:

En la tabla 3, se muestra películas de quitosano y quitosano despolimerizado preparadas en condiciones similares. A partir de las comparaciones puede obtenerse el siguiente resultado.

Tabla 3. Grado de hinchamiento de películas de quitosano y quitosano despolimerizado

| TPP(%p/p) | V(mL) | Tiempo(h) | Película de quitosano | Grado de hinchamiento | Película de quitosano despolimerizado | Grado de hinchamiento |
|-----------|-------|-----------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| 0 | 25 | 0 | CP1 | 0,81 | CDP1 | 0,66 |
| 1 | 25 | 0,5 | CP2 | 0,46 | CDP2 | 0,56 |
| 1 | 25 | 1 | CP3 | 0,42 | CDP3 | 0,48 |
| 1 | 50 | 1 | CP5 | 0,39 | CDP5 | 0,46 |
| 2 | 25 | 1 | CP6 | 0,42 | CDP6 | 0,47 |
| 5 | 25 | 1 | CP8 | 0,40 | CDP7 | 0,48 |

Todas las películas preparadas correspondientes al quitosano despolimerizado presentan un mayor grado de hinchamiento que las películas preparadas a partir del quitosano de mayor peso molecular. Estos resultados podemos atribuirlos al hecho de que las cadenas del polímero despolimerizado son más pequeñas, presentando mayor número de poros por lo que el solvente puede entrar con mayor facilidad; sin embargo, la diferencia no es considerable como para poder deducir dicha afirmación; sólo en el primer caso podemos ver que las películas de quitosano sin reticular presentan un mayor hinchamiento que sus análogas de menor peso molecular.

Modelo cinético:

Los perfiles de hinchamiento se ajustaron a la ecuación de Schott

$$\frac{t}{w} = A + Bt \quad (4)$$

Donde w representa al hinchamiento en el tiempo t y B es el inverso del hinchamiento máximo.

Como se observa en la figura 9, los ajustes presentaron altos coeficientes de correlación (R^2 0,99). Por consiguiente, el proceso de hinchamiento de estas películas está gobernado por la relajación de las cadenas del polímero. Los materiales que se ajustan a la ecuación de Schott siguen una cinética de 2do orden, hecho que cumplen los resultados de este apartado. Dependiendo de los valores obtenidos en la constante B , podemos deducir el hinchamiento máximo alcanzado en las películas, como podemos ver en las figuras 7 y 8; éstas son muy similares, por lo que muy probablemente encontraremos comportamientos similares o muy poco apreciables en la liberación del fármaco.

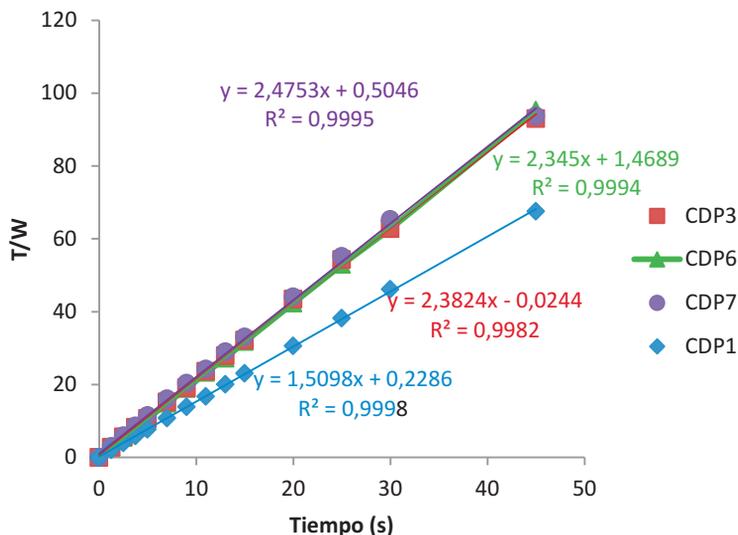


Figura 9. Perfiles de hinchamiento de las películas de quitosano despolimerizadas 1% p/v entrecruzadas con 1% (p/v) de TPP durante 1 hora, en PBS (pH 6,5) ajustados a la ecuación de Schott.

CONCLUSIONES

Se logró caracterizar y despolimerizar quitosano, bajando el peso molecular de 554,22kDa a 133,37kDa; adicionalmente, se construyó la curva de despolimerización del quitosano inicial, con la finalidad de controlar el peso molecular deseado en la despolimerización. Se obtuvieron películas de quitosano de bajo y alto peso molecular, reticulado con tripolifosfato y cargado con antocianinas por el método de evaporación de solvente. Los estudios de espectroscopía de infrarrojo y microscopía electrónica de barrido, termogravimetría e hinchamiento, mostraron que el tripolifosfato reacciona electrostáticamente con el quitosano, manteniendo las antocianinas dentro de la matriz polimérica.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Laboratorio de Química N° 33 y N° 12 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, así como al Instituto de Química (IQ) e Instituto de Química de São Carlos (IQSC)- Universidad de São Paulo – Brasil.

REFERENCIAS

1. Ministerio de Sanidad y Consumo, Monografías de formas farmacéuticas. Formas farmacéuticas. in: *Real Farmacopea Española*. 3ª Edición. Madrid, 2005, pp. 645.
2. X. Ding, A.W.G. Alani, J.R. Robinson, Extended-release and targeted drug delivery system, in: D.B. Troy (Ed.), *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Edition, Remington, Lippincott Williams & Wilkins, 2002, pp. 939-964.
3. I. Aranaz, M. Mengibar, R. Harris, I. Paños, B. Miralles, N. Acosta, G. Galed, A. Heras, Functional Characterization of Chitin and Chitosan, *Current Chemical Biology* 3, 2009; 2; 203-230.

4. Expósito, Ruth. Quitosano, un Biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Bioquímica y Biología molecular I. 2010.
5. Xu Y, Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2003; 250: 215-226.
6. Knaul JZ, Hudson SM, Creber KAM. Improved mechanical properties of chitosan fibres. *J. Appl. Polym. Sci.* 1999; 72: 1721-1731.
7. Wang X, Ma J, Wang Y, He B. Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as effective additives of calcium phosphate cements. *Biomaterials.* 2001; 22: 2247-2255.
8. X.Z. Shu, K.J. Zhu, A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery, *Int. J. Pharm.* 2000; 201: 51-58.
9. Aguiló, E. et al. Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Pp 26-29 (Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú: Perú, 2004).
10. Jacinto, Christian. Liberación Controlada de difosfato de Cloroquina a través de micropartículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Ingeniería, Facultad de Ciencias, 2010.

PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE HOJAS, RAÍCES Y NEUMATÓFOROS DE *Mauritia flexuosa* “aguaje”

Juan Carlos Castro Gómez^{*a}, Gino Andersson Navarro Jiménez^a,
Luis Alexander Cerdeira Gutiérrez^a, Marianela Cobos Ruiz^a

RESUMEN

Mauritia flexuosa es una palmera amazónica muy importante porque brinda servicios ecosistémicos y múltiples beneficios. Sin embargo, los estudios moleculares de la especie son escasos, debido en parte a la falta de un protocolo simple, económico y reproducible para purificar ADN de hojas y otros órganos. Por tal razón, el objetivo fue estandarizar un protocolo para purificar ADN genómico a partir de hojas, raíces y neumatóforos de *M. flexuosa*. El ADN genómico se purificó con un protocolo modificado (sin el empleo de nitrógeno líquido). La calidad y cantidad del ADN se analizó por métodos estándares. La alta calidad del ADN obtenido de los tres tipos de órganos fue demostrada por espectrofotometría ($A_{260}/A_{230} > 2$ y A_{260}/A_{280} de 1,77 a 1,81), por hidrólisis del ADN con la enzima *Hind* III, por los amplicones RAPD sintetizados y la integridad de las bandas de ADN en el análisis electroforético. En conclusión, el protocolo descrito es simple, económico y reproducible y nos permite obtener ADN genómico de alta pureza tanto de las hojas como de las raíces y de los neumatóforos. Por tanto, tal como ha sido demostrado experimentalmente, el ADN purificado es apropiado para realizar estudios moleculares de *M. flexuosa*.

Palabras clave: Diversidad genética, estudios moleculares, palmera amazónica.

GENOMIC DNA PURIFICATION FROM LEAVES, ROOTS AND PNEUMATOPHORES OF *Mauritia flexuosa* “aguaje”

ABSTRACT

Mauritia flexuosa is a very important amazonian palm tree because it offers ecosystemic services and multiple benefits. However, molecular studies of the species are few, partly due to the lack of a simple, economic and reproducible protocol to purify DNA of leaves and other organs. For this reason, the objective was to standardize a protocol to purify genomic DNA from leaves, roots and pneumatophores of *M. flexuosa*. Genomic DNA was purified with a modified protocol (without the use of liquid nitrogen). DNA quality and quantity were analyzed by standard methods. The high quality of the DNA obtained from the three types of organs was demonstrated by spectrophotometry ($A_{260}/A_{230} > 2$ and A_{260}/A_{280} of 1.77 to 1.81), DNA hydrolysis with *Hind* III, synthesized RAPD amplicons, and DNA integrity by electrophoresis analysis. In conclusion, the described protocol is simple, economic and reproducible, and it allows us to obtain genomic DNA of high purity from leaves, roots, and pneumatophores. Consequently, these results demonstrated experimentally that purified DNA is appropriate for molecular studies of *M. flexuosa*.

Key words: genetic diversity, molecular studies, amazonian palm tree.

^a Unidad Especializada de Biotecnología, Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA), Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), Psje. Los Paujiles S/N AAHH Nuevo San Lorenzo, San Juan Bautista, Iquitos, Perú. juanccgomez@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

La amazonía peruana se caracteriza por su gran biodiversidad de recursos fitogenéticos promisorios. Entre éstos, la palmera *Mauritia flexuosa* L.f. “aguaje” que frecuentemente forma los “aguajales” tiene una gran importancia socio-cultural¹, nos brinda servicios ambientales² y sus frutos tienen buena aceptación y una gran demanda por el alto valor nutricional, medicinal e industrial.³⁻⁵ Pero, esta creciente demanda está promoviendo la tala selectiva de plantas hembras para la cosecha de los frutos, lo cual podría causar su erosión genética y sobreexplotación. Estos impactos negativos pueden ser minimizados con métodos alternativos de cosecha y la inmediata implementación de programas de reforestación, de domesticación y de mejoramiento genético. Para dar soporte científico a estos programas, es necesario evaluar la diversidad genética, genotipificar ecotipos importantes, identificar y clonar marcadores gene-específicos asociados con el sexo y con resistencia a factores bióticos y abióticos adversos y realizar estudios del genoma.

Sin embargo, para realizar los estudios de genética molecular mencionados, debemos disponer de protocolos rápidos, simples, económicos y reproducibles para purificar el ADN genómico a partir de diferentes tipos de tejidos. Como no existe un protocolo universal para purificar el ADN de las plantas con las características mencionadas, se ha reportado varios protocolos de purificación de ADN especie-específicos a partir de hojas de varias especies vegetales.⁶⁻¹⁰ Pero estos protocolos no siempre son útiles para purificar ADN de alta calidad de hojas o de distintos tejidos de otras especies vegetales, debido a la diversidad de metabolitos que interfieren con el proceso de purificación y en los análisis moleculares posteriores.¹¹⁻¹³

Probablemente, por estas dificultades y debido a la rápida oxidación de los tejidos, no hay protocolos publicados sobre la purificación del ADN genómico de *M. flexuosa*. Aunque hay reportes sobre estudios moleculares de la especie en base al ADN obtenido de las hojas, pero no dan detalles metodológicos ni muestran evidencias de la cantidad ni calidad del material genético obtenido.^{14,15} Debido a esta falta de información científica y a las dificultades de coleccionar hojas de plantas adultas, por su gran altura (15 a 30 m), pero siendo factible purificar el ADN de otros tejidos accesibles como las raíces y los neumatóforos, se ha realizado esta investigación cuyo objetivo principal fue estandarizar un protocolo adecuado.

PARTE EXPERIMENTAL

Colecta de material botánico

Las hojas, raíces y neumatóforos fueron colectadas en el fundo “Leonardo”, ubicado en las coordenadas 03°46'50,5" LS y 73°18'25,3" LE a la altura del km 1,5 de la carretera a Santa Clara del Distrito de San Juan Bautista-Iquitos. Se seleccionó aleatoriamente 12 plantas: 4 plantas de 6 meses a 2 años, 4 plantas >2 hasta 4 años y 4 plantas >4 años. De cada planta, se obtuvo segmentos de 3 cm de hojas, raíces y neumatóforos (figura 1). Éstos se lavaron con agua destilada estéril y solución antioxidante (ácido L-ascórbico 150 µg/mL y ácido cítrico 100 µg/mL). Las muestras fueron transportadas en solución antioxidante a 4°C y protegidas de la luz a la Unidad Especializada de Biotecnología-CIRNA. En el laboratorio, de las hojas se obtuvo segmentos de ~25 mm²; de las raíces y de los neumatóforos se extrajo porciones del ápice de ~15 mg y ~4 mg, respectivamente. Todo este proceso se realizó con el material botánico embebido en solución antioxidante fría (~4°C).

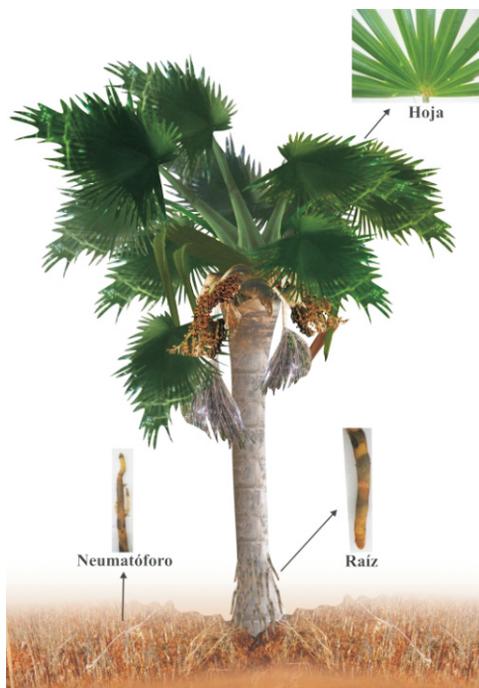


Figura 1. Tipos de muestras botánicas empleadas para purificar el ADN genómico de *M. flexuosa*.

Purificación del ADN genómico

Se realizó en base a Porebski *et al.*¹¹ con modificaciones. Estas modificaciones fueron: a) exclusión de la etapa de pulverización del material vegetal con nitrógeno líquido, porque este insumo no está disponible en la amazonía, b) uso de arena estéril para triturar las muestras, c) empleo de alta proporción del tampón de extracción:muestra (10:1) y d) reducción del tiempo de purificación a sólo una hora. Para estandarizar el protocolo se realizó diversos experimentos con la cantidad de muestra botánica, la cantidad de arena, el tiempo de trituración, la proporción tampón de extracción:muestra y el volumen de cloroformo:alcohol isoamílico. Finalmente, el protocolo estandarizado consta de los siguientes pasos:

- 1) Poner en un mortero 10 a 90 mg de la muestra, 100 mg de arena estéril y 10 volúmenes del tampón de extracción (Tris-HCl 300 mM pH 8,0; NaCl 2,0 M, EDTA 25 mM, CTAB 2%, polivinilpirrolidona 40000 2%, albúmina de suero bovino 0,3%) y β -mercaptoetanol 2%, triturar por 1 a 2 minutos.
- 2) Transferir el homogenizado a microtubos estériles de 1,5 mL e incubar a 75°C por 10 minutos, homogenizar por inversión cada 2 minutos.
- 3) Añadir igual volumen de cloroformo:alcohol isoamílico, homogenizar en el vortex por 10 segundos y centrifugar a 14000 x g a 4°C por 5 minutos.

- 4) Transferir el sobrenadante a un microtubo, repetir el paso 3) y transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo.
- 5) Añadir igual volumen de alcohol isopropílico helado, homogenizar suavemente por inversión e incubar a -20°C por 10 minutos.
- 6) Centrifugar a $10000 \times g$ a 4°C por 5 minutos, descartar el sobrenadante; y el ADN precipitado lavar dos veces con $250 \mu\text{L}$ de etanol de 70°C frío.
- 7) Centrifugar a $5000 \times g$ a 4°C por 5 minutos, descartar el sobrenadante, secar a 40°C por 10 minutos y resuspender con $100 \mu\text{L}$ de tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) y almacenar a -20°C .

Análisis espectrofotométrico

Para el análisis espectrofotométrico en las tres etapas de purificación (E) se tomó alícuotas de $50 \mu\text{L}$ después de los pasos 1 y 2 (E1), pasos 3 y 4 (E2) y después de los pasos 5, 6 y 7 (E3) del proceso de purificación. De estas muestras se midió su absorbancia desde 190 hasta 1100 nm . Para determinar la calidad y cantidad del ADN purificado se midió absorbancias de las muestras a 230, 260 y 280 nm , con los que se determinó los ratios de calidad (A_{260}/A_{230} y A_{260}/A_{280}). La cantidad de ADN se determinó de acuerdo a Sambrook *et al.*¹⁶

Análisis electroforético

Una mezcla de ADN genómico purificado de los tres grupos etéreos de hojas, raíces o neumatóforos se sembraron en gel de agarosa al 1% y se realizó la electroforesis con TBE $0,5\text{X}$ (Tris-borato 45 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) a 80 V por una hora. El gel se tiñó con bromuro de etidio ($0,1 \text{ mg/mL}$) y las bandas de ADN se observaron en un transiluminador UV.

Hidrólisis del ADN con endonucleasa

Una mezcla de $20 \mu\text{g}$ de ADN genómico obtenido de los tres grupos etéreos de hojas, raíces o neumatóforos se incubó con 50 U de la enzima de restricción *Hind* III a 37°C por 24 horas. Los fragmentos de ADN fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 V por una hora. Las bandas de ADN se observaron con luz UV después de tratar el gel con bromuro de etidio ($0,1 \text{ mg/mL}$).

Amplificación con cebadores aleatorios

Los componentes para la reacción en cadena de la polimerasa fueron: tampón 1X , MgCl_2 $1,87 \text{ mM}$, dNTPs $0,5 \text{ mM}$, cebadores aleatorios A (5'-GGGTAACGCC-3'), B (5'-CCGCAGCCAA-3') ó C (5'-GCGATCCCCA-3') $0,25 \mu\text{M}$, Amplitaq Gold $0,025 \text{ U}/\mu\text{L}$, ADN genómico 40 ng y agua ultrapura para un volumen final de $20 \mu\text{L}$. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Eppendorf ep gradient con las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C por 4 minutos, 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 40°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los amplicones se resolvieron por electroforesis a 80 V por 3 h en gel de poliacrilamida al 8%. Las bandas de ADN se revelaron por tinción argéntica según Bassam y Greshold¹⁷.

Análisis estadístico

Se determinó el promedio y desviación estándar de la cantidad de ADN aislado a partir de los tres tipos de tejidos y de diferentes cantidades de muestras (10 a 90 mg). También, para determinar diferencias en la cantidad promedio de ADN genómico obtenido se realizó el ANVA con test HSD de Tukey con un nivel de confianza del 95% y considerando diferencias estadísticas significativas cuando $p < 0,05$. El coeficiente de correlación de Pearson se empleó para analizar este parámetro entre la cantidad de muestra botánica empleada y la cantidad de ADN genómico obtenido. Todos los análisis se hicieron con el programa IBM SPSS Statistics 21.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha purificado ADN genómico a partir de hojas, raíces y neumatóforos de *M. flexuosa*, el cual se caracteriza por su alta calidad y cantidad apropiadas para estudios moleculares de esta especie. La alta calidad se evidencia por los resultados de los análisis espectrofotométricos durante la purificación, que muestran desaparición gradual de los picos de absorbancia de sustancias contaminantes. Así, en la última etapa de purificación (E3) se observó un único pico de máxima absorbancia a 260 nm, el cual corresponde al ADN genómico puro (figura 2). Asimismo, en la tabla 1 se muestra que los ratios A_{260}/A_{230} son mayores de 2, lo cual nos indica que el ADN purificado no está contaminado con polisacáridos ni polifenoles, porque ratios bajos sugieren contaminación con estos compuestos.^{11,18} También, los ratios A_{260}/A_{280} adecuados nos indican que el ADN no está contaminado con proteínas ni está degradado.^{10,16}

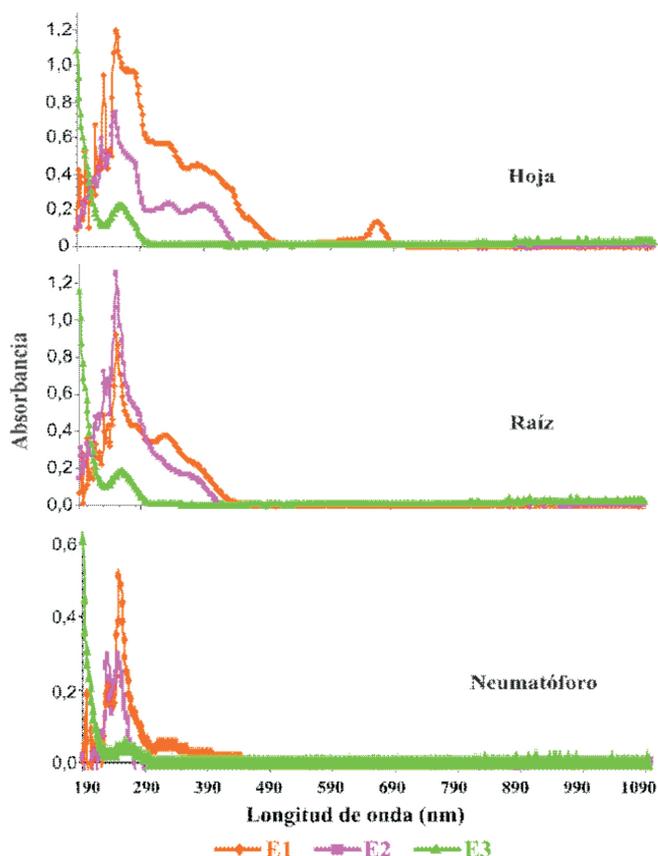


Figura 2. Perfil espectrofotométrico de las muestras en las tres etapas de purificación del ADN genómico (E1, E2 y E3) a partir de hojas, raíces y neumatóforos de *M. flexuosa*.

Tabla 1. Calidad y rendimiento del ADN genómico purificado a partir de hojas, raíces y neumatóforos de *M. flexuosa*.

| Tipo de muestra | n | Ratios de calidad | | Rendimiento ($\mu\text{g ADN/g muestra}$) |
|-----------------|----|-------------------|-----------------|------------------------------------------------|
| | | A260/A230 | A260/A280 | |
| Hoja | 12 | 2,03 \pm 0,27 | 1,77 \pm 0,05 | 366 \pm 132 |
| Raíz | 12 | 2,13 \pm 0,21 | 1,77 \pm 0,06 | 257 \pm 102 |
| Neumatóforo | 12 | 2,10 \pm 0,35 | 1,81 \pm 0,02 | 81 \pm 29 |

Los valores de los ratios de calidad y del rendimiento indican el promedio \pm desviación estándar

Adicionalmente, otras evidencias experimentales nos indican la alta pureza del ADN genómico obtenido (figura 3). Primero, al hidrolizar el ADN genómico con la enzima *Hind* III, nos revela ausencia de inhibidores para este tipo de enzimas (figura 3,1). Segundo, al poder sintetizar múltiples amplicones con los tres cebadores (figura 3,2), evidenciados por la alta intensidad de las bandas de ADN, nos muestra que no contiene inhibidores para la ADN polimerasa taq. Porque varias sustancias que coprecipitan con el ADN durante la purificación interfieren con los análisis moleculares mencionados.¹¹⁻¹³

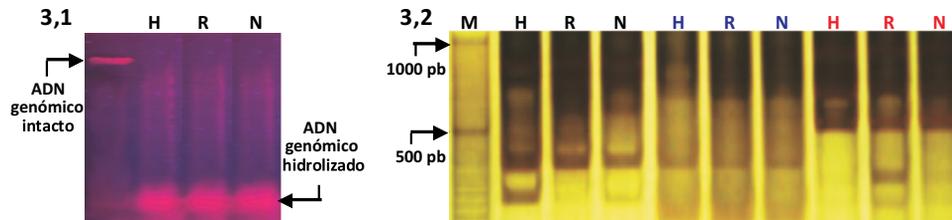


Figura 3. Evidencias experimentales de la alta calidad del ADN genómico purificado a partir de hojas (H), raíces (R) y neumatóforos (N) de *M. flexuosa*. Hidrólisis del ADN genómico con la enzima de restricción *Hind* III (3,1) y amplificación del ADN con cebadores aleatorios A, B y C (3,2). M: marcador de peso molecular.

En cuanto a la cantidad de ADN genómico obtenido los resultados indican que dependió del tipo (tabla 1) y cantidad de muestra botánica (figura 4). De tal forma, que de acuerdo al rendimiento promedio obtenido ($\mu\text{g ADN/g tejido}$) observamos que hoja > raíz > neumatóforo. Así, de las hojas se obtuvo 1,4 veces más ADN que de las raíces y 4,5 veces más que de los neumatóforos. También, de las raíces se obtuvo 3,2 veces más ADN que de los neumatóforos, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($F = 25,7$, $gl = 2$, $p < 0,05$). Adicionalmente, la reproducibilidad del protocolo se muestra con la alta correlación de Pearson ($> 0,97$) entre la cantidad de tejido utilizado (hoja, raíz o neumatóforo) y la cantidad de ADN puro obtenido (figura 4).

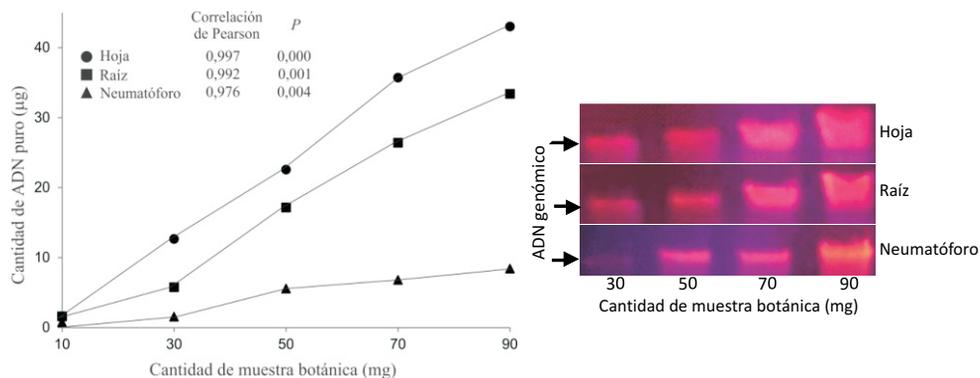


Figura 4. Relación entre la cantidad de muestra de hojas, raíces y neumatóforos y la cantidad de ADN genómico puro obtenido. Gráfico de dispersión con resultados del análisis de correlación de Pearson (4,1) y gels de agarosa que muestran la cantidad e integridad del ADN genómico obtenido por tipo de muestra (4,2).

Las diferencias en la cantidad de ADN genómico obtenido por tipo de órgano puede deberse a sus diferencias histológicas e histoquímicas. Así, el ADN obtenido de las hojas procede de diferentes células, porque las hojas de palmeras tienen células que forman la epidermis, la hipodermis, el mesófilo y los tejidos del floema y xilema. Todas las células que constituyen estos tejidos son nucleadas y tienen paredes celulares finas (excepto las células del xilema).¹⁹ Además, las células del mesófilo presentan cloroplastos y al ser lisadas liberan las clorofilas. Estos compuestos fueron detectados en la primera etapa de purificación del ADN de hojas, pero no de los demás órganos (figura 2). En segundo lugar, el ADN obtenido de las raíces deriva principalmente de los meristemos, los cuales se encuentran en la parte interna del ápice, ligeramente por encima de la cofia.¹⁹ Finalmente, el ADN genómico obtenido de los neumatóforos también provienen principalmente de los meristemos apicales. Estos órganos están muy desarrollados en suelos húmedos y gran parte de la estructura está formada por células que constituyen el aerénquima, caracterizados por grandes espacios intercelulares para facilitar el intercambio de gases;¹⁹ consecuentemente, en estos órganos la densidad celular por área o cantidad de material botánico es mucho menor que en las hojas o en las raíces. Lo que nos permite explicar la menor cantidad de ADN obtenido de estos órganos. Por tanto, las particulares características histológicas e histoquímicas de los tres tipos de órganos empleados explica las diferencias en la cantidad de ADN genómico purificado.

Al comparar el rendimiento de nuestro protocolo con los reportes de purificación de ADN a partir de hojas de otras palmeras encontramos algunas diferencias. En este estudio obtuvimos en promedio > 350 µg ADN/g de hoja (tabla 1). Mientras, que de *Cocos nucifera* obtienen 300 µg de ADN/g de hoja²⁰ y de *Phoenix dactylifera* sólo de 30 a 35 µg de ADN/g de hoja.²¹ Estas variaciones se deben a diferencias en varios aspectos: a) edad, y composición química de los tejidos foliares; b) la anatomía e histología de las hojas y c) diferencias en los protocolos empleados, particularmente en los tipos y concentraciones de los componentes del tampón de extracción, la proporción tampón: muestra, entre otros.

La investigación realizada podría tener algunas limitaciones. Porque no se ha evaluado la hidrólisis del ADN con otras enzimas de restricción y no se ha obtenido el ADN de plantas procedentes de distintas zonas geográficas, dado que es posible que diversos metabolitos inhibitorios pueden ser sintetizados en respuesta a factores ambientales variables. Finalmente, no se ha probado si el protocolo descrito es apropiado para purificar ADN de otros órganos de *M. flexuosa*.

Con este trabajo se ha superado una primera brecha, que es el de contar con un protocolo simple, económico y reproducible para purificar ADN de *M. flexuosa*. Aún queda por hacer mucha investigación a nivel molecular de esta especie. Porque hasta la fecha no se ha identificado marcadores moleculares asociados con el sexo. Si esto se logra, se sentarán las bases para que los programas de cultivo y repoblamiento de la especie sean exitosos. Asimismo, falta identificar marcadores genéticos asociados con resistencia al estrés causado por factores abióticos y bióticos y aquellos marcadores genéticos que determinan el tamaño, forma, color y composición nutricional de los frutos de *M. flexuosa*. También es necesario realizar estudios de diversidad genética de la especie e iniciar proyectos de secuenciamiento del genoma y transcriptoma. Si logramos estos avances, daremos soporte científico al establecimiento de programas de mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares, que aceleraría significativamente la obtención de variedades mejoradas de la especie.

CONCLUSIONES

El protocolo descrito es simple, económico y reproducible y nos permite obtener ADN genómico de alta pureza tanto de las hojas como de las raíces y de los neumatóforos. Por tanto, tal como ha sido demostrado experimentalmente, el ADN purificado es apropiado para realizar estudios moleculares de *M. flexuosa*.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Jorge L. Marapara y Lastenia Ruiz Mesía por brindarnos las facilidades de acceso a las instalaciones y uso de equipos de la Unidad Especializada de Biotecnología del Centro de Investigaciones de la Amazonía-UNAP. Un especial agradecimiento al Dr. J. Dylan Maddox por la revisión crítica del Abstract.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gilmore MP, Endress BA, Horn CM. The socio-cultural importance of *Mauritia flexuosa* palm swamps (aguajales) and implications for multi-use management in two Maijuna communities of the Peruvian Amazon. *J Ethnobiol Ethnomed* **2013**;9:29.
2. Freitas L, Otárola E, del Castillo D, Linares C, Martínez P, Malca GA. Servicios ambientales de almacenamiento y secuestro de carbono del ecosistema aguajal en la Reserva Nacional Pacaya Samiria, Loreto-Perú. IIAP. Documento Técnico N° 29. **2006**; p. 1-62.
3. Villachica H. Frutales y Hortalizas Promisorias de la Amazonía Peruana. En Tratado de Cooperación Amazónica. Iquitos-Perú. Secretaria Pro tempore. **1996**; p.76-83.
4. Rojas R, Salazar C, Llerena C, Rengifo C, Ojanama J, Muñoz V, et al. Industrialización primaria del aguaje (*Mauritia flexuosa* L.f.) en Iquitos (Perú). *Folia Amazónica* **2001**;12(1-2):107-121.
5. Ferreira BS, de Almeida CG, Faza LP, de Almeida A, Diniz CG, da Silva VL, et al. Comparative properties of Amazonian oils obtained by different extraction methods. *Molecules*. **2011**;16(7):5875-1585.

