

ISSN 1810-634X

REVISTA de la SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

REVISTA TRIMESTRAL

VOLUMEN 85 N° 2
ABRIL - JUNIO 2019



INSTITUCIÓN CIENTÍFICA FUNDADA EN 1933

LIMA, PERÚ

REVISTA
de la
SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ

(Rev Soc Quím Perú)

ISSN 1810 – 634X

Revista Trimestral

Comité Editor

Editor en Jefe : Ana Cecilia Valderrama Negrón

Miembros : Julio Santiago Contreras

Lisveth Flores Del Pino

Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

Comité Consultivo

Alarcón Cavero, Hugo

Univ. Nac. de Ingeniería, Perú

Caramantín Soriano, María

Universidad de Talca, Chile

Cedrón, Juan Carlos

Universidad de La Laguna, España

Ceroni Galloso, Mario

Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Perú

Calvo Buendía, Eduardo

Univ. Nac. de Ingeniería, Perú

Dávalos Prado, Juan

Consejo Sup. de Invest. Científica, España

Flores Del Pino, Lisveth

Univ. Agraria La Molina, Perú

Gamboa Fuentes, Nadia

Pontificia Universidad Católica del Perú

Gómez Valdez, Badhin

Univ. Católica de Santa María, Arequipa, Perú

Gonzáles Gil, Patricia

Pontificia Universidad Católica del Perú

Guzmán Duxtán, Aldo Javier

Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Perú

Kong, Maynard

Pontificia Universidad Católica del Perú

La Rosa Toro Gómez, Adolfo

Univ. Nac. de Ingeniería, Perú

Lock de Ugaz, Olga

Sociedad Química del Perú

Muñoz Jáuregui, Ana María

Univ. San Martín de Porres, Perú

Pannia Espósito, Breno

Universidad de Sao Paulo, Brasil

Páucar Cuba, Karin

Univ. Nac. de Ingeniería, Perú

Picasso Escobar, Gino

Univ. Nac. de Ingeniería, Perú

Quintana Cáceda, María

Univ. Nac. de Ingeniería, Perú

Rodríguez Best, Angélica

Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Perú

Romero Ramos, Celso

Instituto Butantan, Brasil

Rueda, Juan Carlos

Univ. Nac. de Ingeniería - Perú

Ruiz Quiroz, Julio

Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Perú

Santiago Contreras, Julio

Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Perú

Uribe, Carmen Luisa

Univ. Nac. de Ingeniería, Perú

Revista indizada en el **Chemical Abstracts**, **SciELO** y **Latindex**

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

Casilla Postal 14-0576 – Lima 14 Perú

Teléfono (511) 960 189 928

e-mail: 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 85

ABRIL - JUNIO 2019

N° 2

En el Perú: N° suelto S/.15

Suscripción anual: S/. 60.00

En el extranjero: Suscripción anual: \$50.00

SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ
CONSEJO DIRECTIVO
(marzo 2018 – marzo 2020)

Presidente	: MSc. Graciela Untiveros Bermúdez
Vice-Presidente	: Mg. Helmer Helí Lezama Vigo
Tesorero	: Dr. Juan Manuel Parreño Tipián
Secretaria	: Quím. Claudia Cecilia Villanueva Huerta
Director Administrativo	: Mg. Neptalí Ale Borja
Director Biblioteca	: Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
Vocales	: Ing. Richard Hernández Morán MSc. Christian Jacinto Hernández Mg. Lía Elis Concepción Gamarra Lic. Norma Cuizano Vargas Q.F. Mario Bolarte Arteaga Ing. Quím. Hernán Zapata Gamarra

Comisión de Economía y Finanzas

Presidenta: Ing. Quím. Flor de María Sosa Masgo

Comisión de Publicaciones

Presidenta: Dra. Ana Cecilia Valderrama Negrón

Comisión de Actuaciones Científicas

Presidenta: MSc. Luz Castañeda Pérez

**INSTITUCIONES Y EMPRESAS PROTECTORAS DE LA
SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ**

**UNIÓN DE CERVECERÍAS BACKUS Y JHONSTON S.A.A.
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA – UNMSM**

CONTENIDO
(Vol. 85 – N° 2 – 2019)

Editorial	127
Trabajos Originales	
- Evaluación de la calidad del destilado alcohólico de anís verde (<i>Pimpinella anisum</i> L.) obtenido por destilación fraccionada, por Clesez Tunqui Quispe, Alexia Pardo Figueroa Dianderas, Gustavo Tejada Flores e Ivette del Rosario Cjuro Farfán.	129
- Caracterización bioquímica, biológica y molecular del factor difusor presente en el veneno de la serpiente <i>Bothrops atrox</i> “jergón”, por Julio Delgadillo, Dan Vivas, Edith Rodríguez, Fanny Lazo, E.F. Sánchez y Armando Yarlequé.	141
- Eficiencia de la resina Lewatit Monoplus M 600 en la remoción de nitratos en aguas para consumo humano, por Tania E. Guerrero Vejarano y Oscar G. Anaya Fernández.	153
- Estudio de la biodegradación de residuos de aceite lubricante retenidos en bentonita usando el consorcio bacteriano oil eating microbes (<i>Rodhococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Bacillus</i>), por Jaqueline Chirre Flores, Alejandro Patiño Gabriel y Raymundo Erazo Erazo.	163
- Alternativas de pretratamiento textil: método integrado de descruce-blanqueo y blanqueo químico-enzimático, evaluación y comparación con el método clásico, por Beatriz Orcon Basilio, Mariel Giraldo Borja, Eduardo Flores Rúa y Anthony Ynca Berrosipi.	175
- Nanoemulsiones O/W de aceite esencial de naranja y tween 80, por George Alvarado López y Esperanza Medina Lezama.	189
- Estudio comparativo del contenido de compuestos bioactivos y cianidina-3- glucósido del maíz morado (<i>Zea mays</i> L.) de tres regiones del Perú, por Ana María Ccacca Ccacca, Mercedes Soberón Lozano e Inés Arnao Salas.	206
- Evaluación de la adsorción del carbón obtenido del mesocarpio de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.) modificado por ultrasonido, por Diego Suárez Ramos y Elvito Villegas.	216
- Biopelículas producidas con cáscara de naranja y reforzadas con celulosa bacteriana, por Evelin Alata Mayhuire, Yuri Cuadros Huamaní, Luis Miranda Zanardi y Esperanza Medina de Miranda.	231
- Estudio teórico de la actividad antioxidante de compuestos aromáticos con bases de schiff heterocíclicas sustituidos en posiciones meta y para, por Williams García, Helmer Lezama y Rodolfo Pumachagua.	242
- Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de sanky (<i>Corryocactus brevistylus</i>), por Tatiana Rojas, María E. Fuentes Campos, Eliana Contreras-López, Susana Gomez y Ana María Muñoz-Jáuregui.	258

- Composición química y ensayos de actividad antioxidante y del efecto fungistático sobre *Candida albicans* del aceite esencial de *Piper aduncum* L. “matico”, por Sharon Ingaroca, Américo Castro y Norma Ramos. 268

Informaciones

280

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.

Si alguna parte del trabajo, y a pedido de los autores, necesitara ser impreso a color, asumirán el 100 % del exceso del costo señalado por la imprenta.

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 3cm. Espacio 1½, 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 la revistas se escribirán según el Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html>) y *List of Journals Indexed in Index Medicus*, (<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lsiou.html>) Las referencias citadas se escribirán con el tamaño de fuente 10 y se seguirá el estilo de Vancouver.

Editorial

Este año del 5 al 12 de julio se realizará el 47° Congreso Mundial de Química IUPAC en la ciudad de París, Francia. Lo relevante de ese evento es que también se conmemora los 100 años de la IUPAC con el lema “Frontiers in Chemistry: Let’s create our Future”.

Es preciso recordar que el primer Congreso Internacional de Químicos tuvo lugar del 3 al 5 de septiembre de 1860 en la ciudad alemana de Karlsruhe con el objetivo de definir los términos "átomo", "molécula" y "equivalencia", necesarios para la comprensión entre los químicos de esa época. A ese congreso asistieron 127 químicos que procedían de los siguientes países: 57 de Alemania, 21 de Francia, 18 de Gran Bretaña, 7 de Rusia y Austria-Hungría, 6 de Suiza, 3 de Suecia y Bélgica, 2 de Italia y 3 de otros países. Entre los asistentes se puede citar a Bunsen, Adolf von Baeyer, Emil Erlenmeyer, von Fehling, Carl Fresenius, Kopp, Friedrich Beilstein, Jean-Baptiste Boussingault, Dumas, Arnould Paul Edmond Thénard, Cannizzaro, Dmitri Mendeleev, Lothar Meyer, entre otros destacados científicos.

A partir de 1860 se celebraron más congresos de química, tanto mundiales como regionales que han contribuido no solo a ponernos de acuerdo con los términos químicos, sino también a divulgar nuestras investigaciones, a estrechar lazos de amistad, realizar alianzas formales o informales, a difundir entre los jóvenes esta hermosa ciencia y en algunos casos a dejar en claro algunas posiciones científicas sobre los problemas mundiales como son el hambre, las enfermedades, el cambio climático, entre otros.

Las secciones del 47° Congreso Mundial de Química IUPAC son química para la vida, química para la energía recursos, química para el ambiente, química y sociedad, educación química, entre otros. Como siempre, muchos químicos que laboran en las diversas empresas así como los académicos que están en universidades e institutos de investigación nos reuniremos en París para celebrar los 100 años de la IUPAC, institución a la cual muchos químicos estamos afiliados, para reencontrarnos, reforzar los lazos de cooperación e intercambio, crear nuevas alianzas y aportar con nuestras investigaciones al desarrollo de la ciencia química necesaria para elevar la calidad de vida de la humanidad cuidando al mismo tiempo nuestro medio ambiente y así crear un mejor futuro por medio de la química.

Dr. Mario Ceroni Galloso
Miembro afiliado IUPAC

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL DESTILADO ALCOHÓLICO DE ANÍS VERDE (*Pimpinella anisum* L.) OBTENIDO POR DESTILACIÓN FRACCIONADA

Cleseztunqui Quispe^a, Alexia Pardo Figueroa Dianderas^b, Gustavo Tejada Flores^b,
Ivette del Rosario Cjuro Farfán^c

RESUMEN

En este trabajo de investigación se evaluó la calidad del destilado alcohólico de anís verde (*Pimpinella anisum* L.) obtenido por destilación fraccionada en una columna de uno (01), dos (02) y tres (03) platos; el cual es un producto intermedio para la elaboración de anisado. El proceso productivo contempló la mezcla de aguardiente y granos de anís verde para su posterior maceración, una vez obtenido el macerado, se procedió a su destilación en un alambique de columna fraccionada. La metodología para la evaluación consistió en la realización de análisis organoléptico, fisicoquímicos, espectroscópicos (UV-visible) y cromatográficos (CCF, CLAE y CG/EM). Se realizaron cinco (05) corridas de producción para obtener cinco (05) muestras de destilado por cada tamaño de columna (uno, dos y tres platos). En general, el destilado alcohólico de anís verde se caracterizó por la elevada presencia de compuestos carbonílicos, y moderada presencia de compuestos insaturados y carbohidratos. Los análisis de CCF, CLAE y CG/EM evidencian la presencia de *trans*-Anetol. En función a sus características se concluyó que el mejor destilado para la formulación de anisados es el obtenido en la destilación con dos (02) platos.

Palabras clave: anís verde (*P. anisum* L.), destilado alcohólico, destilación fraccionada, *trans*-Anetol.

ASSESSMENT OF THE QUALITY OF THE GREEN ANISE (*PIMPINELLA ANISUM* L.) ALCOHOLIC DISTILLATE OBTAINED BY FRACTIONAL DISTILLATION

ABSTRACT

In this research work, it was evaluated the quality of the green anise (*P. anisum* L.) alcoholic distillate obtained by fractional distillation in a column of one, two and three plates; which is an intermediate product for the production of aniseed. The production process involved the

^a Facultad de Química, Universidad Nacional de San Agustín, Calle Santa Catalina N° 117, Arequipa, Perú, cleseztq1402@gmail.com

^b Facultad de Ingeniería y Computación, Universidad Católica San Pablo, Quinta Vivanco S/N Urb. Campiña Paisajista, Arequipa, Perú.

^c Facultad de Ingeniería de Procesos, Universidad Nacional de San Agustín, Calle Santa Catalina N° 117, Arequipa, Perú.

mixture of schnapps and green anise grains for subsequent maceration. The macerated was distilled in a fractional column pot still. The evaluation methodology included organoleptic, physicochemical, spectroscopic (UV-visible) and chromatographic (TLC, HPLC and GC/MS) analysis. In order to obtain five samples for each column size (one, two and three plates), five production runs were carried. In general, the alcoholic distillate of green anise had characterized by the high presence of carbonyl compounds, and the moderate presence of unsaturated compounds and carbohydrates. The analysis of TLC, HPLC and GC/MS demonstrate the presence of *trans*-Anethole. Based on its characteristics, it was concluded that the best distillate for the production of aniseed is obtained in the distillation with two (02) plates.

Key words: green anise (*P. anisum* L.), alcoholic distillate, fractional distillation, *trans*-Anethole.

INTRODUCCIÓN

El anís (*P. anisum* L.) es una planta herbácea muy aromática; su aceite esencial se utiliza como aditivo, aromatizante y saborizante en las industrias alimentaria, farmacéutica, cosmética, entre otras¹. En estudios referentes al anís verde, se ha demostrado que su aceite esencial posee una composición variable de metabolitos secundarios según la zona de la que proviene, el tiempo de cosecha y el clima; metabolitos de los cuales los más importantes son el *trans*-Anetol y el *p*-Anisaldehído². Se ha evidenciado que no existen estudios, investigaciones ni información específicamente sobre la caracterización del destilado alcohólico de anís verde obtenido por destilación fraccionada, sin embargo, existen trabajos de investigación que describen y determinan las características del aceite esencial de anís verde^{2,3,4,5}. La empresa donde se realizó la investigación actualmente produce anisados a base de destilado alcohólico de anís verde (*P. anisum* L.), pero no ha realizado estudios sobre las principales características y componentes del destilado obtenido por destilación fraccionada en columna de uno (01), dos (02) y tres (03) platos. Por esta razón, el objetivo de la investigación fue evaluar las propiedades de los tres (03) destilados alcohólicos de anís verde (*P. anisum* L.) e identificar, según la evaluación de sus características, cuál de los tres (03) es el mejor para formular anisados.

PARTE EXPERIMENTAL

La investigación se realizó en el Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad Nacional de San Agustín (Arequipa, Perú), Laboratorio de Control de Calidad de la Universidad Católica de Santa María (Arequipa, Perú) e instalaciones de una industria licorera productora de anisados (Arequipa, Perú).

1. Identificación taxonómica del anís verde

En la tabla 1 se muestra los resultados de la identificación taxonómica del anís verde.

Tabla 1. Identificación taxonómica del anís verde.

Clasificación científica					
Reino	Plantae	División	Magnoliophyta	Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae	Orden	Apiales	Familia	Apiaceae
Subfamilia	Apiodeae	Género	Pimpinella	Especie	<i>P. anisum L.</i>

Fuente: Herbarium Arequipense (HUSA) Universidad Nacional de San Agustín.

El ejemplar de la especie en estudio (*P. anisum L.*) fue depositado e identificado en el herbario “Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín.

2. Muestreo y preparación de las muestras

Para que las muestras sean representativas, se controlaron y estandarizaron los siguientes parámetros: masa de anís verde, grado alcohólico y masa del aguardiente, tiempo de maceración, y masa del macerado que se carga al alambique. El muestreo se realizó en una empresa licorera, específicamente en el área de producción del destilado de anís.

Se inició el proceso productivo con la formulación y masado de 115,85 kg de aguardiente, masado de 12,60 kg de anís verde, y maceración por 15 días en tanques de acero inoxidable de 200 L de capacidad. Luego, se transportó el macerado a la olla de cocción de cobre del alambique de columna fraccionada (propiedad de la industria licorera en la que se realizó el trabajo) con tres (03) platos para su destilación, proceso que se repitió cinco (05) veces para obtener las muestras. Se siguió el mismo proceso para el muestreo de destilado obtenido en un alambique de dos (02) y de un (01) plato. El alambique posee un sistema clamp que permite retirar y colocar platos de destilación según el número de platos con el que se desee trabajar. Las muestras fueron tomadas en quince (15) corridas de producción (05 por cada tamaño de columna), todas por un volumen de 500 mL y correctamente rotuladas para su análisis por triplicado. El muestreo se realizó basándose en la NTP 319.079.1974⁶.

3. Análisis organoléptico

Las muestras fueron analizadas por personas con experiencia en cata de bebidas alcohólicas (trabajan en la industria licorera productora de anisados) siguiendo las normas NTP-ISO 11035:2009⁷ y NCh107⁸ y los datos colectados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Ponderaciones para el análisis organoléptico de destilado de anís verde.

Nivel	Sabor	Color	Olor	Estado físico
1	Ácido y picante	Café oscuro, amarillento y turbio	Etanólico, ligeramente aromático a anís	Líquido opalescente
2	Intensamente ácido, ligeramente dulce	Incoloro, ligeramente amarillento	Ligeramente aromático a anís, penetrante	Líquido cristalino
3	Picante, ácido, ligeramente dulce	Incoloro cristalino	Intensamente aromático a anís, agradable.	-
4	Dulce, ligeramente ácido	-	-	-
5	Muy dulce, aromático y ligeramente ácido	-	-	-

Fuente: Elaboración propia.

4. Análisis fisicoquímico

Se midieron las variables siguiendo métodos, procedimientos, lineamientos y/o especificaciones establecidas y reguladas.

- **Grado alcohólico:** Se midió según la norma NTE INEN 340⁹.
- **Densidad:** Se midió según la norma NTP ISO 279: 2011¹⁰.
- **Acidez:** Se midió según la norma NTP 211.027:2003¹¹.
- **Punto de ebullición:** Se midió según el método semi micro.
- **Índice de refracción:** Se midió según la norma NTP ISO 280:2011¹².
- **Índice de esteres:** Se midió según la norma NTP 319-088 INDECOPI¹³.
- **Índice de carbonilos:** Se midió según la norma NTP 319.078:1974¹⁴.

5. Análisis espectroscópicos y cromatográficos

5.1. Espectroscopia UV-visible

El equipo que se utilizó para la determinación de la longitud de onda de los estándares (*trans*-Anetol y *p*-Anisaldehído) fue un espectrofotómetro UV-visible modelo GENESYS 10S con software Vision lite, lámpara de xenón y rango de longitud de onda de 190 a 1100 nm. Se realizó un barrido espectral a un rango de 200-400 nm; para lo cual se preparó una solución de 0,1 µL de *trans*-Anetol /10 mL de etanol p.a. y 0,1 µL de *p*-Anisaldehído/10 mL en etanol p.a.

5.1.1. Determinación de la curva de calibración

Para el caso del *trans*-Anetol, la curva de calibración se realizó con etanol p.a. y estándar de *trans*-Anetol. Se preparó una solución madre de 12,3 mg/L en 100 mL y después se realizaron diluciones. A partir de la curva se obtuvo la ecuación de regresión lineal $Y = 0,4607x$, con un $R = 0,9918$. Para el caso del *p*-Anisaldehído, la curva de calibración se realizó con etanol p.a. y estándar de *p*-Anisaldehído. Se preparó una solución madre de 12,3mg/L, en 100 mL y después se realizaron diluciones. A partir de la curva se obtuvo la ecuación de regresión lineal $Y = 0,0499x - 0,0044$, con un $R = 0,9991$. Las muestras de destilado fueron centrifugadas, filtradas y diluidas 10 µL en una fiola de 10 mL.

5.2. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Mediante esta técnica se determina cualitativamente la presencia de compuestos mayoritarios. Se inició con la preparación de la cámara cromatográfica; se colocó en la cámara acetato de etilo: tolueno (7:93), se homogenizó por agitación y se dejó reposar por 10 minutos. En las cromatoplasmas de Silicagel 60 F₂₅₄, con soporte de vidrio de 20x20 cm, adquiridas en Merck Perú; se trazó una línea de base a una distancia de 1,5 cm por encima de la base de la placa y luego se realizó la activación en una estufa a 60 °C por un periodo de 1 hora. Posteriormente se realizó el sembrado de las muestras, extrayendo 5 µL y colocándolos por encima de la línea de base, a continuación se introdujo en la cámara que debe ser cerrada herméticamente. Cada 5 minutos fue verificado que el solvente no rebasa la línea marcada en la cromatoplasma ($L = 1,5$ cm). Se utilizó como fase estacionaria metanol, y para la revelación se utilizó revelador H₂SO₄: Vainillina y Lámpara UV de 254 nm.

5.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)

Las corridas se realizaron en un cromatógrafo tipo LACHROM LITE – CLAE, con bomba cuaternaria de baja presión, detector de diodos, espectrofotómetro UV-visible, automuestreador y una columna RP C18 de 125 mm. Se utilizaron como fase móvil y estacionaria metanol grado CLAE y una columna RP C18 125 mm, con una velocidad de flujo de 1 mL/min, una temperatura de columna de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, y un volumen de inyección de muestra de 20 μL . Los estándares y las muestras fueron filtrados en una membrana fina de 0,45 μm para llevar a cabo una corrida de cada uno de ellos a 265 nm, obteniendo un tiempo de retención de 12,440 min para el *trans*-Anetol y de 2,873 min para el *p*-Anisaldehído. Las muestras fueron preparadas en una solución de metanol:agua ultra pura (50:50) y se realizaron las corridas por triplicado. Esta técnica se utilizó para determinar la concentración de los componentes mayoritarios (*trans*-Anetol y *p*-Anisaldehído) en las muestras, utilizando como referencia los estándares correspondientes a una concentración de 99,99 %. Este análisis fue realizado por un Laboratorio de Control de Calidad Acreditado por INACAL.

5.4. Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM)

El equipo que se utilizó fue un cromatógrafo SHIMADZU GC-2010, versión 2100; con detector de ionización a la llama y espectroscopía de masas, con columna capilar SPD 20, inyector automático. La corrida se realizó en las siguientes condiciones: temperatura de columna $45 \pm 3^\circ\text{C}$, temperatura de inyección de 250°C , temperatura de detección de 300°C , y fase estacionaria Helio. Las muestras fueron preparadas en una solución de Hexano (5 μL /10 mL de solvente) y luego fueron filtradas. Este análisis fue realizado por un laboratorio de control de calidad acreditado por INACAL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Análisis organoléptico

En la tabla 3 se muestran los resultados del análisis organoléptico realizado a las muestras de destilado alcohólico de anís verde obtenidas con uno (01), dos (02) y tres (03) platos.

Tabla 3. Resultados del análisis organoléptico.

Variable	01 plato	02 platos	03 platos
Sabor	Picante, ácido, ligeramente dulce (3)	Muy dulce, aromático y ligeramente ácido (5)	Dulce, ligeramente ácido (4)
Color	Incoloro, ligeramente amarillento (2)	Incoloro cristalino (3)	Incoloro cristalino (3)
Olor	Ligeramente aromático a anís y penetrante (2)	Intensamente aromático a anís, agradable (3)	Ligeramente aromático a anís, agradable (2.5)
Estado físico	Líquido cristalino ligeramente opalescente (1,5)	Líquido cristalino (2)	Líquido cristalino (2)

Fuente: Elaboración propia.

El sabor y el olor son las características más importantes para valorar la calidad del destilado y diferenciarlos. Los resultados confieren al destilado obtenido con dos (02) platos las mejores características organolépticas para ser utilizado como insumo principal en la elaboración del producto final al cual está destinado.

2. Análisis fisicoquímicos

En la tabla 4 se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados a las muestras de destilado alcohólico de anís verde obtenidas con uno (01), dos (02) y tres (03) platos.

Tabla 4. Resultados de los análisis fisicoquímicos.

Variable	01 plato	02 platos	03 platos
Grado alcohólico	61,00	61,23	60,08
Acidez	2,541	3,217	3,415
Densidad	0,9099	0,9091	0,9119
Índice de refracción	1,363	1,362	1,363
Punto de ebullición	83,2	81,2	81,2
Índice de éster	8,31	7,62	6,78
Índice de carbonilos	8,22	15,15	22,12

Fuente: Elaboración propia.

El destilado obtenido con dos (02) platos tiene 61,23° GL, un mayor grado alcohólico que el obtenido con uno (01) y tres (03) platos, lo que indica que se da una mejor separación y arrastre de compuestos aromáticos. Respecto a la acidez, el destilado obtenido con un plato presenta menor acidez, sin embargo, esta se ve afectada con el paso del tiempo debido a la oxidación de alcoholes, aldehídos e hidrólisis de los ésteres presentes. En el caso de la densidad, el destilado obtenido con tres (03) platos tiene mayor densidad, es decir, mayor cantidad de extractos (sustancias no volátiles) que los otros destilados.

El índice de refracción (IR) es una variable que guarda relación con la composición química: si hay predominancia de compuestos bencénicos el IR es mayor a 1,50 y si no la hay, el IR es próximo a 1,45. Los índices de refracción de destilados obtenidos con uno (1), dos (02) y tres (3) platos son similares, con predominancia de compuestos no aromáticos. Respecto al índice de éster, es menor en los destilados obtenidos con dos (02) y tres (3) platos, lo que indica la presencia de ésteres de baja masa molecular. El índice de carbonilos del destilado de tres (03) platos es 22,12 %, mientras que de los destilados de un (01) plato y dos (02) platos son 8,22 y 15,15 %, respectivamente; es decir, el de tres (03) platos tiene mayor presencia de aldehídos y cetonas.

3. Análisis cromatográficos y espectroscópicos

3.1. Espectroscopia UV-visible

En las tablas 5 y 6 se muestran los resultados de los análisis de Espectroscopia UV-visible realizados a las muestras de destilado alcohólico de anís verde obtenidas con uno (01), dos (02) y tres (03) platos.

Tabla 5. Resultados de los análisis de Espectroscopia UV-visible: concentración de *trans*-Anetol (mg/L).

Prueba	01 plato	02 platos	03 platos
P1 (mg/L)	1,09	1,02	1,45
P2 (mg/L)	1,08	1,16	1,35
P3 (mg/L)	1,12	1,09	1,26
P4 (mg/L)	1,08	1,09	1,26
P5 (mg/L)	0,95	1,16	1,36

Fuente: Elaboración propia.

El destilado obtenido con tres (03) platos tiene mayor concentración de *trans*-Anetol que los obtenidos con uno (01) y dos (02) platos.

Tabla 6. Resultados de los análisis de Espectroscopia UV-visible: concentración de *p*-Anisaldehído (mg/L).

Prueba	01 plato	02 platos	03 platos
P1 (mg/L)	5,02	4,26	4,86
P2 (mg/L)	5,82	4,12	4,76
P3 (mg/L)	4,74	4,90	4,72
P4 (mg/L)	5,12	4,58	4,72
P5 (mg/L)	5,74	4,64	5,82

Fuente: Elaboración propia.

El destilado obtenido con dos (02) platos presenta una menor concentración de *p*-Anisaldehído, motivo por el cual existe una menor probabilidad de incrementar su acidez con el tiempo; es decir, es más estable.

3.2. Cromatografía en Capa Fina

En la figura 1 y en la tabla 7 se muestran los resultados de la cromatografía en capa fina realizada a las muestras de destilado alcohólico de anís verde obtenidas con uno (01), dos (02) y tres (03) platos.

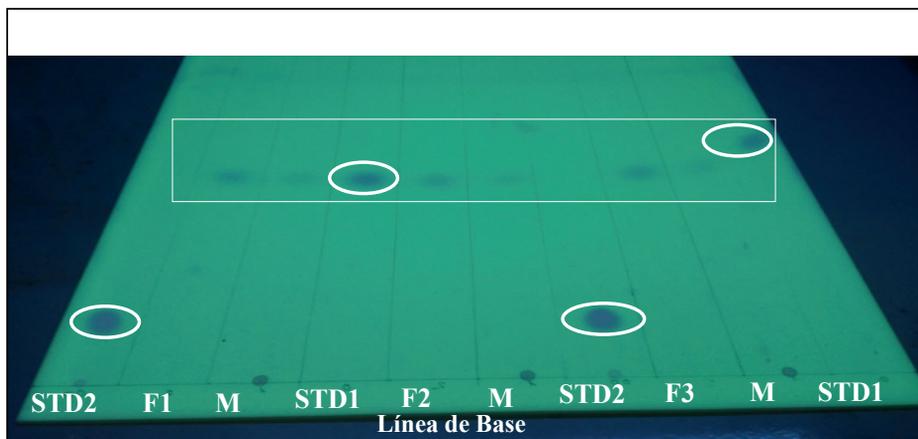


Figura 1. Resultados de los análisis de Cromatografía en Capa Fina.

Leyenda: STD1: Estándar de *trans*-Anetol; STD2: Estándar de *p*-Anisaldehído; M: Macerado; F1: Destilado de un (01) plato; F2: Destilado de dos (02) platos y F3: Destilado de tres (03) platos.

Tabla 7. Resultado de los análisis de Cromatografía en Capa Fina (Rf).

Fase móvil	Estándar	01 plato	02 platos	03 platos
Tolueno: Acetato	<i>trans</i> -Anetol	0,86	0,85	0,85
de Étilo (7:93)	<i>p</i> -Anisaldehído	0,50	0,00	0,00

Fuente: Elaboración propia.

La tabla 7 y la figura 1 muestran la relación de frente que se obtuvo de los destilados, las cuales se compararon con la relación de frente de los estándares STD1 (*trans*-Anetol) y STD2 (*p*-Anisaldehído) indicando la presencia de *trans*-Anetol y la ausencia de *p*-Anisaldehído.

3.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)

La figura 2 muestra los cromatogramas de las muestras de los estándares del *p*-Anisaldehído y del *trans*-Anetol, mientras que en la tabla 8 se presentan los resultados de los análisis de CLAE realizados a las muestras de destilado alcohólico de anís verde obtenidas con uno (01), dos (02) y tres (03) platos.

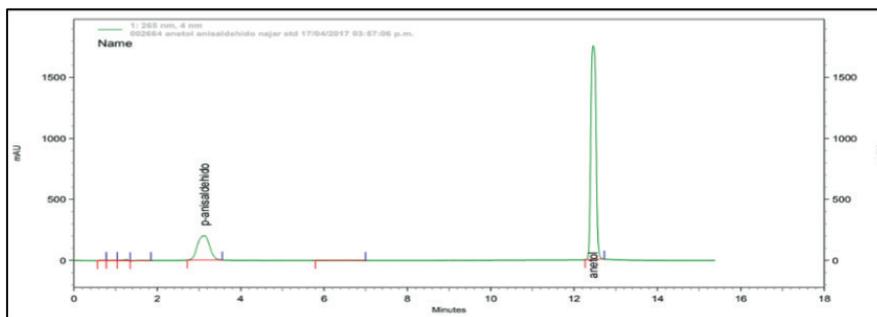


Figura 2. Cromatograma del *p*-Anisaldehído y del *trans*-Anetol obtenido en los análisis de CLAE.

Tabla 8. Resultados de los análisis de CLAE.

Compuesto	01 plato	02 platos	03 platos
<i>trans</i> -Anetol	0,1164	0,1169	0,1057
<i>p</i> -Anisaldehído	No detectable	No detectable	No detectable

Fuente: Elaboración propia.

El destilado obtenido con dos (02) platos tiene 0,1169 % de *trans*-Anetol, seguido por el obtenido con un (01) plato con 0,1164 % y el obtenido con tres (03) platos con 0,1057 %. No se detectó *p*-Anisaldehído en ninguna de las muestras.

3.4. Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM)

En las figuras 3, 4 y 5 se pueden observar los cromatogramas obtenidos para las muestras de destilado alcohólico de anís verde obtenidas con uno (01), dos (02) y tres (03) platos, respectivamente; y en la tabla 9 se muestran los resultados de los análisis de GC/EM realizados a las muestras mencionadas.

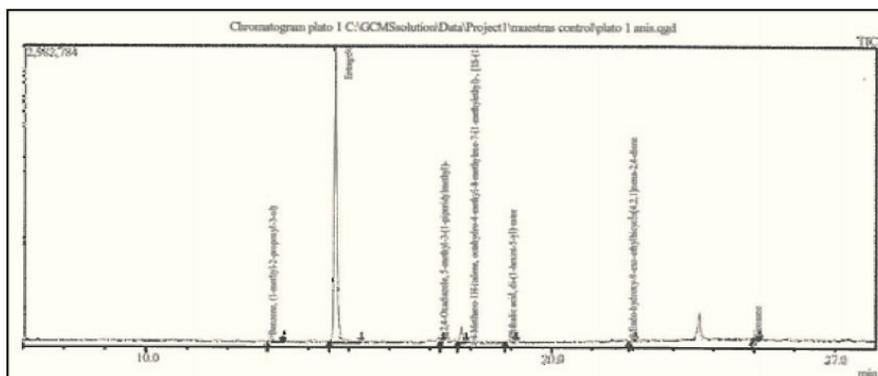


Figura 3. Cromatograma del destilado obtenido con un (01) plato.

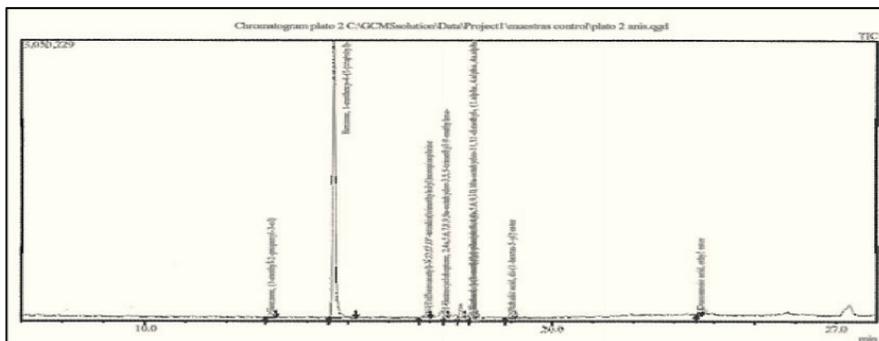


Figura 4. Cromatograma del destilado obtenido con dos (02) platos.

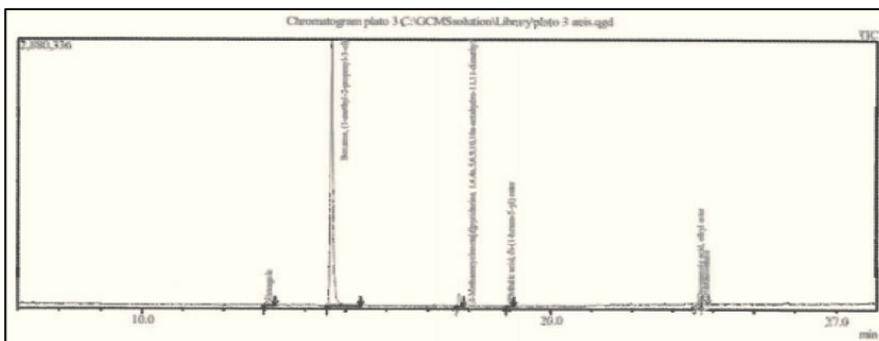


Figura 5. Cromatograma del destilado obtenido con tres (03) platos.

Tabla 7. Resultado de los análisis de Cromatografía en Capa Fina (Rf.).

Compuesto	01 plato		02 platos		03 platos	
	Tiempo de retención (min)	Área (%)	Tiempo de retención (min)	Área (%)	Tiempo de retención (min)	Área (%)
<i>trans</i> -Anetol	14,62	90,15	14,63	86,83	14,63	88,16
1,4-metano-1H-indeno, octahidro-4-metil	17,75	3,88	-	-	-	-
Estragol	13,05	2,09	13,05	1,75	13,06	1,67
Acido ftálico, di-(1-hexen-5-il) éster	18,98	1,77	18,98	1,84	18,98	2,08
Oxadiazol, metil-3-(1-piperidil)	17,29	0,71	-	-	-	-
1,4-metanocicloocta[d] piridacina	-	-	17,75	3,88	17,75	3,46
2-butanol, 3-(1-metil-2-fenil)	-	-	18,02	0,89	-	-
Etil éster, ácido	-	-	23,63	2,14	23,64	2,53
N-(trifluoroacetil)-N-o, o', o' '- tris (trimetilsilil)	-	-	16,93	1,99	-	-
α -Himachalene	-	-	17,35	0,68	-	-
Eicosano	25,04	0,69	-	-	-	-
Tritetracontano	-	-	-	-	23,77	2,1
9-endo-hidroxi-9-exo-etil-biciclo-[4.2.1]-nona-2,4-dieno	21,96	0,71	-	-	-	-

Fuente: Elaboración propia.

En el destilado obtenido con dos (02) platos se identificaron ocho componentes predominando el *trans*-Anetol con 86,83 %, en los destilados con uno (01) y tres (03) platos se identificaron siete y seis componentes predominando el *trans*-Anetol con 90,15 % y 88,16 %, respectivamente. En los tres destilados se tiene un tiempo de retención de 14,62 a 14,63 min del compuesto mayoritario.

CONCLUSIONES

En general, los destilados obtenidos presentan compuestos carbonilos, insaturados y carbohidratos, siendo los destilados con dos (02) y tres (03) platos los que presentan el mejor sabor y olor. Los análisis de UV-VIS, CCF, CLAE y CG/EM revelan que el compuesto mayoritario en los destilados es el *trans*-Anetol. Según los resultados de los análisis realizados y los requerimientos del anisado (bebida alcohólica obtenida por aromatización de alcohol con variedades de anís) producido por la industria licorera donde se realizó el trabajo, se concluye que el destilado de dos (02) platos presenta mejores características y presencia de componentes que lo hacen diferente y mejor que los demás para la formulación del producto final.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a INNÓVATE PERÚ por haber cofinanciado junto con la empresa Manuel Muñoz Najar S.A.C. Industria Licorera el proyecto Contrato N° 031-PITEI-2016, a partir del cual se realizó el presente trabajo. Agradecemos a todos nuestros familiares, amigos y compañeros de trabajo por el apoyo brindado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. European pharmacopoeia. Monograph on anise fruit oil. [Internet] 9na ed. España; 2002. [citado 12 mar 2019]. Disponible en: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-9th-edition>
2. Orav A, Raal A. Essential oil composition of *P. anisum* L. fruits from various European countries. Nat Prod Res. 2008; 22: 227-232.
3. Chaquilla G, Estela W, Torres V, Ballinas M, Gastélum M, Nevárez V. Composición química y contenido de fenoles totales en aceite esencial de muña *Minthostachys setosa* Briq Epl y anís *P. anisum* L. ECIPERU. 2012; 8 (2): 107-111.
4. Trigo I, De Groot W, Medrano N, Espinoza J. Extracción y caracterización del aceite esencial *P. anisum* L., producido en Bolivia. Agron Colomb. 2016, 34 (1): S1447-S1449.
5. Quiñones Y. Análisis de los principios activos de especies mexicanas de anís y evaluación de su actividad biológica sobre microorganismos patógenos. [Tesis Doctoral]. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2011.
6. Norma Técnica Peruana NTP 319.079.1974. Aceites esenciales. Extracción de muestras. Lima: INDECOPI; 2016.
7. Norma Técnica Peruana NTP-ISO 11035. Análisis sensorial. Metodología. Lima: INDECOPI; 2009.
8. Norma Técnica Chilena NCh-107. Análisis sensorial. Aceites. Chile: INN; 2001.
9. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 340. Bebidas alcohólicas. Determinación del grado alcohólico.
10. Norma Técnica Peruana NTP ISO 279: 2011. Determinación de la densidad. Lima: INDECOPI; 2016.
11. Norma Técnica Peruana NTP 211.027. Bebidas Alcohólicas. Alcohol etílico. Método de ensayo. Determinación de la acidez total. Lima: INDECOPI; 2003.
12. Norma Técnica Peruana NTP ISO 280. Determinación del Índice de Refracción. Lima: INDECOPI; 2016.
13. Norma Técnica Peruana NTP 319.088. Determinación de índice de esteres. Lima: INDECOPI; 2016.
14. Norma Técnica Peruana NTP 319.078. Determinación de índice de carbonilos. Lima: INDECOPI; 2016.

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, BIOLÓGICA Y MOLECULAR DEL FACTOR DIFUSOR PRESENTE EN EL VENENO DE LA SERPIENTE *Bothrops atrox* “JERGÓN”

Julio Delgadillo^a, Dan Vivas^a, Edith Rodríguez^a, Fanny Lazo^a, E. F. Sánchez^b y Armando Yarlequé^{a*}

RESUMEN

La hialuronidasa del veneno de *Bothrops atrox* fue purificada y caracterizada. Se estudió el efecto de iones monovalentes y divalentes en su actividad catalítica, mostrando que el ion magnesio (150 mM) incrementa la actividad en 40 %, mientras que la glicina lo inhibe en un 44 %. La enzima carece de actividad tóxica cuando es administrada en ratones albinos en ensayos de toxicidad, pero incrementa la acción hemorrágica del veneno total sobre la piel de estos animales. El antiveneno botrópico polivalente, Perú) fue capaz de reconocer componentes del veneno total de *B. atrox*, así como la enzima purificada, en ensayos de inmunodifusión. El cDNA que codifica para esta hialuronidasa se obtuvo a partir de mRNA extraído del veneno fresco, y secuenciado. El análisis de la secuencia de cDNA, de 2020 pb, muestra que contiene un ORF de 1350 pb que codifica para una pre-enzima de 449 aminoácidos, cuyo procesamiento, posiblemente, resulta en una enzima madura de 429 aminoácidos, masa molecular 50 kDa y pI de 9,19, indicando su naturaleza básica, y con 4 probables sitios de N-glicosilación (Asn103, Asn111, Asn153 y Asn357).

Palabras clave: veneno, serpiente, factor difusor, hialuronidasa, *Bothrops atrox*.

SOME BIOCHEMICAL, BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF THE DIFFUSION FACTOR FROM *Bothrops atrox* SNAKE VENOM

ABSTRACT

The hyaluronidase from *Bothrops atrox* venom was purified and characterized. The effect of monovalent and divalent ions on their catalytic activity was studied, showing that the magnesium ion (150 mM) increases de activity in 40%, while glycine inhibits it by 44 %. The enzyme lacks toxic activity, when administered in albino mice in toxicity tests, but increases the hemorrhagic action of the total venom on the skin of these animals. The polyvalent

^a Lab. Biología Molecular - Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM - Perú

^b Centro de Investigación y Desenvolvimento, FUNED - Brasil

* ayarleque48@gmail.com

botropic antivenom, was able to recognize components of the total venom of *B. atrox*, as well as the purified enzyme, in immunodiffusion assays. The cDNA coding for hyaluronidase from the venom of *B. atrox* was obtained from mRNA extracted of the fresh venom, and sequenced. The analysis of the cDNA, of 2020 bp, shows that it contains an ORF of 1350 bp that codes for a pre-enzyme of 449 amino acids, which probably is processing resulting in a mature enzyme of 429 amino acids, Molecular Weight of 50 kDa and pI 9.19, indicating its basic nature, and with 4 probable N-glycosylation sites (Asn¹⁰³, Asn¹¹¹, Asn¹⁵³ and Asn³⁵⁷).

Key words: venom, snake, diffusion factor, hyaluronidase, *Bothrops atrox*.

INTRODUCCIÓN

El ácido hialurónico es un polisacárido multifuncional de alto peso molecular encontrado en todos los vertebrados; especialmente en los mamíferos, se encuentra en la matriz extracelular de tejido conectivo blando, la piel, cartílago y en el líquido sinovial¹. Esta molécula participa en muchos procesos biológicos como la fecundación, reproducción, envejecimiento, comunicación celular, así como en la formación de tumores entre otros².

Ante este abundante sustrato, la evolución dio origen a las hialuronidasas (E.C. 3.2.1.35), enzimas que se encuentran presentes en muchos organismos de diversos grupos (bacterias, insectos, arácnidos, reptiles, mamíferos, entre otros) con un mayor énfasis en los grupos de animales venenosos. Estas enzimas hidrolizan el ácido hialurónico (hialuronato) en el enlace β (1-4) formado entre N-acetilglucosamina y el ácido glucurónico³.

Las hialuronidasas son ubicuas en los venenos de serpientes, *per se* estas enzimas no son tóxicas, pero participan en la difusión de los componentes tóxicos del veneno (metaloproteasas, serinoproteasas, fosfolipasas, entre otros) a razón de ello han recibido la denominación de “factores difusores”. Pese a este rol primordial en el proceso de envenenamiento, aún se mantiene un limitado conocimiento sobre estas enzimas, principalmente por su inestabilidad, rápida degradación y bajo contenido en el veneno. Sin embargo, existen reportes de hialuronidasas aisladas del veneno de algunas especies ofídicas como: *Agkistrodon contortrix contortrix*⁴, *Agkistrodon acutus*⁵, *Naja naja*⁶ y *Crotalus durissus terrificus*⁷.

En el Perú, esta enzima ha sido purificada sucesivamente de los venenos de *Lachesis muta*⁸, *Bothrops atrox*⁷ y *Bothrops brazili*⁹ en los cuales se ha reportado interesantes singularidades, principalmente en la hialuronidasa de *B. atrox*, especie responsable de la mayoría de casos de ofidismo del país. En el 2013, González *et al.*⁷, reportaron una enzima de 110 kDa, una masa atípica para las hialuronidasas eucariotas, asimismo una estabilidad enzimática hasta las 100 horas y un pH óptimo de 5,0. No obstante, algunas características importantes como su dependencia a iones y su efecto difusor en modelos biológicos, no se han descrito.

El presente trabajo busca incrementar el conocimiento acerca de las características bioquímicas y biológicas de la hialuronidasa y sentar los primeros estudios moleculares de esta enzima, que permitan dar respuesta a las características singulares antes mencionadas, con miras a explorar el modo de neutralizarla durante el envenenamiento.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Veneno.- Se utilizó el veneno extraído de ejemplares adultos de *Bothrops atrox* procedentes de Pucallpa-Ucayali, y mantenidos en el serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Antivenenos.- Para el ensayo de inmunodifusión se empleó el suero anti-botrópico polivalente comercial del Instituto Nacional de Salud (INS) Lima-Perú.

Animales de experimentación.- Se emplearon ratones albinos Balb-c machos (18-22g) procedentes del bioterio del INS-Perú. El cuidado animal fue hecho de acuerdo con las recomendaciones éticas de la Biomedical Research Involving Animals of the Council of International Organizations of Medical Sciences (COIMS).

Enzima purificada

La hialuronidasa del presente estudio se obtuvo según el método desarrollado por González *et al.*⁷, que emplearon dos pasos cromatográficos, uno de intercambio aniónico sobre DEAE Sephadex A-50 seguido de una columna de filtración molecular en Sephadex G-50.

Cuantificación de proteína

El contenido proteico del veneno y la enzima purificada fueron cuantificados midiendo la absorbancia de luz UV a 280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 120. Además, se empleó el método de Lowry, utilizando el reactivo de Folin Ciocalteu 1:6 en medio alcalino en presencia de albúmina sérica bovina como proteína estándar, midiéndose la absorbancia a 660 nm.

Actividad enzimática

Fue llevada a cabo por el método turbidimétrico de Di-Ferrante¹⁰. La mezcla de reacción contenía 0,2 mL de ácido hialurónico (0,5 mg/mL), 0,25mL de buffer acetato de amonio 0,05M a pH 5,0 con NaCl 0,15 M y se adicionó 0,05 mL del veneno (1 mg/mL) o enzima purificada (0,1 mg/mL). Luego se incubó a 37°C por 15 minutos, deteniéndose la reacción con 2mL de bromuro cetil trimetil amonio (BCTA) al 2,5 % en NaOH 2 %. Finalmente, se midió la turbidez a 400 nm. La actividad específica fue expresada en unidades Di-Ferrante (UDF) la cual se define como la cantidad de proteína requerida para reducir la turbidez inicial del sustrato en un 50 %.

Efecto de iones sobre la actividad enzimática

Se prepararon baterías de reacción conteniendo: KBr, KCl, NaCl, CaCl₂ y MgCl₂ en el rango de 0,05 a 0,3 M. Se preincubaron alícuotas de la enzima con los respectivos iones por 10 minutos a 37 °C y luego se midió la actividad enzimática según el método antes descrito.

Efecto de algunos aminoácidos sobre la actividad enzimática

En estas pruebas se utilizaron ácido glutámico, glicina y el tripéptido glutatión preparados a concentraciones de 3, 6 y 12 mM. Las alícuotas de la enzima con el respectivo compuesto se preincubaron a 37°C por 10 minutos y luego se midió la actividad enzimática.

Determinación de la toxicidad

Se trabajó con cinco grupos de ratones albinos, a los cuales se les inoculó intraperitonealmente 0,1 mL de hialuronidasa (5-20µg). El control positivo se realizó con 0,1 mL de veneno crudo (1 mg/mL) y el control negativo con 0,1 mL de solución salina. Luego se monitoreó la mortalidad o reacciones adversas en los ratones en un lapso de 48 horas. Después de este tiempo, los ratones fueron sacrificados y sometidos a disección para observar daños cutáneos y/o viscerales.

Evaluación del efecto difusor

Fue realizado por medio de la actividad hemorrágica, de acuerdo con Isla *et al.*¹¹. Se prepararon 5 muestras que fueron inoculadas vía intradérmica en ratones. La muestra 1 contenía 1,4 µg de veneno completo, equivalente a 1 dosis hemorrágica mínima (1 DHM), Segura *et. al.*¹¹ La muestra 2 contenía 1,4 µg de veneno completo previamente inactivado por calor a 60 °C, la muestra 3 contenía 1,4 µg de la enzima purificada, la muestra 4 contenía la mezcla de 1,4 µg de veneno y enzima, respectivamente; finalmente, la muestra 5 contenía veneno inactivado por calor más la enzima (1,4 µg c/u). Luego de dos horas de la inoculación, los animales fueron sacrificados y se les retiró la piel de la zona abdominal para observar el lado interno y calcular el diámetro y el área hemorrágica.

Reconocimiento por el suero anti-botrópico

Adicional al reporte de neutralización previo^{7, 12}, se evaluó el grado de reconocimiento de la enzima por parte del suero anti-botrópico polivalente-INS, siguiendo el método de Ouchterlony y Nilsson. El veneno crudo y la enzima se analizaron por inmunodifusión contra el antiveneno. El revelado fue realizado con el colorante azul brillante de Coomasie al 0,1 % y una solución decolorante para poder evidenciar las líneas de precipitación.

Estudios moleculares

El objetivo de este acápite fue el de obtener la secuencia de aminoácidos de la enzima a partir de la secuencia de nucleótidos codificantes, y determinar *in silico* las características bioquímicas de la proteína en estudio.

Aislamiento de RNA y su conversión en cDNA

Se realizó de acuerdo con el método descrito por Vivas *et al.*¹³, con el objetivo de no sacrificar a los animales. Las muestras de veneno fresco, obtenidas por presión manual, sobre las

glándulas de ejemplares de *Bothrops atrox*, fueron recibidas en viales de 1,5 mL conteniendo RNA later con el fin de mantener íntegro la calidad de RNA total. Posteriormente, el RNA fue purificado empleando el kit de aislamiento High Pure (Roche) seguido de su conversión a cDNA con el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (NOVAGEN); para ambos casos se procedió de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Diseño de cebadores

La literatura determina que el tamaño del cDNA de las hialuronidasas oscila entre los 1500 y 2500 pares de bases (pb). Por esta razón, se realizó un alineamiento múltiple de las hialuronidasas de *Protobothrops mucrosquamatus* (GenBank: XM_015822281.1), *Ovophis okinavensis* (GenBank: AB851978.1), *Protobothrops flavoviridis* (GenBank: AB851937.1) y *Bothrops neuwiedi pauloensis* (GenBank: FJ654998.1), a partir del cual fueron diseñados manualmente 5 pares de cebadores (HD1- HDr10) y sintetizados por la casa comercial Invitrogen®.

Obtención del cDNA de la hialuronidasa

Para amplificación de la secuencia del gen se empleó el siguiente protocolo de amplificación: un ciclo de denaturación inicial 95°C por 5 min seguido por 32 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos; hibridación a 56- 60°C por 30 segundos y una polimerización a 72°C por 80 segundos; finalmente, se incubó a 72°C por 7 minutos. Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis de agarosa al 1 % preteñido con el intercalante RedGel. El secuenciamiento de los productos amplificados fue realizado en un secuenciador automatizado ABI 3730 XL realizado por la casa comercial Macrogen, Inc, Corea del Sur).

Análisis *in silico*.

La secuencia nucleotídica resultante fue sometida al análisis de identificación empleando el servidor en línea BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). El análisis de los marcos de lectura abierta (ORFs) y la traducción de la secuencia nucleotídica fue obtenida mediante los programas ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) y Translate Tool (<http://ca.expasy.org>). La preferencia de codón (Codon Usage) fue realizado mediante el programa online SMS (http://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html). La proteína deducida fue analizada tanto en identidad como en semejanza con otras secuencias de hialuronidasas con el programa en línea BLASTp. La predicción de las propiedades bioquímicas de la proteína deducida fue realizada mediante el programa Protparam (<http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>), la determinación del péptido señal mediante el programa Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y los sitios potenciales de glicosilación fueron predichos con el software NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de iones y aminoácidos sobre la hialuronidasa de *B. atrox*.

Los ensayos con iones Na^+ , K^+ , Br^- , Cl^- , Ca^{+2} y Mg^{+2} señalaron un grado distinto de inhibición o activación según la concentración utilizada. Los resultados obtenidos al preincubar la enzima con los iones a concentraciones finales (50 - 300 mM), establecen que el ion Mg^{+2} (150 mM) incrementa la actividad enzimática en 40 % mientras que, el Ca^{+2} (150 mM) y el K^+ (300 mM) incrementaron la actividad en 7 % y 10 %, respectivamente (tabla 1).

Tabla 1. Acción de los iones sobre la actividad enzimática.

Agentes	% Actividad enzimática (UDF/mg) (Enzima purificada =100 %)			
	50 mM	100 mM	150 mM	300 mM
MgCl₂	90	115	140	105
KBr	80	90	95	110
CaCl₂	70	88	107	86
NaCl	78	94	99	84
KCl	65	83	93	78

Existen numerosos estudios que demuestran la influencia de los cationes divalentes en la actividad de las enzimas de origen ofídico. Algunos de ellos han mostrado que los aniones monovalentes Cl^- y Br^- elevan la actividad de la enzima purificada como en el caso del veneno de *L. muta*⁸. En nuestro caso se verificó que el ion Mg^{+2} un típico activador enzimático en las ponzoñas de serpientes tiene acción sobre hialuronidasa de *B. atrox*, en este caso también se observó semejanza con *B. brazilii*⁹ ya que el Mg^{+2} también incrementaba su actividad. Aun cuando en este estudio no se hizo el análisis de iones divalentes asociados a la estructura enzimática, no existe ningún reporte hasta la fecha sobre la presencia del ion Mg^{+2} como cofactor de la hialuronidasa.

Por otra parte, en varias enzimas ofídicas, se ha demostrado la influencia de los L-aminoácidos en el incremento o reducción de la actividad específica. La glicina tuvo efecto inhibitorio al reducir la actividad en 39 y 44 % a las concentraciones de 6 mM y 12 mM, respectivamente. Por otro lado, el ácido glutámico, así como el glutatión mostraron valores de inhibición menores al 20 % (tabla 2). Para el caso de la glicina, este aminoácido puede estar trabando el acceso del sustrato al sitio activo u obstruyendo a los residuos involucrados. De hecho, la glicina que es un zwitterion ($\text{pI} = 5,97$) tiene la capacidad de interactuar con la proteína a través de sus grupos cargados negativa y positivamente, y debido a su tamaño pequeño no es impedido estéricamente de unión débil a múltiples partes de la proteína¹⁵.

Tabla 2. Efecto de aminoácidos sobre la actividad de la hialuronidasa.

Concentraciones	% de Inhibición de la Actividad Enzimática		
	Aminoácidos		
	Glicina	Glutati6n	Ac. Glutámico
3 mM	33	19.5	9
6 mM	39	18.5	17
12 mM	44	17.7	19

Análisis de la toxicidad, capacidad difusora y reactividad antigénica de la enzima

La enzima no produjo daño alguno al ser inyectado intraperitonealmente; con ello se demuestra que carece de toxicidad, lo cual también ha sido reportado para las hialuronidasas de *Agkistrodon contortrix contortrix*⁴, *Agkistrodon acutus acutus*⁵, *Lachesis muta*⁸ y *B. brazil*⁹ entre otros venenos.

Para comprobar la acción difusora de la hialuronidasa se usó como parámetro la actividad hemorrágica que posee el veneno de *B. atrox* (Foto 1). De acuerdo con ello, 1,4 µg de veneno produce un área hemorrágica de 10 mm¹¹. Cuando el veneno fue calentado a 60 °C el área hemorrágica se redujo a 2,5 mm en comparación al control positivo. La enzima purificada no produjo ninguna área hemorrágica, no obstante, amplió el área hemorrágica del veneno crudo a 12,8 mm. Por último, el veneno calentado mezclado con la enzima activa originó una área hemorrágica de 3,7 mm. Estos resultados muestran concordancia con la prueba de difusión mediante hemolisis en placas⁸ ya que, en ambas, se monitoreo el efecto difusor de la hialuronidasa.