6. Doyle JJ, and Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **1987**;19:11-15.
7. Wang X, Wang Z, and Zou Y. An improved procedure for the isolation of nuclear DNA from leaves of wild grapevine dried with silica gel. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1996**;14(4):1-5.
8. Zhang J, and Stewart J. Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA. *The J. Cotton Sci.* **2000**;4:193-201.
9. Sharma AD, Gill PK, and Singh P. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **2002**;20:415a-415f.
10. Castro JC, Cobos M, Ramírez R, Imán SA. Aislamiento de ADN genómico de *Myrciaria dubia* (HBK) “camu camu” apropiado para análisis moleculares. *Ciencia Amazónica* **2012**;2(1):7-15.
11. Porebski S, Bailey L, and Baum B. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1997**;15: 8-15.
12. Merlo DJ, and Kemp D. Effect of polysaccharides on kinetics of DNA. *Plant Physiol.* **1976**;58:1522-1526.
13. Pandey R, Adams R, and Flournoy L. Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1996**;14(1):17-22.
14. Picanço LR, Gomes MT, da Silva JL, Silva W, Costa P and Serrão LA. Genetic diversity in natural populations of Buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.). *CBAB, Crop Breed. Appl. Biotechnol.* **2011**;11: 216-223.
15. Menezes EV, Souto WF, Ciampi AY, Azevedo VC, Valério HM, Pimenta MA. Development and characterization of DNA microsatellite primers for buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.). *Genet Mol Res.* 2012;11(4):4058-4062.
16. Sambrook J, Fritsch E, and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. First Edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory publications. New York. USA. **1989**; p. 545.
17. Bassam BJ, Gresshoff PM. Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nat. Protoc.* **2007**;2(11):2649-2654.
18. Loomis MD. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol* **1974**;31:528-544.
19. Tomlinson PB. *The Structural Biology of Palms*. Oxford Science Publication. New York. U.S.A. 1990.
20. Upadhyay A, Jose J, Manimekalai R, and Parthasarathy V. Molecular analysis of phylogenetic relationship among coconut accessions. *Man. Plant Gen. Div.* **2002**;1:1-6.
21. Quenzar B, Hartmann C, Rode A, and Benslimane A. Date palm DNA mini-preparation without liquid nitrogen. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1998**;16(3):263-269.

EFFECTO DE LA MADUREZ EN LOS COMPONENTES DE VALOR COMERCIAL (TANINOS Y GOMA) DE TARA *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze.

Marianela Melo Ferrari^{*}, Patricia Glorio Paulet¹ y Gladys Tarazona Reyes¹

RESUMEN

El Perú lidera la exportación de tara (*Caesalpinia spinosa*); sin embargo, no hay información del efecto de la madurez en sus componentes de valor comercial. Con el objetivo de evaluarlos, se analizó los frutos de tara de dos zonas geográficas: Huari (silvestre) y Pachacámac (cultivado) en cuatro niveles de madurez, desde los 2,5 hasta los 6,5 meses después de la floración. En el fruto fresco se determinó humedad, peso y color mediante la coordenada a* (CIELAB). En las vainas secas, molidas y sin semillas se analizó los taninos, acidez titulable (% ácido gálico) y sólidos solubles. De las semillas se obtuvo la goma por extracción térmico-mecánica, en la cual se midió la viscosidad. Se encontró que el fruto verde con semillas formadas, recolectado entre los 2,5 a 3,5 meses después de la floración, los contenidos de taninos, acidez y sólidos solubles se mantuvo en valores constantes hasta los 5–5,5 meses, disminuyendo al 6to mes de permanencia del fruto en el árbol. La viscosidad de la goma para Pachacámac fue constante, mientras que en Huari tuvo una tendencia creciente. Se concluye que, el mejor momento de cosecha fue entre el 5to y 6to mes después de la floración.

Palabras clave: *Caesalpinia spinosa* (Mol) Kuntze, madurez, taninos, gomas, tara.

EFFECT OF MATURITY ON COMPONENTS OF COMMERCIAL VALUE (TANNINS AND GUM) TARA *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze.

ABSTRACT

Peru leads the export of tara (*Caesalpinia spinosa*). However, there is no information on the effect of the maturity of fruits over their commercial value components. To evaluate this effect, tara fruits were analyzed from two geographical areas: Huari (wild) and Pachacamac (cultivated) in four maturity levels ranging from 2.5 up to 6.5 months after flowering. Also, in the fresh fruit, moisture, weight and CIELAB color coordinate a* was determined. In the seedless crushed dry pods, it was analyzed the tannins, acidity (% gallic acid) and soluble solids. From the seeds, the gum was extracted by thermal-mechanical procedures and the viscosity was measured. We found that for the green fruit with seeds already formed, collected between 2.5-3.5 months after flowering, the levels of tannins, acidity and soluble solids had values that remained constant up to 5 – 5.5 months, declining at 6 months of permanence of the fruit on the tree. The viscosity of the gum from Pachacamac seeds was constant, whereas for Huari seeds had a growing trend. It was concluded that the best time for harvesting tara pods was between the 5th and 6th month after flowering.

¹ Escuela de Post Grado. Universidad Nacional Agraria, La Molina. Av la Universidad s/n. Lima 12,
^{*} marianelamelof@gmail.com

Key words: Tara, *Caesalpinia spinosa* (Mol) Kuntze, maturity, tannins, gums, tara.

INTRODUCCION

La tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, es un arbusto originario del Perú, considerada especie forestal nativa, que crece entre los 800 y 2,800 msnm¹. Actualmente no existe norma técnica ni parámetros óptimos de calidad para determinar el mejor momento de cosecha. La mayor producción de tara proviene de bosques silvestres, pudiendo recolectarse inmaduras perjudicando en su contenido de taninos y gomas. El fruto de tara es aprovechado en la industria química (taninos), alimenticia (aditivo hidrocoloide), farmacéutica (ácido gálico, antioxidante). Nuestro país es el principal exportador de tara aportando el 80% de la oferta, contribuyendo a la economía nacional². La tara peruana es considerada de mejor calidad que la de Bolivia y Ecuador respecto al nivel de taninos³. Los principales productores de tara son los departamentos de Cajamarca (39,5%), Ayacucho (16,4%), La Libertad (12,5%), Huánuco (8,4%), Ancash (6,2%) y otros (5,8%)⁴. Dentro de la actividad económica de este fruto, hay un mercado interno desde productores, intermediarios, transportistas que llevan el producto a las empresas procesadoras y exportadoras y un mercado externo. El conocer el efecto de la madurez del fruto de tara en sus componentes de valor comercial, objetivo de esta investigación, brindará información del mejor momento de cosecha que permita la estandarización de la calidad de la oferta exportable de este vegetal.

PARTE EXPERIMENTAL

Lugar de ejecución: La recolección de los frutos se realizó en dos zonas geográficas: Huari (zona sierra) y Pachacámac (zona costa) desde diciembre 2010 hasta diciembre 2011. Los análisis químicos y fisicoquímicos se realizaron en los laboratorios de la Facultad de Industrias Alimentarias – UNALM y de la Cía. Exportadora El Sol.

Material biológico: Frutos de tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. 50 arbustos como unidad experimental de una población de 500 para cada zona geográfica, con similitud en edad, altura, producción, tipo de cultivo y riego.

Equipos y reactivos: Calentador – agitador electromagnético (IKA), viscosímetro RVT (Brookfield), aguja N°4 RV, molino manual, licuadora de cuchillas, horno, tamices de 3,5 mm y 2 mm, hidróxido de sodio (Merck), polvo de piel de cerdo desengrasado y molido preparado para curtiembre (L.H. Lincoln & Son), sulfato de cromo y potasio (Merck).

Métodos de análisis:

Determinación del color⁵: Se utilizó esta técnica por la geometría irregular del fruto que, al secarse, es quebradizo. Los resultados se expresaron en valor cromático a*: de -120 (verde) a +120 (rojo), ya que los frutos, según su madurez, viran de verde a rojo-naranja. Para esta técnica se requirió de:

Cámara fotográfica Canon PowerShot SD1000 digital ELPH (Japón), resolución: 7,1 mega píxeles, colocado verticalmente a 22,5 cm de la muestra mediante un soporte universal.

Dos lámparas fluorescentes compacta spiral 20 General Electric, luz fría, 20W, temperatura color de 6500K, colocadas a 24 cm y en ángulo de 45° de la muestra.

La cámara se configuró como sigue: modo de operación: manual, no flash, no zoom, velocidad ISO 1600, balance de blancos: luz de día, abertura del lente: f 2,8, exposición: 1/100; la imagen se tomó a una resolución intermedia (2592x1944); almacenada en formato JPEG de alta resolución y calidad superfina.

Cartilla de color QPcard 201 y software QPcolorsoft 501 disponible en <http://www.qpcard.se/BizPart.aspx?tabId=28> y software Adobe Photoshop. La cartilla tiene 30 colores: 4 grises en los vértices que sirven para referir la iluminación general de la foto; 7 grises en la parte superior derecha que sirven para orientar el software sobre la iluminación y el resto de colores para la corrección del color. Las dimensiones de la cartilla son 142 x 40 mm.

Procedimiento: Una foto tiene los colores auténticos si ha sido tomada con luz solar, pero esta luz varía a lo largo del día. La foto es corregida al color que tendría si hubiera sido tomada con una fuente de luz libre de distorsión fotografiando la muestra junto con la cartilla Qpcard 201 y corrigiendo los colores mediante el software QPcolorsoft 501. Luego, con el software Adobe Photoshop se determina el parámetro de color a^* como si se estuviera midiendo con un colorímetro.

Determinación de los sólidos solubles⁶. Se disolvió 8 g en 1 L agua a 96 °C; se enfrió a 25 °C, se tomó 200 mL y filtró sobre 2 g caolín mas papel filtro rápido; se evaporó en cápsula tarada 100 mL del filtrado. Se pesó el residuo.

$$\text{Sólidos solubles, \%} = \frac{(W2-W1)10}{W3} 100$$

Donde: W1=peso (g) de la cápsula de evaporación

W2= peso (g) de la cápsula + residuo de la solución tánica luego de evaporar

W3= peso (g) de la muestra

10= Factor de dilución

Determinación de los no taninos solubles⁶. Se disolvió 8 g en 1 L agua a 96 °C, se enfrió a 25 °C, se tomó 200 mL y se hizo reaccionar con agitación por 10 minutos con polvo de piel de cerdo (previamente humedecido en agua 10 veces su peso y tratado con solución al 3% de sulfato de sodio y potasio en proporción 1:1, luego lavado por 4 veces con agua (15 veces su peso seco); finalmente exprimido hasta un 72,5 % de humedad). El polvo de piel captura los taninos presentes en la extracción acuosa; luego se filtró sobre tamiz 2 mm y el líquido que no reaccionó se recibió en 2 g de caolín; se filtró sobre papel filtro rápido y se evaporó 100 mL del filtrado sobre cápsula tarada. Se pesó el residuo.

$$\text{No taninos, \%} = \frac{F(W2-W1)10}{W3} 100$$

Donde: W1= peso (g) de la capsula de evaporación

W2= peso (g) de la cápsula + residuo de la solución tánica luego de evaporar

W3= peso (g) de la muestra

10= Factor de dilución

$F = \frac{200 + \text{gramos de agua adicionada en el polvo de piel con 72.5 \% de humedad}}{200}$

Determinación de los taninos⁶:

$$\text{Taninos, (\%)} = \text{Sólidos solubles (\%)} - \text{No taninos (\%)}$$

Los tipos de materiales analizados por este método pueden ser productos de plantas tales como maderas, cortezas, hojas, frutos y raíces.

Determinación de la acidez titulable: utilizando meq ac. gálico = 0,1701

Determinación de la viscosidad⁷: Se dispersó la goma 1 % (p/p) en 400 mL agua, se agitó a 500 rpm por 1 hora seguido de un licuado en un molino de cuchillas por 1 minuto; se colocó en baño de agua caliente (100 °C) por 10 minutos completando la hidratación. Se enfrió con agitación por 2 horas, se midió la viscosidad a 25 °C en un viscosímetro Brookfield RVT aguja N°4 a 20 rpm y se multiplicó por el factor del equipo expresándolo en centipoises.

Viscosidad, cps = lectura a 20rpm x factor a 20 rpm, spindle 4

Donde: factor a 20 rpm, spindle 4 = 100

Se determinó la reología mediante la representación gráfica del esfuerzo de corte versus la velocidad de corte y la viscosidad aparente versus la velocidad de corte, para todos los niveles de recolección de las dos zonas geográficas estudiadas.

Análisis estadístico: Se utilizó el programa estadístico SSPS versión 19. Los resultados fueron procesados por un análisis ANOVA de un factor y la prueba de Tukey para estimar la significancia estadística. Las diferencias en $p < 0,05$ se consideraron significativas. Para los datos de color se usó la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis, y el test de Dunn's para evaluar diferencias significativas en $p < 0,05$.

Identificación de la zona de estudio, características de los árboles elegidos y niveles de recolección: ver tablas 1, 2 y 3. Al no haber valores de referencia respecto a los días después de la floración para iniciar la recolección, se trabajó con características visuales, tales como la forma del fruto (si presentaba semillas formadas), el color de la vaina (desde el color verde hasta anaranjado-rojizo), color de la semilla (desde el color verde hasta marrón) y la apariencia táctil del fruto (vainas frescas o secas y si la semilla estaba blanda o dura), a fin de determinar cuatro niveles de recolección.

Tabla 1: Identificación de las zonas de estudio.

| Zona | Departamento | Provincia | Distrito | Altitud (msnm) |
|--------|--------------|-----------|------------|----------------|
| Sierra | Ancash | Huari | Huari | 3000 |
| Costa | Lima | Lima | Pachacámac | 70 |

Tabla 2: Características de los árboles elegidos.

| Zona de Recolección | Edad (años) | Producción por árbol (kg) | Tipo de cultivo | Tipo de riego | Altura (m) |
|---------------------|-------------|---------------------------|-----------------|--------------------|------------|
| Huari | 10 | 20 – 30 | Silvestre | Lluvia | 5 - 6 |
| Pachacámac | 7 | 5 | Cultivado | Canales de regadío | 1,5 - 2 |

Obtención de la vaina molida: Siguiendo la figura 1, se separó los frutos que presentaron daños físicos. El desvainado se realizó en forma manual separando la semilla. Se procedió al secado de las vainas mediante estufa de aire circulante a 40 °C hasta humedad de 10 %. La

vaina seca se molió en un molino manual hasta un tamaño de partícula 2 mm aproximadamente. Se almacenó en bolsas plásticas de polipropileno rotuladas, a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Obtención de la goma de tara: Según la figura 1, de las semillas separadas de la vaina, se procedió a extraer la goma en un proceso térmico – mecánico, en seco. Se pesó 100 g de semillas, se colocó en un recipiente resistente al calor y se expuso a 170-180 °C por 10 minutos con agitación de 5 segundos cada 2 minutos; seguido de una molienda en molino de cuchillas a máxima velocidad. Las semillas con el calor se dilataron y al exponerlas a un choque mecánico se partieron fácilmente dejando libre los componentes de la semilla: cáscara, goma en hojuela y embrión. Con ayuda de zarandas de 3,5 mm y 2 mm se separó la goma y se almacenó en bolsas de polipropileno rotuladas, a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

Tabla 3: Características visuales y tiempo de madurez de los cuatro niveles de recolección.

| Nivel de recolección | Meses después de la floración (mes-df) | | Características visuales |
|----------------------|----------------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | Huari | Pachacamac | |
| 0 | 0 | / 0 | 75 % de flores en el árbol |
| 1 | 2,5 | / 3–3,5 | Semilla formada con goma Color de la vaina: verde Color de la semilla: verde Apariencia táctil: vaina fresca, semilla blanda |
| 2 | 4 | / 3,5 – 4,5 | Color de la vaina: amarillo pintas rojas Color de la semilla: verde oscuro Apariencia táctil: vaina fresca, semilla blanda |
| 3 | 5 | / 4,5 – 5 | Color de la vaina: naranja - rojo Color de la semilla: marrón Apariencia táctil: vaina semi-seca, semilla dura. Llamada por los recolectores “estado sazón”. |
| 4 | 5,5 | / 6 – 6,5 | Color de la vaina: rojo - anaranjado Color de la semilla: marrón Apariencia táctil: vaina seca, semilla dura. Llamada por los recolectores “estado galleta”. |

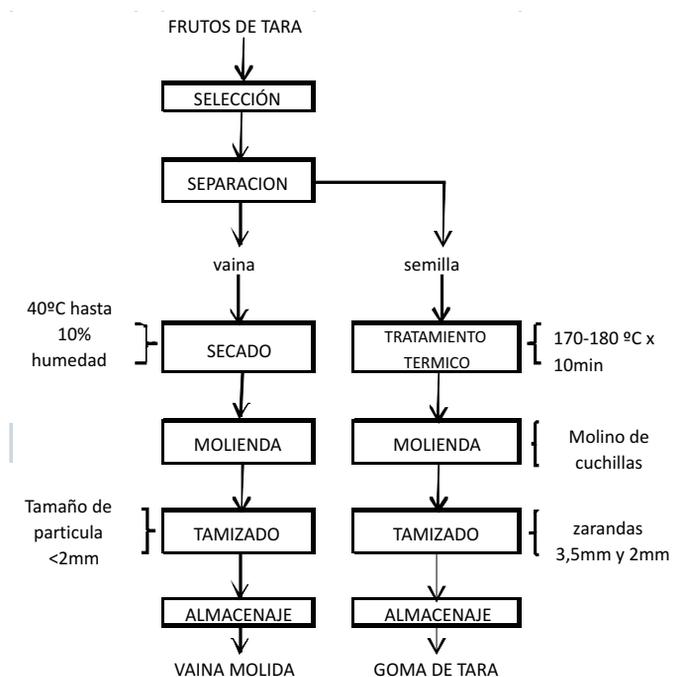


Figura 1: Flujo de operaciones para la obtención de vaina molida y goma de tara.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados de análisis en el fruto fresco. (Se presentan los resultados en la figura 2).

Humedad y peso: Hay una acentuada pérdida de agua en el fruto de tara a lo largo de su madurez, desde 60 % hasta 10 % para los frutos tomados al 5,5 mes-df, y hasta 6 % para los frutos que permanecieron hasta el 6,5 mes-df en el árbol. Estadísticamente los datos de humedad difieren para cada nivel de madurez. Para esta variable el mejor tiempo de recolección es cuando el fruto presenta menos agua, esto es, a partir del 5,5 mes-df y 6to mes-df para la zona Huari y Pachacámac, respectivamente. El peso también disminuye en el tiempo, relacionado con la pérdida de agua.

Color expresado en coordenada a*: La tabla 4 muestra los valores de color obtenidos en cada nivel de recolección para Pachacámac. A los 3–3,5 mes - df, la vaina presentó un color verde ($a^* -4,33$), observándose pintas rosadas, de allí el valor a^* positivo. A los 3,5-4,5 mes-df, aun presentaba vainas verdes ($a^* -2,14$); luego a los 4,5-5 mes-df el color dejó de ser verde para tornarse rojo-naranja, por ello los valores positivos. A los 6-6,5 mes-df el fruto permanece en el árbol variando el color hacia un rojo oscuro, por ello el valor a^* disminuye hasta cero. Estadísticamente los datos de color difieren significativamente para cada nivel de madurez. Para esta variable el mejor tiempo de recolección podría ser a partir de los 4,5-5 mes-df y antes del 6to mes-df, donde se obtuvo el mayor valor.

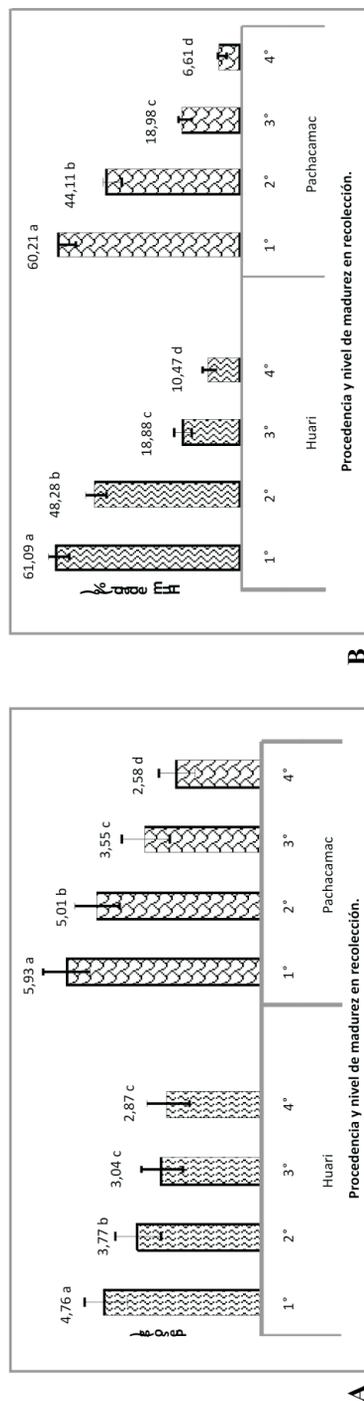


Figura 2: Comportamiento de la humedad y peso a lo largo de su madurez.

A: Los valores mostrados son medias de peso (g) de fruto fresco \pm desviación standard. Para Huarí: (n= 99 para el 1er nivel, n=113 para el 2do nivel, n=110 para el 3er nivel y n=201 para el 4to nivel de recolección). Para Pachacamac: (n= 130 para el 1er nivel, n=45 para el 2do nivel, n=35 para el 3er nivel y n=83 para el 4to nivel de recolección).

B: Los valores mostrados son medias de humedad (%) de fruto fresco \pm desviación standard, Para Huarí: (n= 50 para los cuatro niveles de recolección). Para Pachacamac: (n= 20 para el 1er nivel, n=21 para el 2do nivel, n=21 para el 3er nivel y n=21 para el 4to nivel de recolección).

C

| Nivel de madurez en recolección. | Meses después de la floración (meses - df) | |
|----------------------------------|--------------------------------------------|------------|
| | Huarí | Pachacamac |
| 1° | 2,5 | 3 – 3,5 |
| 2° | 4 | 3,5 – 4,5 |
| 3° | 5 | 4,5 – 5 |
| 4° | 5,5 | 6 – 6,5 |

C. meses – df (meses después de floración) equivalentes a cada nivel de madurez en recolección. En una misma variable; letras encima de las barras indica diferencias no significativas, letras diferentes indica diferencias significativas con Tukey ' ' = 0,05. Línea vertical encima de barras es gráfica de desviación estándar.

Tabla 4: Datos de color expresados en coordenada a*. Zona Pachacámac

| Nivel de Recolección | Tiempo después de la floración | Mínimo | Máximo | Mediana | Rango |
|----------------------|--------------------------------|----------|---------|---------|-------|
| 1 | 3 – 3,5 meses | -16,2540 | 19,5232 | -4,3385 | 35,78 |
| 2 | 3,5 – 4,5 meses | -2,1449 | 48,2602 | 13,2886 | 50,40 |
| 3 | 4,5 – 5 meses | 12,3240 | 40,0821 | 27,2321 | 27,59 |
| 4 | 6 – 6,5 meses | 0,0000 | 39,1580 | 21,5543 | 39,16 |

Expresado como coordenada a*, verde a rojo. -120=Verde. +120=Rojo

Nº de lecturas: 359 para nivel recolección 1; 484 para nivel recolección 2; 90 para nivel recolección 3; 500 para nivel recolección 4.

Resultados de análisis en la vaina de tara: (Se presentan los resultados en la figura 3).

Taninos: Para el caso de Huari, a los 2,5 mes-df ya presentaba un nivel de taninos de 63% y 60% para el 5,5 mes-df. Para Pachacámac los taninos inician desde 62 % pero al mantenerse en el árbol hasta más del 6to mes-df los taninos disminuyen a 56 %. Con estos altos valores iniciales de taninos el fruto ya podría recolectarse en el primer nivel a partir de los 2,5 mes-df, donde ya está formado químicamente y sólo pierde humedad y peso en el tiempo, aunque, no sería industrialmente factible por el nivel de agua elevado y el color que resulte de la molienda de vainas verdes no es característico para la venta que es beige claro – oscuro⁸. La acentuada disminución de los taninos en las vainas de tara de la zona Pachacámac a los 6-6,5 mes-df puede deberse a la disminución de los compuestos fenólicos con el grado de madurez en las frutas; los taninos se mantienen hasta llegar a la senescencia donde se degradan. De los resultados, para esta variable el mejor tiempo de recolección puede ser después de los 5,5 mes-df y antes del 6to mes-df donde los valores se mantienen altos.

Acidez y sólidos solubles: De acuerdo a las figuras 3 B y 3 C, el mayor valor obtenido para las variables acidez y sólidos solubles en la zona Huari fue a los 4 mes-df y en Pachacámac a los 3-3,5 mes-df pudiendo recolectarse también a los 4,5-5 mes-df. Asimismo, se observa una acentuada disminución a partir del 6 mes-df para ambas variables.

Resultados de análisis en la goma: En la figura 3 D, para la zona Huari, la viscosidad de la goma de tara aumentó conforme avanzaba el tiempo de maduración, iniciándose con 1162 cps a 2,5 mes-df, llegando hasta 8312 cps a los 5,5 mes-df; para la zona Pachacámac la viscosidad de la goma a los 3-3,5 mes-df ya presentaba valores altos de 6362 cps, manteniéndose alto hasta el 6-6,5 mes-df. Para esta variable el mejor tiempo de recolección fue después de los 5,5 mes-df en donde los valores de viscosidad de la goma se mantuvieron altos para ambas zonas geográficas.

También determinó el comportamiento reológico de las dispersiones de goma de tara para ambas zonas geográficas en los cuatro niveles de recolección encontrándose que la representación del esfuerzo de corte “ τ ” versus la velocidad de corte o deformación “ γ ” no es una constante y está dada por una curva, según figura 4; la pendiente de la curva viene a ser el coeficiente de viscosidad aparente “ μ_a ”, asimismo, la figura 5 muestra la relación entre el

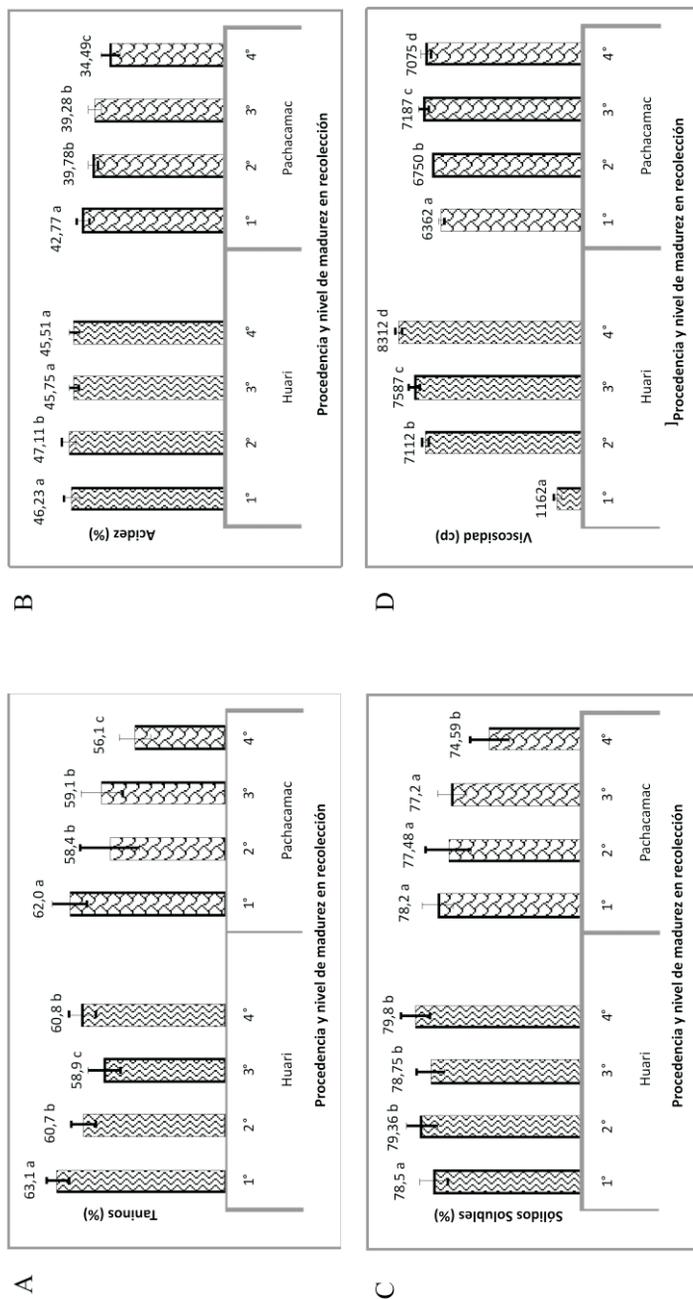


Figura 3. Evolución de los componentes de la vaina de tara molida y calidad reológica en goma de tara a lo largo de su madurez.

A. Valores: media de taninos (%) en vaina de tara \pm desviación standard, en base seca. Para Huari ($n=11$ para el 1er nivel, $n=15$ para el 2do nivel, $n=12$ para el 3er nivel y $n=10$ para el 4to nivel de recolección. Para Pachacamac ($n=9$ para el 1er nivel, $n=21$ para el 2do nivel, $n=12$ para el 3er nivel, $n=14$ para el 4to nivel de recolección) B. Valores: media de acidez (%) expresado en ácido gálico, meq: $0,1701$ en vaina de tara \pm desviación standard, en base seca Para Huari ($n=24$ para el 1er nivel, $n=22$ para el 2do nivel, $n=24$ para el 3er nivel y $n=25$ para el 4to nivel de recolección. Para Pachacamac ($n=8$ para los cuatro niveles de recolección) C. Valores: media de sólidos solubles (%) en vaina de tara \pm desviación standard, en base seca ($n=11$ para el 1er nivel, $n=15$ para el 2do nivel, $n=12$ para el 3er nivel y $n=10$ para el 4to nivel de recolección. Para Pachacamac ($n=9$ para el 1er nivel, $n=21$ para el 2do nivel, $n=12$ para el 3er nivel, $n=14$ para el 4to nivel de recolección) D. Valores: media de viscosidad (cp) en goma \pm desviación standard, en base seca ($n=4$ para Huari y Pachacamac para cada nivel de recolección) En una misma variable: letras iguales encima de las barras indica diferencias no significativas, letras diferentes, diferencias significativas con Tukey $\alpha=0,05$. Línea vertical encima de barras es gráfica de desviación standard.

coeficiente de viscosidad aparente y la velocidad de corte; en ambas la goma de tara presentó el comportamiento de un fluido no newtoniano pseudoplástico disminuyendo la viscosidad aparente al incrementar la velocidad de deformación aplicada.

Según los resultados de las variables estudiadas podemos indicar que al tercer mes-df la goma está formada químicamente y solo pierde humedad a lo largo de su madurez para el caso de Pachacámac y a partir del 4to mes-df para el caso de Huari, pudiéndose recolectar hasta el 5-5,5 mes-df para ambas zonas geográficas; pero si el fruto permanece en el árbol después del 6to mes-df las variables taninos, acidez, sólidos solubles y color, disminuyen. En cuanto a la viscosidad de la goma en Huari fue aumentando a lo largo de su madurez; en cambio, en Pachacámac desde el primer nivel de recolección se obtuvo un valor alto manteniéndose similar para los otros niveles de recolección.

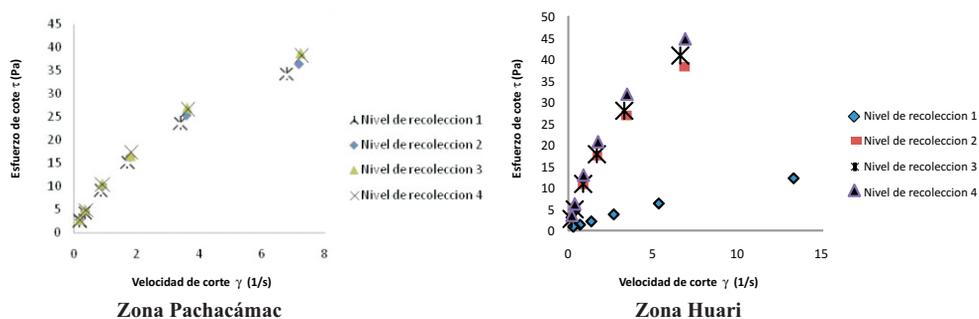


Figura 4: Esfuerzo de corte versus velocidad de corte medido a concentración de 1 % p/p en un Brookfield RVT spindle 4.