Adicionalmente, la prueba de inmunodifusión permitió establecer la antigenicidad de la enzima cuya reactividad se evidencia frente al antiveneno botrópico polivalente ya que se forma una línea de precipitina bien definida; el veneno crudo, enfrenteado al mismo antiveneno produjo al menos 5 líneas de precipitación. Esta misma reactividad se ha visto en los estudios de esta enzima en *L. muta*⁸ y *B. brazil*⁹.

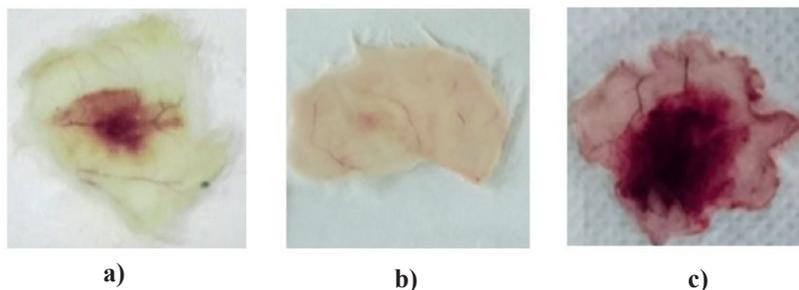


Foto 1. Efecto difusor de la enzima purificada. Se evaluó por el incremento del área hemorrágica, causada por el veneno total en comparación con el área obtenida al adicionar la enzima purificada. Hemorragia producida por el veneno total b) ausencia de hemorragia al inocular la enzima purificada c) hemorragia producida por el veneno total más la enzima purificada.

Amplificación y secuenciación de la secuencia nucleotídica

A partir de 400 μL de veneno fresco obtenido por presión manual a un ejemplar de *Bothrops atrox* se obtuvo 40 μL de RNA total, con ello se procedió a su conversión en cDNA el cual fue utilizado para amplificar el gen de interés.

Los cebadores diseñados, en dirección 5' \rightarrow 3', fueron: HD1: ctcccgggatgttactcgtgg, HD2: atttgaaggtcgttcttctca, HD3: ataatcaaaatcgatattga, HDr4: ccagtttccagtcagtcaatgact, HD5: tgaacatattgagggtcaagt, HD6: attgggacgttatcgttaa, HDr7: cacatctccagtttcttgca, HDr8: ccagtttctttacaatcac, HDr10: ttcttaattttaattacagc. El posicionamiento de estos cebadores dentro de la secuencia consenso se muestran en la figura 1. Los amplicones obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y preparados para su secuenciación.

El ensamblaje de los segmentos obtenidos permitió la identificación de una secuencia constituida por 2020 pares de bases, la cual fue depositada en la base de datos del GenBank del NCBI con código de acceso KY499627, el análisis por BLASTn, evidenció una notoria homología con otras secuencias pertenecientes a hialuronidasas de origen ofídico depositadas en la base de datos, siendo la más homóloga la hialuronidasa de *Protobothrops mucrosquamatus* (GenBank: XM_015822281) con una identidad del 95 % y una longitud de cobertura del 98 %.

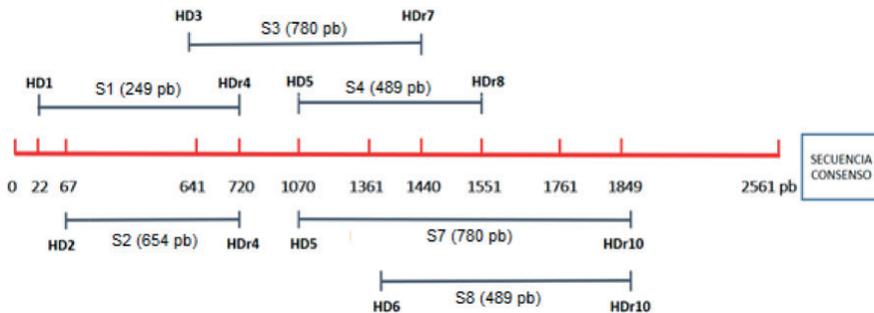


Figura 1. Segmentos de la secuencia consenso para la obtención del gen de la hialuronidasa de *B. atrox*.

Obtención de la secuencia aminoacídica

El análisis con el Programa ORF finder dio un marco de lectura +1, con búsqueda limitada al codón de iniciación ATG, para una secuencia proteica de 449 aminoácidos, corroborado con el programa Translate Tool. La proteína deducida (figura 2) se enmarca a partir del nucleótido 178 hasta el nucleótido 1350 con el codón stop TAA determinándose una región nucleotídica no traducida 5' (UTR 5') de 177 pb y una UTR 3' de 669 pb.

El programa Signal P predijo un péptido señal de 20 aminoácidos en la posición N-terminal (figura 2), los 429 aminoácidos restantes, conforman la proteína madura que al ser analizada con el programa BLASTp determina homología con otras hialuronidasas, siendo

la hialuronidasa de *Bothrops moojeni* (ATU85542) la de mayor identidad (98 %) con una longitud de cobertura del 100 %. La secuencia proteica de *Bothrops atrox*, producida en el presente estudio, fue denominada como Ba-Hyal y también se encuentra depositada en la base de datos con el código de acceso AUF71538.

Por otro lado, el análisis de la secuencia primaria con el programa ProtParam deduce una masa molecular de 50.10 kDa con un pI. teórico de 9.19 estableciéndose la naturaleza básica de esta enzima. Se obtuvo un total de 6994 átomos. El coeficiente de extensión molecular fue de 88405 M⁻¹ cm⁻¹ y un índice alifático de 76.15.

La composición de los aminoácidos de la proteína madura mostró que el aminoácido más abundante fue la leucina (37 residuos, 8,6 %) en tanto que la cisteína y el triptófano fueron los menos abundantes (ambos con 10 residuos, 2,3 %).

Asimismo, mediante el programa NetGlyc fueron identificados 6 motivos de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr). No obstante, sólo cuatro de los residuos en las posiciones Asn¹⁰³, Asn¹¹¹, Asn¹⁵³ y Asn³⁵⁷ resultaron con un mayor score.

```

acctgctgtctctgctggctcaaatggctttgcttcaactggggcttggaaactgctctttctt 69
gggaactgttcaactgcccctgtgtgtgtgtggaccctactgggtggatggactggaaacctgga 138
cttggcctggaactaacgaccagcaaaaatctgcaatattatgatatgcactatggatcaaatgctgga 207
1 M Y H L W I K C L A
gcttgatattttctgaagagatttaaggagttcatgttatgcagcccaagctccaatgtatccta 276
11 A W Y F L K R F N G V H V M Q A K A P M Y P N
ggaccttctctgtgttctggaatgcaactaccaccaatgtcgctgogctataagtggtatagat 345
34 E P F L V F W N A P T T Q C R L R Y K V D L D
cttaagacttttcaactgttaacaaatgccaatgactctttaaagggtctgctgacaaatttat 414
57 L K T F H I V T N A N D S L S G S A V T I F Y
ctcactttgggagctctatccccatattgatgacctggggcttctccaatgggattataccgcaa 483
80 P T H L G V Y P H I D D R G H F F N G I I P R
aacgaaagctgctggaacatctcaataataacaaatcggtatataatcgtatgatcccactgggaca 552
103 L V K H L N K S K S D I N R H T P L R T
tttcatggacttggagctattgactgggaaactggagaccocagggatgagaactgggcaataa 621
126 F H G L G V I D W N W R P Q W D R N W G S K
aatgtttacagaaacagatctattcaatttctgtagagattgaccaccaaatgtctggaagataaact 690
149 N V Y R N R S I Q F A R D L H P E L S E D K I
aagagattagctaacgaggaattgaaaaagctgcaaaagagtttcatgagagatcacactttactagct 759
172 K R L A K Q E F E K A A K S F M R D T L L A A
gaaagaaatggcagagatattggctactactctgctatccagattggcacaattataataaag 828
195 E E M R P D G Y W G Y Y L Y P D C H N Y N Y K
acaaaactgcatcaacacagagagatgctccagatattgaaatgcaaggaataatcagctacttgg 897
218 T K P D Q Y T G E C P D I E M S R N N Q L L W
ctatggagagacagactgccccttttctcaatataatcttgaaccatattgaggctcaagtaacaat 966
241 L W R D S T A L F P N I Y L E T I L R S S D N
gcttgaatatttggaccatcgccctaaagaaagcaatgcgactgttccatggctagagaaatgaa 1035
264 A L K F V H H R L K E A M R I A S M A F N D Y
gcttgccttttttggatattgcccagcgttctatgcatatcccttgaaccttaacacagagaagc 1104
287 A L P F F V Y A R P F Y A Y T F E P L T Q E D
ttggtgactactgttgggtaaacagcagacatggggcgagcaggaattgtctttggggaagcagca 1173
310 L V T T V G E T A D M G A A G I V F W G S M Q
tatgcagctacggtgaaagctggaagagtgaaagactatgaatggtccatgggagctatattc 1242
333 Y A S T V E S C G K V K D Y M N G P L G R Y I
gttaatgtaactactgcagccaagattgcagcgtttccttggcaagagacatggaagtgtgtcga 1311
356 V N V T T A A K I C S R F L C K R H G R C V A
aaacatagtgatcaaatgccccttcaactgtttctctgatattcaggatcatggtcgtatggcaat 1380
379 K H S D S N A F L H L F P D S F R I M V H G N
gcaacagaaaaaaagtgattgtaaaagaaaattggagtggaagaaattgatttctttaaagaaatac 1449
402 A T E K K V I V K G K L E L F N L I F L R N N
tttatgtgccaggttaccagagttggaagagactatattggaagactctataaagagataaagg 1518
425 F M C Q C Y Q G W K G L Y C E K H S I K E I R
aaaataaagaaataaattgcatggaagactcttcttatttcccccaaaaacaaaattgccaac 1587
448 K I -
agatcacaaagcaaaaatccagcttgaactcaggggcaattctatagatctctcgaagacttgcaa 1656
atattgtaaacctttaaagtttcaagcaaaatagatctgtaataaaaaatcaaggaaaaaagagaca 1726
cagtggttctgtaactgaaatgcttgggagagaagagacatgactgttttccagactctgggtc 1794
taactaaataaaacctttgcttcccttttctcgcactccaactggaggtgggttcttctactccta 1863
actcttctcagagcttcagaagtgaaattaggaatgcatcttctgtaaatgcaagccactttttc 1932
tctaccctccccccccactctcccccaaatataaagattgtgtggaatgaaaaagaaata 2001
tttttaatttataaac 2020
    
```

Figura 2. Secuencia nucleotídica y secuencia de aminoácidos inferida de la hialuronidasa de *B. atrox*.

Los numerales a la derecha e izquierda de la figura se refieren las secuencias de nucleótidos y de aminoácido, respectivamente. El residuo catalítico conservado (E¹³⁵) los residuos posicionales (D¹³³, Y²⁰⁶, Y²⁵³, W³²⁸) de las hialuronidasas de los vertebrados son identificados en cuadros y subrayados, respectivamente. La terminación del ORF por el codón TAA es indicado por un guion. Los cuatro principales motivos de N-glicosilación están sombreados (N¹⁰³ N¹¹¹ N¹⁵³ N³⁵⁷).

El estudio realizado por Harrison *et al.*¹⁶, basado en secuencias de cDNA de la glándula del veneno de *Echis ocellatus*, constituye la primera secuencia completa de una hialuronidasa del veneno de serpiente. La enzima de esta serpiente tiene cinco sitios de N-glicosilación conservados, tres de los cuales parecían tener alto potencial de glicosilación, esta enzima tiene una alta homología del 95 % con las hialuronidasas de los venenos de *Echis pyramidum leakeyi*, *Bitis arietans* y *Cerastes cerastes cerastes*. Cada uno de ellos ha conservado los residuos de la región catalítica (Glu135), las regiones posicionales (Asp133, Tyr206, Tyr253 y Trp328) y los scaffold de cisteínas (Cys340, Cys211, Cys227, Cys365, Cys370, Cys376 y Cys429). En nuestro caso la hialuronidasa de *B. atrox* también tiene como región catalítica (Glu135) y las mismas regiones posicionales observándose una alta homología a nivel molecular con las enzimas mencionadas.

La comparación de los datos moleculares presentados en este estudio, con respecto a los datos bioquímicos reportados por González *et al.*⁷, determinan una significativa diferencia en el peso molecular, 50 kDa vs 110 kDa. Esta diferencia podría ser explicada por la presencia de glicosilaciones, ya que las hialuronidasas presentan grados de glicosilación que oscilan entre el 10 - 30 % y se ha demostrado la presencia de motivos de N-glicosilación en la secuencia de esta proteína; los estudios de deglicosilación nos darán información sobre los impactos de glicosilación en la masa molecular de la enzima. También se puede hipotetizar dos razones fundamentales para estas diferencias en peso molecular: la primera es que puede tratarse de una isoforma dimérica *per se*, pero los datos de González *et al.*⁷, indican que el 2 β mercaptoetanol no tiene efecto significativo sobre la actividad, no obstante, estudios con agentes reductores más fuertes como el DTT pueden dar más luces al respecto. La segunda opción sería una dimerización en solución, a un pH ácido los residuos de metionina y cisteína (con radical expuesto) tienden a oxidarse y promover la dimerización, por lo que el análisis de espectrometría de masas podría explicar este comportamiento.

Las expectativas que han abierto los estudios moleculares son muchas, especialmente en el entendimiento de la estructura y los mecanismos de acción de la enzima hialuronidasa de *Bothrops atrox* en el proceso de envenenamiento para de esta forma, poder diseñar una mejor estrategia de neutralización de los componentes tóxicos de dicha ponzoña.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo corroboran la presencia de la enzima hialuronidasa de la serpiente peruana *Bothrops atrox* y su rol difusor de los componentes tóxicos del veneno. Los análisis moleculares *in silico* determinan un peso de 50 kDa con un pI 9.19, lo que indica la presencia de modificaciones postraduccionales como las glicosilaciones o una posible versión dimérica de la proteína. Este singular hecho abre nuevas expectativas para el estudio de esta enzima. Asimismo, la enzima es activada por el ion magnesio e inhibida por el aminoácido glicina y es reconocida por el suero antibotrópico polivalente (INS-Perú).

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este artículo agradecen el financiamiento a Innóvate Perú, Proyecto Contrato N°131-FINCYT-IB-2013 “Producción de antivenenos específicos contra serpientes peruanas empleando tecnología IgY”. El presente trabajo fue parte de la tesis de Maestría en Biología Molecular del autor principal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Menzel EJ, Farr C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett.* 1998; 131:3-11.
2. Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol.* 2004; 83, 317-325.
3. Meyer K. Hyaluronidases In: Boyer, P.D. (Ed.). *The enzymes.* New York: Academic press; 1971. pp: 307-320.
4. Kudo K, Tu AT. Characterization of hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* (Southern Copperhead) venom. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 386: 154–162.
5. Xu X, Wang X, Liu X, Huang J, Lu Z. Purification and partial characterization of hyaluronidase from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. *Toxicon.* 1982; 20: 973-981.
6. Girish KS, Kemparaju K. A low molecular weight isoform of hyaluronidase: Purification from Indian cobra (*Naja naja*) venom and partial characterization. *Biochem (Mosc.)* 2005; 70:708–712.
7. Hurtado L, Lerma L, Rodríguez E y Yarlequé A. Evaluación Aislamiento y algunas propiedades bioquímicas de una hialuronato glucanohidrolasa del veneno de la serpiente Peruana *Lachesis muta* “shushupe”. *Rev Soc Quim Perú.* 2007; 73(4): 226-234.
8. González E, Ortiz C, Sandoval G, Lazo F, Delgadillo J, Rodríguez E, Severino R, Yarlequé A. Purificación y caracterización bioquímica de un factor de difusión presente en el veneno de la serpiente *Bothrops atrox* “jergón”. *Rev Soc Quim Perú.* 2013; 79(1): 3-12.
9. Delgadillo J, Palomino M, Lazo F, Rodríguez E, González E, Severino R, *et al.* Purificación y algunas propiedades de una hialuronidasa de la serpiente *Bothrops brazili* “jergon shuhupe”. *Rev Soc Quim Perú.* 2013; 79(4):348-358.
10. Di Ferrante N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *Med Res.* 1955; 303-306.
11. Isla M, Málaga O, Yarlequé A. Características bioquímicas y acción biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili*. *An Fac Med.* 2003; 64(3): 159-166.
12. Segura A, Castillo MC, Núñez V, Yarlequé A, Gonçalves LR, Villalta M, *et al.* Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medical – relevant *Bothrops* snake venoms. *Toxicon.* 2010; 56(6):980-9.
13. Vivas-Ruiz D, Sandoval G, Mendoza J, Inga RR, Gontijo S, Richardson M, Eble JA, Yarleque A, Sánchez EF. Coagulant thrombin-like enzyme (barnettobin) from *Bothrops barnetti* venom: molecular sequence analysis of its cDNA and biochemical properties. *Biochimie.* 2013; 95(7):1476-86. doi: 10.1016/j.biochi.2013.03.015.

14. Cevallos M, Navarro Duque C, Varela-Julia M, Alagon C. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate- polyacrilamide gel electrophoresis. *Toxicon* 1992; 30: 925-930.
15. Jaworek MW, Schuabb V, Winter R. The effects of glycine, TMAO and osmolyte mixtures on the pressure dependent enzymatic activity of α -chymotrypsin. *Phys Chem Chem Phys*. 2018 Jan 17; 20(3):1347-1354. doi: 10.1039/c7cp06042d.
16. Harrison R, Ibson F, Wilbraham D, Wagstaff S. Identification of cDNAs encoding viper venom hyaluronidases: Cross- generic sequence conservation of full length and unusually short variant transcripts. *Gene*. 2007; 392: 22-33.

EFICIENCIA DE LA RESINA LEWATIT MONOPLUS M 600 EN LA REMOCIÓN DE NITRATOS EN AGUAS PARA CONSUMO HUMANO

Tania E. Guerrero Vejarano^{a*}, Óscar G. Anaya Fernández^b

RESUMEN

En varias partes del mundo las fuentes de agua son contaminadas por nitratos, principalmente por actividades antropogénicas, siendo una potencial amenaza para la salud, la presente investigación tuvo como objetivo determinar la eficiencia de la resina convencional de intercambio iónico LEWATIT MonoPlus M 600 (aniónica de base fuerte) en la remoción de nitratos, se utilizó el método de espectroscopia Uv-Vis para la cuantificación de nitratos, asimismo se construyó las columnas de intercambio iónico con diámetro de 1", 0,05 L de volumen de resina y una altura de columna de 40 cm, donde se evaluó la eficiencia de las columnas de intercambio iónico, se manejó dos variables, el tiempo de operación y diferentes concentraciones de nitratos. Se determinó que la mayor eficiencia de la resina fue de 99,55 %, a una concentración de 6,45 meq de NO_3^- (400 ppm) en un tiempo de 30 min. La eficiencia más baja de 18,61 % se encontró para la concentración de 16,13 meq de NO_3^- (1000 ppm) en 120 min de operación de la columna. En el análisis de las aguas de Tingo María se determinó que el Pozo 5 de Villa Potokar fue el único que supera los límites máximos permisibles tal como lo indican los estándares de calidad ambiental nacional de agua (10 ppm de NO_3^- de N total o 45 ppm de NO_3^-) con una concentración de 52,76 ppm, por lo tanto, no es apta para consumo humano sin previo tratamiento.

Palabras clave: Nitratos, resinas de intercambio iónico, eficiencia

EFFICIENCY OF THE LEWATIT MONOPLUS M 600 RESIN IN THE REMOVAL OF WATER NITRATES FOR HUMAN CONSUMPTION

ABSTRACT

In several parts of the world the water sources are contaminated by nitrates, mainly by anthropogenic activities, being a potential threat to health, the present investigation had as objective to determine the efficiency of the conventional ion exchange resin LEWATIT MonoPlus M 600 (anionic strong base) in nitrate removal, the Uv-Vis spectroscopy method was used for the quantification of nitrates, as well as the ion exchange columns with a diameter of 1", 0.05 L of resin volume and a height of 40 cm column, where the efficiency

^a Universidad Nacional Agraria de la Selva -Carretera Centra km 1.21 Tingo María. Cp 10131 Perú.
taniaguerrero@unas.edu.pe

^b Ministerio de Vivienda

of the ion exchange columns was evaluated, two variables were managed, the operation time and different concentrations of nitrates. It was determined that the highest efficiency of the resin was 99.55 %, at a concentration of 6.45 meq of NO_3^- (400 ppm) in a time of 30 min. The lowest efficiency of 18.61 % was found for the concentration of 16.13 meq of NO_3^- (1000 ppm) in 120 min of column operation. In the analysis of the waters of Tingo María it was determined that Well 5 of Villa Potokar was the only one that exceeds the maximum permissible limits as indicated by the national environmental water quality standards (10 ppm of NO_3^- of total N or 45 ppm of NO_3^-) with a concentration of 52.76 ppm, therefore it is not suitable for human consumption without previous treatment

Key words: Nitrates, ion exchange resins, efficiency

INTRODUCCIÓN

Generalmente, las fuentes de aguas subterráneas y superficiales son contaminadas, en algunos lugares el agua subterránea sirve como la única fuente de agua potable en las comunidades rurales y las zonas urbanas. Las actividades antropogénicas como la agricultura, la explosión demográfica y la industria generan contaminantes tóxicos tales como aniones inorgánicos, iones metálicos, productos químicos orgánicos sintéticos, residuos orgánicos, etc., que cada año se incrementa sustancialmente que afecta directamente a la calidad de las fuentes de agua. Muchos aniones inorgánicos son tóxicos y nocivos para los seres humanos, principalmente los que no se perciben a simple vista en el agua potable debido a la gran solubilidad que pueden tener en el agua, esto aumenta los posibles riesgos para la salud¹. Dentro de los aniones inorgánicos peligroso para los seres vivos están los nitratos (NO_3^-). El aumento de los niveles de NO_3^- se asocia especialmente al uso intensivo de fertilizantes en la agricultura, lo que ha llevado a una mayor contaminación de las fuentes de agua subterránea y superficial². Los nitratos no se unen fácilmente al suelo, por lo que se lixivian fácilmente, la contaminación del agua ocurre por escorrentía agrícola y urbana, eliminación de aguas residuales no tratadas, desperdicios industriales, fugas de pozos sépticos, lixiviados de vertederos, estiércol animal, desechos de extracción de aire NO_x de los dispositivos de control de la contaminación del aire³. Estos aniones son una gran amenaza para la salud de animales y seres humanos. En seres humanos causa dos efectos para la salud: inducción del "síndrome del bebé azul" (metahemoglobinemia), especialmente en lactantes y formación potencial de nitrosaminas cancerígenas⁴. Los nitratos, debido a su alta solubilidad en agua⁵, un contaminante difícil de eliminarlo en las fuentes de agua en el mundo, en algunos lugares la fuentes de agua tienen capacidad natural de eliminarlos como algunas cuencas donde hay una interface agua dulce y salada, las reacciones de oxidación y reducción pueden atenuar estos contaminantes⁶, pero por lo general es una preocupación mundial, existen varios reportes de investigaciones para eliminar aniones inorgánicos como los NO_3^- , dentro de ellos tenemos el carbón activado que muestra poca adsorción hacia los aniones inorgánicos como los NO_3^- ⁷, las arcillas capturan cationes y aniones ya sea a través de iones de intercambio, adsorción o ambos sobre todo tienen acción cuando son tratadas con surfactantes⁸, así como también los hidróxidos dobles en capas (LDH), remueven materiales inorgánicos con propiedades deseables para eliminar

los contaminantes aniónicos del agua como los NO₃⁻, con una eliminación era de 85,5 %⁹, la zeolita cubierta con una capa de quitosano protonada con ácido fue probada satisfactoriamente para eliminar NO₃⁻¹⁰. El uso de materiales de desecho agrícola ha sido estudiado para la eliminación de NO₃⁻ a partir de soluciones acuosas¹¹ y las resinas de intercambio iónico Purolite A 520 son muy eficientes en la remoción de nitratos¹⁰. Generalmente, hay varios tipos de resinas de intercambio iónico que se ofertan en el mercado, sin embargo, no todas presentan la misma eficiencia, dicha información es importante para la elegir la resina adecuada, ya que son procesos costosos, en este trabajo se presentan los resultados de la resina convencional aniónica de base fuerte con resultados prometedores a un costo mucho más bajo en donde el objetivo principal fue determinar la eficiencia de la resina antes mencionada.

PARTE EXPERIMENTAL

1.1 Lugar de ejecución: Se realizó en la Universidad Nacional Agraria de la Selva, Facultad de Recursos Naturales Renovables, Laboratorio de Fitoquímica y Tratamiento de Aguas Residuales.

1.2 Equipos: Bomba peristáltica, espectrofotómetro AQUAMATE ORION 8000 UV-visible, cronómetro. **Materiales:** material de uso común de laboratorio, tubería de PVC categoría 10 de 1", tapas rosca para tubería de PVC, mangueras, recipiente de plástico de 16 litros. **Reactivos:** Resina de intercambio iónico LEWATIT MonoPlus M 600 (aniónica de base fuerte), Solución de cloruro de sodio ACS; ISO; Reag. Ph Eur adquirido de Merck, nitrato de potasio (KNO₃) ACS, ISO, Reag. Ph Eur. Adquirido de Merck

1.3 Diseño y construcción de la columna: Para el diseño y construcción de la columna se tomaron las siguientes consideraciones^{12,13}.

Volumen de Servicio: (Vs)

$$V_s = \frac{REC}{IRC} \dots \dots \dots (1)$$

Donde: Vs: Volumen de servicio (L/m³), volumen de agua en litros que puede soportar un metro cúbico de resina hasta su regeneración. REC: Capacidad de la resina (kg/m³). IRC: Concentración del ion a eliminar (kg/L)

Tiempo de servicio: (St)

$$St = \frac{V_s}{SRT} \dots \dots \dots (2)$$

Donde: St: Tiempo de servicio. SRT: Caudal de flujo de servicio = L/h/m³

Determinación del volumen de resina: (Vol)

$$Vol = \left[\frac{IRC * Q}{REC} \right] * [St] \dots \dots \dots (3)$$

Donde: **Vol**: Volumen de resina (L). **Q**: Flujo total L/h (5,8 L/h)

Determinación del volumen de la columna: (V_c)

$$V_c = \text{Vol} * FE \dots\dots\dots (4)$$

Donde: FE = 4 (para resinas aniónicas de base fuerte).

Determinación de la altura de la columna

$$hc = \frac{V_c * 4}{\pi * d} \dots\dots\dots (5)$$

Donde:

V_c= volumen de columna (L). **d**= diámetro de la tubería en la columna a utilizar (1")

h = altura de la columna (cm)

1.4 Construcción de la curva de calibración para medir la concentración de nitratos: Se pesó 0,18452 g KNO₃, se aforo a un volumen de 250, se tomó 25 mL de la solución madre y se aforo a 250 mL, a partir de esta solución intermedia se preparó 5 estándares de 0; 0,90; 2,71; 4,52; 6,33 ppm, Los mismos que fueron tratados con 1 mL de HCl 0,1 N, se dejó reposar 30 minutos antes de aforarlos a 50 mL. Se realizó las lecturas en el espectrofotómetro utilizando las cubetas de cuarzo a una longitud de onda de 220 nm.

1.5 Colección de las muestras de agua de Tingo María: Las muestras se tomaron el 16/08/2013 en dos pozos de Castillo Grande, el 04/11/2013 en Brisas del Huallaga, y Villa Potokar, 12/11/2013 en la quebrada Cocheros y Naranjal. Para las muestras de agua de pozo se utilizó el muestreo simple o de sondeo a 4,5 metros de profundidad y para aguas superficiales el muestreo integrado, en ambos casos, fue manual y se siguió la cadena de vigilancia (etiquetado, sellado y registro), las muestras se almacenaron en botellas de vidrio hasta ser analizadas en el laboratorio el mismo día, se tomaron tres muestras por punto de muestreo.