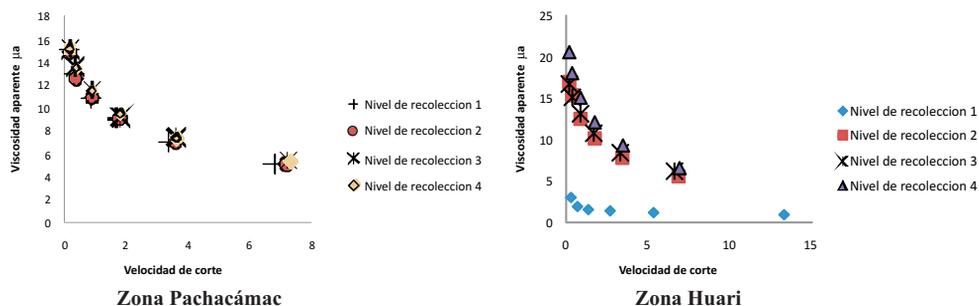


Figura 5: Viscosidad aparente versus esfuerzo de corte medido a concentración de 1 % p/p a 25 °C en un Brookfield RVT spindle 4

Estas variaciones en la viscosidad en el primer nivel de recolección podría explicarse por diferencias en el tipo de semilla y variedad, más que los factores climáticos, ambientales, o de cultivo, riego y edad del árbol. Otros factores tales como el peso molecular, forma y tamaño de la cadena polimérica (lineal o ramificada) y número de ramificaciones de galactosa a lo largo de la cadena lineal de manosa modificarían los valores de viscosidad encontrados. Puede ser

considerado niveles óptimos de recolección para Huari el cuarto nivel de recolección y para Pachacámac el tercer nivel de recolección, esto es a partir del 5to mes-df y antes del 6to mes-df, considerando las características de formación de goma en semillas, ganancia de color y pérdida de humedad.

CONCLUSIONES

El mejor momento de cosecha resultó ser a partir del 5to mes después de la floración y antes del 6to mes después de la floración donde se obtuvo un nivel mayor en goma, baja humedad y máximo color.

El efecto del tiempo de madurez sobre el contenido de taninos, acidez y sólidos solubles se mantuvieron constantes desde que el fruto está formado; pero aun verde y fresco, es decir, a partir de los 2,5 meses hasta el 6to mes después de la floración.

Los frutos que se mantienen en el árbol, después del 6to mes después de la recolección dieron los más bajos valores de taninos, acidez y sólidos solubles.

AGRADECIMIENTO

A la Cia Exportadora El Sol SAC, a la Ing. Rossana Romero Dulanto (Fundo Belloni), a la Sra. Mabel López quienes proporcionaron las facilidades para la recolección de la tara de Pachacámac y Huari.

REFERENCIA

1. Dostert, N.; Roque, J.; Brokamp, G.; Cano, A.; Weigend, M.; La Torre, MI. Factsheet: datos botánicos de tara. *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. Botconsult GMBH. 9p. 2009.
2. Flores, F.; Chávarry, L.; Vega, D. Criterios y pautas para la selección de arboles plus. *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara o taya”. Programa Adefor, Fosefor, Cosude, Intercooperación, Samiri. 62 p. 2005.
3. Marquina, RE. Evaluación del impacto socioeconómico del aprovechamiento de la tara (*Caesalpinia spinosa* Molina) en la comunidad campesina San Pedro de Pampay Ayacucho, considerado el enfoque de género. Tesis (M.Sc). UNALM. 117 p. 2008.
4. De la Cruz LP. Aprovechamiento integral y racional de la tara (*Caesalpinia spinosa* – *Caesalpinia tinctoria*). *Revista del Instituto de Investigación FIGMMG UNMSM*. 2004; 7(14): 64-73.
5. Villalobos, C. Formación y control de manchas indeseables en las pastas fortificadas con hierro al ser cocidas con hierbas aromáticas. Tesis (M.Sc.) UNALM, 2009.
6. ASTM. Standard practice for extraction of tannins from raw and spent materials. Method D6405-99, 2009.
7. Wang, Q, Ellis, PR, Ross-Murphy, SB. Dissolution kinetics of guar gum powders. I. Methods for commercial polydisperse samples. *Carbohydrate Polymers* 2002; 49: 131-137.
8. Mancero, L. La Tara (*Caesalpinia spinosa*) en Perú, Bolivia y Ecuador. Análisis de la cadena productiva en la región. ECOBONA (Programa regional para la gestión social de ecosistemas forestales andinos). Serie 02. 103 p. 2008.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PLOMO EN SANGRE PROVENIENTE DE LA POLICIA DE TRÁNSITO FEMENINA DE LAS UNIDADES CENTRO Y SUR DE LIMA METROPOLITANA

Graciela Arosquipa Aguilar^a, Elvito Villegas Silva^{b*}

RESUMEN

El contenido promedio de plomo en sangre de la policía femenina perteneciente a las Unidades Centro y Sur de Lima Metropolitana para los años 2005 y 2008 han sido menores al nivel umbral (20 µg Pb/dL) tanto para el personal que laboraba en la vía pública como para el que brindaba servicio en oficina. Sin embargo, existe la posibilidad de riesgo ocupacional por la toxicidad del plomo en cualquier concentración en que se encuentre en el ser humano. Para $p < 0,05$ no hay diferencias significativas entre los contenidos promedio de plomo en sangre para el personal que trabajaba en la vía pública pero en diferentes unidades; situación semejante se presentó con los resultados para el personal que laboraba en oficina, tanto en el año 2005 como en el 2008.

Palabras clave: Plomo, plomo en sangre, plomo atmosférico

DETERMINATION OF LEAD CONTENT IN BLOOD FROM THE FEMALE TRANSIT POLICE WHO BELONG TO THE CENTER AND SOUTH UNITS OF METROPOLITAN LIMA

ABSTRACT

The average content of lead in blood from the female police who belong to the center and south units from Metropolitan Lima in 2005 and 2008 have been below the threshold level (20 µg Pb/dL) for both workers in the street and in offices. Nevertheless, there is the possibility of occupational risk for the toxicity of lead in any concentration in a human being. For $p < 0,05$ there are no significant differences between the average contents of lead in blood for the workers in the streets but in different units; and there was similar situation for the workers in offices, in both years 2005 and 2008.

Key words: Lead, lead in blood, atmospheric lead

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental por plomo es un problema muy antiguo; primero focalizado en el sector laboral y posteriormente en los sectores urbanos y/o rurales por su cercanía a fuentes de emisión antropogénicas (minerías, fundiciones y otras actividades) que utilizan plomo. Una vez que el plomo ingresa a la atmósfera éste puede viajar largas distancias si las partículas de plomo son muy pequeñas. Es removido por la lluvia y por adsorción en material particulado, que cae al suelo o a los ecosistemas acuáticos, aunque esta liberación, no siempre conduce a exposición¹.

^a Ecología y Gestión Ambiental, Escuela de Posgrado, URP

^{b*} Departamento Académico de Química-UNALM. elvito@lamolina.edu.pe

El plomo es el único contaminante clásico del aire que puede ingresar en los seres humanos a través de vías indirectas, no cumple función biológica y no se metaboliza. Se absorbe generando intoxicación aguda y crónica, se transporta por la sangre estableciendo un rápido equilibrio entre eritrocitos y plasma, se distribuye en diversos órganos y tejidos, y se deposita principalmente en los huesos. Afecta a muchos órganos, sistemas y procesos fisiológicos, alterando la biosíntesis del grupo hemo, riñones, sistema cardiovascular, aparato reproductor y sistema nervioso central. La neurotoxicidad del plomo es más crítica para el feto en desarrollo y el niño en crecimiento que para los adultos^{2,3}.

El plomo puede, por otra parte, influir de forma decisiva en el metabolismo del glutatión⁴, pues inhibe la enzima glutatión reductasa, que mantiene un nivel constante de glutatión a expensas de reducir glutatión disulfuro. Por esta razón, se plantea la hipótesis de que la toxicidad del plomo está relacionada con la disminución del sistema de defensa antioxidante celular y la generación de especies reactivas oxigenadas (ROS)^{4,5}. También se producen efectos tóxicos del plomo por la interferencia de éste con los iones divalentes Ca^{2+} , Zn^{2+} y probablemente Fe^{2+} y Mg^{2+} , al interactuar con los centros de coordinación de estos cationes en sus enzimas, restringiendo las funciones de acoplamiento, transcripción o inhibiendo dichas enzimas^{2,6}.

En el presente trabajo se ha determinado el contenido de plomo en sangre proveniente de la policía de tránsito femenina, de las Unidades Centro y Sur de Lima Metropolitana, para evaluar aspectos de su exposición a este contaminante ambiental.

PARTE EXPERIMENTAL

Población y muestra

La población considerada para el estudio corresponde a un grupo de 650 personas, constituido por el personal de la Policía de tránsito femenina que presta servicios en las Unidades Centro (distritos: Lima Cercado, Breña y San Miguel) y Sur (distritos: La Victoria, San Juan de Miraflores, Chorrillos, San Borja y Surquillo) de Lima–Metropolitana, seleccionándose a 200 personas que tenían como mínimo cuatro años de servicio activo. De las 200 personas seleccionadas, 100 personas pertenecían a la Unidad Centro (UC) y 100 a la Unidad Sur (US). De las 100 personas seleccionadas en cada unidad, solamente accedieron voluntariamente a la toma de muestras 30 personas de cada unidad (25 que trabajan en la vía pública y 5 que trabajan en oficina). Se tomó 30 muestras de sangre de la policía de tránsito femenina perteneciente a la UC y 30 de la policía de tránsito femenina perteneciente a la US.

Obtención de las muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron tomadas de 60 efectivos policiales (edad entre 20 y 36 años), por personal de Sanidad de la Policía Nacional del Perú. Se obtuvo las muestras en dos momentos diferentes, el primero en el mes de julio de 2005 y el segundo en el mes de octubre de 2008.

Para la toma de muestras de sangre venosa se procedió de acuerdo a las recomendaciones del Environmental Health Criteria⁷.

Preparación de reactivos

Disolución diluyente: formada por fosfato de amonio al 0,2 % (p/v) y Tritón X–100 (octal–fenoxi–polietoxietanol) al 0,1 % (p/v).

Disolución de enjuague: formada por Tritón X–100 al 0,1 % (p/v).

Disolución para el reactivo en blanco: formado por ácido nítrico al 1 % (v/v).

Estándares de plomo de 100; 50; 25; 10; 5 y 2,5 µg/dL.

Preparación de la muestra de sangre

La muestra fue preparada adicionando una disolución de Tritón X-100 y APODEC (amonio pirrolidín ditio carbamato) al 2,5 % para quelar al plomo; el complejo formado fue extraído con el solvente MIBX (metil isobutil cetona). Se utilizó 100 μL de la muestra de sangre preparada y 900 μL de la disolución diluyente.

Cuantificación del plomo en las muestras de sangre

La cuantificación se realizó por espectrofotometría de absorción atómica. Se realizó la lectura de las muestras a una longitud de onda de 283,31 nm.

Equipo: Espectrofotómetro de Absorción Atómica GBC modelo PMAVANTA serie A-6752.

Rango óptimo de trabajo: 5 a 120 $\mu\text{g/dL}$ de sangre

Sensibilidad: 0,05 $\mu\text{g Pb/mL}$ de disolución saturada de MIBX para 1,0 % de absorción.

Límite de detección: 0,05 $\mu\text{g Pb/dL}$ de sangre

Análisis estadístico

Se aplicó una comparación de medianas de la concentración de plomo en las muestras de sangre utilizando la prueba t de Student, con un test posterior de la prueba U de Mann Whitney.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN**Primer período: año-2005.****Personal policial que trabajaba en la vía pública**

Los resultados de la concentración de plomo en las muestras de sangre del personal de la policía de tránsito femenina de la UC dieron un valor promedio de 19 $\mu\text{g Pb/dL}$, el que representó el 95% del nivel umbral, siendo superior al valor promedio obtenido en la US que fue de 18 $\mu\text{g Pb/dL}$ y que representó el 90% del nivel umbral. Ambos resultados fueron menores aunque cercanos al valor de 20 $\mu\text{g Pb/dL}$, establecido como nivel umbral⁸.

No obstante que la concentración promedio de plomo en sangre fue ligeramente mayor en el personal de la UC, la variabilidad fue alta y semejante en ambas unidades (4 $\mu\text{g Pb/dL}$). La concentración promedio de plomo en sangre estuvo comprendida en un intervalo de 15 a 23 $\mu\text{g Pb/dL}$ en la UC, mientras que en la US el intervalo fue de 14 a 22 $\mu\text{g Pb/dL}$ (tabla 1).

Tabla 1. Concentración de plomo en sangre del personal que trabajaba en la vía pública

| Variable | Plomo ($\mu\text{g/dL}$) Año - 2005 | |
|---------------------|---------------------------------------|------------|
| | Unidad Centro | Unidad Sur |
| Número | 25 | 25 |
| Media | 19 | 18 |
| Desviación estándar | 4 | 4 |
| Mínimo | 12 | 12 |
| Máximo | 26 | 29 |
| Intervalo | 15 a 23 | 14 a 22 |

Para un valor $p < 0,05$ no hay diferencias significativas en la concentración promedio de plomo en sangre, entre el personal de la policía de tránsito femenina de la UC y US de Lima Metropolitana, que trabajaba en la vía pública.

Personal policial que trabajaba en oficina

El valor promedio de la concentración de plomo en sangre del personal de la policía de tránsito femenina de la UC fue 10 $\mu\text{g Pb/dL}$ lo que representó el 50% del nivel umbral, siendo este porcentaje mayor al determinado en la US que fue de 9 $\mu\text{g Pb/dL}$ en promedio, valor que representó el 45% del nivel umbral. Respecto a la variabilidad de los resultados, la US presentó una mayor variabilidad ($s = 0,7 \mu\text{g Pb/dL}$) que la UC ($s = 0,4 \mu\text{g Pb/dL}$). En este caso, los intervalos para la concentración promedio de plomo en sangre fueron de 9,6 a 10 $\mu\text{g Pb/dL}$ en la UC y de 8,3 a 10 $\mu\text{g Pb/dL}$ en la US, como se aprecia en la tabla 2.

Tabla 2. Concentración de plomo en sangre del personal que trabajaba en oficina

| Variable | Plomo ($\mu\text{g/dL}$) Año - 2005 | |
|---------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|
| Lugar | Unidad Centro | Unidad Sur |
| Número | 5 | 5 |
| Media | 10 | 9 |
| Desviación estándar | 0,4 | 0,7 |
| Mínimo | 9,5 | 8,3 |
| Máximo | 10 | 10 |
| Intervalo | 9,6 a 10 | 8,3 a 10 |

Para un valor $p < 0,05$ no hay diferencias significativas en la concentración promedio de plomo en sangre, entre el personal de la policía de tránsito femenina de la UC y US de Lima Metropolitana, que trabajaba en oficina.

Considerando que el contenido promedio de plomo en sangre fue de 19 $\mu\text{g Pb/dL}$ para el personal de la policía de tránsito femenina de la UC que trabajaba en la vía pública y aquél del personal de la misma Unidad que trabajaba en oficina de 10 $\mu\text{g Pb/dL}$, entonces la concentración de plomo en el personal que trabajaba en la vía pública fue casi el doble que aquél del personal de la misma Unidad que trabajaba en oficina.

Situación semejante se presenta en el personal de la policía de tránsito femenina de la US que trabajaba en la vía pública, con un contenido promedio de plomo en la sangre (18 $\mu\text{g Pb/dL}$) que representa el doble del contenido que el del personal de la misma Unidad que trabajaba en oficina (9 $\mu\text{g Pb/dL}$).

Segundo período: año–2008.

Personal policial que trabajaba en la vía pública

La concentración promedio de plomo en sangre obtenido para el personal de la policía de tránsito femenina de la UC fue de 18 $\mu\text{g Pb/dL}$, valor que representa el 90% del nivel umbral y es mayor al valor obtenido en la US que fue 16 $\mu\text{g Pb/dL}$ en promedio, representando el 80% del nivel umbral. En estas determinaciones se presentó una variabilidad semejante en la UC y US ($s = 3 \text{ g Pb/dL}$). Los intervalos de concentración de plomo en sangre fueron entre 15 y 21 $\mu\text{g Pb/dL}$ para la UC, y entre 13 a 19 $\mu\text{g Pb/dL}$ en la US (tabla 3).

Tabla 3. Concentración de plomo en sangre del personal que trabajaban en la vía pública

| Variable | Plomo ($\mu\text{g}/\text{dL}$) Año - 2008 | |
|---------------------|----------------------------------------------|------------|
| | Unidad Centro | Unidad Sur |
| Número | 25 | 25 |
| Media | 18 | 16 |
| Desviación estándar | 3 | 3 |
| Mínimo | 11,4 | 9,3 |
| Máximo | 22,5 | 22,7 |
| Intervalo | 15 a 21 | 13 a 19 |

Las concentraciones promedio de plomo en sangre, entre el personal de la policía de tránsito femenina de la UC y US de Lima Metropolitana que trabajaban en la vía pública no muestran diferencias significativas a un valor $p < 0,05$.

Personal policial que trabajaba en oficina

Los resultados de la concentración promedio de plomo en sangre del personal de la policía de tránsito femenina de la UC fue de $9 \mu\text{g Pb}/\text{dL}$, representando 45% del nivel umbral. Dicho valor es menor al determinado en la US que fue de $10 \mu\text{g Pb}/\text{dL}$ (50% del nivel umbral). La variabilidad en los resultados de la US ($s = 1,0 \mu\text{g Pb}/\text{dL}$) con respecto a la UC ($s = 0,9 \mu\text{g Pb}/\text{dL}$) fue similar. Los intervalos para la concentración promedio de plomo en sangre han sido de $8,1$ a $10 \mu\text{g Pb}/\text{dL}$ en la UC y de $8,7$ a $11 \mu\text{g Pb}/\text{dL}$ en la US (tabla 4).

Tabla 4. Concentración de plomo en sangre del personal que trabajaba en oficina

| Variable | Plomo ($\mu\text{g}/\text{dL}$) Año - 2008 | |
|---------------------|----------------------------------------------|------------|
| | Unidad Centro | Unidad Sur |
| Número | 5 | 5 |
| Media | 9 | 10 |
| Desviación estándar | 0,9 | 1,0 |
| Mínimo | 8,3 | 8,3 |
| Máximo | 10,2 | 11,2 |
| Intervalo | 8,1 a 10 | 9 a 11 |

Los valores promedio de la concentración de plomo en sangre, entre el personal de la policía de tránsito femenina de las Unidades Centro y Sur de Lima Metropolitana que trabajaban en oficina no muestran diferencias significativas a un valor $p < 0,05$.

Como el contenido promedio de plomo en sangre fue de $18 \mu\text{g Pb}/\text{dL}$ para el personal de la policía de tránsito femenina de la UC que trabajaba en la vía pública y aquél del personal de la misma Unidad que trabajaba en oficina de $9 \mu\text{g Pb}/\text{dL}$, entonces la concentración de plomo en la sangre del personal que trabajaba en la vía pública es el doble que el del personal que trabajaba en la oficina. Mientras para la US, el contenido promedio de plomo en sangre fue de $16 \mu\text{g Pb}/\text{dL}$ para el personal de la policía de tránsito femenina que laboraba en la vía pública y de $10 \mu\text{g Pb}/\text{dL}$ para el personal de la misma Unidad que trabajaba en oficina, observándose que el personal que trabajaba en la vía pública tenía un contenido promedio de plomo en la sangre 60% mayor al encontrado en el personal que trabajaba en oficina.

Evaluación de los resultados del año 2005 con los del año 2008:

El personal de la policía de tránsito femenina de la UC que trabajaba en la vía pública experimentó una disminución de 5% en el valor promedio de la concentración de plomo en sangre del año 2005 (19 µg Pb/dL) respecto al resultado del año 2008 (18 µg Pb/dL). Para el personal policial de la misma Unidad que trabajaba en oficina también se observó una disminución del 10% en el valor promedio de la concentración del plomo en sangre del año 2005 (10 µg Pb/dL en promedio) frente al resultado del año 2008 (9 µg Pb/dL).

Respecto al personal de la policía de tránsito de la US que trabajaba en la vía pública, el valor promedio de la concentración de plomo en sangre experimentó una disminución de 11% del año 2005 (18 µg Pb/dL) respecto al resultado del año 2008 (16 µg Pb/dL). Mientras que para el personal policial de la misma Unidad que trabajaba en oficina se observó un incremento de 10% de la concentración del plomo en sangre del año 2005 (9 µg Pb/dL) frente al resultado del año 2008 (10 µg Pb/dL).

El contenido de plomo en sangre para el personal de la policía de tránsito femenina, comprendido entre 20 y 36 años, que trabajaba en la vía pública ha disminuido entre el año 2005 y 2008, tendencia que también se ha observado en los reportes del contenido de plomo en el aire de Lima Metropolitana, suministrados por la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA, donde se establece un nivel de 0,2 µg Pb/m³ de aire en Lima Centro y de 0,1 µg Pb/m³ en Lima Sur, en el año 2005; valores que fueron coincidentes para el año 2007 (no se determinó plomo en aire en el año 2008)⁹.

Aunque las concentraciones de plomo en sangre, encontradas en el personal de la policía de tránsito femenina que laboraba en la vía pública, no excede el nivel umbral para la UC ni para la US, se ha podido establecer que existiendo la disposición de la eliminación de plomo en gasolina desde el año 2005, el descenso de la concentración de plomo en sangre del personal que se encuentra expuesto al tránsito vehicular entre el 2005 y 2008 ha sido solamente entre 5 y 11%, respectivamente.

En el caso del personal que trabajaba en oficina, la situación ha sido diferente, habiéndose reportado inclusive un aumento en la concentración de plomo en sangre para la US, del orden del 10% y una disminución de 10% en el personal de la UC, en el lapso de dos años.

De acuerdo a los resultados del análisis de plomo en sangre del personal de la policía de tránsito femenina de la UC y US de Lima Metropolitana, se ha encontrado que no existe diferencia significativa entre los valores de plomo obtenidos en la UC y US, tanto para el año 2005 como para el 2008, en el caso de la policía que trabajaba en la vía pública, lo que indica un nivel semejante de exposición, posiblemente al inhalar aire que contiene partículas de plomo, provenientes de la industrias de manufactura, fundiciones, incineración de residuos sólidos e incluso del humo de cigarrillos. Por otro lado, no obstante que los valores encontrados no exceden el valor umbral, se debe considerar que el plomo es tóxico en cualquier concentración que se encuentre en el ser humano, tiene gran capacidad para generar radicales libres que desencadenan daño celular, manifestándose en agotamiento o inhibición de la actividad enzimática, daño en la bicapa lipídica y ADN, induciendo una amplia gama de disfunciones fisiológicas, bioquímicas y de comportamiento^{2,10,11}.

CONCLUSIONES

En el año 2005, el contenido promedio de plomo en sangre para la policía de tránsito femenina, fue casi el doble para el personal que trabajaba en la vía pública respecto a los valores obtenidos en el personal que laboraba en oficina.

En el año 2008, el contenido promedio de plomo en sangre, para el personal de la policía de tránsito femenina que trabajaba en la vía pública corresponden al doble y 60% mayor a los contenidos promedio de plomo obtenidos por el personal que laboraba en oficina.

Los valores del contenido promedio de plomo en sangre para el personal que laboraba en la vía pública disminuyeron en el año 2008 respecto al año 2005, mientras que para el personal que trabajaba en oficina, los valores obtenidos disminuyeron en 11% (UC) y aumentaron en 10% (US).

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen a la policía de tránsito femenina de las Unidades Centro y Sur de Lima Metropolitana por su colaboración facilitando las muestras de sangre y al Departamento de Ingeniería Forense de la Dirección Nacional de Criminalística de la Policía Nacional del Perú, por haber permitido utilizar el laboratorio para realizar el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Plomo. División de Toxicología y Medio Ambiente. Departamento de salud y Servicios Humanos de USA, Servicios de Salud Pública. ATSDR (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades). National Technical Information Service. Springfield, Virginia. 2007.
2. Godwin, H. The biological chemistry of lead. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2001; 5: 223–227.
3. Nevin, R. Trends in Preschool Lead Exposure, Mental Retardation, and Scholastic Achievement: Association or Causation? *Environmental Research*. 2009; 109: 301–310.
4. Gurer, H.; Ozgunes, H.; Saygin, E.; Ercal, N. Antioxidant effect of taurine against lead-induced oxidative stress. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2001; 41(4), 397–402.
5. Juberg, D.; Kleiman, C.; Kwon, S. Position Paper of the American Council on Science and Health: Lead and Human Health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1997; 38: 162–180.
6. Lidsky, T.; Schneider, J. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain*. 2003; 126: 5–19.
7. WHO (World Health Organization). ECH 165: Inorganic Lead. Identity, physical and chemical properties, and analytical methods. Geneva. 1995.
8. OMS (Organismo Mundial de la Salud). Límites de exposición profesional a los metales pesados que se recomienda por razones de salud. Informe Técnico N° 647: 39–85. Ginebra. 1980.
9. DIGESA (Dirección General de Salud Ambiental). Resultados de la vigilancia sanitaria de la calidad del aire (Contaminante: Plomo): Comportamiento del plomo en Lima y Callao (2000–2007). Ministerio de Salud. Lima.
10. Flora, S.; Mittal, M.; Mehta, A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian Journal of Medical Research*. 2008; 128: 501–523
11. Gonzales-Estrecha, M.; Trasobares, E.; Fuentes, M.; Martínez, M.; Cano, S.; Vergara, N.; Gaspar, M.; Gonzáles-Revaldería, J.; Barciela, M.; Bugarín, Z.; Fernández, M.; Badía, P.; Pintos, C.; Gonzáles, M.; Guillén, J.; Bermejo, P.; Fernández, C.; Arroyo, M. Blood lead and cadmium levels in a six hospital employee population. PESA study, 2009. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2010; 25284: 01–08.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN ANTIOXIDANTE DE FRUTOS Y RAÍCES DE *Euterpe oleracea* y *Euterpe precatoria*

Víctor Sotero^{1*}, Martha Maco¹, Claudia Merino-Zegarra¹, Elías Vela¹,
Éricka Dávila², Dora García².

RESUMEN

Se realizó la caracterización química, nutricional, tamizaje fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante de raíces y frutos de dos palmeras del género *Euterpe*: *E. precatoria* (EP) y *E. oleracea* (EO) del “Centro de Investigaciones Allpahuayo” (Jardín de Frutales Nativos – Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana-IIAP) en la Reserva Allpahuayo Mishana. Los análisis de ácidos grasos se realizaron mediante la cromatografía gaseosa, los de compuestos fenólicos por espectrofotometría UV/vis y la evaluación de la actividad antioxidante, se realizó “*in vitro*”, mediante la captura de radicales libres del DPPH. De acuerdo al análisis bromatológico se observó alta concentración de carbohidratos en frutos de ambas especies (EP y EO) con 89,45% y 91,12% (peso seco), respectivamente. En la determinación de ácidos grasos de la fracción lipídica de ambos aceites destacaron: el ácido oleico (EP: 62,1%; EO: 44,7%) y palmítico (EP: 19,6% y EO: 16,7%). A través del tamizaje fitoquímico en frutos y raíces de EP, se identificaron: triterpenos, esteroides, cumarinas, azúcares reductores, fenoles, taninos y flavonoides; y en EO: cumarinas, fenoles y taninos. En la actividad antioxidante del fruto íntegro (cáscara y pulpa) se obtuvo un IC₅₀ de 1,35 mg/ml en EP y 10,04 mg/ml en EO, y en raíces 0,54mg/ml, para ambas especies. En compuestos fenólicos las raíces de ambas especies presentaron mayor concentración con: 194,99 mg/100 g y 185,00 mg/100 g para EO y EP, respectivamente.

Palabras clave: *Euterpe oleracea*, *Euterpe precatoria*, antioxidantes, aceite.

CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIOXIDANT EVALUATION *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria* FRUITS AND ROOTS

ABSTRACT

Chemical characterization, nutritional, screening phytochemistry and antioxidant activity evaluation of roots and fruits of two palm trees of the *Euterpe* genus, *E. precatoria* (EP) and *E. oleracea* (EO) of the Center for Research Allpahuayo (Native Fruit Garden - Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana - IIAP) in the Allpahuayo Mishana Reserve. The fat acids were analyzed by the gas chromatography, the phenolics compounds by spectrophotometry UV/Vis and the antioxidant evaluation was realized “*in vitro*” by the scavenging of free radicals of DPPH. According to the bromatological analysis this showed

¹ Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). Apartado 784. Iquitos, Perú. Laboratorio de Sustancias Naturales Bioactivas-IIAP. E-mail: .proyectopalmeras@gmail.com

² Facultad de Ingeniería Química-Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) – Freyre N° 616, Iquitos - Perú.

high concentration of carbohydrates in fruits of both species (EP and EO) with 89.45% and 91.12% (dry weight), respectively. In the determination of the principal fatty acids of the lipid fraction are: oleic acid (EP: 62.1%, EO: 44.7%) and palmitic (EP: EO 19.6% and 16.7%). Through phytochemical screening were identified in fruits and roots of EP: triterpenes, steroids, coumarins, reducing sugars, phenols, tannins and flavonoids, and EO: coumarins, phenols and tannins. Antioxidant activity of all of the fruit (peel and pulp) had an IC50 of 1.35 mg/ml in EP and 10.04 mg/ml in EO, and roots 0.54 mg/ml for both species. Phenolic compounds in roots of both species had a higher concentration: 194.99 mg/100 g and 185.00 mg/100 g for EO and EP, respectively.

Key words: *Euterpe oleracea*, *Euterpe precatoria*, antioxidants, oil,

INTRODUCCIÓN

Euterpe precatoria y *Euterpe oleracea*, son dos palmeras amazónicas, conocidas comúnmente como huasaí, y cuyos frutos y tallo son parte de la culinaria regional, así como sus raíces en la medicina tradicional¹. La importancia de estas palmeras ha crecido debido a que se las considera especies oleaginosas, y como potencial uso de su biomasa para la generación de energía en la región amazónica². Tanto la pulpa como los productos derivados de *E. oleraceae*, al ser reductores de peso, energizantes y disminución del envejecimiento, se ha vendido el 2008 en los Estados Unidos, cerca de US\$ 109 millones, siendo Brasil, el país de origen de estas exportaciones³.

Los frutos de *E. oleracea*, tienen en su composición compuestos fenólicos, de importante acción antioxidante debido a su capacidad de secuestrar radicales libres; entre estos se encontraron antocianinas (3,19 mg/g) y proantocianidinas (12,89 mg/g); la mayor concentración de antocianinas presentes fueron cianidin -3-glucósido y cianidin-3-rutinósido. En las proantocianidinas, se encontró, mayormente, polímeros⁴. Este fruto presenta componentes que incluye a los ácidos grasos, esteroides y aminoácidos. En trabajos con voluntarios, administrados con fruto de *E. oleracea*, presentaron un significativo crecimiento de la capacidad antioxidante en el plasma de los individuos en 2,3 y 3 veces, ya sea consumido como jugo o pulpa⁵. Los compuestos fenólicos han sido reconocidos, por sus cualidades hepatoprotectoras, prevención de arterioesclerosis, efectos antiinflamatorios e inducen apoptosis en una variedad de células tumorales^{6,7,8}.

El aceite de *E. oleracea*, presenta cerca de 71% de ácidos grasos insaturados, siendo de éstos 60,81% de monoinsaturados y 10,36% de poliinsaturados⁹; también se ha encontrado, en éste, alta presencia de ácido oleico en el endocarpio (45,1%) y pericarpio (45,7%), en los frutos de *E. oleracea*¹⁰.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antioxidante y determinar la composición química de dos especies del género *Euterpe*: *E. precatoria* y *E. oleracea*.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Las muestras de las especies de *Euterpe*, fueron colectadas del Jardín de Frutales Nativos del “Centro de Investigaciones Allpahuayo” – IIAP, en la Reserva Allpahuayo Mishana, carretera Iquitos-Nauta Km, 26, durante los meses de octubre y noviembre del 2008. A partir de estas colectas se obtuvo frutos y raíces para los análisis químicos que fueron realizados en el Laboratorio de Sustancias Naturales Bioactivas del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, Iquitos-Perú.

Determinaciones analíticas

Se realizó los análisis bromatológicos según metodología del Instituto Adolfo Lutz¹¹; la concentración de carbohidratos se realizó por diferencia de peso. Para la caracterización de ácidos grasos, los aceites fueron derivatizados y esterificados¹². La identificación y cuantificación se realizó por cromatografía gaseosa utilizando un equipo VARIAN 450-GC, columna de sílica fundida supelcowax de 60 m y 0,25 mm, de d.i. conteniendo 0,25 μm de polietilenglicol, detector de ionización de llama (FID), helio como gas de arrastre a un flujo de 1,5 ml/min, programación de temperatura de la columna con calentamiento a 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 170 $^{\circ}\text{C}$ hasta 225 $^{\circ}\text{C}$, temperatura del detector de 260 $^{\circ}\text{C}$, razón de división split de la muestra en el inyector de 1/20. Se realizó el tamizaje fitoquímico¹³, para lo cual se preparó extractos utilizando solventes con diferentes polaridades: éter etílico, etanol 95 % y agua. La actividad antioxidante se realizó por reducción del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), con absorbancia de 515 nm¹⁴. En la determinación de polifenoles totales se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu¹⁵. Se puso 20 μL de extracto metanólico, 1,58 mL de agua destilada y 100 μL del reactivo en un matraz aforado de 10 mL, y, después de un minuto, se añadió 300 μL de solución acuosa de carbonato sódico al 20%; después de 2 horas de reposo a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de la mezcla a 760 nm frente a un blanco. Los resultados se expresaron como equivalentes de catequina (50 mM/mL de metanol).

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza simple (ANOVA), utilizándose el programa estadístico Statgraph, a $p = 0,05$. Cuando se observó significancia en esta prueba se aplicó la prueba comparativa de Tuckey ($p = 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los análisis bromatológicos reportaron alta concentración de carbohidratos en ambas especies con 91,13% y 89,45% para EO y EP, respectivamente (tabla 1). En la fracción grasa se observó una diferencia que difiere significativamente $p < 0,05$.

De acuerdo al análisis de los aceites de ambas especies, la mayor concentración de ácidos grasos son de tipo insaturados (tabla 2), destacando sobre todo el ácido oleico con una concentración de 44,7% y 62,1% para EP y EO, respectivamente. Este último resultado fue mayor a lo encontrado por Montovani *et al.*¹⁰, quienes obtuvieron 45,5% de ácido oleico en fruto íntegro de EO.

Tabla 1, Análisis bromatológicos de las pulpas + cáscara de las especies *Euterpe oleracea* y *Euterpe precatoria*

| Especie | Humedad, % | Análisis Centesimales | | | |
|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------|
| | | Proteína | % en Peso Seco | | Carbohidratos |
| | | | Grasa | Ceniza | |
| <i>E. oleracea</i> | 40,60 ^a \pm 7,29 | 5,74 ^a \pm 0,21 | 1,63 ^a \pm 0,02 | 1,51 ^a \pm 0,31 | 91,12 |
| <i>E. precatoria</i> | 42,8 ^b \pm 10,17 | 4,18 ^b \pm 0,023 | 5,2 ^b \pm 0,25 | 1,17 ^b \pm 0,01 | 89,45 |

Nota: Letras diferentes indican que difieren significativamente ($p < 0,05$)

Tabla 2. Concentración de ácidos grasos en *Euterpe Oleracea* y *Euterpe precatoria*

| Ácido graso | <i>E. precatoria</i> | <i>E. oleracea</i> |
|-----------------|----------------------|--------------------|
| Ac caprílico | 3,0 ± 0,2 | 0,3 ± 0,0 |
| Ac mirístico | 1,5 ± 0,0 | 0,2 ± 0,0 |
| Ac, palmítico | 19,6 ± 3,2 | 16,7 ± 0,9 |
| Ac palmitoleico | -,- | 0,1 ± 0,0 |
| Ac esteárico | 3,8 ± 0,5 | 6,9 ± 0,1 |
| Ac oleico | 44,7 ± 6,7 | 62,1 ± 2,1 |
| Ac linoleico | 2,8 ± 0,3 | 4,9 ± 0,8 |
| Ac linolénico | 3,1 ± 0,6 | 0,8 ± 2,6 |
| NI | 21,5 | 8,0 ± 1,2 |

Ni: no identificados

En el tamizaje fitoquímico (tabla 3) destacan los siguientes grupos de compuestos:

En el extracto etéreo: Triterpenos y esteroides en fruto y raíz de EP, y en fruto de EO, carotenos en frutos de ambas especies.

En el extracto etanólico: Cumarinas en raíz de EP, y en fruto y raíz de EO; flavonoides, fenoles y taninos en raíz de ambas especies; azúcares reductores en frutos de EP y EO

En los extractos acuosos: Posible presencia de alcaloides (por confirmar) en fruto y raíz de EP; azúcares reductores en frutos de EP y EO; saponinas en frutos de EP y EO; fenoles y taninos en frutos y raíces de EP y en fruto y raíz de EO; flavonoides en fruto y raíz de EP y raíz de EO; glicósidos en fruto y raíz de EP y EO.

De esto se puede deducir que en cuanto a la fitoquímica del fruto de EO presenta cumarinas, que no se encontraron en el de EP; por lo demás ambos cuentan con triterpenos y esteroides, carotenos, azúcares reductores, compuestos fenólicos y aceites esenciales; estos últimos, que debidamente analizados darían un valor agregado para la industria de perfumería, alimentos y medicina¹³. Las raíces de EP cuentan con triterpenos; de hecho por ser los formadores de los aceites esenciales, que no se manifiestan en EO. Pero sí tienen una composición similar en cuanto a cumarinas, fenoles y taninos.

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico de las especies *Euterpe precatoria* y *Euterpe oleracea*

| Extracto | Metabolitos secundarios | Ensayos | <i>Euterpe precatoria</i> | | <i>Euterpe oleracea</i> | |
|----------|--------------------------|---------------------|---------------------------|------|-------------------------|------|
| | | | Fruto | Raíz | Fruto | Raíz |
| Etéreo | Alcaloides | Dragendorff | - | - | - | - |
| | | Mayer | - | - | - | - |
| | | Wagner | - | - | - | - |
| | Triterpenos - Esteroides | Salkowski | - | ++ | ++ | - |
| | | Liebermann-Burchard | ++ | + | ++ | - |
| | Quinonas | Bornträger | - | - | - | - |
| | Cumarinas | Baljet | - | - | - | - |
| | Carotenos | Carr-Price | ++ | - | ++ | - |
| | Aceites y ácidos grasos | Sudan | ++ | - | + | - |

sigue ...

... viene

| | | | | | | |
|--------------------------|----------------------|--------------------------|-------------|-----|-----|----|
| Etanólico | Alcaloides | Dragendorff | - | - | - | - |
| | | Mayer | - | - | - | - |
| | | Wagner | - | - | - | - |
| | Cumarinas | Baljet | - | + | + | ++ |
| | | Azúcares reductores | Fehling | ++ | ++ | + |
| | Saponinas | Espuma | - | - | - | - |
| | Fenoles y taninos | Cloruro férrico | - | ++ | - | ++ |
| | | Gelatina | - | + | - | + |
| | Aminoácidos y aminas | Nihidrina | - | - | - | - |
| | Flavonoides | Shinoda | - | - | - | - |
| | | Leucoantocianidina | - | +++ | - | ++ |
| | | Quinonas | Bornträger | - | - | - |
| | Acuoso | Glicósidos cardiotónicos | Kedde | - | - | - |
| Alcaloides | | | Dragendorff | +/- | +/- | - |
| Mucilagos | | Mayer | - | - | - | - |
| | | Wagner | - | - | - | - |
| | | Tacto | - | - | - | - |
| Azúcares reductores | | Fehling | + | + | + | + |
| | | Saponinas | Espuma | ++ | ++ | + |
| Fenoles y taninos | | Cloruro férrico | ++ | ++ | ++ | ++ |
| | | Gelatina | - | ++ | +++ | - |
| | | Flavonoides | Shinoda | ++ | ++ | - |
| Principios amargos | | Sabor | - | - | - | - |
| Glicósidos | | Molish | + | +++ | + | ++ |
| Glicósidos cardiotónicos | | Kedde | - | - | - | - |

Nota: (-) Ausencia; (+/-) Dudoso; (+) leve; (++) moderado; (+++) abundante

En la evaluación de la actividad antioxidante con DPPH (tabla 4), se observó que las raíces presentan una excelente actividad inhibidora, obteniendo un IC_{50} de 0,54 mg/ml para las raíces de ambas especies. Por el contrario, se obtuvo un IC_{50} de 1,35 y 10,04 mg/ml en frutos de *E. oleracea* y *E. precatória*, respectivamente.

En la concentración de compuestos fenólicos (tabla 5), las especies en estudio difieren significativamente; así, por ejemplo, se observa una alta concentración de compuestos fenólicos en raíz de *E. oleracea* (194,99 mg/100g) y raíz de *E. precatória* (185,00 mg/100g), promedios comparados solo con compuestos como el té, vino o similares. Algunas bebidas, consumidas habitualmente son ricas en compuestos fenólicos; por ejemplo: el café contiene entre 200-500 mg por taza; el té, entre 150-200 mg por taza; y el vino tinto, entre 200-800 mg por vaso¹⁶.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición al DPPH e IC_{50} de *E. precatória* y *E. oleracea*

| Especie / Muestra | IC_{50} , mg/ml |
|-----------------------------------------|----------------------------|
| <i>Euterpe precatória</i> raíz | 0,54 ± 0,44 ^b |
| <i>Euterpe precatória</i> fruto íntegro | 1,35 ± 0,085 ^a |
| <i>Euterpe oleracea</i> raíz | 0,54 ± 0,02 ^b |
| <i>Euterpe oleracea</i> fruto íntegro | 10,04 ± 0,187 ^c |

Nota: Letras diferentes indican que difieren significativamente (p<0,05)

Tabla 5. Concentración de compuestos fenólicos (mg/100g) en especies *Euterpe precatória* y *Euterpe oleracea*

| Muestra | Absorbancia 700 nm | Promedio |
|----------------------------|--------------------|----------------------------|
| Raíz <i>E. precatória</i> | 0,480 | 185,00 ± 3,13 ^b |
| Fruto <i>E. precatória</i> | 0,132 | 26,68 ± 2,33 ^a |
| Raíz <i>E. oleracea</i> | 1,015 | 194,99 ± 0,40 ^b |
| Fruto <i>E. oleracea</i> | 0,183 | 29,37 ± 6,45 ^a |

Nota: Letras diferentes indican que difieren significativamente ($p < 0,05$)

CONCLUSIONES

Los frutos de *Euterpe precatória* y *Euterpe oleracea*, colectados en Iquitos presentan una excelente actividad antioxidante, confirmando lo que nos indica la literatura especializada.

De acuerdo al tamizaje fitoquímico de las *Euterpes*, se observó que destacan las siguientes familias químicas: triterpenos y esteroides, azúcares reductores, fenoles y taninos y flavonoides en fruto y raíz de EP; cumarinas, fenoles y taninos y flavonoides en fruto y raíz EO.

Las raíces de ambas especies presentan alta concentración de compuestos fenólicos, identificándoles como los compuestos responsables de la actividad antioxidante.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP), por el apoyo a la ejecución de este estudio.

BIBLIOGRAFIA

- Flores, S. Cultivo de Frutales Nativos Amazónicos, Manual Para el Extensionista, Tratado de Cooperación Amazónica, Secretaria Pro-Tempore, Lima, Ed, Mirigraf, 1997, 307pp.
- De Andrade Miranda, I.; Barbosa, E.; Rabelo, A.; Santiago, F.F. Palmas de comunidades ribereñas como recurso sustentable en la Amazonía brasileña, *Rev. Perú. Biol.* 2008; 15(1): 115- 120.
- Brasileiro, A, “Superfood” promoted on Oprah’s site robs amazon poor of staple, In: <http://www.bloomberg.com/apps/news>, accesado ene2012.
- Schauss, A.G.; Wu. X.; Prior, R.; Ou, B.; Patel, D.; Huang, D.; Kababick, J. Phytochemical and Nutrient Composition of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Acai). *J. Agric. Food Chem.*, 2006;54(22):8598–8603.
- Mertens - Talcott, S.; Rios, J.; Jilma-Stohkawetz,P.; Pacheco-Palencia, L.; Meibohm, B.; Talcott, S.; Drendorf, H, Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich A ai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. *J. Agric. Food Chem.*, 2008; 56(17): 7796– 7802.
- Martínez, A, Los flavonoides: Unos amigos del corazón, Medellín: Editorial Colombiana S.A., 2000, 54p.
- Roy M, Chakraborty S. Siddiqi M, Bhattacharya R.K. Induction of apoptosis in tumor cells by natural phenolic compounds. *Asian Pasc. J. Cancer Prev.* 2002; 3(1):61-67.

8. Khanduja, K.L.; Aytı, P.K.; Kumar, S.; Mittal, N.; Sohi, K.K.; Pathak, C.M. Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: a Bcl-2 independent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1760 (2): 283-289.
9. Silva Do Nascimento, R.J.; Couri, S.; Antoniassi, R.; Pereira Freitas, S. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. *Ver. Bras. Frutic.*, 2008; 30 (2):498-502.
10. Mantovani, **I.S.B.**; **Fernandes, S.B.O. E.**; **Menezes, F.S.** Constituintes apolares do fruto do açaí (*Euterpe oleracea* M. – *Arecaceae*) *Rev. Bras. Farmacogn.*, 2003; 13 (1): 41-42.
11. Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2^{ed}, São Paulo, 1985; Vol. 1, 583 p.
12. Hartman, L.; Lago, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl ester from lipids, *Lab. Pract.*, 1973; 22: 475-477.
13. Lock, O. Investigación Fitoquímica, Métodos de estudio de productos naturales, PUC - Lima, 1988; 213 p.
14. Lebeau, J.; Furman, C.; Berner, J.L.; Dunez, P.; Teisser, E.; Cotelle, N. Antioxidant Properties of Di-Tert-Butylhydroxylated Flavonoids, *Free Rad, Biol, Med*, 2000; 29: 990-912.
15. Mc Donald, S.; Prenzler, P.D.; Autolovich, M.; Robards, K. Phenolic content and antioxidant activity of olive oil extracts, *Food Chem*, 2001; 73: 73–84.
16. Gutiérrez - Maydata, A. Café, antioxidantes y protección a la salud [artículo en línea]. , *MEDISAN*, 2002; 6(4): 72-81. <http://bvs.sld.cu/revistas/san>. consultado 25/10/2012.

SÍNTESIS DE NUEVOS COMPLEJOS DE OXOVANADIO (IV) DE POTENCIAL ACTIVIDAD INSULINOMIMÉTICA CON LIGANDOS CUMARINA-3-ÁCIDO CARBOXÍLICO Y DERIVADOS SUSTITUIDOS

Paloma Salas Fernández¹, Nora Alvino De La Sota¹, Carla Galli Rigo-Righi^{1*}

RESUMEN

El trabajo consistió en el diseño y síntesis de cuatro nuevos complejos de oxovanadio (IV), metal de comprobada acción insulino-mimética. Se utilizó como ligando a la cumarina-3-ácido carboxílico y derivados 6 y 6,8-sustituidos. Las cumarinas resultan de interés como ligandos por sus reconocidas propiedades biológicas y aplicaciones farmacológicas, entre las que se incluyen el efecto insulino-sensibilizador de ciertos derivados alcoxi-hidroxi. Esto último podría conducir a un eventual efecto sinérgico con el centro metálico.

La síntesis de los complejos vanadilo involucró la síntesis previa de los ligandos cumarina-3-ácido carboxílico y su derivado 6-bromo, así como la síntesis de tres derivados aún no reportados, 6-bromo-8-metoxi-, 6-bromo-8-nitro y 6-bromo-8-hidroxi-, los cuales fueron sintetizados mediante una adaptación de una condensación de Knoevenagel. Los complejos por su parte, fueron sintetizados por una reacción de metátesis entre el VO_4 y el ligando correspondiente, basándose en métodos reportados para otros complejos vanadilo y bajo un control estricto de pH.

Los ligandos cumarina-3-ácido carboxílico y derivados sustituidos fueron caracterizados por RMN, FT-IR y UV-VIS. En el caso de los complejos, el carácter paramagnético del centro metálico no permitió su caracterización por RMN; por lo que fueron identificados por espectroscopía FT-IR y determinación del porcentaje de vanadio.

Palabras clave: Diabetes mellitus, complejos de oxovanadio (IV), actividad insulino-mimética, cumarina-3-ácido carboxílico.

SYNTHESIS OF NEW OXOVANADIUM (IV) COMPLEXES OF POTENTIAL INSULINMIMETIC ACTIVITY WITH COUMARIN-3-CARBOXYLIC ACID LIGANDS AND SUBSTITUTED DERIVATIVES

ABSTRACT

This work comprises the design and synthesis of four new oxovanadium (IV) complexes, a metal which possesses insulin-mimetic action. Coumarin-3-carboxylic acid and three of its 6- and 6,8- derivatives were used as ligands. Coumarins are of interest due to their well-known biological properties and pharmacological applications; these include the insulin-sensibilizing effect of certain alcoxy-hydroxy- derivatives which might lead to the eventual existence of a synergetic effect with the active metal center.

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

The synthesis of the vanadyl complexes was preceded by the synthesis of the coumarin-3-carboxylic acid and its 6-bromo- derivative, as well as the syntheses of three derivatives not previously reported: 6-bromo-8-metoxi-, 6-bromo-8-nitro-, and 6-bromo-8-hydroxy-, which were prepared by a Knoevenagel condensation reaction. The complexes, on their part, were prepared by a metathesis reaction between VO_2SO_4 and the corresponding ligands, on the basis of methods reported for other vanadyl complexes and under strict pH control.

The coumarin-3-carboxylic ligands and the derivatives were characterized by $^1\text{H-NMR}$ -, FT-IR- and UV-Vis-spectroscopy. In the case of the complexes, their paramagnetic character did not allow for NMR characterization, being thus identified by FT-IR-spectroscopy and by the quantitative determination of their vanadium contents.

Key words: *Diabetes mellitus*, oxovanadium (IV) complexes, insulin-mimetic action, coumarin-3-carboxylic acid.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades no transmisibles más comunes en el mundo, y la primera no infecciosa considerada epidémica. Los desórdenes en el metabolismo de la glucosa, proteínas y lípidos, derivados de una absoluta deficiencia en la secreción (DM tipo 1) o en la acción de la hormona reguladora insulina (DM tipo 2), conducen a graves complicaciones vasculares y neurológicas, responsables de la elevada tasa de mortalidad mundial asociada a esta enfermedad (8,2%)¹. Esta cifra es similar a la reportada para el VIH y malaria juntas.

Si bien actualmente existen varios medicamentos orales de origen orgánico comercialmente disponibles para el tratamiento de su forma más común, la DM tipo 2, éstos adolecen de limitada eficacia, pérdida progresiva de actividad y efectos colaterales adversos. Cada uno de ellos actúa sobre algún(os) mecanismo(s) específico(s) de regulación de la glucosa, por lo que es frecuente la necesidad de una terapia combinada e incluso, en fases más avanzadas de la enfermedad, dosis de insulina o análogos de la misma.

En este contexto, el papel esencial de los iones metálicos y sus compuestos biomoleculares en el desarrollo y funcionamiento de los seres vivos estimuló un creciente interés en el campo de los metalofármacos de comprobada actividad insulinomimética, entre los cuales destacan el W, Cr, Mg, V y Zn.^{2,3} Numerosas investigaciones han demostrado que el vanadio es capaz de imitar o potenciar la mayoría de los efectos fisiológicos y terapéuticos de la insulina en el tratamiento de la diabetes. Este metal estimula el transporte y oxidación de la glucosa y regula su exceso en el organismo al estimular la síntesis de glicógeno y la lipogénesis e inhibir la gluconeogénesis y la lipólisis.^{4,5}

Las investigaciones iniciales en las sales de vanadio (IV) y (V), se extendieron en la década de los 90 a complejos de los mismos con ligandos orgánicos y, en particular, a aquellos del ion oxovanadio (IV), por ser esta la especie dominante a nivel intracelular, que es donde el vanadio ejerce su efecto IM. Estos complejos han mostrado ser más efectivos a bajas dosis gracias a una mejorada bioabsorción y presentan, además, menos efectos colaterales adversos.⁶ Una característica deseable a considerar en el diseño de estos complejos es su potencial actividad oral, la cual requiere el uso de ligandos orgánicos de relativamente bajo peso molecular y con un buen balance lipofílico-hidrofílico asociado a la presencia de un cierto número de átomos O y/o N así como de grupos NH y/o OH, que aseguren una eficaz difusión pasiva a través de las membranas biológicas.⁷ Por otro lado, los complejos deben ser relativamente estables en los fluidos corporales para ejercer cabalmente su acción terapéutica y, no tóxicos.

En este contexto, cabe mencionar al bis(etilmaltolato)oxovanadio (IV) (BEOV), complejo de oxovanadio (IV) ampliamente evaluado en su actividad IM. En un estudio de fase clínica I se comprobó su no toxicidad y tolerancia en individuos sanos y una biodisponibilidad total tres veces mayor que la del sulfato de vanadilo.⁸ Este compuesto alcanzó y completó en el año 2008 la fase clínica IIa con resultados relativamente prometedores.⁹

En el presente trabajo se reporta la síntesis de tres nuevos ligandos cumarínicos y de cuatro nuevos complejos de oxovanadio (IV) con ligandos orgánicos de la familia cumarina-3-ácido carboxílico.

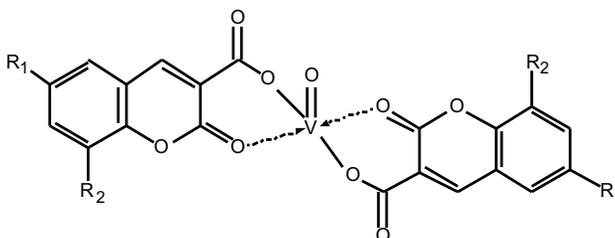


Figura 1. Estructura de los complejos de oxovanadio (IV) con ligandos cumarínicos: (1) $R_1 = H$, $R_2 = H$; (2) $R_1 = Br$, $R_2 = H$; (3) $R_1 = Br$, $R_2 = OCH_3$; (4) $R_1 = Br$, $R_2 = NO_2$; (5) $R_1 = Br$, $R_2 = OH$

La cumarina y sus derivados poseen reconocida y amplia actividad biológica y farmacológica. Los ligandos cumarínicos seleccionados poseen la capacidad de actuar como ligandos bidentados y formar complejos neutros. Asimismo, dado que algunos compuestos cumarínicos alcoxi-hidroxi han mostrado actividad hipoglicemiante y efecto atenuante de las complicaciones diabéticas podría surgir incluso un efecto sinérgico con el vanadio.¹⁰

PARTE EXPERIMENTAL

Equipos. Los espectros IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro FTIR-Perkin Elmer 1600. Los espectros UV-Visible fueron medidos en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2. Los espectros 1H -RMN y ^{13}C -RMN fueron medidos en un espectrómetro Bruker de 300 MHz. Los ensayos de calcinación para el análisis del porcentaje de vanadio se realizaron en una mufla Shimaden 200 en presencia de aire desde 25 °C hasta 900 °C. Los ensayos de determinación espectrofotométrica de vanadio se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2, de acuerdo a una adaptación experimental de la Norma Estándar Americana ASTM 1548-92 para la determinación de cantidades mínimas de vanadio en muestras de aceites pesados.¹¹ El comportamiento térmico del complejo 1 (figura 1) fue estudiado mediante un análisis termogravimétrico que se realizó en el Centro de Tecnología de Recursos Minerales y Cerámica en la Ciudad de la Plata, Argentina, utilizando un equipo marca Netzsch modelo 409/c. Los análisis elementales se realizaron en el Instituto de Química y Mineralogía de la Universidad de Leipzig (Alemania).

Reactivos. Los solventes etanol absoluto, metanol, tolueno, hexano y éter dietílico se adquirieron, de J.T Baker; cloroformo, diclorometano, dimetilsulfóxido, tetrahidrofurano, acetonitrilo y acetona, de Mallinckrodt Baker; ácido acético glacial, ácido sulfúrico 98%, ácido clorhídrico fumante, piperidina, de Merck. Los reactivos 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-

diona (ácido de Meldrum), 2-hidroxibenzaldehído (salicilaldehído), 5-bromo-2-hidroxi benzaldehído (5-bromosalicilaldehído), 5-bromo-2-hidroxi-3-metoxi benzaldehído (5-bromo-3-metoxi salicilaldehído), 5-bromo-2-hidroxi-3-nitro benzaldehído (5-bromo-3-nitro salicilaldehído) y ácido yodhídrico 55% se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Co.

La sal de oxovanadio (IV), $\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, empleada para la síntesis de los complejos, se obtuvo por reducción del V_2O_5 en medio ácido y con etanol. La sal acetato de piperidonio, catalizador necesario para la reacción de formación de los ligandos cumarínicos, se obtuvo por una reacción de neutralización. Asimismo, las sales de sodio de cuatro de los ligandos se sintetizaron mediante una reacción de neutralización.

Síntesis de los ligandos

Los ligandos (1-4) fueron sintetizados por una adaptación del método desarrollado por Lam y colaboradores¹², que se describe a continuación.

Una mezcla equimolar (2,5 mmol) del 2-hidroxi benzaldehído y de 2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6-diona (ácido de Meldrum) que contiene de 10-50 mg de acetato de piperidonio como catalizador, se disuelve en etanol absoluto a temperatura ambiente y bajo agitación. La solución resultante de color amarillo a naranja se mantiene a reflujo por 1 a 2 horas, durante las cuales se produce la precipitación gradual del producto, que se completa por enfriamiento en baño de hielo. El sólido obtenido se aísla por filtración y se lava con etanol helado.



Figura 2. Esquema de síntesis para los ligandos cumarina-3-carboxilato y sus derivados
(1) $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{H}$; **(2)** $\text{R}_1 = \text{Br}$, $\text{R}_2 = \text{H}$; **(3)** $\text{R}_1 = \text{Br}$, $\text{R}_2 = \text{OCH}_3$; **(4)** $\text{R}_1 = \text{Br}$, $\text{R}_2 = \text{NO}_2$;
(5) $\text{R}_1 = \text{Br}$, $\text{R}_2 = \text{OH}$

El ligando 5 se obtuvo por hidrólisis ácida de su precursor, el 6-bromo-8-metoxi-cumarina-3-acido carboxílico, con una mezcla de ácido yodhídrico 55% y ácido acético glacial (2:1) que se mantiene a reflujo por 15 horas. El producto se separa del yodo en exceso por un exhaustivo lavado con cloroformo.

A continuación se reportan los rendimientos obtenidos en la síntesis de cada uno de los ligandos, su purificación, solubilidad y caracterización espectroscópica. En caso del ligando 2 se incluye, además, los datos espectroscópicos del intermediario aislado.

Cumarina-3-ácido carboxílico (1)

Rendimiento 73,3%. Se purificó por recristalización en agua. Soluble a temperatura ambiente en diclorometano, acetato de etilo y DMSO; y en caliente en agua y etanol. IR (cm^{-1}): 3421,9 ($\nu_{\text{O-H}}$ COOH); 3056,2 ($\nu_{\text{C-H}}$ arom.); 1745,4 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactona); 1683,9 ($\nu_{\text{C=O}}$ COOH); 1613,6/1568,3/1489,8/1452,2 ($\nu_{\text{C-C}}$ arom.); 1420,6 ($\delta_{\text{O-H}}$ en el plano); 1226,9/1207,7 ($\nu_{\text{C-O}}$ COOH); 1041,9 ($\delta_{\text{O-H}}$ fuera del plano). $^1\text{H-RMN}$ (DMSO) δ (ppm): 13,14 (s, COOH); 8,75 (s, H-4); 7,90 (m, H-8); 7,72 (m, H-5); 7,40 (m, H-7 y H-6).

6-bromo-cumarina-3-ácido carboxílico (2)

Rendimiento 55,6%. Se purificó por recristalización en etanol absoluto. Soluble a temperatura ambiente en: diclorometano, cloroformo y metanol; y en caliente en: etanol y acetona. IR (cm^{-1}): 3420,1 ($\nu_{\text{O-H}}$ COOH); 3046,9 ($\nu_{\text{C-H}}$ arom.); 1764,4 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactona); 1676,9 ($\nu_{\text{C=O}}$ COOH); 1611,4/1596,8/1559,2/1479,9 ($\nu_{\text{C-C}}$ arom.); 1366,7 ($\delta_{\text{O-H}}$); 1221,8/1206,2 ($\nu_{\text{C-O}}$ COOH); 1031,5 ($\delta_{\text{O-H}}$). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 12,06 (s, COOH); 8,87 (s, H-4); 7,85 (m, H-5 y H-7); 7,40 (d, H-8).

Intermediario del ligando (2)

IR (cm^{-1}): 3444,2 ($\nu_{\text{O-H}}$ fenólico); 3042,9 ($\nu_{\text{C-H}}$ arom.); 2948,4/2840,0/2808,6 ($\nu_{\text{C-H}}$ alif.); 1755,6 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactona); 1613,2/1600,3/1558,7/1413,8 ($\nu_{\text{C-C}}$ arom.); 1475,8 (δ_{as} CH_3); 1363,6 ($\delta_{\text{O-H}}$ fenólico); 1340,8 (δ_{s} CH_3); 1247,9 ($\nu_{\text{C-O-C}}$).

6-bromo-8-metoxi-cumarina-3-ácido carboxílico (3)

Rendimiento 76,8%. Se purificó por recristalización en una mezcla etanol:acetona (4:1). Soluble a temperatura ambiente en acetona; y en caliente en: metanol y etanol. IR (cm^{-1}): ~3400 ($\nu_{\text{O-H}}$ COOH); 3061,8/3045,9 ($\nu_{\text{C-H}}$ arom.); 2978,2/2943,8 ($\nu_{\text{C-H}}$ alif.); 1746,6 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactona); 1686,2 ($\nu_{\text{C=O}}$ COOH); 1615,3/1602,8/1566,7/1460,1 ($\nu_{\text{C-C}}$ arom.); 1474,4 (δ_{as} C-H alif.); 1368,2 (δ_{s} C-H alif.); 1382,2 ($\delta_{\text{O-H}}$); 1230,5/1213,2 ($\nu_{\text{C-O}}$ COOH); 1125,8 ($\nu_{\text{s C-O-C}}$ OCH_3). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 12,08 (s, COOH); 8,83 (s, H-4); 7,41 (m, H-5 y H-7); 4,02 (s, OCH_3).

6-bromo-8-nitro-cumarina-3-ácido carboxílico (4)

Rendimiento 21%. Se purificó por recristalización en cloroformo con mínima cantidad de dioxano. Soluble a temperatura ambiente en dioxano; y en caliente en: metanol, etanol y etilenglicol. IR (cm^{-1}): 3467,7 ($\nu_{\text{O-H}}$ COOH); 3078,5 ($\nu_{\text{C-H}}$ arom.); 1769,8/1743,1 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactona); 1699,9 ($\nu_{\text{C=O}}$ COOH); 1622,4/1606,9/1565,5 ($\nu_{\text{C-C}}$ arom.); 1527,1 (ν_{as} NO_2); 1448,6 ($\delta_{\text{O-H}}$); 1348,0 (ν_{s} NO_2); 1226,1/1201,4 ($\nu_{\text{C-O}}$ COOH). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) δ (ppm): 13,60 (s, COOH); 8,95 (d, H-7); 8,88 (s, H-4); 8,75 (d, H-5).

6-bromo-8-hidroxi-cumarina-3-ácido carboxílico (5)

Rendimiento 85%. Se purificó por recristalización en etanol absoluto. Soluble a temperatura ambiente en DMSO; y en caliente en: metanol y etanol. Anal. Calcd. para $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{O}_5\text{Br}$: C, 42,14; H, 1,77; Br, 28,03. Exp.: C, 41,98; H, 1,62; Br, 29,12. IR (cm^{-1}): 3065,9 ($\nu_{\text{C-H}}$ arom.); 1727,8 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactona); 1678,5 ($\nu_{\text{C=O}}$ COOH); 1606,2/1513,2 ($\nu_{\text{C-C}}$ arom.); 1377,2 ($\delta_{\text{O-H}}$ en el plano); 1231,1/1197,7 ($\nu_{\text{C-O}}$ COOH). $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d^6) δ (ppm): 13,35 (s, 1H, H ácido); 10,89 (s, 1H, OH fenólico); 8,62 (s, 1H, H-4); 7,56 (d, 1H, H-5); 7,27 (d, 1H, H-7). $^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO-d^6) δ (ppm): 115,73 (C-6); 119,58 (C-10); 120,25 (C-3); 121,66 (C-5); 122,05 (C-7); 142,67 (C-9); 145,72 (C-8); 147,38 (C-4); 156,08 (O-C=O lactona); 163,87 (COOH)

Síntesis de los complejos (figura 1).

Todos los complejos, excepto el 4 que no se logró obtener, fueron sintetizados por el método general que se describe a continuación.

Una solución concentrada de sulfato de vanadilo hidratado (2,5 mmol) se agrega a una solución del ligando cumarínico (5 mmol) en la mínima cantidad de etanol (o metanol en caso del ligando 2), mantenida a reflujo y bajo agitación. La mezcla de reacción se lleva a pH 4,5 por adición lenta de una solución de Na_2CO_3 al 10%. Al cabo de 2 a 2,5 horas de calentamiento, se aísla el producto por filtración en caliente y se lava primero con etanol caliente y luego exhaustivamente con agua helada hasta eliminación del sulfato.