1.6 Determinación de la eficiencia de la columna de resinas de intercambio iónico: La eficiencia de la columna se evaluó a un caudal establecido, se tomó muestras en la salida de la columna, a diferentes tiempos de trabajo tales como: 30, 60, 90 y 120 minutos, en las cuales se determinó la concentración de nitratos a cada muestra recogida y se analizó la concentración de nitratos por triplicado con el espectrofotómetro UV-VIS, la eficiencia se calculó con la siguiente fórmula

$$\text{Eficiencia}(\%) = \frac{[\text{meqNO}_3^-]_{\text{entrada}} - [\text{meqNO}_3^-]_{\text{salida}}}{[\text{meqNO}_3^-]_{\text{entrada}}} * 100 \dots\dots\dots (6)$$

Donde: meq NO₃⁻: miliequivalentes de nitratos

Variables independientes: Tiempo de operación: 30 min, 60 min, 90 min y 120 min.

Concentración de nitratos: 16,13; 12,9; 9,68 y 6,45 meq.

Variables dependientes: Eficiencia de la remoción de nitratos, disminución de meq NO₃⁻.

El diseño experimental fue DCA con arreglo factorial de 4x4. El análisis estadístico de los datos se realizó con el software estadístico R

1.7 Análisis de las aguas de Tingo María: Se analizó la concentración de nitratos (NO₃⁻) de las aguas de consumo de Tingo María, antes y después de ingresar a la columna de intercambio iónico con el método antes descrito dentro de ellas esta: agua subterránea de pozo del centro poblado menor de Castillo Grande, asentamiento humano Brisas del Huallaga, Lotización Villa Potokar y de la ciudad universitaria

1.8 Determinación de la capacidad real de la resina, volumen de agua de regeneración y lavado

Determinación de la capacidad real de la resina: Se calculó la capacidad real de la resina, con la cantidad de gramos que ha atrapado ésta durante el proceso hasta su límite. Conociendo el caudal de trabajo y la concentración de las aguas, se procede a realizar los cálculos para determinar la capacidad experimental de la resina

$$C = \frac{Tc * Q * [NO_3^-]}{Vol} \dots\dots\dots (2)$$

Donde: C: capacidad real de la resina (g/L) Tc: Tiempo de ruptura (h); Q: Caudal de entrada del agua a la columna (L/h); [NO₃⁻]: Concentración de nitratos (g/L);

Vol: Volumen de resina (L)

Después de determinar la capacidad de remoción experimental de la resina, se comparó con la capacidad de remoción teórica y se determinó la capacidad real de la resina.

Determinación del volumen de agua de regeneración y lavado: Para regenerar la resina se utilizó una solución de NaCl al 10 %, el volumen se estimó estequiométricamente según el ratio de regeneración (Rg)

$$Rg = \frac{[eq NaCl]}{[1.25 eq]} \dots\dots\dots (3)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño y construcción de la columna:

Tabla 1. Datos de diseño.

Parámetro de diseño	Cantidad
Volumen de servicio (Vs) =	77,5 L/m3 de resina
Tiempo de servicio (Ts) =	0,66 h
Volumen de columna (Vc) =	0,1972 L
Volumen de resina (Vr) =	0,049 L
Altura de columna (Hc) =	38,919 cm

Fuente: Datos calculados con las ecuaciones de diseño

En el diseño de las columnas de intercambio iónico se consideró los criterios del Manual de Ingeniero Químico¹³, el diseño coincide con un reporte de columnas hechas a partir de cloruro de polivinilo (PVC) con 1” de diámetro, 16 cm de longitud con un volumen de 0,06 mL con resina macroporosa de intercambio catiónico, o LayneRT (Layne Christensen Co., The Woodlands, TX) y una resina de intercambio de aniones modificada con nanopartículas de óxido ferroso¹², en la presente investigación se usó 0,05L de resina a diferencia de lo reportado la cantidad de resina depende de la densidad y las propiedades de las mismas¹³.

Curva de calibración:

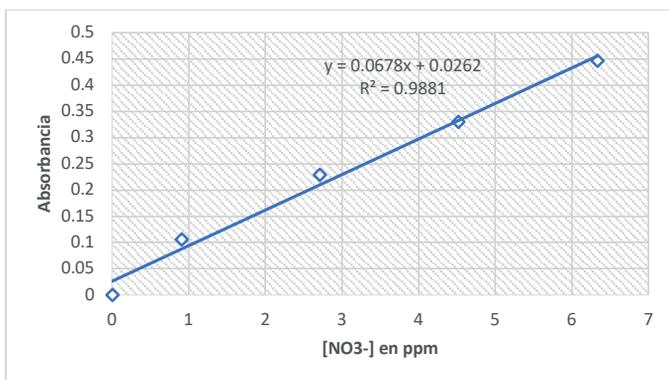


Figura 1. Curva de calibración para determinación de la concentración de nitratos en ppm.

La curva de calibración cumple con la Ley de Beer como se observa en la figura 1, con un coeficiente de correlación R^2 óptimo cercano a 1, por lo tanto, se puede asegurar la confiabilidad de los resultados de las concentraciones de nitratos reportados.

Determinación de la eficiencia de la columna:

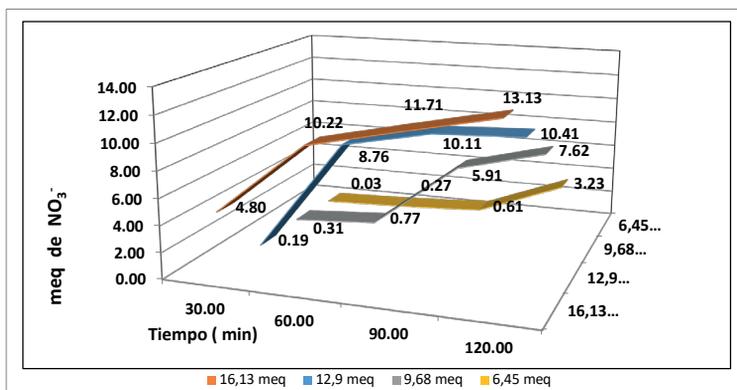


Figura 2. meq. de NO₃⁻ remanentes en función del tiempo.

La cinética de remoción de meq NO_3^- depende de la concentración inicial de la solución que ingresa a cada columna, el tiempo de operación, el pH y la capacidad de la resina o absorbente utilizado. La concentración de 6,45 meq de NO_3^- presentó 0,61 y 3,23 meq de NO_3^- remanentes a los 90 y 120 minutos, respectivamente, la columna tiene buena capacidad de eliminación hasta los 90 min., luego baja su capacidad en un 50 %, aproximadamente. La concentración de 9,68 meq presentó 0,77 meq remanentes a los 60 min, su capacidad de intercambio es óptimo hasta ese tiempo. La concentración de 12,9 meq a los 30 min presentó 0,19 meq remanentes y la concentración de 16,13 meq de 4,80 meq, se aprecia que la capacidad de intercambio de la primera es óptima hasta los 30 min y la segunda debido a la alta concentración de meq no realiza el intercambio iónico de manera eficiente (figura 2). Los tiempos ya mencionados alcanzan una considerable eliminación de nitratos, la resina es óptima para remover los nitratos si comparamos con los reportes siguientes. La capacidad de adsorción de la tela de carbono tratada con ácido para remover NO_3^- y NO_2^- , fue de 2,03 y 1,01 mmol/g, respectivamente⁷. Entre todas las organoarcillas, HDTMA QLD-bentonita modificada mostraron mejor resultado: H-B-2CEC y H-B-4CEC podrían eliminar 0,20 meq y 0,24 meq de NO_3^- /g de organoarcilla, respectivamente⁸. Los hidróxidos dobles preparados (Ni-Fe) fue estudiado su potencial para eliminar NO_3^- usando agua de mar enriquecida NO_3^- a una concentración de 40 mol/dm³, donde la máxima de NO_3^- fue de 0,33 mmol/g cuando se añadió LDH (Ni-Fe)⁹. La Chitosan cubierta con zeolita (Ch-Z) protonado con HCl, tiene capacidad de intercambio iónico para NO_3^- de 0,74 mmol NO_3^- /g de Ch-Z¹⁰. Las resinas y adsorbentes antes mencionados tienen poca capacidad de intercambio iónico a diferencia de la resina de intercambio iónico selectiva para nitrato Purolite A 520E¹⁴ que tiene una alta capacidad de intercambio iónico, la idea es dar otras alternativas a la resina específica considerando los costos y la accesibilidad de la misma sobre todo para zonas rurales y urbanas donde las fuentes de agua, principalmente las subterráneas son contaminadas por nitratos.

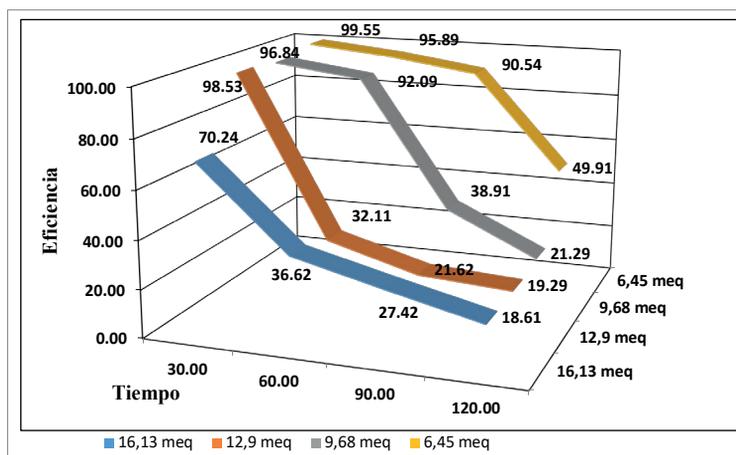


Figura 3. Eficiencia de la columna en función del tiempo de operación.

Después de analizar los meq de NO_3^- remanentes en función del tiempo, se evaluó la eficiencia de las columnas de intercambio iónico con la resina antes mencionada y extrapolar datos respecto a que tan eficientes son a diferentes concentraciones y hasta que tiempo de operación trabaja de manera óptima el intercambio iónico, estos datos son importantes para los interesados en remover nitratos que como ya se dijo causan problemas de salud. Se determinó que 6,45 meq de NO_3^- presentó un buen intercambio iónico hasta los 90 min con una eficiencia de 90,54 %, 9,68 meq de NO_3^- hasta los 60 min tuvo una eficiencia de 92,09 %, 12,9 meq de NO_3^- con 98,53 % de eficiencia a los 30 min y finalmente la solución más concentrada que se evaluó de 16,13 meq con una eficiencia de 70,24 % (figura 2). Uno de los absorbentes de arcilla, montmorrillonita de calcio activada por HCl mostró hasta una capacidad de eliminación de NO_3^- hasta 22,28%⁸. La eliminación de NO_3^- con Hidróxidos de doble capa (LDH) se encontró que era 85,5 % bajo ciertas condiciones, usando 0,3 g de LDH en 100mL de solución de NO_3^- con una concentración inicial de 10 mg/L⁹. La resina ALR-AE, presentó una capacidad de absorción de 87,2 %, el proceso fue de aproximadamente 10 min¹⁵. Las columnas de intercambio iónico presentan una buena eficiencia, considerando que se usó concentraciones muy altas con respecto a las concentraciones que normalmente se encuentran las fuentes de agua ya sea subterránea o superficial.

Análisis de las aguas de Tingo María

Tabla 2. Eficiencia de remoción de nitratos (NO_3^-) de las aguas de Tingo María.

Muestras	Lugar	Concentración	Concentración	Eficiencia (%)
		Entrada (ppm)	Salida (ppm)	
1	Quebrada Cocheros (reservorio)	13,16	0,02	99,84
2	Quebrada Naranjal (reservorio)	14,38	0,04	99,70
3	Pozo 1 (Castillo Grande)	18,2	0,08	99,57
4	Pozo 2 (Castillo Grande)	19,4	0,08	99,58
5	Pozo 3 (Brisas del Huallaga)	22,81	0,15	99,34
6	Pozo 4 (Villa Potokar)	43,88	0,23	99,48
7	Pozo 5 (Villa Potokar)	52,76	0,58	98,90

Fuente: Datos reportados del Espectrofotómetro Orion Aquamate UV-vis 8000.

Después de analizar la concentración de NO_3^- en las aguas subterráneas y las quebradas, la mayoría están por debajo de 45 ppm, que es el límite máximo permisible tal como lo indica los estándares de calidad ambiental nacional de agua (10 ppm de NO_3^- de N total o 45 ppm de NO_3^-), el único que supera los límites máximos permisibles es el Pozo 5 con una concentración de 52,76 ppm. Asimismo, la columna operó eficientemente con un promedio de aproximadamente 99 % de remoción de nitratos en las aguas de Tingo María.

Determinación de la capacidad de la resina, volumen de agua de regeneración y lavado

Se obtuvo que la resina atrapa 69,9 g/L por lo tanto, la capacidad real de la resina es de 1,112 eq/L, aproximándose al dato teórico del fabricante de 1,25 eq/L. Se determinó que el agua del primer lavado fue aproximadamente 0,5 L por espacio de 10 min, seguido de una generación con NaCl al 10 % con un volumen de 1,2 L durante 10 min y finalmente el lavado 2 con 1,5 L de agua durante 15 min.

CONCLUSIONES

Se determinó que la mayor eficiencia de la resina de intercambio iónico LEWATIT MonoPlus M 600 (aniónica de base fuerte) fue de 99,55 %, para la concentración de 6,45 meq de NO_3^- (400 ppm) en un tiempo de 30 min. La eficiencia más baja de 18,61 % se encontró en la concentración de 16,13 meq de NO_3^- (1000 ppm) en 120 min de operación de la columna. Asimismo, se puede concluir que la resina antes mencionada presenta una considerable capacidad de intercambio iónico a las siguientes condiciones de concentración de meq de NO_3^- : 12,9 con una eficiencia de 96,84 % hasta los 30 min, 9,68 con eficiencia de 92,09 % hasta los 60 min y finalmente para 6,45 con una eficiencia de 90,54 % a los 90 min. Estos datos sirven para extrapolar resultados sobre concentraciones de nitratos a evaluar y estimar el tiempo de operación óptima de la columna. Se obtuvo que la capacidad real de la resina es de 1,112 eq/L, aproximándose al dato teórico del fabricante de 1,25 eq/L.

En el análisis de las aguas de Tingo María se determinó que el Pozo 5 de Villa Potokar fue el único que supera los límites máximos permisibles, tal como lo indica los estándares de calidad ambiental nacional de agua (10 ppm de NO_3^- de N total o 45 ppm de NO_3^-) con una concentración de 52,76 ppm, por lo tanto, no es apta para consumo humano sin previo tratamiento.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Ing. José Luis Paredes Salazar, por el apoyo sobre información de la resina a utilizar y su apoyo con el Laboratorio de Análisis de Tratamiento de Aguas, de igual manera al técnico del laboratorio Carlos Remigio Salazar Salazar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Velizarov S, Crespo JG, Reis MA. Removal of inorganic anions from drinking water supplies by membrane bio/processes. *Rev Environ Sci Bio*. 2004; 3: 361–380
2. Rao EVSP, Puttanna K. Nitrates, agriculture and environment. *Curr Sci*. 2000; 79:1163–1168
3. Romano N, Zeng C. Evaluating the newly proposed protocol of incorporated potassium in nitrate toxicity experiments at different salinities: a case study with the tiger prawn, *Penaeus monodon*, juveniles. *Aquaculture*. 2009; 289:304–309.

4. Majumdar D, Gupta N. Nitrate pollution of groundwater and associated human health disorders. *Ind J Environ Hlth.* 2000; 42:28–39.
5. Thomson TS. Nitrate concentration in private rural drinking water supplies in Saskatchewan, Canada. *Bull Environ Cont Toxicol.* 2001; 66:64–70.
6. Valiente N, Carrey R, Otero N, Soler A, Sanz D, Muñoz-Martín A, et al. A multi-isotopic approach to investigate the influence of land use on nitrate removal in a highly saline lake-aquifer system Albacete, Spain 2018 *Science of the Total Environment* 631–632 (2018) 649–659
7. Afkhami A, Madrakian T, Karimi Z. The effect of acid treatment of carbón cloth on the adsorption of nitrite and nitrate ions. *J Hazard Mater.* 2007; 144:427–431.
8. Bhattacharyya KG, Gupta SS. Adsorption of a few heavy metals on natural and modified kaolinite and montmorillonite: a review. *Adv Colloid Interf Sci.* 2008; 140:114–131.
9. Xi Y, Mallavarapu M, Naidu R. Preparation, characterization of surfactants modified clay minerals and nitrate adsorption. *Appl Clay Sci.* 2010; 48:92–96.
10. Schick J, Caullet P, Paillaud J, Patarin J, Mangold-Callarec C. Batch-wise nitrate removal from water on a surfactant-modified zeolite. *Micro Meso Mater.* 2010; 132:395–400.
11. Orlando US, Baes AU, Nishijima W, Okada M. A new procedure to produce lignocellulosic anion exchangers from agricultural waste materials. *Bioresour Technol.* 2002; 83:195–198.
12. William A, Ileana W, Wiprächtigerc M, Kara L. Effects of operating and design parameters on ion exchange columns for nutrient recovery from urine. *Environ Sci Water Res Technol.* 2018; 4: 828-838.
13. Perry RH, Green DW. *Manual del Ingeniero Químico.* 6ta Edición. Madrid: Editorial McGraw-Hill; 2001. 2577 p.
14. Saba S, Nalan K, Ümran Y, Muserref A, Mithat Y. Removal of nitrate from aqueous solution by nitrate selective ion exchange resins. *React Funct Polym.* 2006; 66:1206–1214.
15. Xing X, Baoyu G, Yaqing Z, Suhong C, Xin T, Qinyan Y, et al. Nitrate removal from aqueous solution by *Arundo donax* L. reed based anion exchange resin. *J Hazard Mater.* 2012; 203-204:86–92

ESTUDIO DE LA BIODEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE ACEITE LUBRICANTE RETENIDOS EN BENTONITA USANDO EL CONSORCIO BACTERIANO OIL EATING MICROBES (*Rodhococcus*, *Pseudomonas* y *Bacillus*)

Jaqueline Chirre Flores^a, Alejandro Patiño Gabriel^b, Raymundo Erazo Erazo^a

RESUMEN

La inadecuada disposición final de residuos industriales peligrosos, tal como la bentonita usada en los procesos de refinación de lubricantes automotrices contaminados, genera una serie de impactos ambientales negativos en los recursos agua, aire y suelo. Para contribuir en la minimización de estos impactos, el propósito de la presente investigación fue evaluar la capacidad de biodegradación de una muestra de aceite lubricante automotriz atrapado en arcilla bentonita, utilizando el consorcio bacteriano Oil Eating Microbes (*Rodhococcus pyridinivorans*, *Pseudomonas montielli* y *Bacillus* sp.).

Para obtener el máximo rendimiento de la biodegradación del aceite (reducción de hidrocarburos totales de petróleo en la arcilla), por el consorcio bacteriano, se realizaron dos pruebas experimentales en un biorreactor de 5 litros de capacidad, donde se midieron la concentración de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo, la primera se realizó durante 13 días y la segunda en 59 días: se obtuvo rendimientos de menos del 2 % y 50 % para la primera y segunda prueba, respectivamente, lo que muestra la reducción de la contaminación de la arcilla bentonita contaminada.

Palabras clave: Aceites lubricantes usados, biodegradación, arcillas bentonita.

STUDY OF THE BIODEGRADATION OF RESIDUES OF LUBRICANT OIL RETINED IN BENTONITA USING THE BACTERIAL OIL EATING MICROBES CONSORTIUM (*Rodhococcus*, *Pseudomonas* and *Bacillus*)

ABSTRACT

The inadequate final disposal of hazardous industrial waste, such as bentonite used in the refining processes of contaminated automotive lubricants, generates a series of negative environmental impacts on water, air and soil resources. To contribute to the minimization

^a Facultad de Química e Ingeniería Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú, jaqui_chirreflores@yahoo.es

^b Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

of these impacts, the purpose of the present investigation was to evaluate the biodegradation capacity of a sample of automotive lubricating oil trapped in bentonite clay, using the bacterial consortium Oil Eating Microbes (*Rodhococcus pyridinivorans*, *Pseudomonas montielli* and *Bacillus* sp.).

To obtain the maximum performance of the biodegradation of the oil (reduction of total hydrocarbons of oil in the clay), by the bacterial consortium, two experimental tests were carried out, in a five liter capacity bioreactor, where the concentration of biodegradation of total petroleum hydrocarbons was measured, the first was performed for 13 days and the second in 59 days: less than 2 % and 50% yields were obtained for the first and second tests respectively, which shows the reduction of contamination of the contaminated bentonite clay, which is one of the environmental problems that it is desired to eliminate, since they cause air, water or soil pollution, affecting the ecosystems both aerial, aquatic or terrestrial.

Key words: Used lubricating oils, biodegradation, bentonite clays.

INTRODUCCIÓN

El aceite lubricante usado (ALU) es todo aceite que ha sido utilizado y se encuentra contaminado con impurezas físicas o químicas y no reúne las condiciones óptimas para el fin para el cual fue producido inicialmente. Los aceites lubricantes usados son considerados residuos peligrosos y existen diversas opciones para disminuir su peligrosidad, pero lo más importante es poder eliminar sus impurezas físicas y químicas, para recuperar el aceite base lubricante. El método tradicional ácido-arcilla, genera una gran cantidad de arcillas contaminadas, que no son reaprovechadas. Las arcillas tipo bentonitas, consideradas como suelos arcillosos montmorilloníticos, son altamente plásticos y expansivos (Duque y Escobar, 2013). Se utilizan como medio filtrante para decolorar aceites lubricantes usados de origen mineral y, luego de esto, la arcilla queda como un residuo contaminado con aceite.

Según Venosa *et al.* (1999), las bacterias gram negativas parecen encontrarse más adaptadas a estas fuentes de carbono. Haritash *et al.* (2009), estudiaron la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), como se muestra en la figura 1. Algunas de las especies bacterianas conocidas para degradar PAHs son las siguientes: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Rhodococcus* spp., *Paenibacillus* spp.

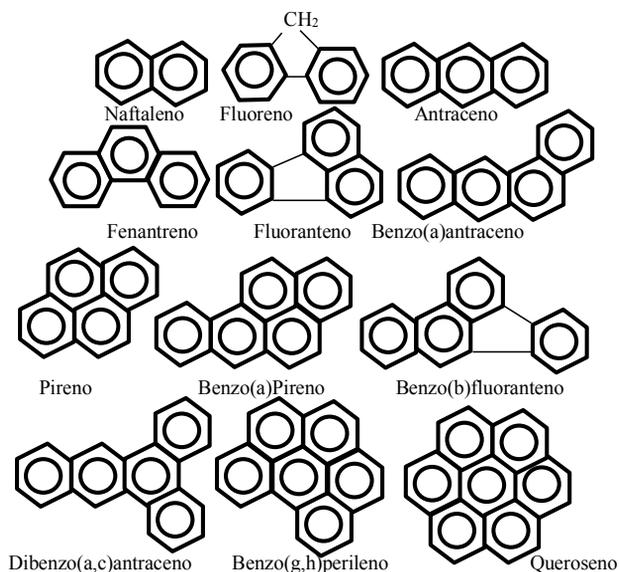


Figura 1. Estructura química de algunos PAHs comúnmente estudiados (Haritash *et al.*, 2009).

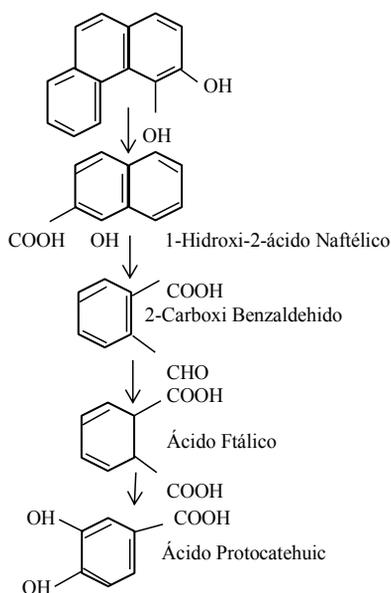


Figura 2. Degradación propuesta del 3,4 – dihidroxi - fenantreno por *Mycobacterium sp.* cepa KR2 (Haritash *et al.*, 2009).

La biodegradación de los PAHs ha sido observada tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas y la tasa puede ser mejorada por pretratamiento físico y químico en suelos contaminados. En la figura 3 se muestra la biodegradación anaeróbica.

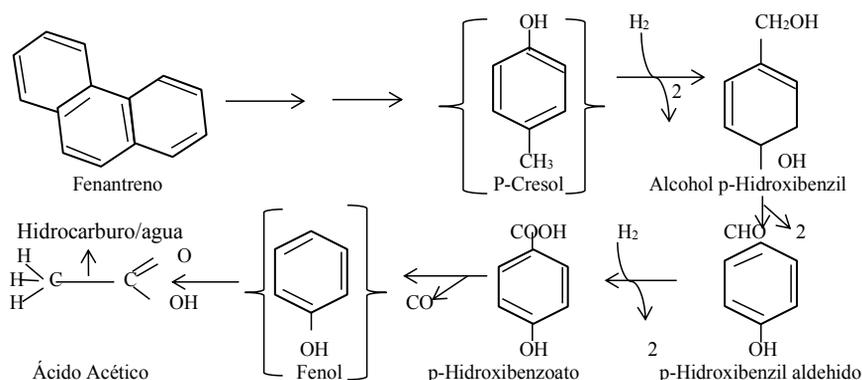


Figura 3. Biotransformación anaeróbica del fenantreno por bacterias sulfato-reductoras (Haritash *et al.*, 2009).

El presente estudio experimental se realizó tomando como referencia el modelo matemático de Medina S. *et al.* (2009), que estudia la biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados, utilizando los fenómenos de difusión, sorción y biodegradación en un reactor de lodos de hidrocarburos.

PARTE EXPERIMENTAL

El aceite contaminado presente en la arcilla se removió mediante el proceso de biodegradación de hidrocarburos con un consorcio de bacterias. Este proceso se realizó en un biorreactor en el cual se proporcionó las condiciones adecuadas al medio de cultivo para que la velocidad de reproducción de las bacterias sea la óptima.

El procedimiento experimental se realizó de la siguiente manera:

- 1.- Determinación de la cantidad de aceite lubricante usado presente en la arcilla.
- 2.- Aislamiento y caracterización de las cepas del consorcio liofilizado.
- 3.- Crecimiento del consorcio bacteriano degradador.
- 4.- Siembra y evaluación de la biodegradación del consorcio en un biorreactor.
- 5.- Cuantificación de la cinética de crecimiento y biodegradación de los hidrocarburos.

Breve descripción de las etapas del procedimiento:

1.- Determinación de la cantidad de aceite lubricante usado presente en la arcilla

Extracción de hidrocarburos totales de petróleo se realizó con el equipo de Soxhlet, de acuerdo a la técnica 3540 de la EPA y la medición se hizo mediante el método gravimétrico.

Una muestra de 5 gramos de arcilla contaminada fue envuelta con pabilo y se utilizó éter etílico como solvente a una temperatura de 60°C durante 12 horas.

Después de 12 horas, se evaporó el éter y se determinó la cantidad de aceite, contenida en el balón.

2. Aislamiento y caracterización de las cepas del consorcio liofizado

La descripción de los microorganismos es relevante para elevar la certeza de la pureza de su uso durante la producción del consorcio.

El aislamiento de las cepas contenidas en el producto “Oil Eating Microbes” se realizó con la finalidad de identificar, purificar y obtener bacterias cuantificables. Se sembró 0,5 gramos del contenido de la pastilla en un tubo con 10 mL de caldo nutricio (Himedia) y otros 0,5 gramos en un tubo con 10 mL de caldo acetamida (Merck). Ambos tubos se incubaron a 30 °C durante 27 horas.

El crecimiento producido en el tubo con caldo nutricio (Himedia) se estrió en dos placas de agar nutriente y el crecimiento producido en el tubo con caldo acetamida se estrió en dos placas de agar King B; todas las placas fueron incubadas a 30 °C por 48 horas.

3.- Crecimiento del consorcio bacteriano degradador

Luego de caracterizar las cepas del consorcio, se dieron las condiciones necesarias para el crecimiento de las bacterias: para el crecimiento de *Pseudomonas montielli* se usó un medio inductor de lipasas (glucosa 15 g/L, glicerol 10 g/L, extracto de levadura 3 g/L, peptona de carne 5 g/L, K₂HPO₄ 0,3 g/L, NaCl 0,5 g/L y estabilizado a pH 7,0), el cual fue preparado en un volumen de 500 mL e inoculado con 10 mL de una suspensión de 10⁵ células/mL. Igualmente para *Bacillus licheniformis* y *Rhodococcus pyridinivorans* se utilizó un medio nutricio fortificado con glicerol (glucosa 20 g/L, glicerol 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, sulfato de amonio 0,5 g/L, fósforo monopotásico 0,4 g/L, NaCl 0,5 g/L, sulfato de magnesio 0,5 g/L; sulfato de manganeso 0,02 g/L y estabilizado a pH 7,0), los cuales fueron preparados en dos matraces, en volúmenes de 500 mL e inoculado con 10 mL de una suspensión de 10⁵ células/mL de cada cepa. Todos los caldos fueron incubados por 48 horas a una temperatura de 30 °C y 150 rpm. Luego de culminado el crecimiento se mezclaron en una botella estéril todos los cultivos y agitados durante 3 horas a 150 rpm. Este fue el consorcio para las evaluaciones de degradación.