Bis(cumarina-3-carboxilato)oxovanadio (IV) (1)

Rendimiento 54%. Soluble a temperatura ambiente en DMSO e insoluble en agua y en una amplia variedad de solventes orgánicos polares y apolares. Análisis de vanadio (a) por calcinación: 18,60%; (b) espectrofotométrico: 17,16%. Análisis elemental: Teórico C, 53,95; H, 2,26; O, 32,34; V, 11,45. Experimental C, 44,17; H, 2,67; O, 35,90; V, 17,26. Termograma (pérdidas de masa): 4,1% (60°C-200°C); 49,2% (200°C-390°C); 9,2% (390°C-550°C). IR (cm⁻¹): 3507,4 (ν_{O-H} H₂O); 3043,9 (ν_{C-H} arom.); 1733,6 (ν_{C=O} lactona); 1609,1 (ν_{as} COO); 1567,6/1550,1/1455,9 (ν_{C-C} arom.); 1410,9 (ν_s COO); 1281,6/1257,7 (ν_{as} C-O-C); 991,15 (ν_{v=0}).

Bis (6-bromo-cumarina-3-carboxilato) oxovanadio (IV) (2)

Rendimiento 52%. A temperatura ambiente es soluble en éter y en caliente en dioxano y THF (con descomposición en todos los casos); insoluble en agua y el resto de solventes orgánicos. Análisis de vanadio (por calcinación): 11,93 %; teórico: 8,45 %. IR (cm⁻¹): 3467,7 (ν_{O-H} H₂O); 3039,7 (ν_{C-H} arom.); 1731,4 (ν_{C=O} lactona); 1616,6/1558,7 (ν_{C-C} arom); 1568,2 (ν_{as} COO); 1425,6 (ν_s -COO); 996,1 (ν_{v=0}).

Bis (6-bromo-8-metoxi-cumarina-3-carboxilato) oxovanadio (IV) (3)

Rendimiento 40%. A temperatura ambiente es parcialmente soluble en DMSO y tolueno; y en caliente soluble en DMSO; insoluble en agua y el resto de solventes orgánicos. Análisis de vanadio (por calcinación): 9,82 %; teórico 7,66 %. IR (cm⁻¹): 3425,1 (ν_{O-H} H₂O); 3074,1 (ν_{C-H} arom); 1729,5 (ν_{C=O} lactona); 1623,8 (δ_{O-H} H₂O); 1602,4 (ν_{as} -COO); 1566,8 (ν_{C-C} arom); 1477,5 (δ_{as} C-H alif); 1412,2 (ν_s COO-); 976,5 (ν_{v=0}).

Bis (6-bromo-8-hidroxi-cumarina-3-carboxilato) oxovanadio (IV) (5)

Rendimiento 92%. A temperatura ambiente es parcialmente soluble en DMSO; insoluble en agua y el resto de solventes orgánicos. IR (cm⁻¹): 3446,3 (ν_{O-H} OH); 1727,9 (ν_{C=O} lactona); 1651,3 (ν_{as} COO); 1593,2-1565,5 (ν_{C-C} arom); 981,8 (ν_{v=0}). ¹H-RMN (DMSO-d⁶) δ (ppm): 10,93 (s, 1H, OH fenólico); 8,55 (s, 1H, H-4); 7,55 y 7,28 (d, 2H, H-5 y H-7).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ligando cumarina-3-ácido carboxílico (1) fue sintetizado siguiendo las condiciones descritas por los autores del método.¹² Los ligandos (2), y los aún no reportados (3 y 4) han sido sintetizados por una adaptación del método de síntesis del ligando 1.

En estas síntesis, resultó determinante dos factores: el tiempo de reacción y la cantidad de catalizador. El primero asegura la conversión completa del intermediario de reacción al producto y el segundo resulta clave en el rendimiento de la reacción. Respecto al primer factor, después de iniciada la reacción precipita un sólido fino de color blanco que, para el caso del ligando (2), fue aislado y caracterizado por espectroscopía FTIR. Su estructura coincide con la esperada para el intermediario de reacción de formación del ligando propuesto por los autores del método, mas no aislado (figura 3).

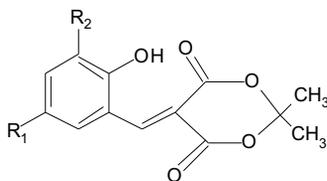


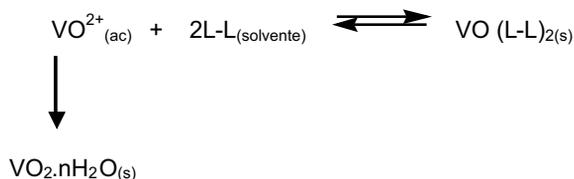
Figura 3. Intermediario de formación del ligando cumarina-3-ácido carboxílico y derivados sustituidos.

Respecto al segundo factor, se observó que existe una cantidad óptima de catalizador, la cual fue hallada empíricamente para cada ligando a las condiciones particulares de síntesis. Repetidos ensayos de síntesis mostraron que, dentro de cierto rango, una pequeña desviación por exceso o por defecto de dicha cantidad provoca una disminución considerable (10-30%) del rendimiento, mientras que por encima de este rango límite se obtiene el intermediario como único producto aún con mayor tiempo de reacción. Por debajo del rango en cuestión no se produce la reacción.

En el caso del ligando (4) se obtuvo un rendimiento máximo del 21 %, en comparación con los relativamente altos rendimientos de los otros ligandos. Esto se ha atribuido a la pobre nucleofilidad del grupo -OH en posición *orto* al grupo -NO₂ en el 2-hidroxibenzaldehído, que disminuye su efectividad para el ataque al grupo carbonilo en el paso de formación del anillo cumarínico. Además, el enlace de hidrógeno intramolecular de la estructura *o*-nitro fenólica dificultaría la desprotonación del grupo -OH y contribuiría a su baja reactividad. Aunque se sometió el intermediario a condiciones más fuertes de reacción, y se variaron tanto el solvente como el catalizador, no se logró una mejora del rendimiento.

En cuanto a la síntesis de los complejos de oxovanadio (IV), se desarrolló un método experimental tomando como referencia la síntesis de complejos de este ion con otros ligandos orgánicas.¹³⁻¹⁸ El medio de reacción fue predominantemente etanólico o metanólico por los requerimientos de solubilidad de los ligandos. Por la misma razón, la sal de vanadio se agregó disuelta en una mínima cantidad de agua caliente.

La adición de la base al medio de reacción ácido (pH=2-3) juega un papel clave en la formación del complejo. Por un lado, debe ser suficiente para garantizar una significativa desprotonación del grupo -COOH del ligando y, por otro, el medio de reacción debe mantenerse por debajo de un pH crítico de 4,5 para evitar la reacción competitiva de hidrólisis del catión VO(H₂O)₅²⁺, que da lugar a la formación irreversible del óxido hidratado VO₂.nH₂O, sólido gris. No obstante, a pesar de emplear una base débil, Na₂CO₃, y llevar a cabo la adición lentamente y bajo un estricto control del pH para favorecer la formación exclusiva del complejo, resultó imposible impedir que ocurra en cierto grado esta reacción competitiva.



Caracterización de los ligandos

El espectro IR del ligando (1) muestra bandas de absorción características de su estructura: a 3421 cm⁻¹ la vibración de estiramiento del enlace OH del grupo -COOH, de intensidad baja debido al enlace de hidrógeno intramolecular entre el -OH y el C=O lactónico, mientras que a 1683 cm⁻¹ aparece una fuerte absorción del grupo carbonilo del -COOH, típica de ácidos carboxílicos α,β-insaturados y β-dicetonícos. Asimismo, el carbonilo lactónico muestra una fuerte absorción a 1745 cm⁻¹, típica de una δ-lactona α,β-insaturada respecto al C=O y al O (figura 4).

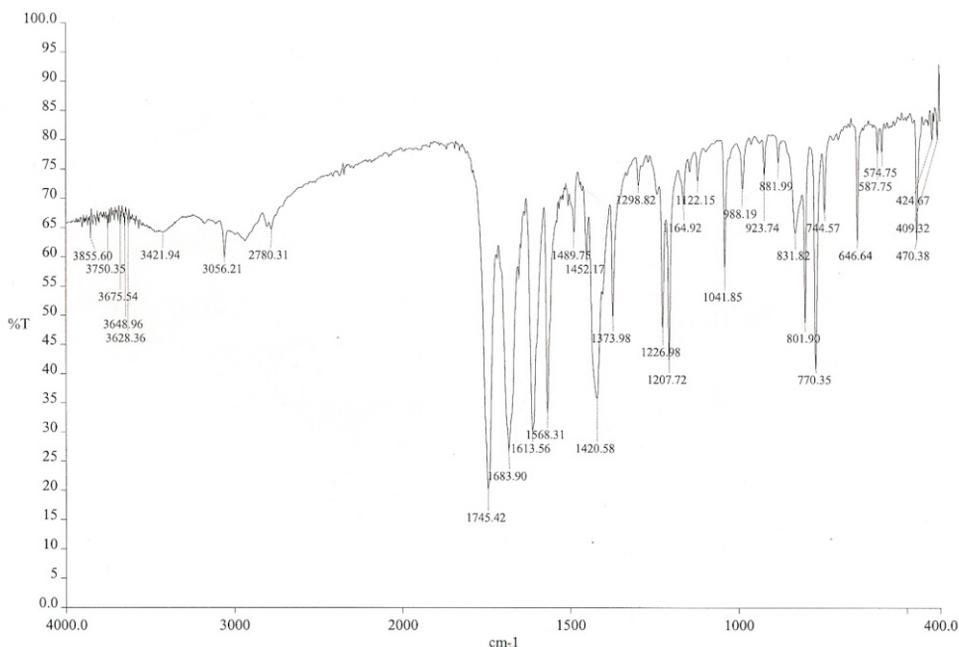


Figura 4. Espectro IR del ligando (1), cumarina-3-ácido carboxílico

El espectro ¹H-RMN presenta señales que concuerdan con las reportadas para el anillo cumarínico entre las que cabe destacar la señal singlete a 8,72 ppm del H-4 y una señal ancha y de baja intensidad a 13,14 ppm correspondiente al protón intercambiable del grupo -COOH. Asimismo, el espectro del ligando 2, corresponde al reportado.¹²

Los espectros IR de los ligandos 2, 3, 4 y 5 presentan las señales características de los grupos funcionales -COOH y C=O lactónico, antes discutidas para el ligando 1; además de las propias de los sustituyentes -OCH₃, -NO₂ y -OH, en caso de los ligandos 3, 4 y 5, respectivamente. En el ligando 4, se observa claramente las fuertes absorciones de los estiramientos asimétrico y simétrico del grupo nitro, a 1527,1 y 1348,0 cm⁻¹, respectivamente.

Por otro lado, los espectros ¹H-RMN de los ligandos 3, 4 y 5, aún no reportados, presentan las señales propias del H-4 y del -COOH así como los desplazamientos químicos esperados y constantes de acoplamiento características de la sustitución 6,8 del anillo cumarínico. En caso del ligando 4, se observa además el singlete del grupo metoxi a 4,02 ppm y en el ligando 5, se observa la señal característica del protón fenólico a 10,89 ppm (figura 5).

Las sales de sodio de los ligandos cumarínicos también fueron caracterizadas por espectroscopía IR. Los espectros infrarrojos de estas sales fueron utilizados como patrón de comparación con los de sus respectivos complejos y facilitaron la identificación de los grupos funcionales y enlaces susceptibles a modificación por coordinación al metal.

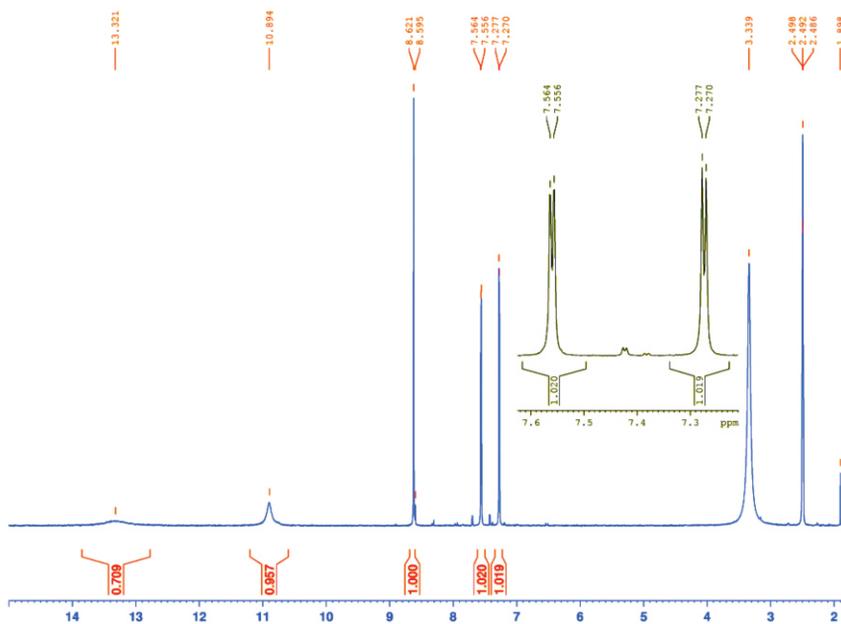


Figura 5. Espectro $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6) del ligando (5), 6-bromo-8-hidroxi-cumarina-3-ácido carboxílico.

La diferencia principal de estos espectros con los correspondientes de los ligandos consiste en la ausencia de las bandas de los grupos $-\text{COOH}$ y la aparición de los estiramientos simétrico y asimétrico característicos del grupo carboxilato. Así, en el espectro IR de la sal del ligando (1) desaparecen las bandas características del grupo carboxílico: 1683 cm^{-1} ($\nu_{\text{C=O}}$), 1420 cm^{-1} (δ_{OH} en el plano), $1226/1207\text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{C-O}}$) y 1041 cm^{-1} (δ_{OH} fuera del plano), y se observa, en su lugar, dos intensas bandas a 1590 cm^{-1} y 1388 cm^{-1} , identificadas como los ν_{as} y ν_{s} del grupo carboxilato, $-\text{COO}^-$, respectivamente. La banda ancha a 3436 cm^{-1} se asigna al agua de cristalización o hidratación (figura 6).

Los cuatro complejos de oxovanadio (IV) han sido caracterizados por espectroscopía infrarroja. La baja solubilidad de estos compuestos imposibilitó la medición de sus espectros UV-Visible y RMN; en este último caso la principal dificultad surgió de la naturaleza paramagnética del ion VO^{2+} que disminuye muchísimo la resolución del espectro limitando su utilidad como técnica de caracterización. Sin embargo, en caso del complejo hidroxilo sustituido (5), se logró obtener un espectro $^1\text{H-RMN}$ que, aunque de baja resolución, presenta la señales características de la sal del ligando desplazadas hacia campo bajo por efecto de la coordinación, lo cual respalda la caracterización propuesta a partir del espectro FT-IR discutida a continuación (figura 7).

El espectro IR del complejo bis(cumarina-3-carboxilato) oxovanadio (IV) (1), se muestra en la figura 6. La fuerte absorción a 991 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento del enlace V=O del catión vanadilo y demuestra la presencia de este centro metálico en el compuesto.

Las bandas de absorción a 1550 y 1410 cm^{-1} , que han sido asignadas a las vibraciones asimétrica y simétrica del grupo $-\text{COO}^-$, se hallan notablemente desplazadas con respecto a los correspondientes en la sal (ν_{as} 1590 y ν_{s} 1388). Asimismo, la banda de estiramiento del grupo $\text{C}=\text{O}$ lactónico se encuentra desplazada hacia menores frecuencias (1733 cm^{-1}) con respecto a la del ligando cumarínico (1745 cm^{-1}) y la sal correspondiente (1740 cm^{-1}). Estos cambios en la posición de las bandas de los grupos $-\text{COO}^-$ y $\text{C}=\text{O}$ lactónico comprobaría la esperada coordinación de ambos grupos al catión vanadilo. Finalmente, la ausencia de la intensa banda $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ del grupo $-\text{COOH}$ presente en el ligando a 1683 cm^{-1} indica que este se encuentra en su forma desprotonada. Por último, la absorción $\nu_{\text{O}-\text{H}}$ a 3507 cm^{-1} se podría asignar a la presencia de agua de coordinación o de hidratación. El resto de bandas presentes en la región de los grupos funcionales corresponden al esqueleto cumarínico.

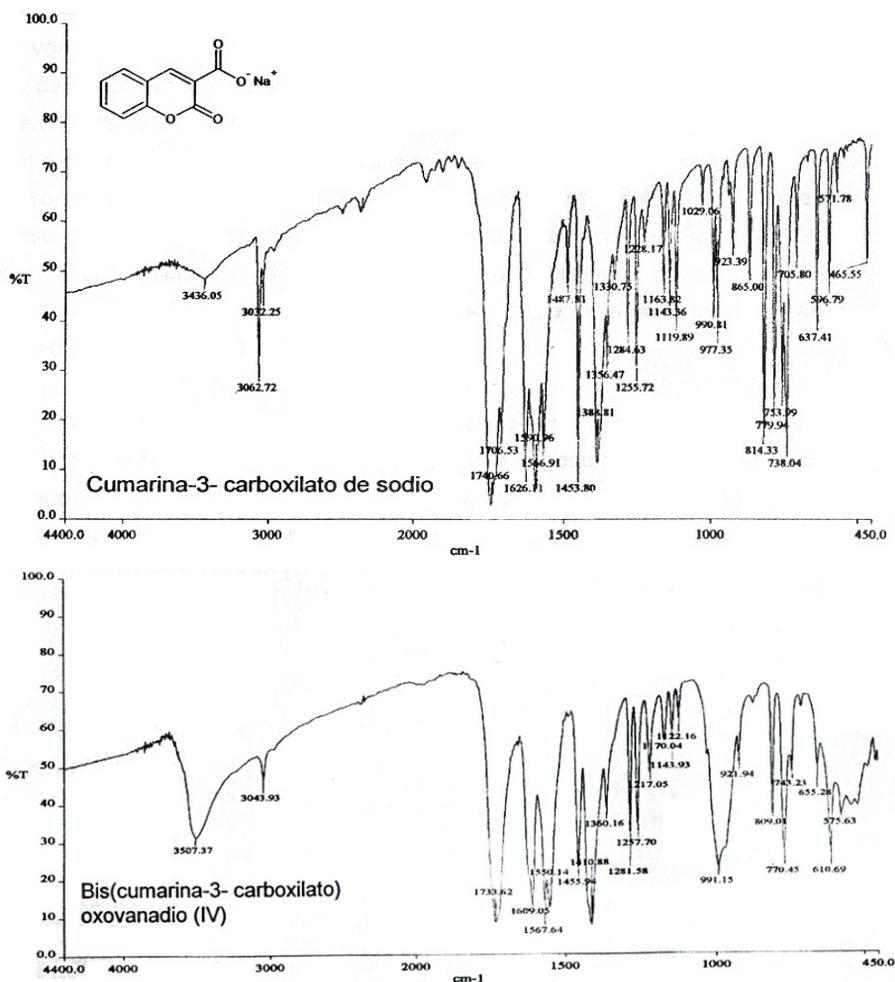


Figura 6. Espectro IR de la sal de sodio del ligando (1) y su correspondiente complejo.

Los espectros IR de los tres complejos análogos presentan también las intensas bandas del grupo VO^{2+} así como similares corrimientos en las bandas ν_{as} y ν_{s} del grupo COO^- y en la $\nu_{\text{C=O}}$ lactónico con respecto a aquéllos observados en las sales de los ligandos correspondientes. En caso de los complejos (3) y (4), la significativa disminución en la $\nu_{\text{=O}}$, con respecto a (1) y (2), se atribuye al efecto donador de electrones de los sustituyentes metoxi e hidroxilo respectivamente, que incrementan la basicidad y fuerza del enlace al metal de los grupos coordinantes -COO^- y C=O lactónico. Esto conduce a una disminución del poder aceptor de los orbitales d vacantes del metal hacia los electrones del oxígeno, debilitando así el correspondiente enlace V=O .

En base a esta información espectroscópica y a la relación molar 2:1 ligando-metal utilizada en la síntesis de estos complejos, es posible proponer una geometría pirámide cuadrada u octaédrica para los complejos obtenidos. Ambas son geometrías características para complejos del ion vanadilo con ligandos bidentados y tetradentados como los del presente trabajo.¹⁹ En el arreglo espacial pirámide cuadrada, la posición apical estaría ocupada por el oxígeno del enlace V=O y las cuatro ecuatoriales por los ligandos bidentados cumarina-3-carboxilato, los cuales, de acuerdo a la evidencia proveniente de los espectros IR, se encuentran enlazados vía el grupo C=O lactónico y uno de los oxígenos del grupo carboxilato. En caso del octaédrico, la sexta posición se encontraría ocupada por una molécula del solvente o agua de coordinación. Esta última se encontraría débilmente enlazada debido a la fuerte influencia *trans* ejercida por el grupo V=O .²⁰

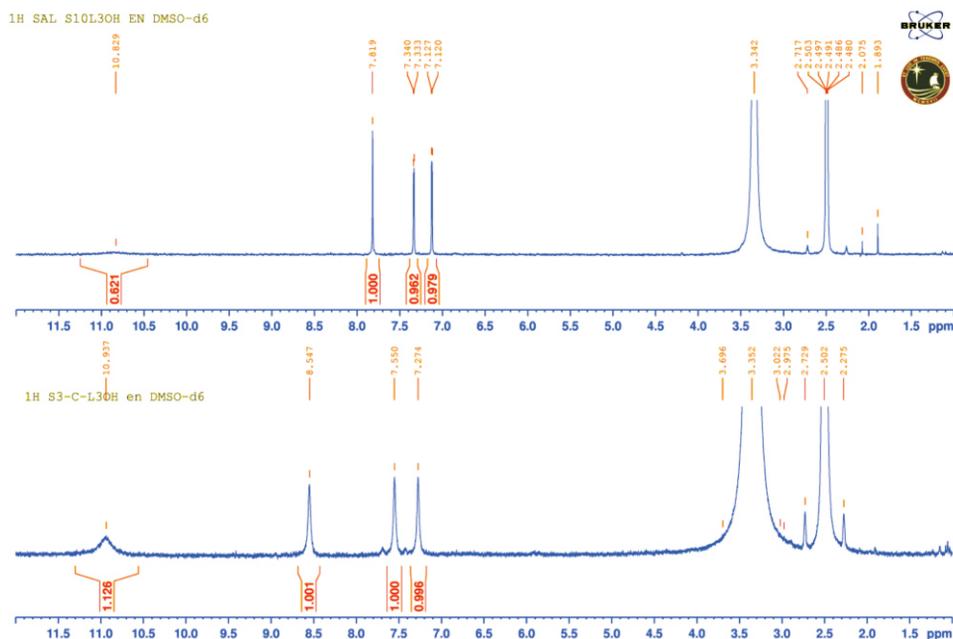


Figura 7. Espectro ^1H -RMN ($\text{DMSO-}\delta^6$) de la sal de sodio del ligando (5) y su correspondiente complejo, bis(6-bromo-8-hidroxi-cumarina-3-carboxilato) oxovanadio (IV)

En caso del complejo (1a), el análisis elemental indica una considerable desviación por exceso en el contenido de V, O e H, y por defecto en el de C, con respecto a los valores teóricos. Se ha calculado que estos valores resultan consistentes con una contaminación aproximada del 20% del óxido $\text{VO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Los porcentajes de vanadio de los complejos (2) y (3), determinados por análisis gravimétrico por calcinación, son también superiores a los esperados, e indican, aunque en menor grado, la presencia del óxido contaminante en dichos compuestos. La formación del óxido se comprobó para (1) mediante un ensayo en blanco bajo exactamente las mismas condiciones que las de formación del complejo pero en ausencia del ligando; incluso a un pH final de 4 se observó la precipitación de un sólido fino de color gris oscuro identificado por su espectro IR como $\text{VO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

Sin embargo, la apariencia de los espectros IR de los complejos oxovanadio (IV) no se vio afectada por la presencia en forma significativa del óxido contaminante $\text{VO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, razón por la cual este no pudo ser detectado desde el inicio. El espectro IR de esta sustancia presenta muy pocas bandas y sólo dos intensas. La ancha banda a 3500 cm^{-1} corresponde a la ν_{OH} del agua de hidratación del óxido y podría confundirse con o estar encubierta por la banda asignada al agua de coordinación o de hidratación del complejo, mientras que la $\nu_{\text{V=O}}$, a aproximadamente 974 cm^{-1} , estaría a su vez encubierta por la del complejo, notándose solo como un débil hombro en caso de los complejos (1) y (2) (figura 6).

Un grave problema que se presentó durante esta etapa de la investigación fue el de la insolubilidad o muy ligera solubilidad de los complejos obtenidos en el gran número de solventes ensayados, lo que impidió su posterior purificación por recristalización. La presencia de los sustituyentes $-\text{Br}$, $-\text{OCH}_3$ y $-\text{OH}$ en el anillo cumarínico en caso de los complejos (2), (3) y (4) no incrementó significativamente su solubilidad. No obstante, los complejos fueron tratados con varios solventes; sin embargo, a las condiciones de gran dilución presentes se produjo una descomposición de los mismos con recuperación del ligando original según:



Un caso especial se presentó con los solventes alcohólicos metanol, etanol y etilenglicol, en los cuales el cambio de color de las soluciones, de un amarillo verdoso pálido inicial a naranja intenso al cabo de unos días, indicaría la oxidación del vanadio (IV) a vanadio (V). Estos resultados concuerdan con el estudio cinético realizado por Orvig y colaboradores para el complejo bis(maltolato)oxovanadio (IV) (BMOV) en solventes alcohólicos.²¹

En otro intento de purificación, se ensayó la sublimación de los complejos sólidos a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ y alto vacío ($0,2 \text{ mmHg}$). El resultado fue la descomposición térmica de los mismos y sublimación del ligando cumarínico por separado. Por otra parte, los intentos de introducir variaciones en el método de síntesis con el fin de impedir la formación del óxido contaminante tampoco dieron resultado: en CH_3CN como solvente no se dio la reacción mientras que la síntesis en medio acuoso a partir de la sal del ligando (1) tuvo un bajo rendimiento.

CONCLUSIONES

La presente investigación ha conducido a la obtención de cuatro nuevos complejos de oxovanadio (IV), metal de comprobada acción insulinoimimética en sus altos estados de oxidación. Asimismo, este trabajo involucró la síntesis de tres nuevos compuestos orgánicos de la familia de la cumarina 3-ácido carboxílico para su uso como ligandos.

Sin embargo, la insolubilidad de los complejos sintetizados ha impedido la purificación de los mismos requerida para los ensayos biológicos *in vivo* inicialmente proyectados. Se espera que la introducción de un mayor número de grupos hidrofílicos en la parte hidrófoba del anillo cumarínico mediante derivatización de la posición 6 bromada, contribuya a mejorar la solubilidad de los complejos de oxovanadio (IV) que se sintetizan a partir de ellos y permita evaluar un potencial efecto asociativo o sinérgico en su actividad antidiabética.

Finalmente, la síntesis de los nuevos complejos constituye en sí misma un aporte al conjunto de compuestos de coordinación de este metal de potencial actividad insulinoimimética para su eventual desarrollo como metalofármaco antidiabético.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a la Dirección de Gestión de la Investigación (DGI) de la Pontificia Universidad Católica del Perú por la financiación prestada que hizo posible la ejecución de este trabajo de investigación.

Deseariamos agradecer también a Peter Lönnecke del Instituto de Química y Mineralogía de la Universidad de Leipzig (Alemania) por la realización del análisis elemental y a la profesora Lic. María S. Conconi del Centro de Tecnología de Recursos Minerales y Cerámica de la Universidad de La Plata (Argentina) por la realización del análisis termogravimétrico y térmico diferencial de uno de los complejos sintetizados.

REFERENCIAS

1. Yoshikawa, Y.; Ueda, E.; Kawabe, K.; Miyake, H.; Takino, T.; Sakurai, H.; Kojima, Y. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**; 7:68-73
2. Ueda, E.; Yoshikawa, Y.; Ishino, Y.; Sakurai, H.; Kojima, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**; 50:337-340
3. Yoshikawa, Y.; Ueda, E.; Miyake, H.; Sakurai, H.; Kojima, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**; 281:1190-1193
4. Galli, C.X.; Salas, P.; Pacheco, J. *Revista de Química* **2006**; 20:3-10
5. A.; Sarada, N.C.; Vijayaraghavan, R. *Medicinal Chemistry Research* **2013**; 22:2929-2937
6. Thompson, K.H.; Orvig, C. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**; 2885-2892
7. Leeson, P.; Davis, A.; *J. Med. Chem.* **2004**; 47:6338-6348
8. Thompson, K.H.; Orvig, C. *J. Inorg. Biochem.* **2006**; 1925-1935
9. Thompson, K.H.; Lichter, J.; LeBel, C.; Scaife, M.C.; McNeill, J.H.; Orvig, C. *J. Inorg. Biochem.* **2009**; 103:554-558
10. Negri, G.; *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2005**; 41: 121-132
11. ASTM Designation: D 1548-92 Standard Tests Method for Vanadium in Heavy Fuel Oil.
12. Song, A.; Wang, X.; Lam, K. S.; *Tetrah. Lett.*, **2003**; 44:1755-1758.
13. Thompson, K.H.; Orvig, C. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**; 2885-2892
14. Thompson, K. H.; McNeill, J. H. ; Orvig, C. *Chem. Rev.*, **1999**; 99:2561-2571.
15. Bora, P.; Yadav, H.S.; *Int. J. Chem. Tech. Res.* **2012**; 4:1428-1432
16. Prasad, K.S.; Kumar, L.S; Shekar, S.C; Prasad, M.; Revanasiddappa, H.D; *Chemical Sciences Journal* **2011**; 12:1-8
17. Sakurai, H.; Katoh, A.; Yoshikawa, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**; 79:1645-1664
18. Saatchi, K.; Thompson, K.H; Patrick, V.O.; Pink, M.; Yuen, V.G.; McNeill, J.H; Orvig, C.; *Inorg. Chem.* **2005**; 44:2689-2697
19. Yadava, A.K.; Yadav, H.S.; Yadav, U.S.; Rao, D.P. *Turk J. Chem.* **2012**; 36:624-630
20. Galli, C.X.; Alvino, N.E.; Pacheco, J. *Revista de Química* **2007**; 21:37-48
21. Sun, Y.; James, B. R.; Rettig, S. J.; Orvig, C. *Inorg. Chem.* **1996**; 35:1667-1673.

EQUILIBRIO DE BIOSORCIÓN DE PLOMO (II) Y CARACTERIZACIÓN MEDIANTE FT-IR Y SEM-EDAX EN PECTINA RETICULADA PROVENIENTE DE CÁSCARAS DE NARANJA

Víctor R. García Villegas^a *, Neptalí Ale Borja^a, Enrique G. Guzmán Lezama^{a,b},
Andrea G. Yipmantin Ojeda^b, y Holger J. Maldonado García^{a,b}

RESUMEN

El material péctico extraído a partir de cáscaras de naranja se reticuló previamente para disminuir su capacidad de hidratación e hinchamiento cuando se encuentra en medio acuoso. La determinación del grado de metoxilación (DM), el porcentaje de ácido galacturónico anhidro (%AGA) y el pka permitieron caracterizar al biosorbente. El rango de pH en el cual se obtuvo la máxima capacidad de sorción fue de 4,5 – 5,5. Para el procesamiento de datos y tratamiento estadístico se empleó el programa estadístico Origin versión 6.0. En el equilibrio de biosorción se obtuvo un mejor ajuste en la isoterma de Langmuir, alcanzando una capacidad de sorción máxima de $q_{\max} = 186$ mg/g. El análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) permitió reconocer los grupos funcionales característicos presentes y las modificaciones realizadas en la biomasa. La morfología de la superficie del biosorbente fue estudiada por el método de microscopía electrónica de barrido, (SEM) y la composición elemental de la biomasa antes del proceso de biosorción se obtuvo mediante análisis con espectroscopía de rayos X con energía dispersiva (EDAX).

Palabras clave: biosorción, pectina, plomo, isoterma, Langmuir

LEAD (II) BIOSORPTION EQUILIBRIUM AND CHARACTERIZATION THROUGH FT-IR AND SEM-EDAX CROSSLINKED PECTIN FROM ORANGE PEELS

ABSTRACT

Pectic material extracted from orange peels was previously cross-linked to diminish hydration and swelling capacity when pectin is found in aqueous solution medium. Degree of metoxilation (DM), galacturonic acid anhydrous (%AGA) and pka determination allowed characterizing biosorbent. Maximum sorption capacity was obtained at pH between 4.5 and 5.5. For data processing and statistical treatment informatics Origin 6.0 version program was used. Data from biosorption equilibrium had a better fit on Langmuir sorption equation model, obtaining $q_{\max} = 186$ mg/g as a maximum adsorption capacity. Fourier transform infrared spectroscopy analysis (FT-IR) allowed recognizing characteristic functional groups presents as well as biomass modifications. Biosorbent surface morphologic was studied by scanning

^a Facultad de Quím. e Ing. Quím., Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima 1.
Vrgv03@gmail.com

^b Facultad de Ciencias y Filosofía Alberto Cazorla Talleri. Departamento de Ciencias exactas-
Sección Química, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima 31

electron microscope (SEM) and elemental composition biomass before biosorption process was obtained through Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDAX).