4.- Siembra y evaluación de la biodegradación del consorcio en un biorreactor

En un biorreactor de 5 litros de capacidad (figura 7), de acero inoxidable A-304, con agitador mecánico, lectura de la velocidad del impulsor (120 rpm), sistema de mamparas y difusor circular de aire, un compresor metálico con aire esterilizado mediante un filtro bacteriológico de 0,45 µm; para inyectar 50 L/min de aire. Asimismo, el equipo cuenta con un calentador que es controlado a 35 °C.

Una muestra de 1,5 kilos de arcilla bentonita saturada, fue colocada en un biorreactor, luego se adicionó 4,5 L de agua destilada mezclando completamente. Esta mezcla se llevó a pH 7,0 con la adición de una solución de NaOH, 1M, y luego se inoculó un volumen de consorcio igual al 10% del volumen total de agua (*Pseudomonas montielli* con $3,4 \times 10^8$ cel/mL; *Bacillus licheniformis* con $1,9 \times 10^8$ cel/mL; y *Rhodococcus yridinivorans* con $8,2 \times 10^8$ cel/mL).

Se tomaron muestras cada 24 h, para medir el rendimiento de la biodegradación, de acuerdo al método gravimétrico de equipo Soxhlet 3540 de la EPA.

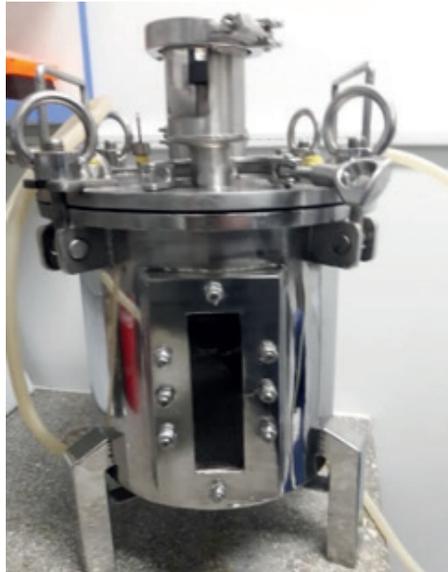


Figura 4. Reactor biológico de 5 L en acero inoxidable.

5.- Cuantificación de la cinética de crecimiento y biodegradación de los hidrocarburos

Se tomó una muestra cada 24 h, para la medición del crecimiento microbiano mediante la técnica de diluciones y siembra por disseminación en agar Cetrimide para *Pseudomonas* e Hicrome para el resto de bacterias, entre ellas los heterótrofos viables acompañantes de la flora de la arcilla.

Las pruebas experimentales confiables, realizadas para la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo, fueron dos procesos batch, durante un periodo de tiempo de 13 y 59 días, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del aislamiento y caracterización de las cepas son los siguientes:

- *Rhodococcus Pyridinivorans*:

Se logró aislar esta bacteria del producto, caracterizándose por tener colonias puntiformes elevadas con bordes lisos y una coloración parduzca (figura 5).

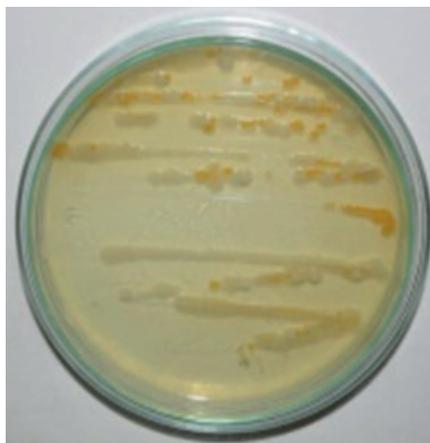


Figura 5. *Rhodococcus pyridinivorans* en un agar nutritivo.

- *Pseudomonas Montielli*:

Las colonias son circulares, de borde liso, mucosas y de aspecto húmedo y con pigmentación verdusca fosforescente (figura 6).



Figura 6. *Pseudomonas montielli* aislada en agar cetrimide.

- *Bacillus licheniformis*:

Las colonias de esta bacteria son de borde lobulado, ligeramente festoneado, superficie rugosa, color blanquecino (figura 7).



Figura 7. *Bacillus Licheniformis* en agar nutritivo.

Producción del consorcio bacteriano degradador

Se logró un consorcio microbiano con las concentraciones: *Pseudomonas montielli* con $3,4 \times 10^8$ cel/mL; *Bacillus licheniformis* con $1,9 \times 10^8$ cel/mL; y *Rhodococcus pyridinivorans* con $8,2 \times 10^8$ cel/mL.

Cuantificación de la cinética de crecimiento y degradación de los hidrocarburos

Durante el desarrollo del proceso de degradación de la primera prueba experimental, se evidenció un aumento de las cepas del consorcio microbiano a partir de los 3 días; el cual se extendió hasta el día 10, momento desde el cual se estableció un crecimiento estacionario y se evidenció una elevación del porcentaje de degradación de hidrocarburos presentes. También hubo un crecimiento de las bacterias heterótrofas viables, que son las que se encuentran en el medio ambiente, las cuales no interrumpieron en la actividad degradativa ya que su crecimiento no fue considerable con respecto al resto de bacterias del consorcio.

La muerte bacteriana se dio pasados los 13 días en la primera prueba experimental, iniciando primero con el género *Rhodococcus* y *Pseudomonas*; y manteniéndose la presencia del género *Bacillus*; ya que estos últimos poseen estructuras de permanencia o latencia llamadas esporas (figura 8).

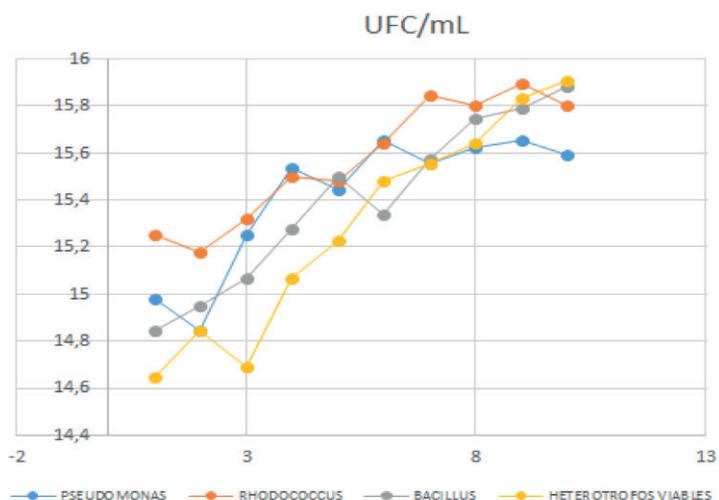


Figura 8. Cinética de crecimiento de bacterias en UFC/mL en función del tiempo de la primera prueba experimental. (Elaboración propia).

En la segunda prueba experimental, la muerte bacteriana se observó luego de 45 días, iniciándose primero con el género *Rhodococcus* y *Bacillus*; y manteniéndose la presencia del género *Pseudomonas* (figura 9).

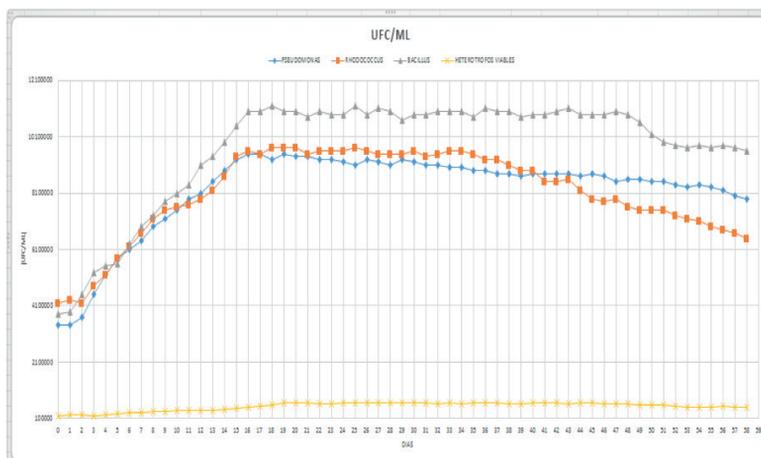


Figura 9. Cinética de crecimiento de bacterias en UFC/mL en función del tiempo de la segunda prueba experimental. (Elaboración propia).

La concentración de hidrocarburos totales de petróleo en gramos, se cuantificaron en el equipo de Soxhlet, de acuerdo a la técnica 3540 de la EPA y la medición se hizo mediante el método gravimétrico.

El rendimiento de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP), se realizó mediante la fórmula:

$$(1 - \frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}}) * 100 \%$$

En la biodegradación de los HTP en la primera prueba experimental se evidenció una elevada actividad a partir de los 9 días de actividad, logrando un máximo de 1,85 % a los 13 días. En cuanto a la degradación de los HTP de la segunda prueba experimental se obtuvo una elevada actividad a partir de los 8 días, logrando un máximo de 50 % a los 59 días como se muestra en la tabla 1.

Figura 1. Concentración de HTP (g) y % de biodegradación de los hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en el tiempo de las dos pruebas experimentales.

Tiempo (días)	Concentración de HTP (g) – (% de biodegradación): 1ra. Prueba	Concentración de HTP (g) – (% de biodegradación): 2da. Prueba
0	2.002	1.961
1	1.998 – (0.19)	
2		1.950 – (0.56)
5		1.923 – (1.94)
6	1.979 – (1.15)	
8		1.792 – (8.62)
9	1.970 – (1.60)	
13	1.965 – (1.85)	
15		1.615 – (17.64)
21		1.506 – (23.20)
45		1.021 – (47.93)
59		0.987 – (49.67 = 50)

Se obtuvo una reducción de menos del 2% de hidrocarburos totales de petróleo en la primera prueba experimental con una dilución de arcilla: agua de 1:1, mientras que en la segunda con una dilución en arcilla: agua de 1:3, se obtuvo un 50% de biodegradación del aceite lubricante usado que se encuentra en la arcilla contaminada.

Se concluye que la segunda prueba experimental, realizada durante 59 días, se obtuvo un mejor resultado de biodegradación de 50 %, en comparación con la primera prueba experimental realizada en 13 días, se obtuvo menos del 2 % de biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo.

Nuestros resultados son bastante alentadores cuando comparados a los obtenidos por Lee *et al.* (2006), después de 105 días, se obtuvo una reducción de 42-51% de hidrocarburos totales de petróleo; en el caso de Xu *et al.* (2013), después de 18 días se redujo en 53%; y Karamalidis *et al.* (2010), después de 191 días se obtuvo una reducción de 94%, a diferentes condiciones de operación.

CONCLUSIONES

Para el presente estudio, se puede concluir que se obtuvo una reducción del 50% de hidrocarburos totales de petróleo, lo que va a influir en la eliminación de los contaminantes de la arcilla, lo que permitirá preservar el medio ambiente.

El método empleado permite reutilizar la arcilla contaminada y, por consiguiente, reducir la cantidad de recursos no renovables empleados en el tratamiento de aceites lubricantes contaminados.

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento a los directores de los Laboratorios de la Facultad de Ciencias Biológicas y de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por brindar sus instalaciones para realizar las pruebas y mediciones del presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aitken M. Mechanisms of organic pollutant transformation and degradation by microorganisms. En *Bioremediation: Principles and Practice*. Volumen I: Fundamentals and Applications. Editado por Sikdar S, Irvine R. Pennsylvania: Technomic Publication; 1998. 333-383.
2. D.S. N° 057-2004 PCM. Plan Integral de Manejo de Residuos Sólidos en Osinergmin. Área de Seguridad y Aspectos Ambientales. Lima: OSINERGMIN; 2014.
3. Duque E, Escobar C. Origen, formación y construcción del suelo, fisicoquímica de las arcillas. [Internet] Capítulo 1; 2013. [Citado 22 feb 2019]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/1864/2/cap1.pdf>
4. Haritash A, Kaushik C. Aspectos de Biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs), India: a review. *J Hazard Mater*. 2009; 169:1–15.
5. Estructplan. Informe Técnico sobre Aceites Usados y sus Usos. [Internet]. Buenos Aires; 2011. [Citado 11 may 2019]. Disponible en: <https://estructplan.com.ar/articulos/informe-tecnico-sobre-aceites-usados-y-sus-usos/>
6. Lee SH, Lee S, Kim D, Kim J. Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions. *J Hazard Mater*. 2007; 143(1-2):65-72.
7. Medina–Moreno SA, Huerta–Ochoa S, Lucho–Constantino CA, Aguilera–Vázquez L, Jiménez–González A, Gutiérrez–Rojas M. Modelado de la biodegradación en biorreactores de lodos de hidrocarburos totales del petróleo intemperizados en suelos y sedimentos. *Rev Mex Ing Quím*. 2009; 8(3):245-258.
8. Jones JM. Diseño de un Sistema de Reciclaje de Aceite Lubricante Usado. [Tesis]. Valdivia: Universidad Austral de Chile; 2007.
9. Rittman, B. *in situ* bioremediation. 2 ed. Park Ridge, New Jersey: Noyes Publication; 1994.
10. Rivera L. Microbiología Interiorización del Conocimiento de Forma Significativa y Comprensiva. Machala: Universidad Técnica de Machala; 2015.
11. Souza P. Tecnología de Argilas. São Paulo: Ed. Universidad de São Paulo; 1975.
12. Tuesta E, Vivas M, Sun R, Gutarra A. Modificación Química de Arcillas y su Aplicación en la Retención de Colorantes. *Rev Soc Quím Perú*. 2005; 71(1):26-36.
13. MacNaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD, Davis GA, Chang YJ, White DC. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 65(8):3566-74.
14. Xu N, Bao M, Sun P, Li Y. Study on bioadsorption and biodegradation of petroleum hydrocarbons by a microbial consortium. *Bioresour Technol*. 2013; 149:22-30.

ALTERNATIVAS DE PRETRATAMIENTO TEXTIL: MÉTODO INTEGRADO DE DESCRUDE-BLANQUEO Y BLANQUEO QUÍMICO-ENZIMÁTICO, EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN CON EL MÉTODO CLÁSICO

Beatriz Orcón Basilio^{*1}, Mariel Giraldo Borja², Eduardo Flores Rúa³,
Anthony Ynca Berrospi⁴

RESUMEN

En la Universidad Nacional de Ingeniería (Laboratorio Textil N° 24) se realizaron ensayos de pretratamiento para descruce y blanqueo, utilizando como materia prima un tejido de ligamento jersey elaborado con algodón Pima de título 30/1 Ne. Se desarrollaron los procesos de descruce y blanqueo para la obtención de un material hidrófilo con un grado de blancura tal que permita el óptimo teñido de blancos y colores claros. Los ensayos de pretratamiento se desarrollaron haciendo uso de material de vidrio diverso y agitación manual, mientras que el proceso de tintura se realizó en una máquina Conmatex con movimiento vertical. Para evaluar el grado de blanco, se utilizó el espectrofotómetro Datacolor 550, software Color Tools versión: 1.1.1. Se realizaron tres procesos de blanqueo: clásico o referencial, que consiste en descruce y blanqueo separados; integrado, que considera descruce y blanqueo en un solo baño; y enzimático, donde la enzima activa la formación de peróxido, con fase previa de descruce. Al evaluar absorción y capilaridad, se concluye que el método enzimático tiene resultados similares a los del método clásico, pero mejores que el integrado. La pérdida de peso de los métodos clásico y enzimático es mayor que el método integrado debido a la fase previa de descruce. Los mejores valores para grado de blancura los registró el método clásico seguido del método enzimático y la prueba de teñido comprueba que el color obtenido mediante ambos métodos está en un rango aceptable. El impacto en los efluentes medido a través del DBO⁵ registró valores menores para el método enzimático.

Palabras clave: algodón, descruce, blanqueo, absorción, capilaridad, efluentes.

1 Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Av. Túpac Amaru 210, Rimac, Lima-Perú, borcon@uni.edu.pe

2 Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería

TEXTILE PRETREATMENT ALTERNATIVES: INTEGRATED METHOD OF SCOURING-BLEACHING AND CHEMICAL-ENZYMATIC BLEACHING, EVALUATION AND COMPARISON WITH THE CLASSICAL METHOD

ABSTRACT

Pretreatments were made to a Pima cotton jersey knit with yarn number Ne 30/1, with two processes: scouring and bleaching to obtain a hydrophilic material with a whiteness degree that allows dyeing of light colors and whites. The trials were developed at a laboratory level at the National University of Engineering (Textile Laboratory No. 24) using beakers and manual agitation, dyeing was executed on the Conmatex machine with vertical movement and to evaluate the degree of whiteness, the spectrophotometer (Datacolor 550, software Color Tools versión: 1.1.1) was used. Three bleaching processes were carried out: classical (referential) consisting of separate scouring and bleaching stages, integrated that considers scouring and bleaching in a single bath and enzymatic where the enzyme activates the formation of peroxide and has a previous scouring phase. When evaluating absorption and capillarity, it is concluded that the enzymatic method has similar results to those of the classical method and better results than the integrated method. The weight loss of classical and enzymatic methods is greater than the integrated method due to the previous scouring phase. The best values for the degree of whiteness were achieved by the classical method followed by the enzymatic method and the dyeing test proves that the colors obtained from both methods are within an acceptable range. The impact on the effluents measured through BOD⁵ registered lower values for the enzymatic method.

Key words: cotton, scouring, bleaching, absorption, capillarity, effluents.

INTRODUCCIÓN

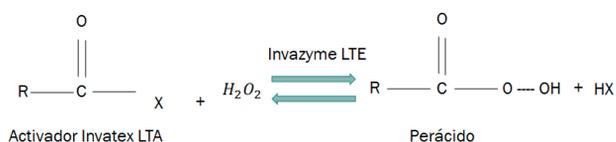
El algodón es la fibra natural de mayor importancia mundial como sustrato textil, con él se producen prendas de vestir, artículos para el hogar y productos industriales, su importancia ha decaído con la aparición de las fibras sintéticas, sin embargo, aún representa más del 50 % de las prendas de vestir. Para muchos tipos de prendas, una prenda de 100 % algodón es señal de calidad garantizada¹.

La fibra de algodón está compuesta por paredes celulares secas de células vegetales muertas. Luego del desmotado y limpieza mecánica se obtiene aproximadamente 95 % de celulosa. La celulosa en el algodón tiene estructura de polímero lineal de β -D-glucopiranososa. Los constituyentes no celulósicos generalmente se encuentran en la cutícula, pared primaria y lumen, estos constituyentes son: proteínas (1,3 %), sustancias pécticas (1,9 %), cenizas (1,2 %), ceras (0,6 %), azúcares (0,3 %), ácidos orgánicos (0,8%), trazas de pigmentos y otros como motas y residuos de semillas y hojas (1,4 %)².

El proceso purificador del algodón es el descruce alcalino, que se realiza previo al teñido. Aquí se eliminan componentes no celulósicos del algodón e impurezas agregadas: lubricantes y aceites. La fibra absorbe el álcali, éste neutraliza el grupo carboxilo en la celulosa y en las pectinas. Los grupos hidroxilos en las unidades de glucosa en la celulosa son débilmente ácidos por lo que favorecen el aumento de la concentración del álcali en la fibra y se ataca intensamente a las impurezas. El descruce proporciona hidrofiliidad al sustrato por acción del álcali y tensoactivos. Actualmente, se usa el hidróxido de sodio para el descruce que elimina impurezas, pero también degrada la fibra bajo condiciones severas creando fisuras en ellas o disolviendo la cutícula o pared primaria. Estos cambios en el algodón resultan en pérdida de peso (5-10 %) y longitud, alteración en el título del hilo y cambios en la resistencia a la tracción (usualmente un aumento)³.

El blanqueo clásico utiliza peróxido de hidrógeno en forma de anión perhidroxi en medio acuoso alcalino (pH 10,5-10,8), este anión reacciona con los pigmentos naturales y los oxida⁴. El descruce y blanqueo se realizan en etapas separadas con alto consumo de energía debido a las altas temperaturas necesarias. Para reducir el consumo de energía, se combinan etapas, se reduce el tiempo de reacción o se usan activadores de peróxido a menores temperaturas. La integración de procesos considera productos que potencien la formulación tal que mejoren la remoción y decoloración de impurezas³.

FORMACIÓN DE PER HIDROLASA:



REACCIÓN DE BLANQUEO:

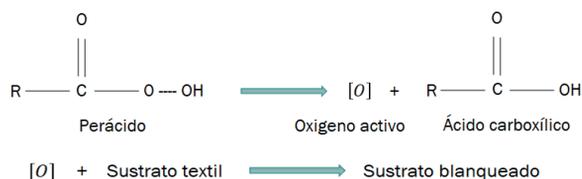


Figura 1. Ecuación del blanqueo enzimático⁴.

El uso de enzimas para el pretratamiento textil tiene ventajas en comparación a los procesos anteriores, se usan como catalizadores a bajas temperaturas, con valores de pH cercanos al neutro, son biodegradables y el impacto ambiental es 25 % menor que un proceso clásico de blanqueo. En el mecanismo del blanqueo químico enzimático, una enzima del tipo aril-esterasa (Invazyme LTE) actúa como catalizador para la formación del perácido, quien libera el oxígeno activo (agente de blanqueo) que reacciona con la fibra para blanquearla. Se muestra la ecuación química con la cual se trabaja este método en la figura 1⁴.

En trabajos anteriores, que analizaron la factibilidad de un tratamiento enzimático para los tres procesos previos: desencolado (aplicable solo a tejidos planos para la remoción de la goma de los hilos de urdimbre), descrude y blanqueo con el uso de una mezcla de enzimas como las amilasas, pectinasas y glucosa oxidasas, el peróxido de hidrógeno se producía enzimáticamente a partir del agente de encolado. Luego, se convertía en la forma de ácido peracético para el blanqueo del tejido de algodón. Sin embargo, el grado de blanco fue medio, pero el grado de absorción fue bueno⁵.

Una de las características más importantes de un efluente es la cantidad de oxígeno necesario para estabilizar, esta cantidad es la demanda bioquímica de oxígeno y es la cantidad de oxígeno requerido para estabilizar el efluente en la presencia de bacterias que consumen los contaminantes químicos⁶.

En la actualidad existen enzimas que pueden reemplazar los procesos de descrude y blanqueo con resultados similares a los procesos clásicos, y que significan una buena alternativa para la reducción de la contaminación⁷.

PARTE EXPERIMENTAL

Muestra

Tejido crudo de ligamento Jersey, con algodón Pima título 30/1 Ne, de gramaje 150 g/m², título Ne 30/1.

Condiciones del proceso

Relación de baño 1:15, que se utilizó debido a que no se contaba con material de vidrio para trabajar relaciones de baño menores. Peso del sustrato: 10 gramos.

Medio de calentamiento y ensayo: Plancha calefactoras con temperatura graduada, vasos de precipitados de vidrio y agitación manual.

Método clásico de descrude y blanqueo

Se utilizó este método como estándar a motivo de comparación con el método integrado (utilizado actualmente en plantas textiles) y el enzimático (propuesta alternativa ecoamigable). Se inicia con el descrude y a continuación el blanqueo, en ambas etapas se pre calienta la solución a 50 °C (para disminuir la tensión superficial del agua y facilitar que el textil se sumerja), se agrega el sustrato y se eleva la temperatura a 98 °C a razón de 3°C/min, manteniéndola por 45 min. Para la eliminación del peróxido residual, se utiliza la enzima Catalasa al 0,5 g/l (Globolase OH-N).

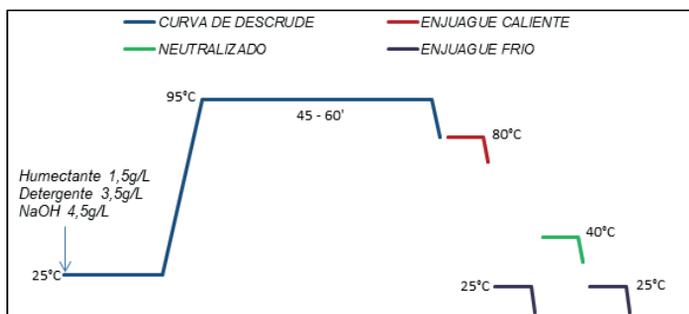


Figura 2. Curva de descruce.

Tabla 1. Receta de descruce.

PRODUCTO	FUNCIÓN	CANTIDAD
Kieralon Wash MFB	Humectante	1,5 g/l
Felosan NFGT	Detergente	3,5 g/l
Hidróxido de Sodio 50°Be	Álcali	4,0 g/l

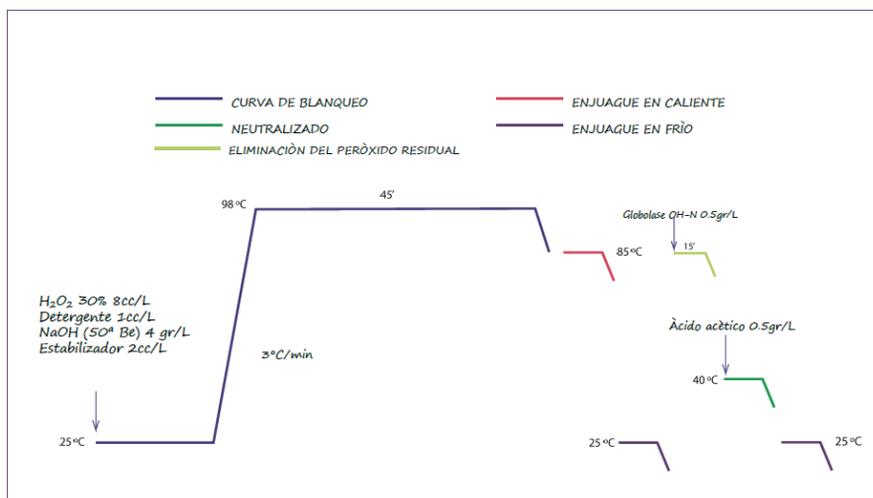


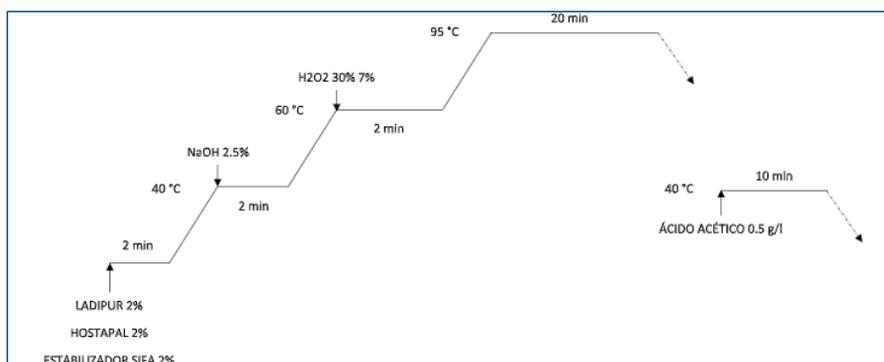
Figura 3. Curva de blanqueo clásico.

Tabla 2. Receta de blanqueo clásico.

PRODUCTO	FUNCIÓN	CANTIDAD
Peróxido de Hidrógeno al 30%	Agente de blanqueo	8 cc/l
Felosan NFGT	Detergente	1 cc/l
Hidróxido de Sodio 50° Be	Álcali	4 g/l
Estabilizador SIFA	Estabilizador de peróxido	2 cc/l

Método integrado

Se trabaja el descruce y blanqueo en un mismo baño con álcali y peróxido, los % de ambos sobre el peso del sustrato. Se agrega el álcali a 40°C y el textil y se mantiene por 2 minutos, elevándose la temperatura a 60°C para ingresar el peróxido. Se eleva la temperatura con gradiente de 3°C/min hasta 98°C donde se mantiene por 30 min. Este baño trabaja con humectante, detergente y estabilizador.