Key word: biosorción, pectin, lead, isotherm, Langmuir

INTRODUCCIÓN

El incremento de las actividades industriales ha intensificado la contaminación ambiental y el deterioro de algunos ecosistemas mediante la acumulación de metales pesados. Las aguas residuales provenientes de las actividades mineras y metalúrgicas son consideradas como la mayor fuente de contaminación de metales pesados y la necesidad de métodos económicos y efectivos para la remoción de estos metales ha conllevado al desarrollo de nuevas tecnologías de separación.¹ Muchas de estas sustancias tóxicas que contienen metales pesados tienden a persistir indefinidamente en el medio ambiente, comprometiendo la salud de animales y personas mediante su acumulación e ingreso a la cadena alimenticia.²

Debbaudt *et al.*³ mencionaron que las sustancias adsorbentes, como el carbón activado, son empleadas para remover materia orgánica de alta masa molecular o sustancias inorgánicas presentes en aguas residuales. Las resinas de intercambio iónico también son efectivas para la remoción de metales pero tienen alto costo. Los materiales de origen biológico, tales como la pectina empleada como biosorbente en esta investigación, que se utilizan para la remoción de contaminantes se obtienen de materiales de desecho.

La pectina es un buen biosorbente de plomo, considerando que presenta unidades de ácido galacturónico como uno de sus principales componentes. Los grupos carboxílicos presentes en dichos componentes tienden a desprotonarse en solución acuosa conforme aumenta el pH del medio. A mayor pH de la solución, mayor será también su ionización, predominando la forma aniónica del grupo carboxilo. La biosorción de sustancias en la pectina tendrá lugar en la carga negativa de los grupos carboxílicos desprotonados, los cuales interactuarán con especies cargadas positivamente, como el caso de los metales cuya interacción puede ser de naturaleza electrostática o mediante la formación de complejos.

La captación en la pectina de dos cationes metálicos (Pb^{2+} y Zn^{2+}) ha sido estudiada por Dronnet *et al.*⁴ En aquel trabajo observaron que el entrecruzamiento de las cadenas pécticas de la pulpa de betarraga, cuando se trata con epíclorohidrina, tiene más eficiencia que cuando es tratado con formaldehído. La reticulación o entrecruzamiento de las cadenas permite una mayor resistencia a la hidratación.

En un estudio teórico para el cálculo de entalpía para las posibles interacciones entre Pb^{2+} y los grupos funcionales presentes en el ácido galacturónico Ferreira & Gschaidner⁵ sugirieron que los sitios más favorables para la adsorción del metal se encuentran en los grupos carboxilo en su forma aniónica y el oxígeno etéreo externo a las unidades de ácido galacturónico; el segundo mejor ligante está conformado por el oxígeno etéreo interno. Balariá & Schiewer⁶ observaron que el mecanismo de la biosorción del plomo en pectinas provenientes de cítricos está determinado principalmente por el número de grupos de ácidos carboxílicos presentes, el cual es mayor en pectina de bajo grado de metoxilación y se encuentra en menor cantidad cuando se tienen altos grados de metoxilación.

García *et al.*⁷ realizaron la extracción de la pectina que se empleó como biosorbente a partir de cáscaras de naranja y se estableció un modelo matemático para describir la cinética de biosorción de plomo en pectina reticulada en función de las condiciones de trabajo. Usando soluciones con igual concentración de metal e igual cantidad de biosorbente, pero a diferente pH, se verificó que la biosorción de especies catiónicas como el Pb^{2+} en pectina se ve favorecida cuando el pH se incrementa a 4,5 – 5,5.⁷

En este artículo se muestran los ajustes de los resultados de biosorción de Pb^{2+} en pectina reticulada para diferentes concentraciones de metal y biosorbente mediante los modelos de Langmuir y Freundlich. Los análisis FT-IR y SEM – EDAX y la determinación del DM, %AGA y pK_a permitieron el reconocimiento de los principales grupos funcionales característicos, morfología, composición y grado de acidez del biosorbente

PARTE EXPERIMENTAL

Caracterización del biosorbente

Las muestras secas de pectina (0-125 μm) antes del tratamiento con formaldehído y después fueron analizadas por el método de FT-IR.

El DM y el %AGA para el material péctico, antes del tratamiento con formaldehído y después, fueron determinados en base al método de valoración ácido-base de Schultz y Schweiger (1965), citado por Pagan, J.⁸

Los pK_a para ambas muestras fueron obtenidos a partir del pH correspondiente al momento en que el volumen de solución de NaOH añadido es la mitad del volumen de la neutralización.⁹

Obtención de la isoterma de biosorción de Pb^{2+}

Se preparó soluciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ de 20, 40, 60 y 80 ppm, ajustando al pH óptimo (5,0 – 5,5) y poniendo en contacto cada solución con 15mg de biosorbente (material péctico reticulado, 0-125 μm)/150 mL. De manera simultánea se realizó la misma operación para 20, 25 y 30 mg de biosorbente y se sometieron a agitación durante 72h en un agitador orbital. Una vez transcurrido el tiempo, el biosorbente se separó de las muestras, se filtró y midió el pH final de las soluciones y se determinó C_{eq} de acuerdo a

$$q = \frac{V(C_0 - C_{eq})}{S}$$

Donde:

q : Capacidad de adsorción ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)

V : Volumen de la solución (L)

C_0 : Concentración inicial del adsorbato (ppm)

C_{eq} : Concentración del adsorbato en el equilibrio (ppm)

S : Masa del biosorbente (g)

El procesamiento de los datos experimentales para la obtención de los parámetros de las isothermas de Langmuir y Freundlich se realizó con el programa estadístico Origin 6.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DM, %AGA y pK_a

El DM es una característica química muy importante relacionada tanto con el mecanismo de biosorción como con la velocidad de gelificación. La tabla 1 muestra los resultados del DM obtenidos para las pectinas antes del tratamiento con formaldehído y después. Los porcentajes obtenidos (53,5% para pectina antes del tratamiento con formaldehído y 40,3% para la pectina después del tratamiento) se encuentran en un rango medio entre los criterios considerados para la denominación de la pectina de LM y HM.^{10,11}

Tabla 1: DM, %AGA y pK_a de la pectina antes del tratamiento con formaldehído y después del tratamiento

| Parámetros | Sin tratamiento | Con tratamiento |
|------------|-----------------|-----------------|
| DM | 53,492 | 40,347 |
| %AAG | 48,744 | 64,611 |
| pK_a | 4,09 | 4,13 |

Estudio del equilibrio de biosorción

La isoterma de sorción de plomo en pectina está representada en la figura 1. El pH óptimo (5,5) descendió al final del proceso a valores comprendidos entre 3,5 y 3,8. La línea continua representa el ajuste a la ecuación de la isoterma de Langmuir y la línea punteada representa el ajuste a la ecuación de la isoterma de Freundlich. La tabla 2 resume los parámetros para ambos modelos obtenidos a partir del procesamiento de datos empleando el programa estadístico Origin 6.0. El coeficiente de correlación no lineal del ajuste al modelo de Langmuir es mayor al que se obtiene cuando se hace el ajuste al modelo de Freundlich. Este valor confirma la alta afinidad que presentan las sustancias pécticas por el Pb(II) en la monocapa (q_{max} : 185,9 mg/g). A diferencia de la curva ajustada al modelo de Langmuir, en donde la tendencia converge hacia el valor de la q_{max} , a medida que aumenta C_{eq} , la curva ajustada al modelo de Freundlich no presenta una región de convergencia por tratarse de una función creciente. Por este motivo, el modelo de isoterma de Freundlich es válido únicamente para sistemas en donde aún no se ha alcanzado el equilibrio.

Estos resultados demuestran que la adsorción química no va más allá de una monocapa en la superficie, por lo que la isoterma de Langmuir es más apropiada para interpretar estos datos.¹²

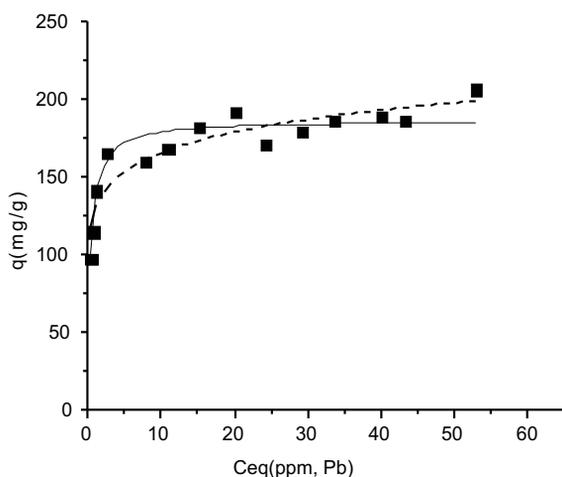


Figura 1: Isoterma de adsorción de Pb (II) en pectina reticulada. La curva de tendencia para el modelo de Langmuir está representada por la línea continua (—) y para el modelo de Freundlich está representada por la línea punteada (- - - -).

Tabla 2: Parámetros de las ecuaciones de Langmuir y Freundlich
(tamaño de partícula: 0 – 125 μm)

| Isoterma de Langmuir | | | Isoterma de Freundlich | | |
|-------------------------|------------|--------|------------------------|-------|--------|
| q_{max} (mg/g) | b (L/mg) | R^2 | k^a | n | R^2 |
| 185,881 | 2,476 | 0,8991 | 128,218 | 9,070 | 0,8643 |

^a Unidades de k : $\text{mg}^{1/n} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{L}^{1/n}$

La afinidad de la pectina por el plomo puede explicarse por la teoría de los ácidos y bases duros y blandos.¹³ El tipo de interacción que posiblemente domine podría ser de naturaleza culómbica por tratarse de un ácido medianamente blando (*de frontera*) como el plomo (II) y bases duras como los oxígenos éteres internos y externos y los grupos carboxilato de las unidades de ácido galacturónico.

Análisis por FT-IR

La caracterización de la superficie del biosorbente antes del tratamiento con formaldehído, después del tratamiento y después de la biosorción de plomo fue realizada mediante el análisis por Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). En general, los cambios producidos en las bandas de un espectro IR para una muestra luego de un proceso determinado, están relacionados con los cambios en la composición de la estructura de dicha muestra.

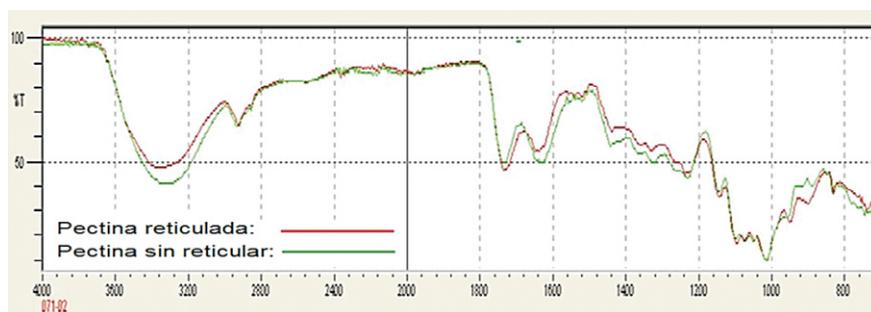


Figura 2: Espectro FT-IR de la pectina antes del tratamiento con formaldehído y después

La espectroscopía FT-IR es un excelente método para el análisis cuantitativo y estructural de pectinas.¹¹ En las figuras 2 y 3 se muestra los espectros obtenidos de la pectina antes del proceso de biosorción del metal y después. La tabla 3 compara las principales vibraciones obtenidas en los espectros característicos para ambas pectinas. Después de la biosorción de Pb^{II} , los espectros FT-IR han cambiado poco. La amplia banda mostrada a $3430,26 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo funcional OH y que se encuentra sobre la de $2939,45 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la absorción del enlace C-H alifático da la apariencia de un pico amplio con picos agudos superpuestos sobre él, característicos en los espectros de los ácidos carboxílicos.¹⁴ Mientras que para las muestras reticuladas antes de la biosorción con el metal y después se obtuvieron señales de $3403,75$ y $3317,56 \text{ cm}^{-1}$ para el grupo OH y $2937,87$ y

2941,44 cm^{-1} para el enlace C-H alifático, respectivamente. La banda que aparece a 1741,69 cm^{-1} presenta una frecuencia relativamente alta, característica en los grupos carbonilo de los ésteres.

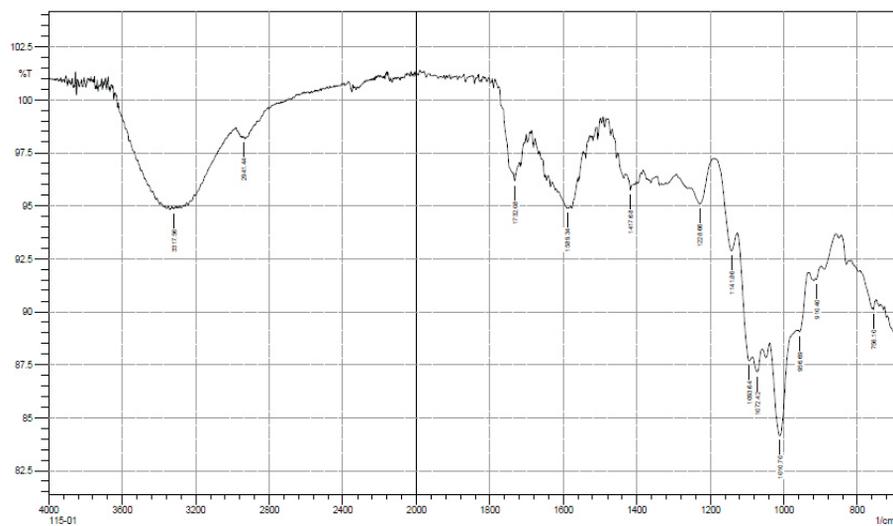


Figura 3: Espectro FT-IR de la pectina después de la biosorción del plomo

Tabla 3: Principales señales del espectro FT-IR para la pectina

| Asignaciones y observaciones | Señales (cm^{-1}) | | |
|---------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------|---------------------------------------------|
| | Pectina antes de reticular | Pectina reticulada | Pect. Retic. después de la biosorción de Pb |
| Banda correspondiente al grupo funcional OH | 3430,26 | 3403,75 | 3317,56 |
| Banda correspondiente al enlace C-H alifático. | 2939,45 | 2937,87 | 2941,44 |
| Banda correspondiente al grupo carbonilo C=O de -COOMe. | 1741,69 | 1741,26 | 1732,08 |
| Banda correspondiente al grupo carbonilo C=O del -COOH. | 1637,10 | 1634,31 | 1589,34 |
| Banda correspondiente a la vibración del enlace -C-O. | 1103,40 | 1101,60 | 1093,64 |

La banda que aparece a $1637,10\text{ cm}^{-1}$, corresponde a grupos carbonilo de ácidos carboxílicos con dobles enlaces conjugados; sin embargo Franco *et al.*¹⁵ comentaron que el espectro de la pectina comercial presenta una banda a $1630,17\text{ cm}^{-1}$ perteneciente al grupo carbonilo del $-\text{COO}$. Las pequeñas disminuciones que se observan en torno a 1600 cm^{-1} para el grupo carbonilo del COOH de la muestra reticulada antes de la biosorción y después ($1634,31\text{ cm}^{-1}$ y $1589,34\text{ cm}^{-1}$) se deben probablemente a que la densidad de carga, el radio y el peso atómico del catión cambian, creando un nuevo ambiente en torno al grupo carbonílico. Sin embargo, no se observó variaciones significativas en los picos correspondientes a los grupos carbonilo del COOMe debido a la ausencia del protón ácido.

Análisis por SEM-EDAX

El método de microscopía electrónica de barrido, SEM (scanning electron microscope) puede ser empleado para estudiar la morfología de las superficies y mediante el análisis con espectroscopía de rayos X con energía dispersiva, EDAX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) se puede estudiar la composición elemental de los elementos existentes de un material determinado. Con ambas técnicas se caracterizó la superficie del biosorbente reticulado antes de la biosorción de plomo y después.

Las figuras 4 y 5 muestran las microfotografías SEM y el espectro EDAX para la pectina reticulada antes y después de la biosorción de plomo. En el espectro EDAX que se muestra en la figura 4 se observa una señal muy intensa de C y otra de menor intensidad de O, características en el biopolímero. El pico del elemento plomo puede observarse en la figura 5. También se determinó picos de Au en ambos espectros debido al tratamiento con polvo de oro utilizado antes de la medición.

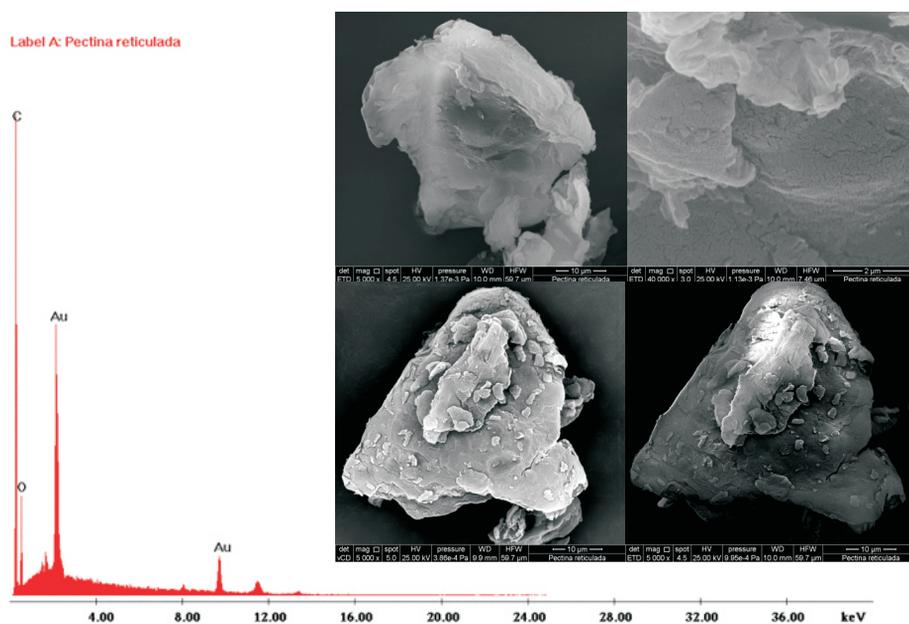


Figura 4: Microfotografía SEM de la pectina reticulada

Label A: Pectina reticulada - Pb

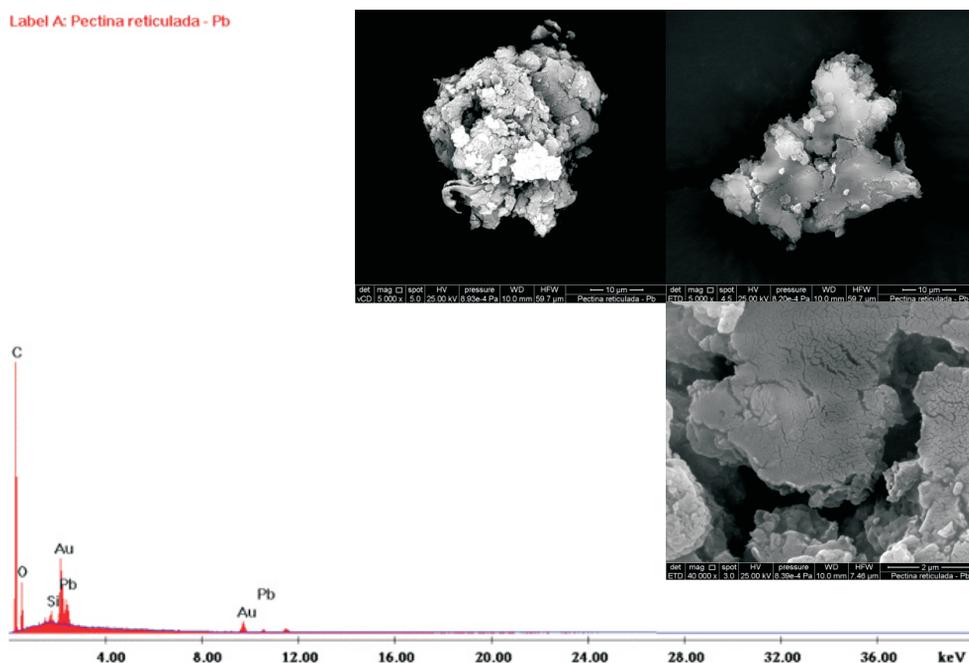


Figura 5: Microfotografía SEM de la pectina reticulada después de la biosorción de plomo.

CONCLUSIONES

Los valores obtenidos para DM, %AGA y pK_a demuestran que las fuertes propiedades ácidas que presenta el material péctico obtenido de cáscaras de naranja lo convierten en un potencial biosorbente para la eliminación de metales pesados.

Cuando la solución de plomo presenta mayor concentración se favorece el proceso, aumentando la capacidad de sorción de la pectina en el equilibrio debido a que la mayor cantidad de iones del metal que presenta el medio aumenta la probabilidad de ocupación de sitios activos.

La superficie de contacto conformada por los sitios activos del biosorbente es mayor cuando aumenta la concentración del mismo, por lo que se produce una mayor disminución de la concentración del metal en la solución, en comparación con aquellos sistemas en donde se emplean concentraciones menores de biosorbente.

La sustitución de un protón ácido por el metal en la pectina reticulada después del proceso de biosorción produce un cambio en la densidad de carga y el radio iónico que se refleja, principalmente, en la disminución de la frecuencia de vibración IR en el grupo carbonilo del $-\text{COOH}$ en la pectina.

El análisis por SEM-EDAX permitió determinar la composición elemental antes del proceso de biosorción y después.

REFERENCIAS

1. Veglio, F. & Beolchini F. Rev. Removal of metals by biosorption. *Hydrometallurgy* 1997; 44: 301-316.
2. Volesky, B. & Holan Z. R. Rev. Biosorption of Heavy Metals. *Biotechnol. Prog* 1995; 11: 235-250.
3. Debbaudt, A.L., Ferreira, M.L. & Gschaidera, M.E. Theoretical and experimental study of M^{2+} adsorption on biopolymers. III. Comparative kinetic pattern of Pb, Hg and Cd. *Carbohydrate Polymers* 2004; 56: 321-332.
4. Dronnet, V.M., Axelos, M.A.V., Renard, C.M.G.C. & Thibault, J. Improvement of the binding capacity of metal cations by sugar-beet pulp. 1. Impact of cross-linking treatments on composition, hydration and binding properties. *Carbohydrate Polymers* 1998; 35: 29-37.
5. Ferreira, M. L. & Gschaidera Theoretical and Experimental Study of Pb^{2+} and Hg^{2+} Adsorption on Biopolymers, 1. *Macromolecular Bioscience* 2001; 6: 233-248.
6. Balaria, A. & Schiewer, S. Assessment of biosorption mechanism for Pb binding by citrus pectin. *Separation and Purification Technology* 2008; 63: 577-581.
7. García, V., Yipmantin, A., Guzmán, E., Pumachagua, R. & Maldonado, H. Estudio de la cinética de biosorción de iones plomo en pectina reticulada proveniente de cáscaras de cítricos. *Rev Soc Quím Perú*. 2011; 77 (3): 173-181.
8. Pagan, J Degradacion enzimática y características físicas y químicas de la pectina del bagazo de melocotón. 1999; *Biblioteca Virtual Miguel de Servantes*. En <http://www.cervantesvirtual.com/> Leído el 19/07/11.
9. Skoog, D. A., West, D., M., Holler, F., J. & Crouch, S., R. Fundamentos de Química Analítica. Ed. Thomson, S. A. Octava edición, 2005.
10. El-Nawawi, S.A. & Heikal, Y.A., Factors affecting gelation of high-ester citrus pectin. *Process Biochemistry* 1997; 32(5): 381-385.
11. Sinitsya, A., Čopíková, J., Prutyánov, V., Skoblya, S. & Machovič, V. Amidation of highly methoxylated citrus pectin with primary amines. *Carbohydrate Polymers* 2000; 42: 359-368.
12. Castellan, G.W. *Physical Chemistry*. Massachusetts. Addison-Wesley Publishing Company, 1983.
13. Atkins, P., Overton, T., Rourke, J., Weller, M. & Armstrong, F. *Shriver & Atkins Química Inorgánica*. Ed. McGraw Hill / Interamericana Editores, S. A. de C. V. 2008.
14. Wade, L. *Química Orgánica*. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana, S. A. 2002.
15. Franco, M., Ramírez, M., García, R., Bernal, M., Espinosa, B., Solís, J., & Duran, C. () Aprovechamiento integral de residuos agroindustriales: Cáscara y pulpa de cacao para la producción de pectinas. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias* 2010; 1(2): 45-66.

Enseñanza de la Química

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN RMN 1D Y 2D DE DERIVADOS OXIGENADOS DE LA 1-FENIL-3-METIL-2-PIRAZOLÍN-5-ONA Y SU POTENCIAL CAPACIDAD LIGANTE

Sergio Zamorano^a, Juan Camus^a

RESUMEN

En este trabajo se presenta el resultado de la síntesis del 1-fenil-3-metil-2-pirazolín-5-hidroxi-4-butoxicarbonil (Pir-C4). Se caracterizan los productos obtenidos usando el microanálisis, la espectroscopía infrarroja, la espectroscopía RMN de H^1 y C^{13} y la RMN en dos dimensiones (COSY y HMBC) para determinar sus estructuras, y se estudia su potencial capacidad ligante en la formación de compuestos de coordinación con el uranilo (UO_2^{2+}).

Palabras clave: Derivados de la pirazolona, espectroscopía RMN 1D y 2D

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION RMN 1D AND 2D OF THE OXIGENATED DERIVATIVES OF THE 1-PHENYL-3-METHYL-2-PIRAZOLINE-5-ONA AND THEIR LIGAND POTENCIAL CAPACITY

ABSTRACT

In this work the result of the synthesis of the 1-phenyl-3-methyl-2-pyrazolin-5-hydroxy-4-butoxicarbonilene (Pir-C4) is presented and the products are characterized, using the microanalysis, the infrared spectroscopy, the spectroscopy NMR of H^1 and C^{13} and the NMR in two dimensions (COSY and HMBC) in order to determine their structures. In addition, the ligand potential capacity of these products are studied to produce coordination compounds with the uranyl (UO_2^{2+}).

Key words: Pirazoline derivatives, 1D and 2D NMR spectroscopy

INTRODUCCIÓN

En publicaciones anteriores presentamos la síntesis y caracterización de moléculas orgánicas y bases de Schiff utilizando la RMN 1D y 2D, para determinar la estructura de estos productos^{1,2}; también recalamos la importancia que está teniendo esta técnica en el campo de los compuestos de coordinación³. La RMN 1D y 2D ha resultado ser una herramienta muy útil en el estudio estructural de las pirazolonas; así por ejemplo, utilizando conjuntamente las técnicas homonucleares de RMN COSY y NOESY pudimos determinar los desplazamientos químicos de los protones y, para complementar, con los experimentos heteronucleares RMN

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

HMBC se obtiene la correlación a dos o tres enlaces de distancia entre núcleos distintos como H^1 y C^{13} , lo que permite verificar la estructura de diversos derivados de la pirazolona⁴⁻⁸. El 1-fenil-3-metil-2-pirazolín-5-ona, posee tres tautómeros, CH, OH y NH.

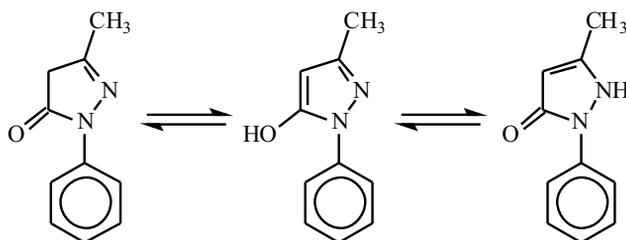


Figura 1. Tautómeros de 1-fenil-3-metil-2-pirazolín-5-ona

Al hacer reaccionar la pirazolona con el cloroformiato de butilo⁵ se obtiene el 1-fenil-3-metil-2-pirazolín-5-hidroxi-4-butoxicarbonil (Pir-C4). La RMN 1D y 2D nos permitió elucidar las estructuras⁹⁻¹¹ de cada uno de los productos sintetizados. Por otro lado, se conoce que las bases de Schiff de los 4-acil-3-metil-1-fenil-2-pirazolín-5-ona, son muy eficientes extractantes de diversos iones metálicos en medio acuoso, y que el uranilo es un ácido fuerte de Lewis y tiene gran afinidad por grupos altamente donores por lo que exhibe buena estabilidad para formar complejos con varios ligandos que contengan átomos donores de oxígeno, azufre y/o nitrógeno¹², permitiendo la formación de una variedad de configuraciones estructurales, como la tetragonal, la pentagonal y la hexagonal bipiramidal.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

Síntesis del Pir-C4.

En 50 ml de dioxano se disuelven 10 mmoles de 1-fenil-3-metil-2-pirazolín-5-ona al que se le agregó 15 mmoles de $Ca(OH)_2$. Se calentó suavemente agitando continuamente durante 1 hora. Una vez enfriada la solución se agrega 11 mmoles de cloroformiato de n-butilo, se deja en reflujo durante 2 horas hasta que tome color rosado. Se enfría mezclando hielo picado con 100 ml de HCl 3N. Se agita vigorosamente durante media hora. Se filtra el precipitado resultante, se seca y luego se recristaliza, disolviendo en alcohol etílico absoluto. Los cristales resultantes son de color café claro amarillento.

Síntesis del complejo $[UO_2(Pir-C4)_2]$

Se disuelve 34,8 mg de Pir-C4 en 30 ml de alcohol metílico absoluto. A la solución resultante se agrega 26,9 mg de acetato de uranilo, disueltos en 30 ml de metanol. La solución resultante se somete a reflujo durante 1 hora. Se obtiene una solución anaranjada, que se deja reposar en el refrigerador a 5°C durante una semana. Se obtienen cristales de color naranja rojizo.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para la determinación de la estructura del Pir-C4, los carbonos se marcan de manera correlativa con números del 1 al 15 y los hidrógenos se designan con letras minúsculas de la “a” a la “j”; esta numeración se muestra en la figura 2.

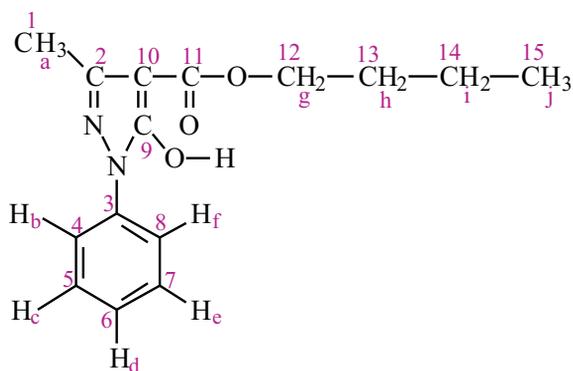


Figura 2. Estructura plana y numeración correlativa de carbonos en la Pir-C4

El análisis químico elemental se realizó utilizando un equipo Fisons EA-1108 (CHNS-O). En la molécula **Pir-C4** ($C_{15}H_{18}N_2O_3$), se tiene que los porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrógeno, teórico/experimental son: 65,69/65,40; 10,21/ 10,21 y 6,57/6,65, respectivamente.

En el caso del complejo UO_2^{2+} con PirC4 se tiene que los porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrógeno, teórico/ experimental son: 44,12/43,65; 6,86/6,35 y 4,16/4,23, respectivamente.

Los resultados de la espectroscopía IR, registrados en un espectrofotómetro IR-Brucker FT-IR con ventanas de KBr en rango $4000-200\text{ cm}^{-1}$, son los siguientes: las bandas más importantes se encuentran agrupadas en el anillo del pirazol que aparecen a los $1529,6\text{ cm}^{-1}$; la parte aromática aparece a los $3056,2$ y $790,0\text{ cm}^{-1}$. La banda del OH aparece a los $3435,3\text{ cm}^{-1}$.

En el espectro RMN H^1 , que se presenta en la figura 3, se observa claramente la existencia de tres tipos de protones: alifáticos, aromáticos y de tipo OH (cuando corresponde).

Los protones alifáticos se presentan en campo alto, los de tipo CH_3 aparecen en dos señales y los CH_2 en tres señales. Para el caso del Pir C4, se observa una señal a δ 0,987 y 2,409 ppm asignada a los protones H_j y H_a respectivamente. Los grupos metilo ($-CH_2$) aparecen como multipletes a δ 1,472; 1,747 y 4,328 ppm asignadas a los protones H_g , H_h y H_e , respectivamente.