**Figura 4.** Curva de blanqueo integrado.**Tabla 3.** Receta del método integrado.

PRODUCTO	FUNCIÓN	CANTIDAD
Hidróxido de sodio 50° Be	Álcali	4 %
Peróxido de hidrógeno (30%)	Agente de blanqueo	7 %
Hostapal RMN	Humectante	1,5 %
Felosan NFGT	Detergente	1,5 %
Estabilizador SIFA	Estabilizador de peróxido	1,5 %

Método químico - enzimático

Consiste en dos etapas, descruce y luego blanqueo enzimático, en baños diferentes. Se trabaja con la enzima de tipo aril-esterasa, que actúa como catalizador para la formación del perácido, que libera oxígeno activo y oxida los pigmentos coloreados de la fibra para blanquearla. El método trabaja con menor concentración de peróxido de hidrógeno y soda cáustica en comparación con el método clásico. Para el blanqueo se agrega detergente, álcali (soda ash), activador de peróxido, peróxido de hidrógeno, y enzima catalizadora. Se precalienta a 40°C, se agrega el textil y se eleva la temperatura a 65°C con gradiente de 2°C/min. Luego de 30 minutos, se agrega hidróxido de sodio 1,2 g/l y se eleva la temperatura a 98°C con gradiente de 1,5 °C / min., se mantiene por 20 minutos. Luego, en baño nuevo, se agrega catalasa 0,5 g/l para eliminar el peróxido residual.

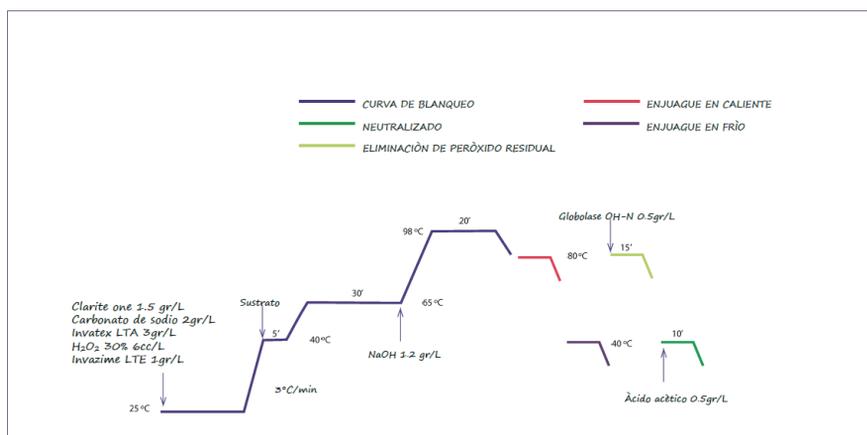


Figura 5. Curva de blanqueo químico-enzimático.

Tabla 4. Receta del método químico-enzimático.

PRODUCTO	FUNCIÓN	CANTIDAD
Clarite One	Detergente	1,5 g/l
Carbonato de sodio (soda ash)	Álcali	2 g/l
Invatex LTA	Activador de peróxido	3 g/l
Peróxido de hidrógeno (30%)	Agente de blanqueo	6 cc/l
Invazyme LTE	Enzima catalizadora	1 g/l
Hidróxido de sodio 50° Be	Álcali	1,2 g/l
Globolase OH-N	Enzima catalasa	0,5 g/l

Neutralizado

Posterior a los baños de descrude y blanqueo se realiza un neutralizado con ácido acético glacial a 0,5 g/l a 40°C, seguido por enjuagues en caliente y frío.

Eliminación del peróxido residual

Posterior a los baños que usan peróxido de hidrógeno, se realiza la conversión hacia agua y oxígeno mediante el uso de 0,5 g/l de catalasa y enjuagues en tibio y frío.

Prueba de teñido

Las muestras pre tratadas y blanqueadas son teñidas con colorante reactivo Azul Everzol SAM con una relación de baño 1:15. La temperatura inicia a 40°C, en presencia de auxiliares (secuestrante, Sirrix 1g/l; humectante, Hostapal HRM 1g/l). Después de 10 min se adiciona el colorante, 1 % sobre el peso del sustrato. Luego del mismo tiempo, para fijar el colorante, se adiciona una décima parte de carbonato, elevando la temperatura a razón de 1,5 °C/min hasta a los 60°C. Luego de intervalos de veinte minutos, se adiciona el resto de carbonato en partes de tres y seis décimos, para permanecer en agitación durante 45-60 minutos. El proceso concluye con el respectivo neutralizado y enjuagues varios.

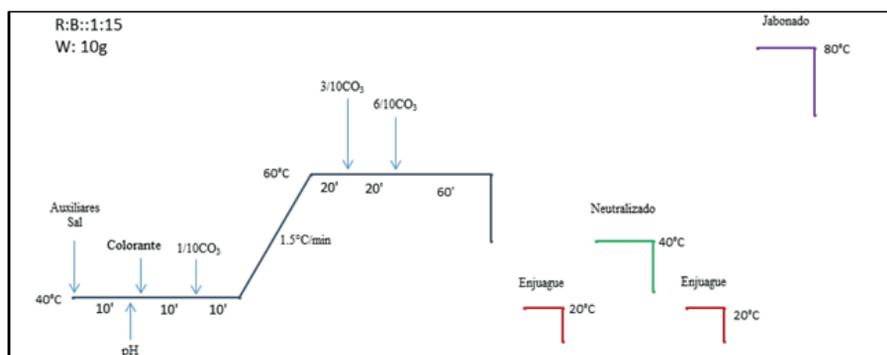


Figura 6. Curva de teñido con colorantes reactivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Demanda bioquímica de oxígeno (DBO5)

Es la cantidad de oxígeno en mg/l necesaria para descomponer la materia orgánica presente mediante acción de los microorganismos aerobios presentes en el agua.

Tabla 5. Tabla comparativa de DBO₅.

MÉTODO	DBO ₅ (mg/l)
Integrado	1179
Clásico	717
Enzimático	519

La DBO del baño residual del blanqueo enzimático es la menor de los tres métodos, lo que indica que el consumo del oxígeno disuelto por la materia orgánica presente en el baño es el menor ya que existe menor presencia de materia orgánica en el baño residual.

La DBO del baño residual del método integrado es la mayor de los tres debido a que hay una combinación de dos procesos: descruce y blanqueo en un mismo baño, altamente alcalino que provocan mayor presencia orgánica descompuesta en el baño.

Grado de blancura

Haciendo uso del espectrofotómetro DATACOLOR, que mide los valores triestímulos, obtenemos el valor de blancura medido en grados Berger.

La tabla 6 muestra el resultado del grado de blanco para los tres métodos de pretratamiento.

Tabla 6. Tabla comparativa del grado de blancura en °Be.

MÉTODO	GRADO BERGER
Clásico	78,18
Enzimático	77,54
Integrado	71,28

Se observa en la figura 7 que la curva longitud de onda vs reflectancia es muy similar para los descruces clásico y enzimático, dando un grado de blanco aceptable.

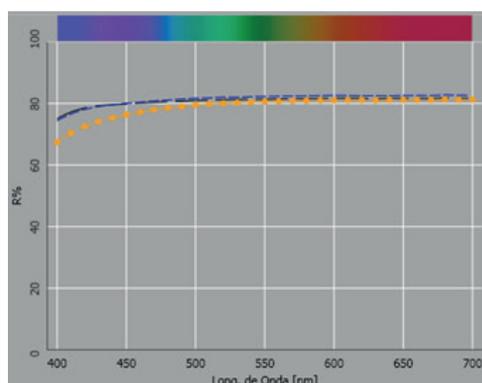


Figura 7. Longitud de onda vs reflectancia:
 ----- Clásico, ---- Integrado, ---- Enzimático

Tabla 7. Descripción del blanco en la escala CIELab.

ESTÁNDAR	LOTE	LECTURA CIE Lab	DESCRIPCIÓN
Clásico	Enzimático	Pasa	Más claro, más verde y más amarillo
Clásico	Integrado	Falla	Más oscuro, más verde y más amarillo

Medida del pH

La medición del pH se realizó en la etapa del blanqueo para los tres métodos después de terminado el proceso, es decir, en la etapa final considerando las dosificaciones de carbonato y soda posteriormente, en los casos que aplica.

Tabla 8. Tabla comparativa de pH.

MÉTODO	pH
Integrado	11
Clásico	12
Enzimático	9

Evaluación del grado de descruce

Determinación de la pérdida de peso

Se realizó la evaluación a los tres procedimientos de blanqueo, aplicando lo siguiente:

$$\% \text{ Peso perdido} = \frac{\text{Peso}_{\text{antes del descruce}} - \text{Peso}_{\text{después del descruce}}}{\text{Peso}_{\text{antes del descruce}}} (100\%)$$

Tabla 9. Tabla comparativa del porcentaje en pérdida de peso total incluyendo descruce.

MÉTODO	PESO INICIAL	PESO FINAL	% PÉRDIDA DE PESO BLANQUEO	% PÉRDIDA DE PESO TOTAL
Enzimático	10,00	9,808	1,25	4,13
Integrado	10,00	9,653	2,78	2,78
Clásico	10,00	9,761	1.75	4,63

Prueba de absorción (Hidrofilidad: Norma AATCC TM 79 – 2014)

Este método está diseñado para medir la absorción de soluciones en los sustratos textiles, mediante el tiempo que tarda una gota de agua con colorante en la superficie del tejido, para ser absorbida completamente. Según esta norma, la muestra se coloca en la parte superior de un vaso de precipitado, dejando caer una gota a 1 cm de la superficie del tejido. Se adaptó el método colocando la tela sin tensión sobre un vaso de precipitados fijado con una liga para evitar las arrugas. Se midió el tiempo que la gota se absorbe en el tejido.

Tabla 10. Comparación del tiempo de absorción de una gota de agua.

MÉTODO	TIEMPO DE ABSORCIÓN (SEG.)
Integrado	2
Enzimático	1
Clásico	1

Prueba de capilaridad (Capilaridad: NORMA AATCC 197-2013)

Este método se usa para evaluar la facilidad con la que una solución se transporta a lo largo del sustrato textil. Se coloca la tela de forma vertical, en sentido de las columnas o cursas (tejido de punto) y se permite el ascenso del agua con colorante, midiendo la altura que alcanza sobre la tela a los 30 minutos. Se trabajó con una tela de 5cm de ancho y 10 cm de alto y se sumergió en una solución de colorante reactivo Turqueza Everzol ED.

Tabla 11. Comparación del ascenso de agua con colorante en los tres métodos.

MÉTODO	ASCENSO DE COLOR (cm)
Enzimático	8,90
Clásico	8,50
Integrado	7,30

Evaluación de tintura

Se trabajó la misma receta de teñido a las mismas condiciones en los tres métodos de blanqueo: Clásico-Integrado-Enzimático.

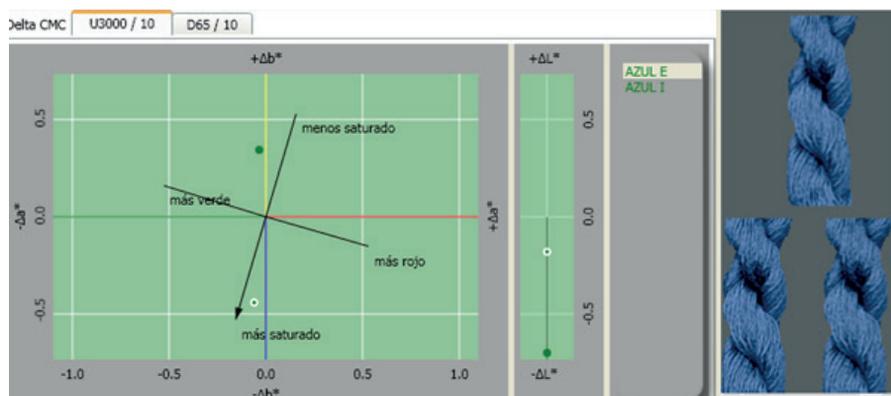
Se realizaron pruebas en el espectrofotómetro DATACOLOR, para poder revisar la reproducibilidad de color, tomando como estándar el teñido del método clásico.

Tabla 12. Descripción de los resultados en función al valor CIE Lab.

ESTÁNDAR	LOTE	Lectura CieLab	DESCRIPCIÓN LOTE
Clásico	Enzimático	Pasa	Más oscuro, más verde y más azul
Clásico	Integrado	Falla	Más oscuro, más verde y más amarillo

Tabla 13. Tabla de diferencia de color total CIE Lab.

LOTE	CIE Da	CIE Db	CIE DC	CIE DH	CIE DE	LECTURA
Enzimático	-0,06	-0,43	0,43	0,07	0,22	Pasa
Integrado	-0,03	0,35	-0,33	-0,13	0,37	Pasa

**Figura 8.** Espacio de color CIE LAB.

CONCLUSIONES

El método clásico obtuvo un grado de blanco de 78,18 °Be, el cual es casi un punto superior al del método de descruce/blanqueo enzimático. Por otro lado, el método integrado resulta con un grado de blanco de 71,28 °Be. Adicionalmente se evaluaron las muestras con la escala CIELab, tomando como estándar el blanco obtenido con el método clásico. Se concluye que el método descruce/blanqueo enzimático es aceptable como alternativa para colores claros y blancos ópticos y por el contrario el blanco obtenido con el método integrado solo para tonos medios.

Con los resultados de DBO_5 se concluye que el proceso de pretratamiento con el método enzimático tiene un impacto ambiental menor al método clásico, ya que es 27 % menor que éste, y más del 100 % menor que el del método integrado.

Una preocupación de las empresas textiles, es el alto % de mermas, que implica costos por pérdidas de material. El método descruce/blanqueo enzimático resulta con una pérdida de peso total de 4,13 % y solo en el proceso de blanqueo, su pérdida de peso es de 1,25 %. El menor valor para pérdida de peso total, lo registra el blanqueo integrado. El método clásico referencial, solo para el grado de blancura, registra una pérdida de peso del 4,63 % total y 1,75 % por el blanqueo. Se concluye que el blanqueo enzimático favorece la conservación de la masa celulósica en la fase de blanqueo.

Los mejores valores de grado de absorción y capilaridad fueron los correspondientes a los métodos descruce/blanqueo enzimático y al clásico, lo que significa que el grado de limpieza de las paredes celulares y accesibilidad de los capilares es similar, lo que se traduce en una buena hidrofiliadad del textil.

Con los resultados de la evaluación tintórea se concluye que el método de descruce/blanqueo enzimático obtienen resultados muy similares al método clásico, por lo tanto lo podría reemplazar.

Como conclusión final el método propuesto de descruce/blanqueo enzimático resulta en menor impacto ambiental, grado de blanco muy similar y resultados de tintura aceptables por lo que una siguiente propuesta de trabajo sería la de eliminar el descruce y reemplazarlo con un bio tratamiento enzimático integral.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ingeniería Química y Textil de la Universidad Nacional de Ingeniería, por el uso de sus instalaciones y la formación académica recibida. Finalmente, un agradecimiento a los ingenieros Ángela Ortiz e Iván Arana por su apoyo incondicional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cassidy T, Goswami P. editors. Textile and Clothing Design Technology. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2017.
2. Menachem L. editor. Handbook of Fiber Chemistry. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2006.
3. Karmakar S. Chemical Technology in the Pre-treatment Processes of Textiles. Amsterdam: Elsevier Science B.V; 1999.
4. Siddiquee AB, Bashir M, Sarker P, Tohfa T, Hossain A, Ibrahim Azad I, et al. Comparative study of conventional and enzymatic pretreatment (scouring & bleaching) of cotton knitted fabric. *Int J Eng Technol.* 2014; 3(1):37-43
5. Spicka N, Forte P. Complete enzymatic pre-treatment of cotton fabric with incorporated bleach activator. *Text Res J.* 2013; 83(6):566–573
6. Fan Q. Chemical Testing of Textiles. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2005.
7. Fakin D, Golob D, Stjepanovič Z. The Effect of Pretreatment on the Environment and Dyeing Properties of a Selected Cotton Knitted Fabric. *Fibres Text East Eur.* 2008; 16(2):101-104.

NANOEMULSIONES O/W DE ACEITE ESENCIAL DE NARANJA Y TWEEN 80

George Alvarado López^a, Esperanza Medina Lezama^b

RESUMEN

En la perspectiva de su aplicación para la remediación de suelos, se estudia la estabilidad física de nanoemulsiones O/W de aceite esencial de naranja, en función de las concentraciones del surfactante no iónico Tween 80 y del aceite esencial, identificándose el principal mecanismo de desestabilización. Para su preparación se empleó el método de la Temperatura de Inversión de Fase (PIT). Las concentraciones evaluadas fueron de 10 y 12 % p/p para el surfactante, y de 5 y 20 % p/p para el aceite esencial. El tamaño de partícula fue determinado mediante la técnica de dispersión dinámica de luz; y la estabilidad se midió registrando la variación del tamaño de gota en función del tiempo. Los resultados obtenidos mostraron que el sistema constituido de 20% de aceite esencial de naranja y 10 % de Tween 80 presentó la mejor estabilidad en relación con los otros sistemas; de igual manera se determinó que el mecanismo de desestabilización subyacente en las nanoemulsiones estudiadas, es la maduración de Ostwald. Asimismo, aplicando el sistema más estable a la remediación de arena contaminada con diésel, se logró una eficiencia de remoción promedio del 98 %.

Palabras clave: aceite esencial naranja, temperatura inversión fase, estabilidad de nanoemulsiones, remediación de suelos.

ORANGE ESSENTIAL OIL O/W NANOEMULSIONS WITH TWEEN 80

ABSTRACT

In the perspective of using it for soils remediation, the physical stability of orange essential oil O/W nanoemulsions was studied as a function of the orange oil and nonionic surfactant Tween 80 concentrations, identifying the main mechanism of destabilization. The emulsions were prepared according to the Phase Inversion Temperature (PIT) method. Surfactant concentrations varied from 10 to 12 wt% and the orange oil ones, from 5 to 20 wt%. The particle size was determined by dynamic light scattering and nanoemulsion stability was assessed, measuring the variation of droplet size as a function of time. The results showed that the highest stability was achieved when using 20 wt% of orange essential oil and 10

^a Escuela Profesional de Ingeniería Química, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Av. Independencia s/n, Arequipa, Perú, georgeal2512@gmail.com

^b Escuela Profesional de Ingeniería Química, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa

wt% of Tween 80. It was also determined that Ostwald ripening was the main destabilization mechanism for the tested nanoemulsions. Using the most stable system for the remediation of contaminated soils with diesel, the average removal efficiency was 98%.

Key words: orange oil, phase inversion temperature, nanoemulsion stability, soil remediation.

INTRODUCCIÓN

Las nanoemulsiones van cobrando cada vez más importancia debido a sus múltiples aplicaciones en áreas como la industria cosmética, alimentaria, en la remediación de suelos, agroquímicos, entre otros. Considerando el tamaño de partícula y su estabilidad termodinámica, una nanoemulsión ostenta diámetros de partícula de la fase dispersa por debajo de 200 nm y es termodinámicamente metaestable. Bajo el mismo criterio, se reconocen dos tipos adicionales de emulsiones, las cuales son: emulsiones convencionales (diámetro de partícula >200 nm), también metaestables, y las microemulsiones (diámetro de partícula <100 nm) que presentan un comportamiento termodinámicamente estable.¹

Reconocer a las nano y micro emulsiones suele ser confuso, pues poseen los mismos componentes (aceite, agua, surfactantes y cosurfactantes) y su estructura molecular es similar, por lo que conviene mencionar las diferencias más relevantes en relación con el presente estudio. En cuanto a las concentraciones de los componentes, McClements² señala un factor de diferenciación muy importante denominado “concentración de saturación” (Cs) del surfactante, entendida ésta como la máxima cantidad de aceite que se puede añadir a una determinada masa de surfactante, expresada en gramos de aceite solubilizado por gramo de surfactante, bajo condiciones ambientales específicas; dicha concentración está muy relacionada a la cantidad total de aceite y la de surfactante presente. De allí que obtener una micro o nanoemulsión dependerá de las cantidades relativas de aceite y surfactante presentes; las nanoemulsiones generalmente necesitan una baja concentración de surfactante para ser sintetizadas, lo cual constituye una importante ventaja económica.

Respecto a la estabilidad del sistema, el mismo autor explica que en una nanoemulsión la energía libre de la dispersión coloidal es mayor que la energía libre de las fases separadas, por lo que es termodinámicamente inestable; por el contrario, una microemulsión, posee una menor energía libre para la dispersión coloidal respecto a las fase separadas, por lo que es termodinámicamente estable. Teóricamente, esto implica que una microemulsión puede formarse espontáneamente una vez que se junten sus componentes, aceite, agua y surfactante, y debe permanecer estable indefinidamente manteniendo las condiciones iniciales; sin embargo en la práctica esto no ocurre porque existen barreras de energía cinética y/o tienen lugar procesos de transferencia de masa que interfieren el sistema generando inestabilidad.

De igual manera, Capek³ explica que la desestabilización de las emulsiones ocurre debido a la tendencia espontánea entre las fases dispersante y dispersa de minimizar su área interfacial; asimismo, el autor agrega que para que una emulsión sea estable electrostática

y estéricamente, se debe controlar la doble capa eléctrica y el grosor de la capa superficial de la gota de aceite, la cual está constituida por el surfactante no iónico. En otras palabras, la estabilidad de la emulsión depende de la razón entre el grosor de la capa de surfactante adsorbido en la superficie de la gota y el grosor de la doble capa eléctrica alrededor de la gota. La estabilidad cinética alcanzada por las nanoemulsiones es tan significativa que puede aproximarse a una estabilidad termodinámica, por lo que son muy apropiadas para aplicaciones en el transporte de principios activos.⁴

Souza *et al.*⁵ determinaron que la estabilidad y la distribución de tamaño de nanoemulsiones en base a aceite esencial de naranja y Ultrol L60 dependían generalmente de la concentración de aceite.

Debido a la inestabilidad termodinámica de las nanoemulsiones, se han llevado a cabo algunos estudios evaluando los mecanismos de desestabilización subyacentes en estos sistemas. Al respecto, Izquierdo *et al.*⁶ evaluaron la estabilidad física de nanoemulsiones constituidas principalmente de hexadecano y Brij 30, en el cual determinaron que el principal mecanismo de desestabilización para estos sistemas era la maduración de Ostwald.

Capek³ indicó que la coalescencia es considerada como el principal mecanismo de desestabilización en emulsiones. Sin embargo, los procesos de desestabilización, debidos a la transferencia de masa, tal como la maduración de Ostwald, siempre ocurrirán en tanto exista una curvatura entre las interfases, también agregó que, a parte de la curvatura de las gotas, también la composición de las mismas influye en el proceso de desestabilización.

De igual manera, se tiene la investigación llevada a cabo por Oliveira *et al.*⁷ en la remediación de suelos contaminados con crudo usando nanoemulsiones. En su investigación determinaron que la nanoemulsión más estable fue aquella conteniendo la más alta concentración de aceite y la más baja concentración de surfactante (20 % de aceite esencial y 10 % de Tween 80). Sin embargo, en su estudio no evaluaron los mecanismos de desestabilización de las nanoemulsiones.

Recientemente, Koroleva *et al.*⁸ determinaron que para nanoemulsiones constituidas de parafina en bajas concentraciones y Brij 30 o mezclas de Tween 80 y Span 80, la maduración de Ostwald fue el mecanismo principal en la desestabilización de estos sistemas. Para sistemas conteniendo alta concentración de aceite, la floculación y la coalescencia fueron los principales mecanismos de desestabilización en períodos largos de tiempo. Por lo que se concluye que el mecanismo de desestabilización depende principalmente de la concentración de aceite.

Al igual que las emulsiones convencionales, los principales mecanismos de desestabilización de las nanoemulsiones pueden ser la coalescencia y la maduración de Ostwald. La coalescencia ocurre debido a la ruptura de la capa delgada que se forma entre gotas adyacentes, lo cual permite que dos gotas se transformen en una sola. La capa delgada que se forma cuando dos gotas están en contacto es un ensamblaje molecular metaestable y su tiempo de vida es un

factor determinante para determinar el tiempo de vida del cuerpo de la nanoemulsión. El cambio del tamaño de gota con el tiempo en el proceso de coalescencia obedece a la siguiente ecuación:⁹

$$\frac{1}{r^2} = \frac{1}{r_0^2} - \frac{8\pi}{3} \nu t \quad (1)$$

Donde: r es el radio promedio de las gotas después de un tiempo t , r_0 es el radio promedio en el tiempo $t=0$, y ν es la frecuencia de ruptura por unidad de la superficie de la película.

La maduración de Ostwald surge de la diferencia de solubilidad entre gotas grandes y pequeñas debido a las diferencias de presiones de Laplace. La teoría Lifshitz-Slezov-Wagner (LSW) predice la linealidad del cubo del radio promedio en el tiempo. El gradiente de esta función lineal es la velocidad de maduración de Ostwald, ω :^{10,11}

$$\omega = dr^3/dt = 8/9 [(C_\infty \nu V_m D)/\rho RT] \quad (2)$$

en donde D es la difusión en la fase continua, ρ es la densidad del aceite, $C(\infty)$ es la solubilidad de la fase bulk (la solubilidad de una gota de aceite de tamaño infinito), V_m es el volumen molar del aceite, R es la constante de los gases, y T es la temperatura absoluta.

En el marco de las aplicaciones en remediación de suelos contaminados con hidrocarburos, una técnica convencional para la remoción de contaminantes del suelo es el lavado; la cual hace uso de soluciones de surfactantes. Se trata de un proceso innovador que está siendo actualmente empleado en el tratamiento de un buen porcentaje de sitios contaminados.^{12,13} Como ejemplo de uso de surfactantes en la remediación de suelos se tiene el estudio llevado a cabo por Riojas *et al.*,¹⁴ quienes han reportado haber alcanzado eficiencias de remoción del 80 % en la remediación de suelo contaminado con diésel, utilizando una mezcla del surfactante no iónico Tween 80 y el solvente natural D-limoneno, el cual es el componente principal del aceite esencial de naranja. El tiempo de acción de esta mezcla en la remoción del diésel fue de 24 horas.

Sin embargo, el principal inconveniente de la aplicación de soluciones de surfactantes en el lavado de suelos es la formación de emulsiones, las cuales colapsan formando dos fases inmiscibles. Asimismo, el gran tamaño de sus gotas obstruye los poros del suelo dificultando de esta manera la remoción del contaminante del suelo.^{15,16} Ante este panorama el uso de nanoemulsiones surge como una buena alternativa para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos, habiéndose comprobado que las nanoemulsiones presentan altas eficiencias de remoción del contaminante a temperatura ambiente.¹⁵ Oliveira *et al.*,⁷ en su estudio de la remoción de crudo de suelo contaminado, alcanzaron una eficiencia de remoción del 96 % utilizando nanoemulsiones conteniendo 20 % de aceite esencial de naranja y 10 % de Ultrol L70, siendo esta formulación la más estable. Tal eficiencia de remoción se logró en un tiempo de 4 horas a una temperatura de 25 °C, estando el sistema bajo agitación a 240 ciclos/min.

En este contexto, conviene ampliar los estudios sobre la estabilidad física de nanoemulsiones constituidas de aceite esencial de naranja con la participación de otros surfactantes no iónicos, como el Tween 80, y su efecto en la eficiencia de remoción de diésel como contaminante de suelos.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales y reactivos

El aceite esencial de naranja de tipo Valenciana fue obtenido en el laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad Nacional de San Agustín mediante la técnica de Arrastre por Extracción de Vapor, el aceite se utilizó posteriormente tal como se obtuvo. Mediante espectroscopia infrarroja se determinó si el aceite esencial de naranja obtenido contenía D-limoneno, para tal fin determinó el grado de coincidencia respecto al contenido de limoneno entre el espectro IR de una muestra de aceite esencial de naranja y un estándar. El resultado arrojó un grado de coincidencia del 99,87 %, tal como se observa en la figura 1. La densidad del aceite fue de 0,84 mg/ml. Asimismo, mediante cromatografía de gases con detección de masas se determinó la concentración de limoneno en el aceite esencial de naranja, siendo el valor obtenido igual a 97,70 %, tal como se observa en la figura 2. El monooleato de polioxietileno(20)sorbitano (Tween 80) fue utilizado tal como se obtuvo de Panreac (Barcelona, España). El NaCl y el agua deionizada fueron obtenidos de Delta Química (Arequipa, Perú). La calidad del agua fue la siguiente: pH = 6,5, cloruro = 0 ppm, TDS (sólidos totales disueltos) = 0 ppm, densidad = 1,01 g/cm³, alcalinidad = 6,5 ppm y conductividad = 0 μS/cm. La función del NaCl es la de amplificar los valores de conductividad, ya que el sistema conteniendo agua deionizada, aceite esencial de naranja y Tween 80 tiene una conductividad muy baja al no tener suficientes grupos ionizables, por lo que la adición de NaCl permite una mejor lectura de los valores de conductividad para cada sistema en la determinación de la PIT. Cabe aclarar que el NaCl solo se utilizó para determinar la PIT, no utilizándose en la preparación de las nanoemulsiones.

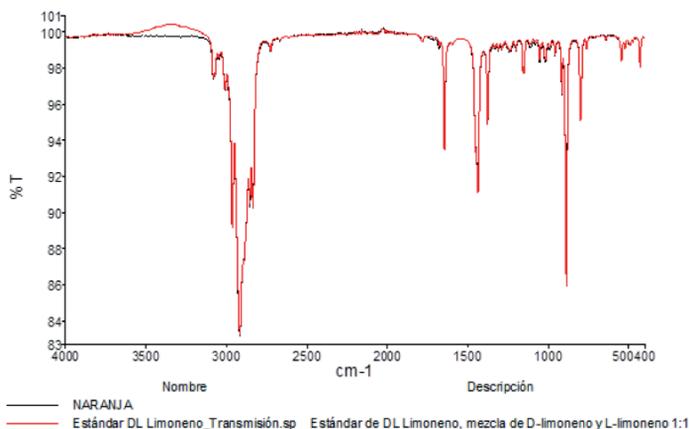


Figura 1. Espectro infrarrojo del D-limoneno.

Determinación del tamaño de partícula

El tamaño de las gotas de las nanoemulsiones fue determinado mediante la técnica de la dispersión dinámica de luz (DLS). Para tal fin se utilizó el analizador de tamaño de partícula Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). Las mediciones fueron llevadas a cabo a un ángulo de dispersión de 90° utilizando un láser de He-Ne ($\lambda=633$ nm) a 25 °C. Los resultados de tamaño de partícula se presentaron en términos del diámetro promedio (Z-Average). Cabe resaltar que la evaluación de los mecanismos de desestabilización de las emulsiones y nanoemulsiones se determina tomando en cuenta la variación del tamaño promedio de las partículas en el tiempo, tal como se cita en la literatura. Asimismo, el tamaño promedio se obtiene de la distribución de tamaño de partículas mediante el software incluido en el equipo Zetasizer Nano.

Estabilidad física de las nanoemulsiones

La estabilidad física de las nanoemulsiones fue determinada midiendo el tamaño de gota en función del tiempo utilizando la dispersión dinámica de luz (DLS).

Aplicación de la nanoemulsión en la remoción de diésel de arena

Se realizó una prueba puntual, por duplicado, evaluando la eficiencia de remoción de diésel de una muestra de arena de playa, empleando para tal fin la nanoemulsión más estable. La arena fue contaminada mediante la adición de 2 gramos de diésel en 10 gramos de arena y dejada en reposo por 24 horas. La limpieza de la arena se realizó añadiendo 30 ml de la nanoemulsión al sistema a 25 °C. Luego de 24 de horas se procedió a separar la nanoemulsión de la arena. La nanoemulsiones fue separada por centrifugación a 3000 rpm. Se utilizó esa cantidad de nanoemulsión en referencia al trabajo de Oliveira *et al.*⁷ En su investigación, ellos utilizaron 30 ml de nanoemulsión para realizar la limpieza de la arena. No se hicieron otras pruebas. El diésel remanente en la arena fue extraído mediante la adición de 30 ml de tolueno al sistema, luego de lo cual se dejó en reposo por una hora y se llevó a centrifugación por 30 minutos a 3000 rpm para separar la arena del tolueno conteniendo el diésel. La cuantificación del diésel en el tolueno fue llevada a cabo mediante espectrofotometría. La longitud de onda elegida para las mediciones fue de 354 nm, debido a que en esta longitud el diésel presentó la máxima absorbancia. El espectro de absorción del diésel fue el siguiente:

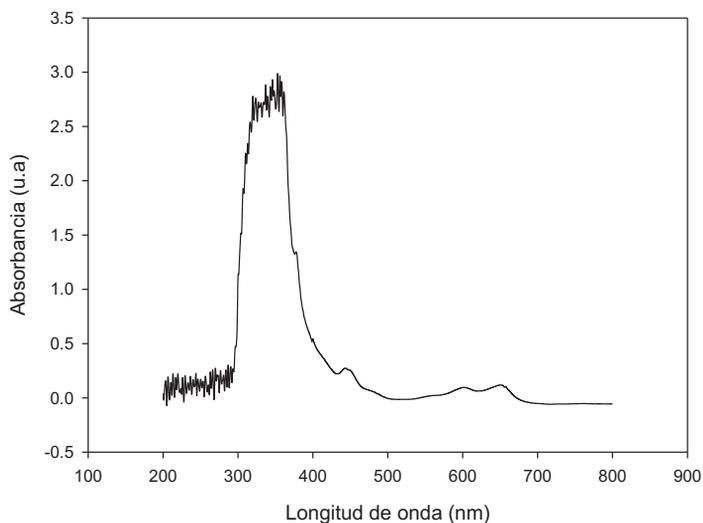


Figura 3. Espectro de absorción del diésel.

A esta longitud de onda de 354 nm, se realizaron mediciones de la absorbancia para diferentes soluciones patrón de diésel en tolueno, obteniéndose la siguiente curva de calibración con su respectiva ecuación:

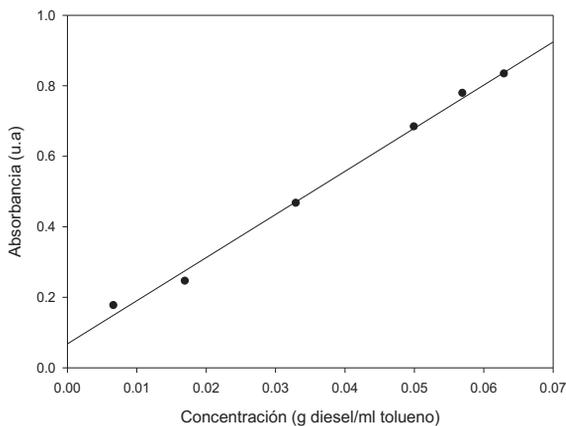


Figura 4. Curva de calibración para soluciones patrón de diésel en tolueno.

La ecuación de la gráfica es:

$$\text{Abs}=12,926\text{Conc}+0.032 \quad (3)$$

Los cálculos se realizaron reemplazando la medida de absorbancia en la ecuación de la curva, obteniendo por lo tanto la concentración de diésel remanente en la arena.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Temperatura de Inversión de Fase (PIT) de los sistemas

Los valores de la PIT de los sistemas fueron determinados midiendo la conductividad de las dispersiones a diferentes concentraciones de aceite y surfactante: 5 % de aceite esencial de naranja con 10 % y 12 % de Tween 80 y 20 % de aceite esencial con las mismas concentraciones de surfactante.

Las figuras 5 y 6 muestran la variación de la conductividad con la temperatura para todos los sistemas. La conductividad de las emulsiones se incrementa conforme aumenta la temperatura, alcanzando un punto máximo, para luego disminuir rápidamente. El valor de la PIT se calcula como el promedio de la temperatura a la cual se encuentra el máximo valor de conductividad y la temperatura correspondiente al valor mínimo de conductividad.

La tabla 2 muestra los valores de la temperatura de inversión de fase calculados para todos los sistemas. De esta tabla se observa que la PIT de las emulsiones conteniendo baja concentración de aceite fue más alta que aquellas conteniendo alta concentración de aceite. Este hecho pudo deberse a que la baja concentración de aceite ralentizó la inversión de fase de los sistemas, ya que no hubo suficiente cantidad de aceite para que el agua pueda dispersarse en ella. Debido a esto se necesitó una mayor temperatura para lograr una mayor solubilidad del agua en aceite.

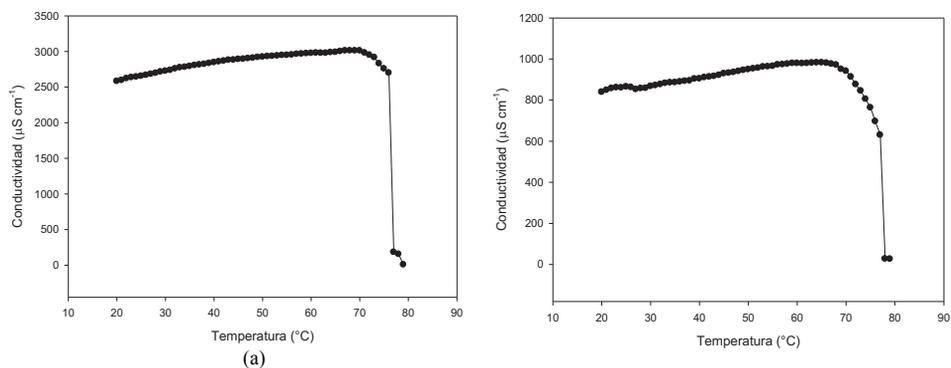


Figura 5. Conductividad en función de la temperatura para los sistemas 5 % aceite esencial de naranja a) 10 % y b) 12 % de Tween 80.

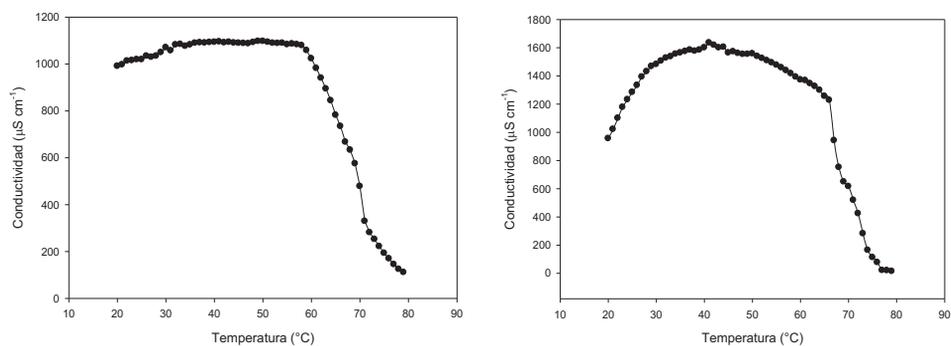


Figura 6. Conductividad en función de la temperatura para los sistemas 5 % aceite esencial de naranja a) 10 % y b) 12 % de Tween 80.

Tabla 1. Valores de la Temperatura de Inversión de Fase (PIT) para todos los sistemas.

Concentración de aceite (% p/p)	Concentración de surfactante (% p/p)	PIT (°C)
5	10	76
	12	73
20	10	63
	12	60

Preparación y caracterización de las nanoemulsiones

Las nanoemulsiones preparadas mediante el método PIT fueron caracterizadas en el analizador de tamaño de partícula. El radio de gota fue medido a distintos intervalos de tiempo hasta la aparición de dos fases, siendo este hecho indicio de la desestabilización de la nanoemulsión. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado. Los sistemas conteniendo 5 % de aceite esencial de naranja presentaron desestabilización de forma muy rápida, siendo evidente la formación de fases en un rango de dos horas desde su preparación, por lo que estos sistemas se descartaron para un posterior análisis. Considerando los sistemas conteniendo 20 % de aceite esencial de naranja, se observó que el sistema 20 % de aceite esencial y 10 % de Tween 80 presentó ciertas fluctuaciones en el tamaño de gota en el tiempo, sin embargo el tamaño de gota permaneció aproximadamente constante en el tiempo tal como se observa en la figura 7, así como en la distribución de tamaño de partícula (figura 8); seguidamente este sistema presentó formación de fases luego de un período de 15 días después de su preparación. Sin embargo, el sistema conteniendo 20 % de aceite esencial y 12 % de Tween 80 presentó un progresivo aumento del tamaño de gota en las primeras 24 horas posterior a su preparación, tal como se observa en la figura 7 y en la distribución de tamaño de partícula para este sistema (figura 9); pasado este tiempo el sistema presentó formación de fases.

Cabe resaltar que en ambos sistemas se observa que el tamaño inicial de partícula decrece conforme aumenta la concentración de surfactante, hecho que puede ser atribuido a un aumento del área en la interfase y a la disminución del valor de la tensión interfacial.

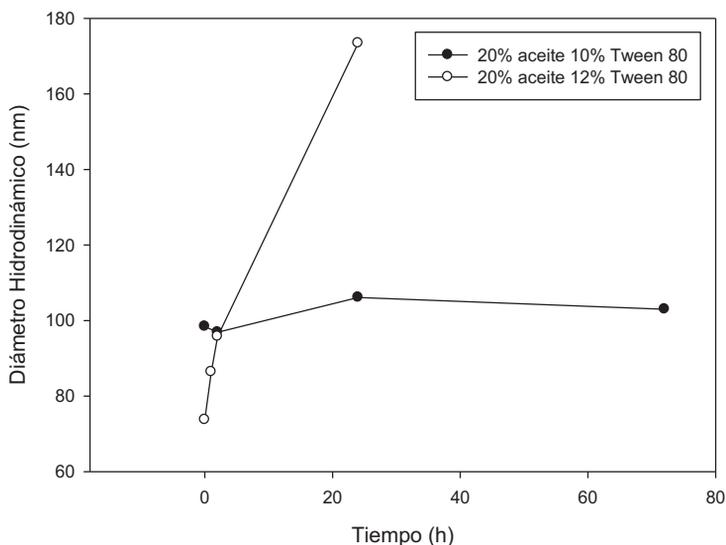


Figura 7. Diámetro hidrodinámico en función del tiempo para los sistemas 20 % de aceite esencial, 10 y 12 % de Tween 80.

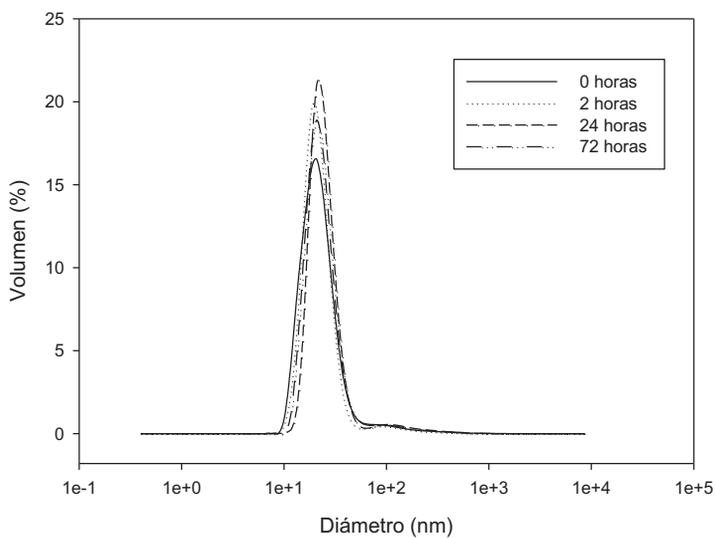


Figura 8. Distribución de tamaño de partícula para el sistema 20 % aceite esencial de naranja 10 % Tween 80.

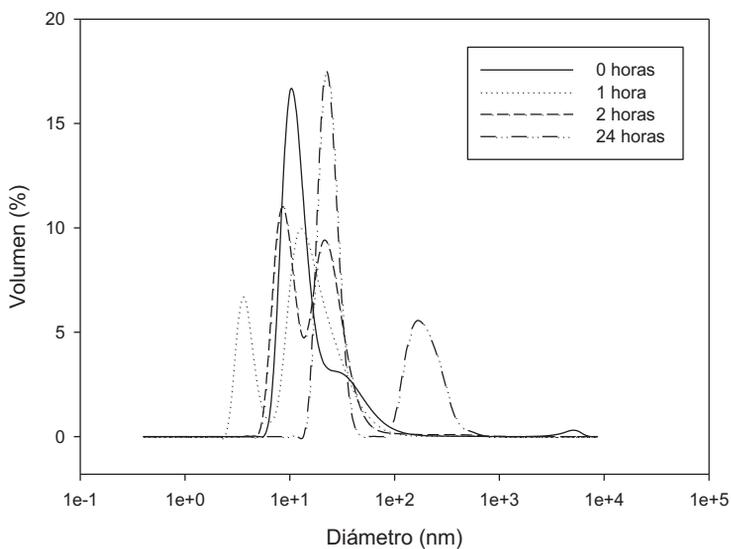


Figura 9. Distribución de tamaño de partícula para el sistema 20 % aceite esencial de naranja y 12 % Tween 80.

Determinación del principal mecanismo de desestabilización

Para el análisis y determinación del mecanismo de desestabilización, se tomaron los datos del sistema 20 % de aceite esencial de naranja y 12 % de Tween 80 (figura 7), debido a que este sistema presentó variaciones en el tamaño de partícula respecto al tiempo. Si la coalescencia fuera el principal mecanismo de desestabilización, entonces la variación del tamaño de gota en el tiempo debería obedecer a la ecuación (1), por lo que la gráfica de r^2 en función de t debería tener una tendencia lineal.

La figura 10 muestra la gráfica de r^2 en función de t para el sistema 20 % de aceite esencial y 12 % de Tween 80, observándose que la tendencia de la curva no fue lineal, determinándose de esta manera que la coalescencia probablemente no sea el principal mecanismo de desestabilización del sistema.

De igual manera, si la maduración de Ostwald fuera el principal mecanismo de desestabilización de la nanoemulsión, entonces la gráfica de r^3 en función del tiempo debería dar una línea recta tal como lo predice la ecuación (2).

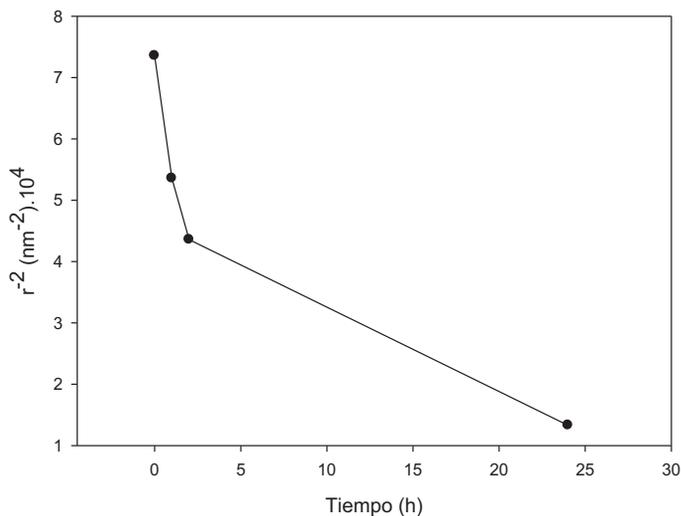


Figura 10. r^2 en función del tiempo. Sistema 20 % aceite esencial 12 % Tween 80.

La figura 11 predice una tendencia lineal entre r^3 y t , por lo que la maduración de Ostwald sería el principal mecanismo de desestabilización de este sistema. Este resultado está acorde con los estudios desarrollados por Izquierdo *et al.*⁶

La desestabilización de los sistemas puede explicarse en base al efecto de la concentración de aceite esencial de naranja y concentración de Tween 80 en la estabilidad de las emulsiones. La rápida desestabilización experimentada por los sistemas conteniendo 5 % de aceite esencial

pudo deberse a la baja concentración de aceite, lo cual probablemente aceleró el proceso de desestabilización, en concordancia con los hallazgos de Koroleva *et al.*⁸

De igual manera, la mayor concentración de surfactante causó la formación de una mayor cantidad de micelas, las cuales facilitaron la difusión de pequeñas moléculas de aceite hacia las moléculas más grandes, causando de este modo la maduración de Ostwald. En la figura 7 se puede observar que conforme aumentó la concentración de surfactante la velocidad de maduración de Ostwald también se incrementó, ya que el sistema conteniendo 12 % de Tween 80 presentó formación de fases en un tiempo mucho menor al observado en el sistema conteniendo 10 % de Tween 80.

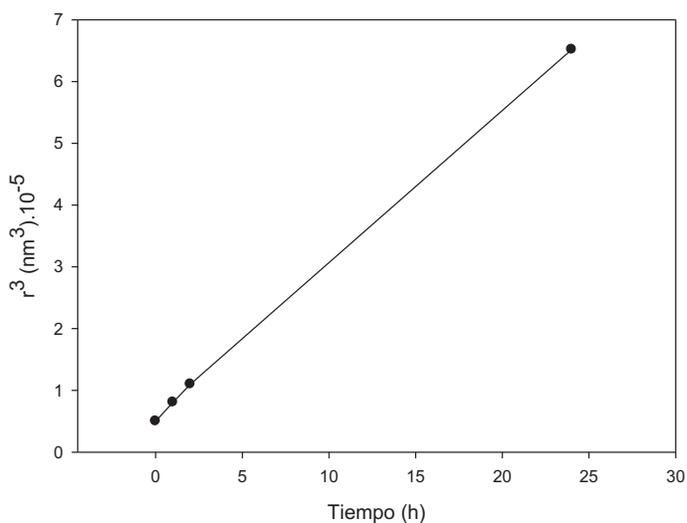


Figura 11. r^3 en función del tiempo. Sistema 20 % aceite esencial 12 % Tween 80.

Se explicó anteriormente que el aumento de la concentración de surfactante causaba una disminución en el tamaño de gota de las nanoemulsiones; Por lo que, al presentar las gotas un tamaño pequeño éstas exhiben un mayor movimiento Browniano, lo cual aceleró la desestabilización del sistema.

Considerando el sistema 20 % de aceite esencial de naranja y 10 % de Tween 80, los resultados muestran que este sistema es relativamente el más estable, estando este resultado acorde con el hallado por Oliveira *et al.*,⁷ y que fue explicado en la introducción de esta investigación. Este hecho puede deberse a que, según Capek,³ existe una concentración de surfactante que es la óptima para formar nanoemulsiones estables debido a que conforme aumenta la concentración de surfactante la tensión interfacial disminuye.

Cabe señalar que la nanoemulsión más estable obtenida por Oliveira *et al.*⁷ permaneció estable aproximadamente dos meses. Este período de tiempo superó ampliamente al tiempo de estabilidad determinado para el sistema 20 % de aceite esencial de naranja y 10 % de Tween 80, por lo que se deberían evaluar mezclas de Tween 80 junto con otros surfactantes, con el objetivo de obtener sistemas que presenten un mayor tiempo de estabilidad.

Eficiencia de remoción del diésel

En la prueba de remoción de diésel se utilizó la nanoemulsión más estable, la cual fue aquella conteniendo 20 % de aceite esencial de naranja y 10 % de Tween 80.

La eficiencia de remoción del diésel de la arena se calculó de la siguiente forma:

$$E(\%) = \frac{W_e}{W_o} \times 100 \quad (3)$$

en donde E (%) es la eficiencia de remoción en tanto por ciento, W_o es la cantidad de diésel inicial en la arena, W_e es la cantidad de diésel removido por la nanoemulsión. La eficiencia obtenida a 24 horas de acción de la nanoemulsión fue igual a 97,5 %, resultado superior al obtenido por Riojas *et al.*¹⁴, el cual fue aproximadamente igual a 80 %. Asimismo, este resultado es superior al obtenido por Oliveira *et al.*,⁷ quienes reportaron haber alcanzado una eficiencia de remoción del 96 % en la remoción de crudo.

La alta eficiencia de remoción alcanzada por la nanoemulsión conteniendo 20 % de aceite esencial de naranja y 10 % de Tween 80 muestra que este sistema tiene un gran potencial para aplicación en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

CONCLUSIONES

Se sintetizaron nanoemulsiones constituidas de aceite esencial de naranja, agua y Tween 80 mediante el método de la temperatura de inversión de fase (PIT). La nanoemulsión más estable correspondió al sistema constituido de 20 % de aceite esencial de naranja y 10 % de Tween 80, siendo este sistema estable por un período aproximado de quince días.

Los sistemas conteniendo 5 % de aceite esencial de naranja presentaron una rápida desestabilización, mientras que el sistema 20 % aceite esencial de naranja 12 % Tween 80 presentó una desestabilización progresiva, evidenciando formación de fases a las 24 horas de ser sintetizada. Analizando dichos sistema se determinó que el principal mecanismo subyacente en la desestabilización de las nanoemulsiones es la maduración de Ostwald.

Empleando la nanoemulsión más estable, 20 % aceite esencial de naranja 10 % Tween 80, se logró obtener una eficiencia de remoción de diésel de una muestra de arena de alrededor del 98 % en un tiempo de 24 horas, demostrándose de esta manera la potencialidad de la aplicación del aceite esencial de naranja en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Se recomienda por lo tanto, continuar con las investigaciones en este rubro.

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento a la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, UNSA, por el financiamiento del proyecto de investigación según contrato N° TT-0125-2016-UNSA. Asimismo, agradecer al Laboratorio de Operaciones Unitarias de la UNSA por las instalaciones prestadas para desarrollar el proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Komaiko JS, McClements DJ. Formation of Food-Grade Nanoemulsions Using Low-Energy Preparation Methods: A Review of Available Methods. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2016;15(2):331–52.
2. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter.* 2012;8(6):1719–29.
3. Capek I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004 Mar 19;107(2–3):125–55.
4. Espitia PJP, Fuenmayor CA, Otoni CG. Nanoemulsions: Synthesis, Characterization, and Application in Bio-Based Active Food Packaging. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2019 Jan 1;18(1):264–85.
5. Souza VB, Almeida SM, Spinelli LS, Mansur CRE. Stability of orange oil/water nanoemulsions prepared by the PIT method. *J Nanosci Nanotechnol.* 2011 Mar;11(3):2237–43.
6. Izquierdo P, Esquena J, Tadros TF, Dederen C, Garcia MJ, Azemar N, et al. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. *Langmuir.* 2002;18(1):26–30.
7. Oliveira PF, Spinelli LS, Mansur CRE. The Application of Nanoemulsions with Different Orange Oil Concentrations to Remediate Crude Oil-Contaminated Soil. *J Nanosci Nanotechnol.* 2012;12(5):4081–7.
8. Koroleva M, Nagovitsina T, Yurtov E. Nanoemulsions stabilized by non-ionic surfactants: stability and degradation mechanisms. *Phys Chem Chem Phys.* 2018 Apr 18;20(15):10369–77.
9. Deminiere B, Colin A, Calderon FL, Bibette J. Chapter 8. Lifetime and Destruction of Concentrated Emulsions Undergoing Coalescence. In: *Modern Aspects of Emulsion Science.* Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1998. p. 261–91.
10. Taylor P. Ostwald ripening in emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 1998 ;75(2):107–63.
11. McClements DJ. Biopolymers in Food Emulsions. In: *Modern Biopolymer Science.* Elsevier; 2009. p. 129–66.
12. Befkadu AA, Chen Q. Surfactant-Enhanced Soil Washing for Removal of Petroleum Hydrocarbons from Contaminated Soils: A Review. *Pedosphere.* 2018; 28(3):383–410.
13. Paria S. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Adv Colloid Interface Sci.* 2008;138(1):24–58.
14. Riojas-González HH, Gortáres-Moroyoqui P, Mondaca-Fernández I, Balderas-Cortes JJ, Torres-Bustillos LG. Evaluación de la biorremediación aplicando mezclas de surfactante-

- solvente en suelo contaminado con diesel. *Rev Latinoam Recur Nat.* 2010; 6(2):100–9.
15. Oliveira MCK de, Gonzalez Maldonado G. Composição para remediação de solos e resíduos sólidos contaminados por hidrocarbonetos de alto peso molecular. Escavador. PI0605007-7, 2006.
 16. Schramm LL. *Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry.* Cambridge: Cambridge University Press; 2000.

ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y CIANIDINA-3- GLUCÓSIDO DEL MAÍZ MORADO (*Zea mays* L.) DE TRES REGIONES DEL PERÚ

Ana María Ccaccya Ccaccya^a, Mercedes Soberón Lozano^b, Inés Arnao Salas^b

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar el contenido de los compuestos bioactivos en coronta de maíz morado (*Zea mays* L.) de tres diferentes regiones del Perú. Las muestras fueron obtenidas en Lima, Abancay y Cajamarca y se determinó el contenido total de polifenoles, flavonoides, antocianinas y cianidina-3-glucósido. Los extractos fueron obtenidos con etanol al 20 %, pH 2, en una relación coronta: solvente 1:100 (p/v) a una temperatura de 70 °C por 30 minutos. Los resultados de antocianinas totales fueron de 24,4 a 42,6 mg/g, los polifenoles totales estuvieron en el rango de 67,9 a 94,1 µg/mg expresado como equivalente de ácido gálico (EAG) y los flavonoides entre 3,1 a 4,4 µg/mg expresado como equivalente de quercetina (EQ). El contenido de cianidina-3-glucósido varió de 9,5 a 18,5 mg/g y fue determinado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Existen diferencias significativas en el contenido de los compuestos bioactivos según la procedencia de la muestra, y la de Lima presenta los valores más altos de polifenoles (94,1 µg EAG/mg), flavonoides (4,4 µg EQ/mg), antocianinas totales (42,6 mg/g) y cianidina-3-glucósido (18,5 mg/g).