En la zona aromática encontramos una señal multiplete a δ 7,266 ppm que integra al protón H_d y otros dos multipletes que integran dos protones cada uno asignados a H_c , H_e y el otro a H_b , y H_f .

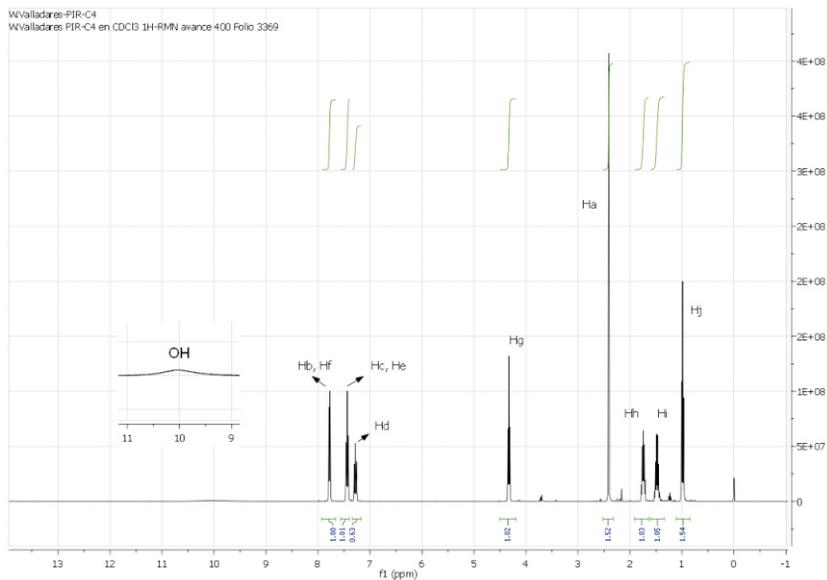


Figura 3. Espectro de RMN- ^1H del Pir-C4

En la figura 4 se muestra una aproximación a la zona aromática para el PirC4

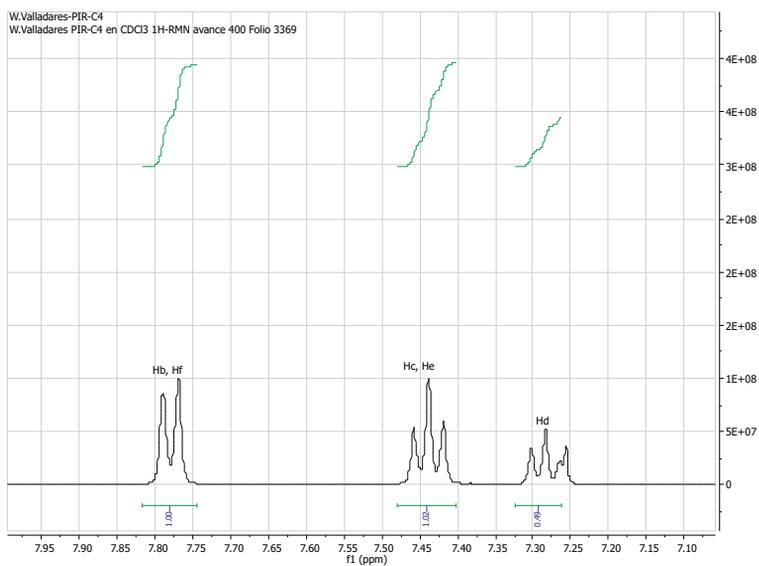


Figura 4. Espectro de RMN- ^1H del Pir-C4

A partir de los espectros de RMN C^{13} y DEPT 135 y de RMN 2D se asignaron todos los carbonos del Pir-C4. Encontramos dos señales a campo alto δ 13,680 y 14,609 ppm correspondiendo a los grupos $-CH_3$ asignada a los carbonos C_{15} y C_1 . Las señales de los grupos $-CH_2$ aparecen a δ 19,262 ; 30,790 y 64,403 ppm asignada a los carbonos C_{14} , C_{13} y C_{12} , respectivamente.

La zona aromática muestra dos señales con carbonos equivalente a 121,377 ppm asignada a los carbonos C_4 y C_8 y la otra a 129,276 ppm; correspondiente a los carbonos C_5 y C_7 . Las señales 126,908 y 137,798 ppm se asignan a los carbonos C_6 y C_3 respectivamente.

Los carbonos del anillo pirazol presentan las señales δ 93,946 ; 148,644 y 157,723 ppm y se asignan a C_{10} , C_2 y C_9 , respectivamente.

Finalmente el carbono del grupo $-COO$ presenta la señal a campo bajo 167,569 ppm y corresponde al C_{11} .

Mediante el experimento de RMN bidimensional correspondiente a HMBC, que se presenta en la figura 5; se puede conocer la correlación que presenta un hidrógeno determinado a dos, tres y hasta cuatro enlaces de distancia con diferentes átomos de carbono, lo que permite elucidar el esqueleto del compuesto y por ello, la asignación de todos los carbonos. Como se observa, la señal singlete del protón H_a se acopla con el C_1 y se correlaciona con C_{10} a tres enlaces. También este protón se correlaciona con el C_2 a dos enlaces. La señal triplete del protón H_j se acopla con el C_{15} y se correlaciona con C_{13} y C_{14} a 3 y 2 enlaces, respectivamente.

El protón H_g , del grupo $-CH_2-$ se acopla con el C_{12} y se correlaciona con el C_{14} , C_{13} y C_{11} a tres, dos y dos enlaces, respectivamente.

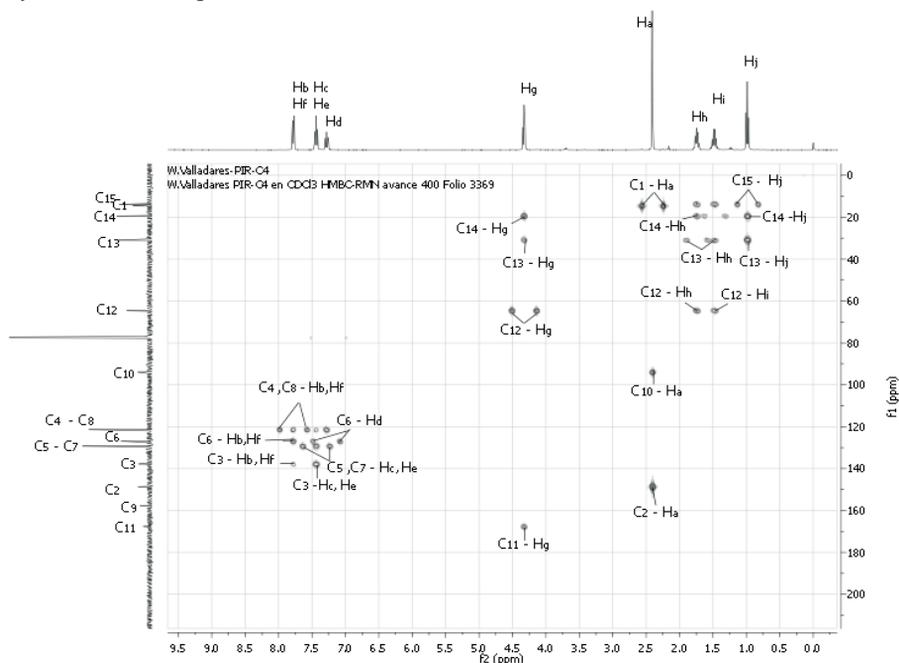


Figura 5. Mapa de contorno correspondiente al experimento HMBC para el Pir-C4, con la interpretación de picos sobre él.

Ampliando la zona de los protones de H_b hasta H_d presentada en la figura 6, se observa que en la zona aromática el duplete correspondiente a los protones H_b y H_f se acoplan a los carbonos C₄ y C₈; además, se correlaciona a tres enlaces con el C₆ y a dos enlaces con el carbono C₃. Los protones H_c y H_e se acoplan a los C₅ y C₇ y se correlaciona a los carbonos C₄ y C₈ a dos enlaces al C₆ y a tres enlaces con el C₃. Finalmente, el protón H_d se acopla con C₆ y se correlaciona con el C₄ y C₈ a tres enlaces.

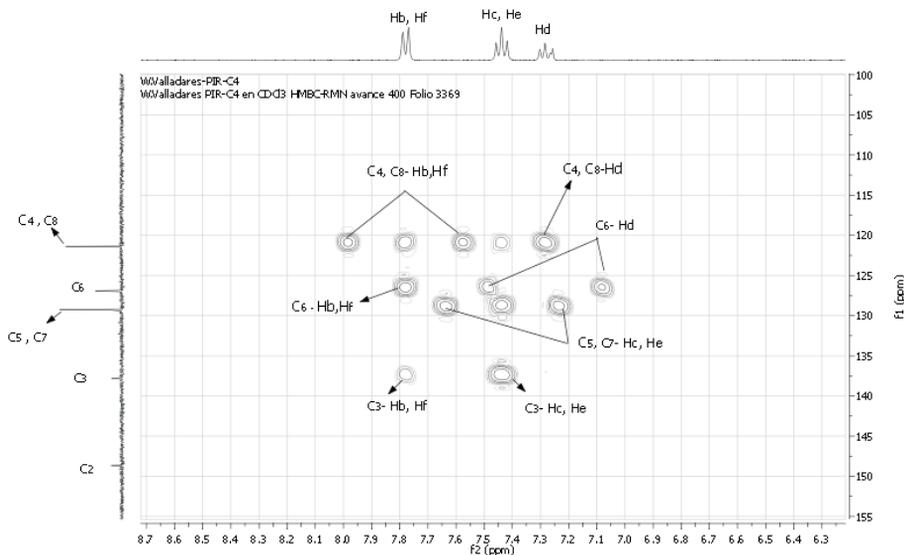


Figura 6. Mapa de contorno correspondiente a una ampliación parcial del experimento HMBC para el Pir-C4, con la interpretación de picos sobre él.

Postulamos la formación de un compuesto de coordinación de tipo $[UO_2(\text{Pir-C4})_2]$ cuya estructura podría esquematizarse de acuerdo con la figura 7.

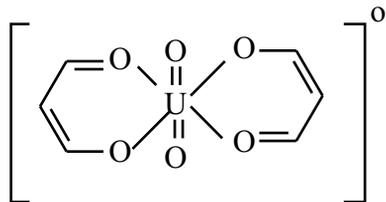


Figura 7. Modelo del compuesto complejo Uranilo-Pir-C4

El análisis químico elemental sugiere esta probable estructura, afianzada, además, por la espectroscopía IR donde se observa que en el espectro del $UO_2(\text{Pir-C4})_2$ aparece un pico débil correspondiente a la elongación simétrica y un pico fuerte

correspondiente a la elongación asimétrica del U=O, a los 832,9 cm⁻¹ y a los 931,4 cm⁻¹, respectivamente.

No se pudo realizar los espectros de RMN de H¹ ni de C¹³ por la baja solubilidad del complejo en los solventes disponibles.

CONCLUSIONES

Se sintetizó un derivado oxigenado de la 1-fenil-3-metil-2-pirazolín-5-ona, el que fue caracterizado mediante el análisis químico elemental, los espectros IR y de RMN mono y bidimensionales. Combinando los experimentos 1D y 2D para facilitar los procesos de asignación y determinación de las estructuras moleculares de los compuestos estudiados. Se sintetizó además un compuesto de coordinación al que se propuso una estructura tipo quelato, el que pudiera participar en reacciones con transferencia de electrones, por su especial configuración de tipo [UO₂-O₄]⁰

BIBLIOGRAFIA

1. S. Zamorano, J. Camus, A. Orellana, M. Osorio. Caracterización de bases de Schiff derivadas de 2-aminofenol, usando RMN 1D y 2D. *Rev. Soc. Quím. Perú.* (2010); 76 (2): 187-193.
2. S. Zamorano, J. Camus. Determinación de la Estructura de Bases de Schiff derivadas 2-aminofenol nitro y fluor sustituidas, utilizando la RMN 1D y 2D. *Rev. Soc. Quím. Perú.* (2011); 77 (1): 27-34.
3. E. Gaggelli, N. Gaggelli y G. Valensin. 2D NMR Methods for Structural Delineation of Copper(II) Complexes of Penicillin and Pilocarpine. *Metal-Based Drugs. Volume 1* (1994), Issue 2-3, Pages 279-287 doi:10.1155/MBD.1994.
4. V. Berrueta, J. Cáceres y L. Cerda. Seminario de Tesis para optar al título de Profesor de Química y al grado de Licenciado en Educación. Universidad de Playa Ancha; 2009. Valparaíso, Chile
5. P. González. Seminario de Tesis para optar al título de Profesor de Química y al grado de Licenciado en Educación. Universidad de Playa Ancha; 2009. Valparaíso, Chile
6. C. Soto. Seminario de Tesis para optar al título de Profesor de Química y al grado de Licenciado en Educación. Universidad de Playa Ancha; 2010. Valparaíso, Chile
7. A. Osorio. Seminario de Tesis para optar al título de Profesor de Química y al grado de Licenciado en Educación. Universidad de Playa Ancha; 2009. Valparaíso, Chile
8. H. Friebolin "Basic one-and two-dimensional NMR spectroscopy" Wiley-VCH, 1998
9. H. Dudderck, W. Dietrich y G. Toth "Elucidación Estructural por RMN" Ed. Springer. 3ra. ed. 2000.
10. A. Castillo, X. Muñoz. Seminario de Tesis para optar al título de Profesor de Química y al grado de Licenciado en Educación. Universidad de Playa Ancha; 1996. Valparaíso, Chile
11. J. Acuña, O. Vega. Seminario de Tesis para optar al título de Profesor de Química y al grado de Licenciado en Educación. Universidad de Playa Ancha; 1993. Valparaíso, Chile
12. R.C. Maurya *et. al.* Coordination chemistry of pyrazolone based Schiff bases relevant to uranyl sequestering agent: Synthesis, characterization and 3D molecular modeling of some octa-coordinate mono- and binuclear-dioxouranium(VI) complexes. *Arabian Journal of Chemistry*. Disponible online 5 February 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbbr.2011.03.031>

QUINOXALINAS COMO POTENCIALES AGENTES *ANTIMYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: UNA REVISIÓN

Mery Santivañez-Veliz ^{1*}, Elsa Moreno-Viguri, Antonio Monge y Silvia Pérez-Silanes

RESUMEN

La tuberculosis requiere nuevos tratamientos frente a su compleja resistencia como MDR-TB y XDR-TB. Las quinoxalinas presentan una amplia variedad de propiedades biológicas antichagásica, antimalarial, antileishmanial, antifungal, antimicobacteriana, antiviral, antitumoral, anticancerosa, analgésica, antiinflamatoria, antioxidante, antihipertensiva y antitrombótica. En esta revisión se muestra las propiedades y nuevas aproximaciones de derivados de 1,4-di-*N*-óxido de quinoxalina como potenciales agentes con actividad antimicobacterial.

QUINOXALINES AS POTENT *ANTIMYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AGENTS: A REVIEW

ABSTRACT

Tuberculosis requires of new treatments against their complex resistance as MDR-TB and XDR-TB. Quinoxalines present a wide variety of biological properties as antichagasic, antimalarial, antileishmanial, antifungal, antibacterial, antiviral, antitumor, anticancer, analgesic, antiinflammatory, antioxidant, antithrombotic and antihypertensive. This review shows the properties and new approaches for 1,4-di-*N*-oxide quinoxaline derivatives as potential antimycobacterial active agents.

Key words: Tuberculosis, quinoxalinas, di-*N*-óxido, chalconas.

INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad contagiosa por vía aérea, generalmente afecta a los pulmones pero también puede afectar a cualquier otro órgano del cuerpo. Está causada por especies del complejo *Mycobacterium* (*M.tuberculosis* (*M.tb.*), *M.africanum*, *M.bovis*, *M.bovis-Calmette-Guerin* (BCG), *M.microti*).¹ Para su tratamiento se requiere un régimen que incluye una combinación de medicamentos de primera y segunda línea.

Las estadísticas muestran que aproximadamente un tercio de la población expuesta a la TB pulmonar se infectan con la bacteria, pero sólo una de cada diez personas infectadas desarrollan la enfermedad activa durante su vida.^{1,2} De manera global, las tasas de incidencia se han mantenido estables entre 1990-2001.³ En el 2009, la TB generó 14 millones de casos prevalentes, 9,4 millones de casos nuevos y 1,7 millones de muertes en todo el mundo. Debido a los bajos niveles de detección y a las notificaciones incompletas se calcula que estas cifras deberían ser mayores. Aunque el número absoluto de incidencias aumenta debido al crecimiento poblacional, la tasa de incidencia disminuye lentamente.⁴

¹ Universidad de Navarra, Pamplona, España.
* msantivanez.l@alumni.unav.es

Entre el 2010-2011, se observó una ligera disminución en las 6 regiones de la OMS.³ En la actualidad, la TB sigue siendo un importante problema de salud mundial, siendo una de las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo, especialmente entre las personas co-infectadas por el VIH.³ Se ubica como la segunda causa principal de muerte dentro de las enfermedades infecciosas después del VIH.⁴

Según el último informe de la OMS, la incidencia estimada a nivel mundial en 2011 corresponde a 8,7 millones de nuevos casos, equivalentes a 125 casos por cada 100.000 habitantes y 1,4 millones de muertes, de los cuales 990.000 no asociadas a VIH y 430.000 asociadas a VIH.⁴ La mayor proporción de casos se encuentra en el sureste Asiático (59%); seguidos de África (26%), del Mediterráneo Oriental (7,7%); de Europa (4,3%) y América (3%).³ Los cinco países con la mayor incidencia son: India, China, Sudáfrica, Indonesia y Pakistán. Siendo India y China el 26% y el 12% respectivamente y en conjunto suman el 40% de los casos de TB a nivel mundial. Mientras el 60% restante se encuentra distribuido entre el sureste Asiático y el Pacífico occidental.³

De manera preocupante, a finales del 2011 se ha reportado en 84 países por lo menos un paciente con XDR-TB, incluidos España y Perú.³ En América, cada año, mueren alrededor de 23.000 personas a causa de la TB y se contagian 270.000, incluyendo 44.000 niños. Estas cifras son un avance si se considera que desde 1990, se ha reducido en 60% el número de casos y en dos tercios el número de muertes. Según la OPS, los países con mayor incidencia de la enfermedad son Haití, Surinam, Bolivia, Guyana y Perú, reportando en el año 2010 de 106 a 230 casos por cada 100.000 habitantes. Canadá, Cuba y Estados Unidos son los de menor incidencia, con menos de 10 casos por cada 100.000 habitantes.

Con la finalidad de erradicar la TB y disminuir el riesgo de muerte de unos 10 millones de personas, se ha elaborado estrategias de control epidemiológico (tabla 1).

Tabla 1. Estrategias para el control epidemiológico

| Fecha | Organización | Objetivo y/o Actividad | Logros y/o estatus |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1993 | OMS | Puesta en marcha de la Estrategia DOTS (Tratamiento Directamente Observado de Corto Curso) | <ul style="list-style-type: none"> • Comprende el diagnóstico, tratamiento, sistema de registro de casos, resultados de tratamiento en los programas nacionales y compromiso político.^{3,5} • En una década, casi todos los países adoptaron la estrategia y el progreso fue considerable. • Las tasas de éxito terapéutico alcanzaron el 85% y las tasas de prevalencia y mortalidad se redujeron a la mitad en comparación con sus niveles de 1990. |
| 2000 | Creación de la Stop TB Partnership | Eliminar la TB como problema de salud pública. | <ul style="list-style-type: none"> • Puesta en marcha de 2 planes correspondientes a los periodos 2001-2005 y 2006-2015.^{3,5} • El componente de I+D de la Parte II del Plan abarca investigación fundamental y operativa, nuevos diagnósticos, medicamentos y vacunas.⁵ |
| 2009 | Movimiento de investigación sobre la TB en alianza con la OMS | Eliminar la TB como problema de salud pública mundial para el 2050. ⁴ | <ul style="list-style-type: none"> • Elaboran un plan de trabajo integral para asegurar el progreso y ampliar la investigación de la TB. |
| 2010 | Stop TB Partnership, el Programa de TB de la OMS y el Fondo Mundial de Lucha contra el SIDA, la TB y la Malaria. | Identificar las áreas que faciliten la aplicación de las actividades de control de TB. ⁶ Maximizar el impacto de las inversiones y comprometer a los países a destinar donaciones. ⁶ | <ul style="list-style-type: none"> • La estrategia del Fondo Mundial para el período 2012-2016 es aumentar la cobertura de la investigación. • Desde el año 2006 se ha triplicado el número de organizaciones que se han comprometido a trabajar juntas. • Queda un largo camino para llegar al objetivo del Plan para el año 2015.⁵ |

Los países miembros de la OPS se han propuesto el objetivo de eliminar la TB de la región para el 2050.⁷ Para esto se necesitaría una tasa de disminución aproximada de 16% por año. Se debería combinar las intervenciones que mejoren el diagnóstico, prevención de la infección con una vacuna pre-exposición, reducción de los factores de riesgo y mejorar la comprensión de la epidemiología con el fin de facilitar las actividades de control.⁴

La detección precoz de la resistencia a los fármacos antituberculosos sería esencial para el correcto control de la MDR-TB.^{8,9} El conocimiento de los mecanismos de resistencia permitiría desarrollar técnicas moleculares para su detección.¹⁰ Se conoce los genes involucrados con la resistencia de *M.tb.* a los fármacos anti-TB y algunos mecanismos de acción han sido descubiertos.¹¹

La falta de capacidad de diagnóstico ha sido una barrera importante en la respuesta eficaz y en la rapidez de la detección. Cuando la MDR-TB se encuentra asociada al VIH es aún más grave porque sólo se detecta el 7% de la carga mundial estimada y todavía en menor fracción para los casos de XDR-TB.¹ En las Nuevas Tendencias Diagnósticas, el objetivo principal es aumentar la detección de casos, siendo tarea prioritaria la innovación en las pruebas diagnósticas que permitan predecir la progresión de la TB y su clasificación.^{4,5} La OMS en el año 2010, aprobó el sistema Xpert MTB/RIF.³ Es un sistema automatizado en tiempo real de la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos. Permite diagnosticar la TB y la resistencia a RIF en 100 minutos, frente a los 3 meses que toman los exámenes actuales; ofreciendo una mejora drástica del diagnóstico de la TB activa y la MDR-TB.^{6,12}

La eficacia del tratamiento farmacológico depende de la dosificación y del tiempo. Se justifica con el hecho de que a dosis sub-terapéuticas se favorece la aparición de resistencias y a dosis elevadas se puede producir mayores efectos secundarios.¹³

El paciente puede tener diversas poblaciones bacilares, intra o extracelular y con diferente actividad metabólica. *M.tb.* tiene la capacidad de entrar en períodos de latencia aún al tener actividad metabólica limitada, dificultando la acción de los antimicrobianos.¹⁴

En el tratamiento estándar se utiliza los fármacos de primera línea, siendo los bactericidas: la INH, RIF y Pirazinamida (PZA) y los bacteriostáticos: el Etambutol (ETB) y Estreptomina (STR).^{15,16} La MDR-TB se produce cuando una cepa de *M.tb.* es resistente a la INH y a la RIF. Se recurre a una combinación de fármacos de segunda línea como las tioamidas, clicloserina, fluoroquinolonas, péptidos cíclicos, aminoglucósidos y el ácido-p-amino salicílico (PAS). La XDR-TB es la forma de TB multi-resistente más difícil de tratar; se produce cuando una cepa de *M.tb.*, además de ser resistente a INH y RIF, es resistente también a los fármacos de la segunda línea y al menos a 1 de los 3 medicamentos inyectables (amikacina, kanamicina o capreomicina). Se recurre a un tratamiento combinado amplio que complica enormemente la terapia.¹⁷

Los objetivos principales de las Nuevas tendencias terapéuticas son el desarrollo de nuevos fármacos activos frente a las cepas resistentes, que permitan regímenes de tratamiento más cortos y con menos efectos secundarios.⁴

El TB Alliance se creó en el 2000 para avanzar en el descubrimiento de prometedores candidatos a nuevos fármacos anti-TB. En la actualidad, cuenta con más de 20 proyectos en su cartera con el objetivo de disminuir el tiempo de tratamiento de 2 años a 6 meses, hasta conseguir algún tratamiento de 1 semana. Se encuentran en fase clínica 3 candidatos a fármaco y un régimen de tratamiento multi-fármaco con moxifloxacino. Comparado con el estándar, el tratamiento con moxifloxacino pretende reducir en un 33% la duración del tratamiento actual, con una administración menor a 2 semanas, al igual que cualquier tratamiento antibiótico.¹⁸

Tiene también 2 ensayos de tratamiento Combinado: El NC-003 en fase 2A, en NC-002 en fase 2B y el RemoxTB en fase 3.¹⁹ En diciembre del 2012, la FDA aprobó Sirturo™ tabletas (figura 3) para casos de MDR-TB con una duración aproximada de 6 meses de tratamiento.²⁰ Comercializada por Janssen Pharmaceutical, una compañía de Johnson & Johnson.²¹

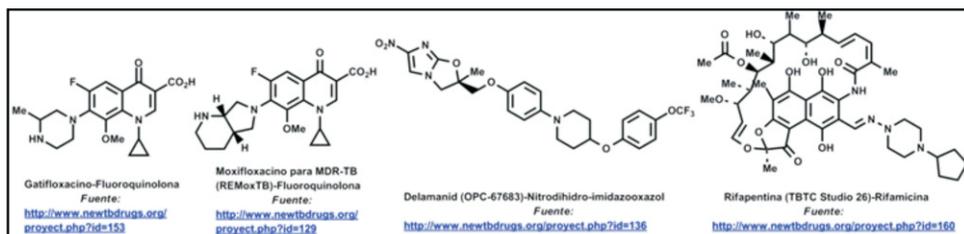


Figura 1: Candidatos a Fármacos que se encuentran en Ensayo Clínico Fase III

Hipótesis inicial

Químicamente, la quinoxalina es un biciclo aromático que presenta 2 átomos de nitrógeno en posición 1 y 4. Se describe como un bioisómero de quinolina, naftaleno o algún otro anillo aromático que incluya la pirazina o piridina^{13,22} (figura 2).

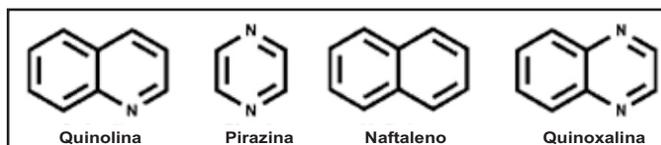


Figura 2.: Estructura del anillo de quinoxalina y sus bioisómeros

La INH y PZA, utilizadas en la actualidad para el tratamiento de la TB, incluyen en su estructura anillos de piridina y pirazina, respectivamente. Considerando factores estéricos y electrónicos, la quinoxalina es una bencilpirazina cuya estructura es similar a INH y PZA. Existen otros compuestos con actividad antibacteriana conocida, como ciprofloxacino (figura 3), obtenido como producto de la oxidación de la quinolina. La quinolina es otro conocido bioisómero del anillo de quinoxalina y la estructura heterocíclica es el scaffold de las fluoroquinolonas.²³ Otro derivado de quinolina es el compuesto TMC207 (Bedaquilina), recientemente aprobado por la FDA, como Sirturo™ tabletas (figura 3).

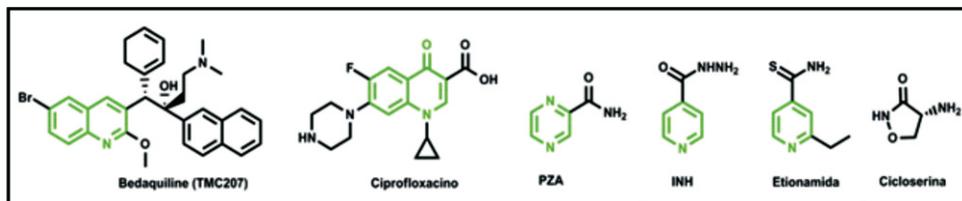


Figura 3: Medicamentos y Candidatos a Medicamentos antituberculosos

Actividad biológica de las quinoxalinas:

Diversas son las actividades biológicas que presentan los derivados de quinoxalina. Como la actividad antimicrobacterial²⁶⁻²⁸, anti-chagásica²⁹⁻³³, antimalarial³⁴⁻³⁶ y antileishmanial³⁷, que pertenecen al subgrupo de enfermedades debidas a protozoos. Otras son las actividades antifungal,²⁶ antibacterial³⁸ y antiviral.³⁹⁻⁴¹ En cuanto a la clasificación correspondiente a neoplasmas, se encuentran las actividades antitumoral⁴²⁻⁴⁴ y anticancerosa^{44,45} que están relacionadas con la inhibición selectiva de células hipóxicas. Formando parte del grupo de enfermedades del sistema nervioso central y de los órganos sensoriales, se encuentran, la³² actividad analgésica^{46,47} anti-inflamatoria y antioxidante.^{48,49} Finalmente, han mostrado también actividad antihipertensiva^{50,51} y antitrombótica^{52,53} que son clasificadas como enfermedades del sistema circulatorio.

Derivados de quinoxalina como agentes antituberculosos:

La Unidad de I+D de Medicamentos de la Universidad de Navarra (UN), cuenta con una línea de investigación que trabaja desde hace décadas en el desarrollo y síntesis de nuevos derivados de quinoxalina, con potencial actividad antituberculosa (anti-TB). En esta revisión se presenta una descripción de los aportes que el equipo del Dr. Monge ha realizado a la comunidad científica en cuanto a la actividad anti-TB de las quinoxalinas. La experiencia del grupo se centra en la variedad de series obtenidas, derivadas de las modificaciones realizadas en las posiciones R₂, R₃, R₆ y/o R₇ de la quinoxalina 1,4-di-N-óxido. Estas posiciones son consideradas como influyentes en la actividad biológica (figura 4).

En la posición R₂, el grupo ha trabajado, principalmente con derivados carbonitrilo, amida, cetona y éster. Los grupos estudiados en la posición R₃ son entre otros, metilo, amina, piperazina, trifluorometilo y fenilo. Finalmente, en las posiciones R₆ y R₇, en las cuales se han realizado las sustituciones de los hidrógenos por flúor, cloro, metilo, trifluorometilo y metoxilo. Estas modificaciones estructurales han permitido obtener una gran variedad de compuestos que ha facilitado un amplio análisis de la relación estructura-actividad (SAR).

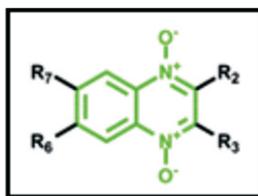


Figura 4. Posiciones influyentes en el anillo de quinoxalina 1,4-di-N-óxido

Las primeras publicaciones del grupo sobre las quinoxalinas como agentes anti-TB se realizaron en la década de los años 90. En estos primeros ensayos, solamente las quinoxalinas 2-carbonitrilo 1,4-di-*N*-óxido presentaron actividad anti-TB al ser comparadas con sus análogos reducidos.⁵⁴ De este modo se confirma la importancia de los grupos 1,4-di-*N*-óxido en el anillo de quinoxalina, como un requerimiento estructural imprescindible para la actividad antimicobacteriana⁵⁴⁻⁵⁶ (figura 4). El grupo de Carta hizo lo mismo con derivados de quinoxalina-2-ona^{28,57} Estudios adicionales realizados por nuestro grupo confirmaron la importancia de la presencia de los *N*-óxido en las diferentes propiedades biológicas, porque su ausencia, lleva a la pérdida de la actividad antimicobacteriana.^{56,58}

A principios de la década del 2000, se obtuvo resultados positivos en diversas series de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido, destacando por sus buenos resultados de actividad los 2 compuestos de la figura 5. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que los derivados de quinoxalina-2-carbonitrilo parecían ser bastante tóxicos⁵⁶, proponiéndose entonces la sustitución del grupo carbonitrilo por un grupo carboxamida⁵⁹, cetona⁶⁰ o carboxilato.⁶¹ Así, se sintetizaron 31 nuevos derivados 3-metilquinoxalina-2-carboxamida 1,4-di-*N*-óxido, encontrándose 3 compuestos con gran selectividad (figura 6).

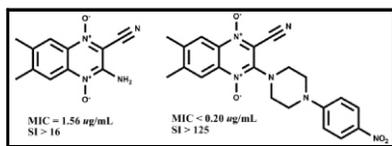


Figura 5.: Derivados más potentes de la serie metil-*N*-Quinoxalinas 2-carbonitrilo 1,4-di-*N*-óxido

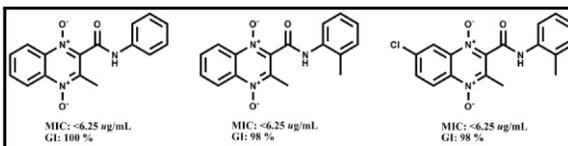


Figura 6.: Derivados más interesantes de la serie 3-fenil-Quinoxalina 2-carboxamida 1,4-di-*N*-óxido

En el mismo año, Jaso et al., sintetizaron 27 derivados de 2-acetil-3-metil-quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido, de los cuales 4 compuestos presentaron actividad anti-TB, buena selectividad y baja citotoxicidad. Siendo los más potentes los que están representados en la figura 7. Por el contrario, los compuestos 2-acetil-3-(4-fenilpiperazin-1-il) metilquinoxalina no mostraron ninguna actividad.⁶⁰

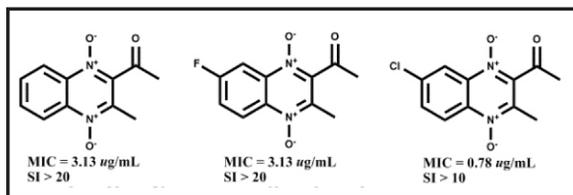


Figura 7.: Derivados más activos de la serie 2-acetil-3-metil-quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido

En el 2005, Jaso et al., sintetizaron 29 derivados de quinoxalin-2-carboxilato 1,4-di-*N*-dióxido con diferentes sustituyentes en R_2 : metilo, etilo, bencilo y ter-butilo y en la posición R_3 : 2-etoxi, 2-oxoetilo y metilo. Estos derivados permitieron concluir que la actividad anti-TB

depende principalmente de los sustituyentes en el grupo carboxilato, de la posición R₂ y mejora en el siguiente orden: bencilo > etilo > 2-metoxietilo > alilo > ter-butilo (figura 8).

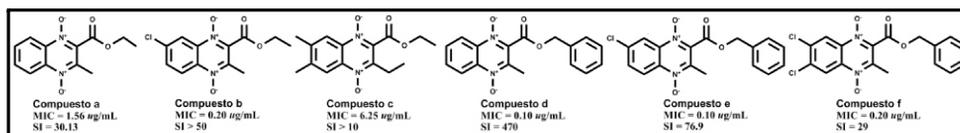


Figura 8.: Derivados etil y bencil 3-metilquinoxalina 2-carboxilato 1,4-di-*N*-óxido

En el 2008, debido a los prometedores resultados se profundizó en la evaluación biológica del derivado etil-7-cloro-3-metilquinoxalin-2-carboxilato 1,4-di-*N*-óxido, incluyendo ensayos *in vivo* y frente a otras cepas de *M.tb.* (Compuesto b, figura 8) Los ensayos mostraron resultados alentadores, tal como buena actividad en ratones, vía oral y también actividad frente a *Mycobacterium bovis* PA-824 resistente. Finalmente, demostró ser muy activo frente a bacterias no replicantes, adaptadas a condiciones de poco oxígeno destacando como compuesto líder en la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la TB.⁶² En el mismo año Villar et al. amplía el estudio biológico de 10 derivados. Se evaluó la actividad frente a cepas resistentes a MDR-TB, la dosis máxima tolerada, la biodisponibilidad oral y la eficacia *in vivo* en ratones. Este estudio mostró el carácter bactericida del compuesto 2-acetil-3-metil-quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido con el cloro en la posición R7, considerándolo como posible candidato para un tratamiento corto.⁶³

En el 2008, el grupo de Dinorah et al., continúan con sus estudios de derivados de quinoxalinas asociadas a complejos metálicos, como el hierro.⁶⁴ Los nuevos complejos mostraron mayor actividad inhibitora *in vitro* sobre el crecimiento de *M.tb.* cepa H³⁷Rv que los medicamentos de "segunda línea", así como una baja citotoxicidad inespecífica en células eucariotas.⁶⁵

En el mismo año, se cuentan con 2 estudios claves en el grupo, por un lado el de Moreno *et al.*, que sintetizan 43 nuevos derivados de quinoxalina-2-carboxamida 1,4-di-*N*-óxido, donde los derivados de 3-metilquinoxalina-2-carboxamida 1,4-di-*N*-óxido mostraron buena actividad *in vitro*.

Por otro lado, con los estudios realizados por Ancizu et al., que sintetizan 36 nuevos derivados 1,4-di-*N*-óxido-3-metilquinoxalina-2-carboxamida, donde 34 de estos compuestos mostraron una inhibición al 90%, siendo el compuesto más activo el que se muestra en la figura 9.¹³ Ambos estudios ayudan a proporcionar conclusiones de estructura-actividad:

En posición R₂, pequeñas modificaciones pueden afectar seriamente la actividad:

- La longitud de la cadena alifática entre el grupo carboxamida y el aromático: debe ser la de un grupo metileno.^{66, 67} Mientras se hace más larga, aumenta la citotoxicidad.
- En cuanto al sistema aromático: es mejor un benceno no-sustituido, porque no afecta negativamente la actividad antituberculosa. La inserción de un *p*-sustituyente, ya sean grupos aceptores de electrones (cloro, bromo trifluorometilo) o grupos donadores de electrones (metilo) no mejora la actividad antituberculosa; disminuye o aumenta la citotoxicidad del compuesto.^{27, 66}
- Se vio que sustituyentes como bifenil, benzodioxol no mejoran la actividad anti-TB.⁶⁶

En posición R3, la presencia de un metilo es indispensable y se descarta el fenilo o cualquier otro aromático.^{36,62,63,66,68}

En posición R6/R7, se puede decir que la inserción de un resto electroatrayente, aumenta la actividad antituberculosa, especialmente si es un átomo de cloro.⁶⁶

- La presencia de un grupo donador de electrones, reduce la actividad.⁶⁷
- Se considera también que se mejora el efecto si ambas posiciones se encuentran sustituidas por un halógeno como Cl o F.
- Finalmente, mediante estudios de electroquímica, se sugiere una posible relación entre el potencial de reducción y la actividad anti-TB como parte del mecanismo de acción.⁶⁹

En conclusión, la potencia, selectividad y baja citotoxicidad de estos compuestos los convierte en nuevos líderes para sintetizar nuevos derivados con mejor actividad.^{66,67}

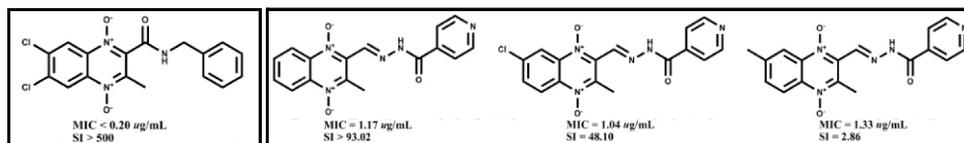


Figura 9: Compuesto 2-(bencilcarboxamida) 6,7-dicloro-3-metilquinoxalina 1,4-*N*-dióxido

Figura 10: 1,4-di-*N*-óxido-quinoxalina-2-il-metilen ácido isonicotínico derivados de hidrazida

Finalmente, también en el año 2010, Torres et al., con el objetivo de identificar nuevos candidatos a fármacos anti-TB, aplican una nueva estrategia de diseño. Se basa en la hibridación molecular, combinando restos farmacofóricos de diferentes sustancias bioactivas para producir un compuesto híbrido con una afinidad (perfil de selectividad modificado) y eficacia mejorada (reduciendo los efectos adversos). Aplicando esta estrategia, se sintetizan 7 compuestos 1,4-di-*N*-óxido-quinoxalina-2-il-metilen ácido isonicotínico, derivados de hidrazida, que presentan diferentes sustituyentes en posiciones R₆/R₇ (figura 10). Con estos resultados, se concluye que en estos derivados, los sustituyentes en R₆/R₇ no parecen ser decisivos para la actividad antimicobacteriana, porque tanto el compuesto sustituido como el no-sustituido, ya sea por un grupo donador o un grupo aceptor de electrones mostraron alta actividad.⁷⁰

Finalmente, se puede concluir que hasta el 2011, el grupo ha sintetizado una gran cantidad de derivados de quinoxalinas y se continúa con el rediseño de nuevos derivados para la obtención de nuevos candidatos, dirigida a tener actividad anti-TB, considerando modificaciones en las posiciones R₂, R₃, R₆ y R₇.

AGRADECIMIENTOS

Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID) de EE.UU. Contrato N°. HHSN272201100012I.

FIMA (Fundación para la Investigación Médica Aplicada) de la Universidad de Navarra.

Beca Talento Internacional del Gobierno de Navarra.

Beca de doctorado con el apoyo de la "Asociación de Amigos" de la Universidad de Navarra.

Dr. Fernando Quevedo y al Dr. José Juárez, por su continuo apoyo y orientación.

REFERENCIAS

1. Martínez González, M.; Seguí Gómez, M.; Carlos Chilleron, S., *Compendio de Salud Pública*. 2da. Edición ed.; 2011.
2. NIAID National Institute of Allergy and Infectious Diseases. <http://www.niaid.nih.gov/topics/tuberculosis/Understanding/WhatIsTB/Pages/TBdefinitions.aspx> (2012).
3. WHO *Global Tuberculosis Report 2012.*; World Health Organization: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html, 2012.
4. Ditiu, L.; Raviglione, M. C. *An International Roadmap for Tuberculosis Research: Towards a world free of tuberculosis*; World Health Organization Stop TB Partnership: 2011.
5. Espinal, M.; Raviglione, M. *The Global Plan to Stop TB 2011–2015*; Stop TB Partnership WHO Stop TB Department: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html, 2011.
6. Ditiu, L.; Atun, R. *Priorities in Operational Research to improve Tuberculosis Care and Control*; WHO Stop TB Partnership The Global Fund To Fight AIDS. Tuberculosis and Malaria 2011.
7. ONU Centro de Noticias de la ONU. <http://www.un.org/spanish/News/fullstorynews.asp?newsID=23019> (2012).
8. Heym, B.; Honore, N.; Truffot-Pernot, C.; Banerjee, A.; Schurra, C.; Jacobs, W. R., Jr.; van Embden, J. D.; Grosset, J. H.; Cole, S. T., Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet* **1994**; *344*: 293-8.
9. Telzak, E. E.; Sepkowitz, K.; Alpert, P.; Mannheimer, S.; Medard, F.; el-Sadr, W.; Blum, S.; Gagliardi, A.; Salomon, N.; Turett, G., Multidrug-resistant tuberculosis in patients without HIV infection. *The New England journal of medicine* **1995**; *333*: 907-11.
10. Torres, M. J.; Criado, A.; Palomares, J. C.; Aznar, J., Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* **2000**; *38*: 3194-9.
11. Coll, P., [Active drugs against *Mycobacterium tuberculosis*]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* **2009**; *27*: 474-80.
12. CINU Centro de Información de las Naciones Unidas. <http://www.cinu.mx/noticias/mundial/tuberculosis-oms-respalda-prue/> (2012).
13. Moreno, E. Design, Synthesis and Study of Quinixaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives against tuberculosis. Universidad de Navarra, Universidad de Navarra, 2011.
14. Wayne, L. G., Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **1994**; *13*: 908-14.
15. Gillespie, S. H., Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2002**; *46*: 267-74.
16. Domínguez-Castellano A; Del Arco A; Canueto-Quintero J; Rivero-Roman A; Kindelan R; Díez-García, F. Guía de práctica clínica de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI) sobre el tratamiento de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. **2007**; *25*: 519–34.
17. NIAID National Institute of Allergy and Infectious Diseases <http://www.niaid.nih.gov/topics/tuberculosis/Understanding/WhatIsTB/ScientificIllustrations/Pages/extensivelyDrugResistantIllustration.aspx> (2012).

18. Alliance, T. Global Alliance for TB Drug Development. <http://www.tballiance.org/why/economic-impact.php> (2012).
19. Alliance, T. Development Regimens. http://www.tballiance.org/downloads/mediakit/TBA_Pipeline_May_2013.pdf
<http://www.tballiance.org/pipeline/developing-regimens.php> (2013).
20. FDA Food and Drug Administration http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Label_ApprovalHistory#labelinfo (2013),
21. Chrispin Kambili, M. D. Bedaquiline TMC207 - Clinical Development Program An Update. Janssen Pharmaceutical Companies of Johnson & Johnson. http://www.newtdrugs.org/meetings/annual2012/downloads/presentations/5-Janssen_C-Kambili-WGND2012.pdf (November 2012).
22. Lima, L. M.; Barreiro, E. J., Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Current medicinal chemistry* **2005**; *12*: 23-49.
23. Sacchetti, J. C.; Rubin, E. J.; Freundlich, J. S., Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature reviews. Microbiology* **2008**; *6*: 41-52.
24. Andries, K.; Verhasselt, P.; Guillemont, J.; Gohlmann, H. W.; Neefs, J. M.; Winkler, H.; Van Gestel, J.; Timmerman, P.; Zhu, M.; Lee, E.; Williams, P.; de Chaffoy, D.; Huitric, E.; Hoffner, S.; Cambau, E.; Truffot-Pernot, C.; Lounis, N.; Jarlier, V., A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **2005**; *307*: 223-7.
25. OMS Clasificación Internacional de las Enfermedades. <http://www.iqb.es/patologia/toc01.htm>
26. Carta, A.; Piras, S.; Loriga, G.; Paglietti, G., Chemistry, biological properties and SAR analysis of quinoxalines. *Mini reviews in medicinal chemistry* **2006**; *6*: 1179-200.
27. Carta, A.; Loriga, M.; Paglietti, G.; Mattana, A.; Fiori, P. L.; Mollicotti, P.; Sechi, L.; Zanetti, S., Synthesis, anti-mycobacterial, anti-trichomonas and anti-candida in vitro activities of 2-substituted-6,7-difluoro-3-methylquinoxaline 1,4-dioxides. *European journal of medicinal chemistry* **2004**; *39*: 195-203.
28. Sanna, P.; Carta, A.; Loriga, M.; Zanetti, S.; Sechi, L., Synthesis of 3,6,7-substituted-quinoxalin-2-ones for evaluation of antimicrobial and anticancer activity. Part 2. *Farmaco* **1999**; *54*: 161-8.
29. Vicente, E.; Duchowicz, P. R.; Benitez, D.; Castro, E. A.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.; Monge, A., Anti-T. cruzi activities and QSAR studies of 3-arylquinoxaline-2-carbonitrile di-N-oxides. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2010**; *20*: 4831-5.
30. Urquiola, C.; Vieites, M.; Aguirre, G.; Marin, A.; Solano, B.; Arrambide, G.; Noblia, P.; Lavaggi, M. L.; Torre, M. H.; Gonzalez, M.; Monge, A.; Gambino, D.; Cerecetto, H., Improving anti-trypanosomal activity of 3-aminoquinoxaline-2-carbonitrile N1,N4-dioxide derivatives by complexation with vanadium. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2006**; *14*: 5503-9.
31. Aguirre, G.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; Gonzalez, M.; Alfaro, M. E.; Jaso, A.; Zarranz, B.; Ortega, M. A.; Aldana, I.; Monge-Vega, A., Quinoxaline N,N'-dioxide derivatives and related compounds as growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. Structure-activity relationships. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2004**; *14*: 3835-9.
32. Benitez, D.; Cabrera, M.; Hernandez, P.; Boiani, L.; Lavaggi, M. L.; Di Maio, R.; Yaluff, G.; Serna, E.; Torres, S.; Ferreira, M. E.; Vera de Bilbao, N.; Torres, E.; Perez-Silanes, S.; Solano, B.; Moreno, E.; Aldana, I.; Lopez de Cerain, A.; Cerecetto, H.; Gonzalez, M.;

- Monge, A., 3-Trifluoromethylquinoxaline N,N'-dioxides as anti-trypanosomatid agents. Identification of optimal anti-T. cruzi agents and mechanism of action studies. *Journal of medicinal chemistry* **2011**; *54*: 3624-36.
33. Torres, E.; Moreno-Viguri, E.; Galiano, S.; Devarapally, G.; Crawford, P. W.; Azqueta, A.; Arbillaga, L.; Varela, J.; Birriel, E.; Di Maio, R.; Cerecetto, H.; González, M.; Aldana, I.; Monge, A.; Pérez-Silanes, S., Novel quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives as new potential antichagasic agents. *European journal of medicinal chemistry* **2013**; *66*: 324-334.
 34. Marin, A.; Moreira Lima, L.; Solano, B.; Vicente, E.; Perez Silanes, S.; Maurel, S.; Sauvain, M.; Aldana, I.; Monge, A.; Deharo, E., Antiplasmodial structure-activity relationship of 3-trifluoromethyl-2-arylcarbonylquinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives. *Experimental parasitology* **2008**; *118*: 25-31.
 35. Vicente, E.; Lima, L. M.; Bongard, E.; Charnaud, S.; Villar, R.; Solano, B.; Burguete, A.; Pérez-Silanes, S.; Aldana, I.; Vivas, L.; Monge, A., Synthesis and structure-activity relationship of 3-phenylquinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives as antimalarial agents. *European journal of medicinal chemistry* **2008**; *43*: 1903-10.
 36. Zarranz, B.; Jaso, A.; Aldana, I.; Monge, A.; Maurel, S.; Deharo, E.; Jullian, V.; Sauvain, M., Synthesis and antimalarial activity of new 3-arylquinoxaline-2-carbonitrile derivatives. *Arzneimittel-Forschung* **2005**; *55*: 754-61.
 37. Burguete, A.; Estevez, Y.; Castillo, D.; Gonzalez, G.; Villar, R.; Solano, B.; Vicente, E.; Silanes, S. P.; Aldana, I.; Monge, A.; Sauvain, M.; Deharo, E., Anti-leishmanial and structure-activity relationship of ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-N-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **2008**; *103*: 778-80.
 38. Asghari, S.; Qandalee, M.; Naderi, Z.; Sobhaninia, Z., One-pot synthesis of 4-arylquinolines from aromatic aminoketones and vinylphosphonium salts. *Molecular diversity* **2010**; *14*: 569-74.
 39. Kleim, J. P.; Winters, M.; Dunkler, A.; Suarez, J. R.; Riess, G.; Winkler, I.; Balzarini, J.; Oette, D.; Merigan, T. C., Antiviral activity of the human immunodeficiency virus type 1-specific nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor HBV 097 alone and in combination with zidovudine in a phase II study. HBV 097/2001 Study Group. *The Journal of infectious diseases* **1999**; *179*: 709-13.
 40. Kleim, J. P.; Rosner, M.; Winkler, I.; Paessens, A.; Kirsch, R.; Hsiou, Y.; Arnold, E.; Riess, G., Selective pressure of a quinoxaline nonnucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT) on HIV-1 replication results in the emergence of nucleoside RT-inhibitor-specific (RT Leu-74-->Val or Ile and Val-75-->Leu or Ile) HIV-1 mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**; *93*: 34-8.
 41. Kleim, J. P.; Bender, R.; Billhardt, U. M.; Meichsner, C.; Riess, G.; Rosner, M.; Winkler, I.; Paessens, A., Activity of a novel quinoxaline derivative against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and viral replication. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1993**; *37*: 1659-64.
 42. Junnotula, V.; Rajapakse, A.; Arbillaga, L.; de Cerain, A. L.; Solano, B.; Villar, R.; Monge, A.; Gates, K. S., *DNA strand cleaving properties and hypoxia-selective cytotoxicity of 7-chloro-2-thienylcarbonyl-3-trifluoromethylquinoxaline 1,4-dioxide*. 2010/04/08 ed.; 2010; *18*: 3125-32.
 43. Solano, B.; Junnotula, V.; Marin, A.; Villar, R.; Burguete, A.; Vicente, E.; Pérez-Silanes, S.; Aldana, I.; Monge, A.; Dutta, S.; Sarkar, U.; Gates, K. S., Synthesis and biological

- evaluation of new 2-arylcarbonyl-3-trifluoromethylquinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives and their reduced analogues. *Journal of medicinal chemistry* **2007**; *50*: 5485-92.
44. Zarranz, B.; Jaso, A.; Aldana, I.; Monge, A., Synthesis and anticancer activity evaluation of new 2-alkylcarbonyl and 2-benzoyl-3-trifluoromethyl-quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2004**; *12*: 3711-21.
 45. Alleca, S.; Corona, P.; Loriga, M.; Paglietti, G.; Loddo, R.; Mascia, V.; Busonera, B.; La Colla, P., Quinoxaline chemistry. Part 16. 4-substituted anilino and 4-substituted phenoxyethyl pyrrolo[1,2-a]quinoxalines and N-[4-(pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4-yl)amino and hydroxymethyl]benzoyl glutamates. Synthesis and evaluation of in vitro biological activity. *Farmaco* **2003**; *58*: 639-50.
 46. Gomtsyan, A.; Bayburt, E. K.; Schmidt, R. G.; Zheng, G. Z.; Perner, R. J.; Didomenico, S.; Koenig, J. R.; Turner, S.; Jinkerson, T.; Drizin, I.; Hannick, S. M.; Macri, B. S.; McDonald, H. A.; Honore, P.; Wismer, C. T.; Marsh, K. C.; Wetter, J.; Stewart, K. D.; Oie, T.; Jarvis, M. F.; Surowy, C. S.; Faltynek, C. R.; Lee, C. H., Novel transient receptor potential vanilloid 1 receptor antagonists for the treatment of pain: structure-activity relationships for ureas with quinoline, isoquinoline, quinazoline, phthalazine, quinoxaline, and cinnoline moieties. *Journal of medicinal chemistry* **2005**; *48*: 744-52.
 47. Ismail, M. M.; Ammar, Y. A.; Ibrahim, M. K.; El-Zahaby, H. S.; Mahmoud, S. S., Synthesis and pharmacological evaluation of novel quinoxalines as potential nonulcerogenic anti-inflammatory and analgesic agents. *Arzneimittel-Forschung* **2005**; *55*: 738-43.
 48. Burguete, A.; Pontiki, E.; Hadjipavlou-Litina, D.; Ancizu, S.; Villar, R.; Solano, B.; Moreno, E.; Torres, E.; Perez, S.; Aldana, I.; Monge, A., Synthesis and biological evaluation of new quinoxaline derivatives as antioxidant and anti-inflammatory agents. *Chemical biology & drug design* **2011**; *77*: 255-67.
 49. Burguete, A.; Pontiki, E.; Hadjipavlou-Litina, D.; Villar, R.; Vicente, E.; Solano, B.; Ancizu, S.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Monge, A., Synthesis and anti-inflammatory/antioxidant activities of some new ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-N-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives and of their 4,5-dihydro-(1H)-pyrazole analogues. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2007**; *17*: 6439-43.
 50. Foks, H.; Wisterowicz, K.; Nasal, A.; Damasiewicz, B.; Radwanska, A., Studies on quinoxaline derivatives. Synthesis of quinoxalylamino-1,3-diazacycloalkanes with potential hypotensive activity. *Acta poloniae pharmaceutica* **1999**; *56*: 201-6.
 51. Nunez, J. L.; Bambrick, L. L.; Krueger, B. K.; McCarthy, M. M., Prolongation and enhancement of gamma-aminobutyric acid receptor mediated excitation by chronic treatment with estradiol in developing rat hippocampal neurons. *The European journal of neuroscience* **2005**; *21*: 3251-61.
 52. Ries, U. J.; Priepke, H. W.; Huel, N. H.; Handschuh, S.; Mihm, G.; Stassen, J. M.; Wienen, W.; Nar, H., Heterocyclic thrombin inhibitors. Part 2: quinoxalinone derivatives as novel, potent antithrombotic agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2003**; *13*: 2297-302.
 53. Ries, U. J.; Priepke, H. W.; Huel, N. H.; Haaksm, E. E.; Stassen, J. M.; Wienen, W.; Nar, H., Heterocyclic thrombin inhibitors. Part 1: design and synthesis of amidino-phenoxy quinoline derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2003**; *13*: 2291-5.
 54. Ortega, M. A.; Sainz, Y.; Montoya, M. E.; Jaso, A.; Zarranz, B.; Aldana, I.; Monge, A., Anti-Mycobacterium tuberculosis agents derived from quinoxaline-2-carbonitrile and quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-di-N-oxide. *Arzneimittel-Forschung* **2002**; *52*: 113-9.

55. Sainz, Y.; Montoya, M. E.; Martínez-Crespo, F. J.; Ortega, M. A.; Lopez de Cerain, A.; Monge, A., New quinoxaline 1,4-di-N-oxides for treatment of tuberculosis. *Arzneimittel-Forschung* **1999**; *49*: 55-9.
56. Ortega, M. A.; Montoya, M. E.; Jaso, A.; Zarranz, B.; Tirapu, I.; Aldana, I.; Monge, A., Antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carbonitrile and quinoxaline-2-carbonitrile 1,4-di-N-oxide derivatives. *Die Pharmazie* **2001**; *56*: 205-7.
57. Carta, A.; Corona, P.; Loriga, M., Quinoxaline 1,4-dioxide: a versatile scaffold endowed with manifold activities. *Current medicinal chemistry* **2005**; *12*: 2259-72.
58. Boiani, M.; Cerecetto, H.; González, M.; Risso, M.; Olea-Azar, C.; Piro, O. E.; Castellano, E. E.; Lopez de Cerain, A.; Ezpeleta, O.; Monge-Vega, A., 1,2,5-Oxadiazole N-oxide derivatives as potential anti-cancer agents: synthesis and biological evaluation. Part IV. *European journal of medicinal chemistry* **2001**; *36*: 771-82.
59. Zarranz, B.; Jaso, A.; Aldana, I.; Monge, A., Synthesis and antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2003**; *11*: 2149-56.
60. Jaso, A.; Zarranz, B.; Aldana, I.; Monge, A., Synthesis of new 2-acetyl and 2-benzoyl quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents. *European journal of medicinal chemistry* **2003**; *38*: 791-800.
61. Jaso, A.; Zarranz, B.; Aldana, I.; Monge, A., Synthesis of new quinoxaline-2-carboxylate 1,4-dioxide derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents. *Journal of medicinal chemistry* **2005**; *48*: 2019-25.
62. Vicente, E.; Villar, R.; Burguete, A.; Solano, B.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Maddry, J. A.; Lenaerts, A. J.; Franzblau, S. G.; Cho, S. H.; Monge, A.; Goldman, R. C., Efficacy of quinoxaline-2-carboxylate 1,4-di-N-oxide derivatives in experimental tuberculosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2008**; *52*: 3321-6.
63. Villar, R.; Vicente, E.; Solano, B.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Maddry, J. A.; Lenaerts, A. J.; Franzblau, S. G.; Cho, S. H.; Monge, A.; Goldman, R. C., In vitro and in vivo antimycobacterial activities of ketone and amide derivatives of quinoxaline 1,4-di-N-oxide. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2008**; *62*: 547-54.
64. Tarallo, M. B.; Urquiola, C.; Monge, A.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q.; Torre, M. H.; Gambino, D., Novel iron complexes with quinoxaline N(1),N(4)-dioxide derivatives: synthesis, characterization and antimycobacterial activity. In *Metal Ions in Biology and Medicine, Vol 10*, Collery, P.; Maynard, I.; Theophanides, T.; Khassanova, L.; Collery, T., Eds. 2008; *10*: 867-872.
65. Tarallo, M. B.; Urquiola, C.; Monge, A.; Costa, B. P.; Ribeiro, R. R.; Costa-Filho, A. J.; Mercader, R. C.; Pavan, F. R.; Leite, C. Q.; Torre, M. H.; Gambino, D., Design of novel iron compounds as potential therapeutic agents against tuberculosis. *Journal of inorganic biochemistry* **2010**; *104*: 1164-70.
66. Moreno, E.; Ancizu, S.; Perez-Silanes, S.; Torres, E.; Aldana, I.; Monge, A., Synthesis and antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives. *European journal of medicinal chemistry* **2010**; *45*: 4418-26.
67. Ancizu, S.; Moreno, E.; Solano, B.; Villar, R.; Burguete, A.; Torres, E.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Monge, A., New 3-methylquinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**; *18*: 2713-9.
68. Vicente, E.; Perez-Silanes, S.; Lima, L. M.; Ancizu, S.; Burguete, A.; Solano, B.; Villar, R.; Aldana, I.; Monge, A., Selective activity against Mycobacterium tuberculosis of new quinoxaline 1,4-di-N-oxides. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2009**; *17*: 385-9.

69. Moreno, E.; Pérez-Silanes, S.; Gouravaram, S.; Macharam, A.; Ancizu, S.; Torres, E.; Aldana, I.; Monge, A.; Crawford, P. W., 1,4-Di-N-oxide quinoxaline-2-carboxamide: Cyclic voltammetry and relationship between electrochemical behavior, structure and anti-tuberculosis activity. *Electrochimica Acta* **2011**; *56*: 3270-3275.
70. Torres, E.; Moreno, E.; Ancizu, S.; Barea, C.; Galiano, S.; Aldana, I.; Monge, A.; Perez-Silanes, S., New 1,4-di-N-oxide-quinoxaline-2-ylmethylene isonicotinic acid hydrazide derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2011**; *21*: 3699-703.
71. Vicente, E.; Villar, R.; Perez-Silanes, S.; Aldana, I.; Goldman, R. C.; Mong, A., Quinoxaline 1,4-di-N-oxide and the potential for treating tuberculosis. *Infectious disorders drug targets* **2011**; *11*: 196-204.

INFORMACIONES

A. De la Sociedad Química

Condecoración

La Dra. Olga R. Lock Sing fue condecorada con la Medalla del Consejo Departamental de Lima del Colegio de Ingenieros del Perú, en reconocimiento a su destacada labor profesional, en cremonia habida el día 7 de junio del presente, durante los actos celebratorios de la Semana de la Ingeniería.

Felicitamos a la Dra. Lock por este merecido reconocimiento.

Conferencia de los “Jueves Científicos”

- Liberación controlada de cloroquina a través de micropartículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído” a cargo del MSc. Christian Jacinto Hernández, el día 14 de agosto del 2013.

II Curso de tópicos de Bioquímica

Se llevó a cabo los días sábados 10, 17 y 24 de agosto. El curso constó de 3 unidades, incluidos objetivos y contenidos teóricos por cada unidas. La exposición estuvo a cargo del Qu+imico Farmacéutico Mario Antonio Bolarte Arteaga, docente de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Alas Peruanas.

Simposio:

“Alimentos andinos, contribución al mundo”

Se llevó a cabo el 20 y 21 de setiembre del 2013 en el local institucional del Consejo Nacional del Colegio de Ingenieros del Perú, sito en Av. Arequipa 4947 – Miraflores, con la finalidad de resaltar el gran aporte nutricional que representan los cultivos andinos con la finalidad de promover su consumo.

El Comité organizador estuvo integrado por la Dra. Ana María Muñoz Jáuregui y Dra. Teresa Blanco Blasco de Alvarado Ortiz, Presidenta y Vicepresidenta respectivamente. Contó con el auspicio de Ajinomoto del Perú S.A., Coca Cola Servicios, Global Alimentos, CONCYTEC, etc.

Sensible pérdida:

Con profundo pesar comunicamos el sensible fallecimiento de:

- Ing. Quím. Dagoberto Sánchez Mantilla, Ex - Decano de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (1967-1969).
- Ing. Rafael Antezana Castro, profesor de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM, acaecido el día 19 de julio del 2013.
- Sra. Olga Sosa Cáceres de Otiniano, madre del Ing. Manuel Eduardo Otiniano Cáceres, socio de nuestra Institución, acaecida el 17 de agosto del 2013.

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

Socios Destacados

La Sociedad Química de Perú, expresa sus sinceras felicitaciones a los siguientes socios por su reciente elección y les desea éxitos en el desempeño de sus funciones:

Mg. Cesario Condorhuamán Ccorimanya, Decano de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM.

Dr. Julio Santiago Contreras, Directos de la Unidad de Post Grado de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM.

Mg. Manuel Otiniano Cáceres, Coordinador del Departamento Académico Operaciones Unitarios de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM.

Mg. Gloria Eva Tomás Chota, Directora del Instituto de Investigación de Ciencias Química, Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM.

Dr. Carlos Cabrera Carranza, Decano de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera Metalúrgica y Geográfica de la UNMSM.

Dr. Armando Yarlequé Chocas, Director de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

B. Otras informaciones

Presentación del Libro: Flavonoid Pharmacokinetics: Methods of Analysis, Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety and Toxicology

Se llevó a cabo la Ceremonia de presentación del Libro: “Flavonoid Pharmacokinetics: Methods of Analysis Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Toxicology”, de los autores Ph.D. Neal M. Davies y Ph.D. Jaime A. Yañez, el día lunes 16 de setiembre del 2013, en nuestro Auditorio Institucional.

Las palabras de bienvenida a este Evento a cargo del Dr. Mario Ceroni Galloso, Presidente de la Sociedad Química del Perú y los comentarios a cargo del Ph.D. Basil D. Roufogalis. Contó con la asistencia de reconocidas personalidades.

Edición gráfica:
ESERGRAF
Jr. Los Halcones 293
Bellavista - Callao
Telf.: 998-513-545
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. 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)



Cumple 80 años
(1933 - 2013)