Palabras clave: maíz morado, compuestos bioactivos, antocianinas, cianidina-3-glucósido.

COMPARATIVE STUDY OF THE CONTENT OF BIOACTIVES COMPOUNDS AND CYANIDIN-3-GLUCOSIDE OF THE PURPLE CORN (*Zea mays* L.) OF THREE REGIONS OF PERU

ABSTRACT

The aim of the research was to evaluate the content of the bioactives compounds in purple corn cob (*Zea mays* L.) of three different regions of Peru. The samples were obtained in Lima, Cajamarca and Abancay and the total polyphenols, flavonoids, anthocyanins and cyanidin-3-glucoside content were determined. The extracts were obtained with ethanol to 20 %, pH 2, in a ratio of corn cob: solvent 1:100 (p/v) at a temperature of 70 °C for 30 minutes.

^aFacultad de Química e Ingeniería Química, UNMSM, Ciudad Universitaria, Av. Venezuela. Lima-Perú. maria_jlas@yahoo.com

^b Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Medicina, UNMSM, Jr. Puno. Lima-Perú.

The results of total anthocyanins were between 24,4 to 42,6 mg/g, the total polyphenols were in the range 67,9 to 94,1 µg/mg expressed as gallic acid equivalent (GAE) and the flavonoids between 3,1 to 4,4 µg/mg expressed as quercetin equivalent (QE). The cyanidin-3-glucoside content varied in the range from 9,5 to 18,5 mg/g and was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). There are significant differences in the content of the bioactives compounds according to the origin of the sample, and that of Lima (Cañete) present the highest value of polyphenols (94,1 µg GAE/mg), flavonoids (4,4 µg QE/mg) total anthocyanins (42,6 mg/g) y cyanidin-3-glucoside (18,5 mg/g).

Key words: purple corn, bioactives compounds, anthocyanins, cyanidin-3-glucoside.

INTRODUCCIÓN

El Perú es un país de gran biodiversidad y uno de sus recursos vegetales es el maíz morado (*Zea mays* L.) que presenta más de 35 variedades, pero todas ellas originadas a partir de la raza Kculli, que aún se sigue cultivando. Sus principales zonas de producción están en los departamentos de Cajamarca, Ayacucho, Ancash, Lima y Arequipa, siendo su ámbito de adaptación la costa y valles interandinos de la sierra hasta 3200 msnm¹.

El cultivo de maíz morado es valorado en el mercado nacional e internacional debido a su gran potencial nutricional y por su contenido de compuestos bioactivos (antocianinas y compuestos fenólicos). Investigaciones determinaron la presencia de ácidos fenólicos tales como el ácido vanílico, ácido cafeico y ácido ferúlico, además de otros flavonoides como hesperidina, quercetina y kaempferol².

Muchas de las propiedades del maíz morado son atribuidas a su alto contenido de antocianinas, pigmentos que son responsables del color morado, rojo y azul de flores, hojas y frutos. Su consumo es de interés para la industria de colorantes alimenticios, debido a su capacidad para impartir colores atractivos y para la industria farmacéutica, por sus acciones benéficas para nuestra salud. Diversos estudios realizados demuestran que las antocianinas poseen actividad antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, antidiabética y antiinflamatoria³.

La principal antocianina y responsable de las propiedades antioxidantes en el maíz morado es la cianidina-3-glucósido, la cual ha sido cuantificada por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por Arriaga y Castro⁴, Pedreschi y Cisneros⁵, y Salinas *et al.*⁶ quienes han usado variedades de maíz morado procedentes de Cajamarca, Lima y México, respectivamente.

Teniendo en consideración que el contenido de los compuestos bioactivos depende de factores intrínsecos como la genética de la planta y factores extrínsecos como las condiciones ambientales del cultivo, nos propusimos comparar la concentración de polifenoles totales, flavonoides, antocianinas totales y cianidina-3-glucósido presentes en la coronta del maíz morado, procedente de tres diferentes regiones del Perú.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Las corontas de maíz morado utilizadas en la presente investigación, se recolectaron de tres diferentes lugares del Perú entre los meses de julio 2017 a marzo 2018: Distrito de Pacarán, provincia Cañete de la región de Lima (700 msnm), distrito de Pichirhua, provincia Abancay de la región de Apurímac (2293 msnm) y en el distrito de Eduardo Villanueva, provincia San Marcos de la región de Cajamarca (2007 msnm). Todas las muestras fueron obtenidas de sus mismas zonas de cultivo.

Preparación de la muestra

La coronta de maíz morado fue previamente cortada en trozos pequeños, secado a 37 °C en una estufa INDUMELAB hasta peso constante; molido en una licuadora doméstica para finalmente pasarlo por una malla N°60 y así obtener una muestra homogénea. Luego fue almacenado a temperatura ambiente en frascos oscuros.

Todos los reactivos empleados en la presente investigación fueron de grado analítico obtenidos de la casa Merck y Sigma Aldrich.

Obtención de los extractos

La extracción de los compuestos bioactivos de la coronta molida de maíz morado se realizó con etanol al 20 %, pH 2 ajustado con HCl concentrado, en una relación coronta: solvente 1:100 (p/v). Se colocó por 30 minutos a 70 °C en baño maría BIOBASE y el extracto obtenido fue filtrado a través de papel Whatman N°40, para luego proseguir con el ensayo.

Métodos de análisis de los compuestos bioactivos

Determinación de antocianinas totales por método de pH diferencial

El contenido de antocianinas totales fue determinado por el método de pH diferencial descrito por Giusti y Wroshtad⁷. Las diluciones fueron preparadas en buffer de cloruro de potasio (pH 1,0) y acetato de sodio (pH 4,5) empleando el potenciómetro METROHM. Las absorbancias fueron leídas en el espectrofotómetro GENESYS UV VIS a dos longitudes de onda 510 nm y 700 nm.

Su contenido se expresó como cianidina-3-glucósido y se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$A = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH1} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH4.5}$$

$$\text{Antocianinas totales} \frac{\text{mg}}{\text{g}} = \frac{A_{\lambda} \times MW_{\lambda} \times FD_{\lambda} \times V}{\epsilon_{\lambda} \times l \times W}$$

Donde:

MW (Peso molecular) = 449,2 g/mol para cianidina-3-glucósido; FD = factor de dilución; l = longitud de paso de celda en cm; ϵ = 26900 coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido; V = volumen mL del solvente de extracción; W = peso en g de la muestra.

Determinación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles se realizó conforme el procedimiento de la organización (ISO) 14502-1, usando un extracto etanólico de coronta de maíz morado al 0,5 mg/mL. El tubo de reacción contenía 100 μ L del extracto, 500 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu y 400 μ L de Na_2CO_3 7,5 % (p/v) y las absorbancias fueron leídas a 765 nm. Se realizó una curva de calibración empleando al ácido gálico como referencia en el rango de concentraciones de 0,5 a 10 μ g/mL ($y=0,09973x+0,01553$, $R^2 =0,999$) y los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG) en μ g/mg.

Determinación de flavonoides

La cuantificación de flavonoides se realizó según el procedimiento de Stalikas⁸, usando un extracto etanólico de coronta molida a 7 mg/mL. El tubo de reacción se preparó mezclando: 100 μ L del extracto, 800 μ L de etanol y 100 μ L AlCl_3 al 20 % (p/v) y después de 30 minutos se leyó a 425 nm. La medición se realizó empleando un blanco de muestra, en el cual se sustituyó el tricloruro de aluminio por etanol. Se preparó una curva de calibración empleando como referencia la quercetina en el rango de concentraciones de 0,5 a 14 μ g/mL ($y= 0,07399x+0,00294$, $R^2 =0,999$). Los resultados se expresaron como equivalentes de quercetina (EQ) en μ g/mg.

Determinación de cianidina-3-glucósido mediante HPLC

Las condiciones de análisis fueron previamente descritas por Arriaga y Castro⁴. Se utilizó un equipo HPLC Hitachi con detector de arreglo de diodos. La separación se realizó en una columna Purospher STAR RP18 de 250 mm de longitud, diámetro 4,6mm y tamaño de partícula de 5 μ m. La fase móvil estuvo compuesta de una solución A (ácido fórmico/agua/metanol en proporción de 1:4:5) y una solución B (ácido fórmico/agua en una proporción de 1:9) y el gradiente de elución utilizado fue: 0 min 10 % A, 10 min 73 % A, 12 min 73 % A, 20 min 10 % A. Las lecturas fueron realizadas a 520 nm. La identificación de la cianidina-3-glucósido se realizó comparando el tiempo de retención de la muestra con el estándar y su cuantificación fue calculada en base a la relación de sus áreas. Las concentraciones de cianidina-3-glucósido se expresaron en mg/ g de coronta.

Análisis Estadístico

Todos los resultados se expresaron como promedio y desviación estándar de tres determinaciones independientes y fueron evaluados usando el paquete estadístico MINITAB 17. Para el análisis estadístico se aplicó ANOVA y el método de comparaciones Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de antocianinas por el método de pH diferencial

Las antocianinas son compuestos bioactivos presentes en el maíz y son responsables de los colores de este recurso nativo, por ello se espera que las variedades de pigmentación más intensa del maíz morado presenten una cantidad elevada de compuestos antociánicos. Uno de los factores que influye en su cuantificación es la eficacia de la extracción, lo cual depende de la naturaleza química de las antocianidinas, si están esterificadas tenderán a disolverse mejor en medio metanólico y si están glicosilada en medio acuoso⁹.

Los niveles de antocianinas de la coronta de maíz morado de las muestras ensayadas se presentan en la tabla 1 y varían entre 24,4 a 42,6 mg/g, siendo mayor en la muestra obtenida del departamento de Lima.

En nuestro país existe información sobre la determinación de antocianinas en muestras procedentes de Cajamarca y de Arequipa. Resultados reportados por Rafael¹⁰ y Gorriti *et al*¹¹ bajo condiciones de extracción similares a las desarrolladas en la presente investigación muestran valores de antocianinas de 8,7 mg/g y 25,9 mg/g, respectivamente. Para el primer caso, la obtención de la coronta de maíz morado fue en el mercado de Cajamarca y no se conocen las condiciones de cosecha, recolección y almacenamiento que pudieran haber influido en la estabilidad de las antocianinas ya que Rafael¹⁰, menciona que la luz solar y sobre todo la temperatura pueden dar lugar a la hidrólisis del enlace glucosídico (posición 3) seguido de la ruptura del anillo y como efecto formación de chalconas incoloras. Esto podría explicar nuestros valores más altos de antocianinas ya que las muestras fueron obtenidas 3 días después de su cosecha e inmediatamente tratadas y almacenadas adecuadamente.

Por otro lado, Quispe *et al*¹², con muestras obtenidas de Arequipa, reportaron valores de contenido de antocianinas entre 13,4 a 20,6 mg/g, que fueron extraídas con etanol al 20% pH 2 durante un tiempo de 60 minutos a la temperatura de 90 °C, estos valores están por debajo de lo encontrado en nuestra investigación. Debemos mencionar que en nuestro laboratorio ensayamos la influencia del tiempo y temperatura, donde observamos que a temperaturas mayores a 70 °C y 30 minutos, el contenido de antocianinas disminuye. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Gu *et al*¹³ donde demostraron que las antocianinas a temperaturas por encima de los 70 °C se degradan siguiendo una cinética de primer orden y que dicha degradación térmica ocasiona la hidrólisis del enlace glucosídico, ruptura del anillo pirililo y formación de chalconas incoloras.

Ramos *et al*² determinaron antocianinas en granos de maíz morado procedente de Cajamarca, para su extracción emplearon soluciones metanólicas ácidas a diferentes concentraciones obteniendo valores de 0,9 a 2,9 mg/g, que son significativamente menores a nuestro contenido de antocianinas de dicha región (34,1 mg/g). El mayor valor obtenido en nuestro estudio se justificaría por que en nuestra determinación usamos la coronta del maíz morado, donde es conocido que se concentra el mayor contenido de antocianinas, comparado con los granos de dicho fruto, hecho que fue confirmado por Arriaga y Castro⁴.

Determinación de polifenoles

En la tabla 1, se presentan los resultados de la cuantificación de polifenoles para las tres diferentes regiones donde la muestra de Lima presenta el mayor contenido, con un valor de 94,1 μg EAG/mg de coronta.

Se ha determinado el contenido de polifenoles totales para muestras de corontas de maíz morado de la región Arequipa. Gorriti *et al*¹¹ y Quispe *et al*¹², encontraron valores de 77,0 μg EAG/mg y 40,6 μg EAG/mg respectivamente. Para el primer caso, la fecha de recolección fue entre los meses de febrero y abril, muy próxima a la de nuestra muestra de Cajamarca (entre febrero y marzo), lo que explicaría los valores cercanos. Para el segundo caso la recolección se hizo en noviembre y su resultado difiere totalmente de nuestras tres muestras investigadas. En ambos casos los factores que podrían haber influido en el contenido de polifenoles serían la altitud, condiciones climáticas, edafológicas y agronómicas.

Ramos *et al*² cuantificaron los polifenoles en granos de maíz morado de Cajamarca y encontraron valores de 4,6 a 8,7 μg EAG/mg y Mex *et al*⁹ realizaron estudios de cinco variedades de maíces cultivados en México obteniendo el valor más alto en granos de maíz morado con 14,5 μg EAG/mg. En ambos estudios, los datos de polifenoles reportados en granos fueron inferiores a los de la coronta de maíz morado de nuestra investigación, lo cual también fue ya mencionado para el caso de las antocianinas, componente de este grupo químico.

Determinación de flavonoides

Existen pocos estudios sobre dicho análisis, uno de ellos es el de Ramos *et al*² quienes trabajaron en granos de maíz morado de Cajamarca expresando sus resultados en equivalente de rutina (ER), en el rango de 1,2 a 2,6 μg ER/mg. En la presente investigación se usó la quercetina como referencia y obtuvimos de 3,1 a 4,4 μg EQ/mg de coronta, no siendo posible un análisis comparativo en equivalencia.

Tabla 1. Contenido de los compuestos bioactivos de la coronta del maíz morado de tres regiones del Perú.

Provincia/ Departamento	Compuestos Bioactivos			
	Antocianinas Totales (mg/g)	Polifenoles (μg EAG/mg)	Flavonoides (μg EQ/mg)	Cianidina-3- glucósido (mg/g)
Cañete (Lima)	42,6 \pm 0,2 ^a	94,1 \pm 2,0 ^a	4,4 \pm 0,2 ^a	18,5 \pm 0,2 ^a
San Marcos (Cajamarca)	34,1 \pm 0,2 ^b	75,4 \pm 1,7 ^b	3,6 \pm 0,1 ^b	10,3 \pm 0,1 ^b
Abancay (Apurímac)	24,4 \pm 0,3 ^c	67,9 \pm 2,2 ^c	3,1 \pm 0,1 ^c	9,5 \pm 0,1 ^c

Todos los datos son promedios de tres repeticiones independientes.

^{a,b,c} diferencia significativa con p-valor <0,05.

EAG: Equivalente de ácido gálico; EQ: Equivalente de quercetina.

Determinación de cianidina-3-glucósido mediante HPLC

En la figura 1, los perfiles cromatográficos de las tres muestras son parecidos, variando sólo en la proporción de cada antocianina. Los picos predominantes fueron 1 y 3, el primero fue identificado comparando el tiempo de retención del estándar cianidina-3-glucósido (figura 1A) con las tres muestras (figura 1B, 1C y 1D), para finalmente determinar su concentración comparando sus áreas respectivas. El pico 3, según Salinas *et al*⁶, es la cianidina-3-(6"-malonilglucósido).

Según Pedreschi y Cisneros⁵, la cianidina-3-glucósido representa el principal tipo de antocianina presente en el extracto comercial de maíz morado obtenido de Lima, seguido por la cianidina-3-glucósido acilada. Asimismo, Cuevas *et al*¹⁴ investigaron sobre la caracterización de las antocianinas en granos de diferentes variedades de maíz boliviano, donde identificaron a la cianidina-3-glucósido y cianidina-3-(6"-malonilglucósido) como las mayoritarias, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación.

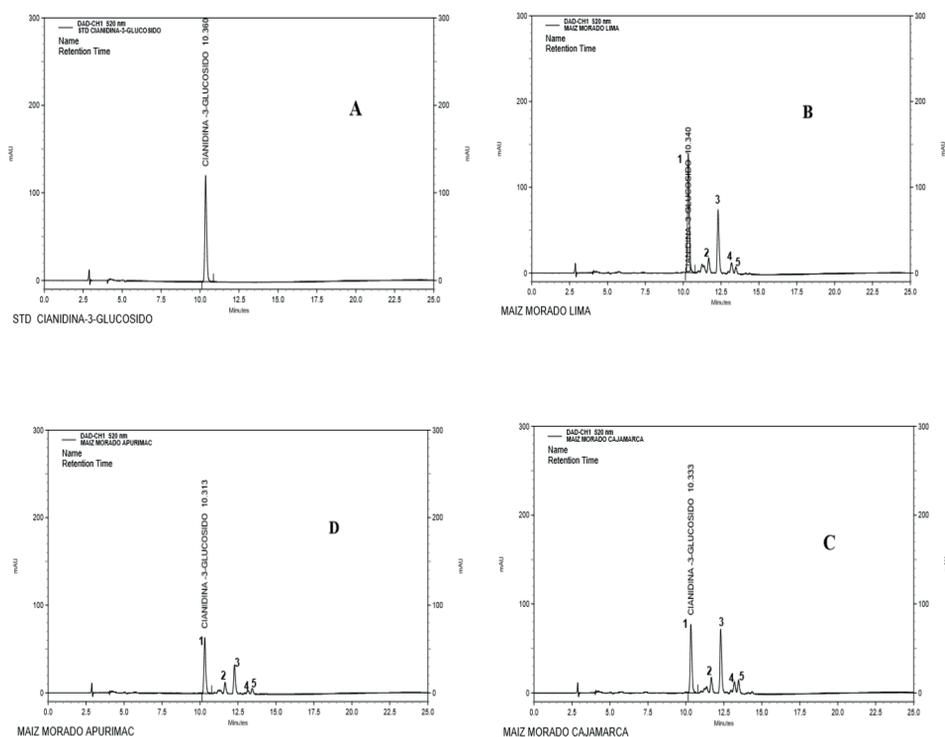


Figura 1. Cromatogramas A) Estándar de cianidina-3-glucósido B) Perfil obtenido del extracto de Lima C) Perfil obtenido del extracto de Cajamarca D) Perfil obtenido del extracto de Apurímac.

En la tabla 1 se puede observar las concentraciones de cianidina-3-glucósido de diferentes regiones del Perú, donde se evidencia que la muestra de Lima presenta el mayor valor con un promedio de 18,5 mg/g. Arriaga y Castro⁴ estudiaron el contenido de cianidina-3-glucósido en coronta de seis muestras proporcionadas por el Instituto Nacional de Innovación Agraria y que fueron cultivadas en Cajamarca, donde concluyeron que la variedad identificada con el nombre de Sintético Amplio era la de mayor contenido (30,8 mg/g). Una probable explicación a este valor más alto, es que la muestra fue obtenida de un banco de germoplasma y fue genéticamente mejorada siendo por lo tanto las condiciones de cultivo diferentes a las especies de maíz morado de la presente investigación.

Por otro lado, Pedreschi y Cisneros⁵ determinaron el contenido de cianidina-3-glucósido en maíz morado de una muestra comercial proporcionado por Fitofarma (Lima), encontrando 15,4 mg/g, siendo inferior al valor de nuestra muestra de Lima. Es necesario indicar que la muestra comercial correspondió a un extracto seco atomizado de maíz morado, además para su extracción se empleó la técnica de maceración en etanol al 60 % por 48 horas a temperatura ambiente y tecnologías de secado por aspersión, mientras nosotros trabajamos con corontas de maíz morado bajo condiciones de laboratorio y condiciones de extracción diferentes.

Hernández *et al*¹⁵ realizaron la cuantificación de cianidina-3-glucósido en granos de maíz morado de diferentes variedades mexicanas obteniendo un máximo de 0,6 mg/g, contenido que es muy inferior al rango de 9,5 a 18,5 mg/g que presentaron las 3 muestras de maíces peruanas, lo que confirma el menor valor de los compuestos bioactivos en granos en comparación con las corontas del maíz morado.

Finalmente, podemos mencionar que las variaciones en el contenido de los compuestos bioactivos del maíz morado en la presente investigación, podrían ser explicadas por diversos factores, entre estos tenemos, la fecha de recolección del recurso vegetal, las condiciones edafológicas, agronómicas, climáticas, diversidad genética, la naturaleza de la muestra, condiciones de extracción (efecto de tiempo, temperatura, concentración) entre otros. De estos factores, los 5 primeros tendrían una importante influencia en el maíz morado de Lima, por ser la muestra con mayor contenido de compuestos bioactivos.

CONCLUSIÓN

Los resultados de antocianinas totales, polifenoles totales, flavonoides y cianidina-3-glucósido de coronta de maíz morado procedente de Lima (Cañete) fueron los que presentaron los valores más altos, lo cual puede ser de interés para la industria alimentaria y farmacéutica.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento al Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la UNMSM por el apoyo brindado durante la realización de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MINAGRI: Ministerio de Agricultura y Riego. Maíz morado. [Internet]; 2017 [citado 2 nov 2018]. Disponible en: <http://repositorio.minagri.gob.pe/handle/MINAGRI/506>
2. Ramos F, Muñoz AM, Alvarado C, Yáñez J. Purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. *J Med Food*. 2012; 15(2): 206-215.
3. Aguilera M, Reza M, Chew R, Meza J. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*. 2011; 13(2):16-22.
4. Arriaga B, Castro I. Determinación de la concentración de cianidina -3-glucósido por cromatografía líquida de alta resolución en *Zea mays* L. “maíz morado” procedente del Instituto Nacional de Innovación Agraria. [Tesis de Pregrado]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2011.
5. Pedreschi R, Cisneros L. Phenolics profiles of andean purple corn (*Zea mays* L.). *Food Chem*. 2007; 100: 956-963.
6. Salinas Y, Salas G, Rubio D, Ramos N. Characterization of anthocyanins extracts from maize kernels. *J Chromatogr Sci*. 2005; 43: 483-487.
7. Giusti MM, Wrosltad RE. Characterization and measurements of anthocyanins by UV-VIS spectroscopy. *CPFAC*. 2001; F1.2.1-F.2.13.
8. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci*. 2007; 30(18): 3268–3295.
9. Mex RMJ, Bolívar NJ, Garma PM, Tut JA, Romero KI. Actividad antioxidante de cinco variedades de maíz cultivadas en Campeche, México. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*. 2013; 12(6):558-571.
10. Rafael E. Extracción y Cuantificación de Antocianinas de maíz morado (*Zea mays* L.) utilizando dos solventes a diferentes temperaturas y tiempos de extracción. [Tesis de pregrado]. Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca; 2017.
11. Gorriti A, Arroyo J, Negrón L, Jurado B, Purizaca H, Santiago I, et al. Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de las corontas del maíz morado (*Zea mays* L.): Método de extracción. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*. 2009; 8 (6): 509-518.
12. Quispe F, Arroyo K, Gorriti A. Características morfológicas y químicas de 3 cultivares de maíz morado (*Zea mays* L.) en Arequipa-Perú. *Rev Soc Quim Perú*. 2011; 73(3):205-217.
13. Yang Z, Han Y, Gu Z, Fan G, Chen Z. Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2007; 9(3): 341-347.
14. Cuevas E, Antezana A, Winterhalter P. Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz morado (*Zea Mays* L.) boliviano. *Memorias Red-Alfa Lagrotech*. 2008; 79-95.

15. Hernández J, Rosales A, Molina A, Miranda A, Willcox M, Hernández JM, *et al.* Cuantificación de antocianinas mediante espectroscopia de infrarrojo cercano y cromatografía líquida en maíces pigmentados. *Fitotec.* 2017; 40(2):219-225.

EVALUACIÓN DE LA ADSORCIÓN DEL CARBÓN OBTENIDO DEL MESOCARPIO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) MODIFICADO POR ULTRASONIDO

Diego Suárez Ramos*, Elvito Fabián Villegas Silva^b

RESUMEN

La presente investigación usó el mesocarpio del cacao (residuo de la producción de chocolate) como material precursor de carbón vegetal. Este se sometió a temperaturas de 500°C, 600°C y 700°C por tiempos de 30, 60 y 90 minutos. Los carbones obtenidos fueron triturados y clasificados según su diámetro en grano fino y grueso. Posteriormente, se evaluó la capacidad de adsorción de cada tratamiento con ácido oxálico (C₂H₂O₄) para determinar el carbón vegetal óptimo a usar como blanco. De acuerdo con los resultados, el tratamiento 600°C60'F presentó la mejor capacidad de adsorción. Este se sometió a ultrasonido a 20kHz a diferentes amplitudes de onda (20 % y 40 %) así como tiempos de exposición de 5, 10 y 20 minutos. La evaluación se hizo en relación al blanco través de parámetros fisicoquímicos tales como cinética y equilibrio químico, isothermas de adsorción de C₂H₂O₄ y estimación de la superficie de adsorción. Finalmente, los resultados muestran que la exposición al ultrasonido genera un efecto positivo en el incremento de la capacidad de adsorción del carbón vegetal, obteniéndose un aumento de la eficiencia hasta de 41,84 % y una superficie de adsorción de 1068,75m² para el tratamiento C(US)40%5'.

Palabras clave: mesocarpio de cacao, pirólisis, carbón activado, ultrasonido, isothermas de adsorción, superficie de adsorción.

EVALUATION OF THE ADSORPTION OF THE MODIFIED CARBON BY ULTRASOUND OBTAINED FROM THE MESOCARPIO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.)

ABSTRACT

The present research used cocoa mesocarp (chocolate production residue) as a precursor material of charcoal. This residue was subjected to temperatures of 500°C, 600°C and 700°C for times of 30, 60 and 90 minutes. Charcoals obtained were ground and classified according to their particle diameter in fine and coarse. Subsequently, the adsorption capacity of each

*^aCentro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental, Departamento Académico de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Perú.
diegosuarez@lamolina.edu.pe

^b Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental, Departamento Académico de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú. elvito@lamolina.edu.pe

treatment with oxalic acid ($C_2H_2O_4$) was evaluated to determine the optimum charcoal to be used as a blank. According to results, $600^\circ C/60^\circ F$ treatment showed the best adsorption capacity. This one was subjected to ultrasound at 20kHz at different wave amplitudes (20 % and 40 %) as well as exposure times of 5, 10 and 20 minutes. Evaluation was compared to blank through physicochemical parameters such as chemical kinetics and equilibrium, isotherms of adsorption of $C_2H_2O_4$, and estimation of the adsorption surface. Finally, results show that exposure to ultrasound generates a positive effect in increasing adsorption capacity of charcoal, obtaining an increase in efficiency of up to 41.84 % and an adsorption surface of $1068.75m^2$ for treatment C(US)40% 5'.

Key words: cacao mesocarp, pyrolysis, activated carbon, ultrasound, adsorption isotherms, adsorption surface.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la preocupación por los niveles de contaminación ambiental ha hecho que la comunidad científica busque soluciones basadas en principios fisicoquímicos tangibles capaces de reducir la movilidad de los contaminantes y su toxicidad. Con miras a este fin, el presente trabajo de investigación busca generar nuevo conocimiento en el campo del tratamiento de la estabilización-solidificación de contaminantes, específicamente pretende innovar la forma tradicional de producir carbón activado conocido por su alta porosidad y propiedades superficiales de alta adsorción por Bastidas *et al.*¹. Como es sabido, la producción del carbón activado se ha realizado a través de dos rutas principales; una por medio del uso de gases de reacción a altas temperaturas, proceso que también es conocido como activación física, y otra por medio de la impregnación de éste con sustancias corrosivas también mencionada por Sik² como activación química.

La investigación aspira a eliminar el uso de gases de reacción como sustancias químicas de impregnación mediante el uso de intenso de ondas ultrasónicas, las cuales al viajar en alta frecuencia a través de un medio líquido generan pequeñas cavidades que se expanden y posteriormente implosionan, creando altas presiones, microcorrientes a chorro y una gran cantidad de calor por Brennen³. Estas extremas condiciones proporcionan un inusual ambiente fisicoquímico el cual podría ser aprovechado en la limpieza los poros e intersticios entre los planos carbonados de la estructura tridimensional del carbón vegetal de tal forma que se logre aumentar su capacidad de adsorción.

Para poder evaluar relación entre el ultrasonido y la capacidad de adsorción en el carbón vegetal, se comparó la eficiencia de adsorción de ácido oxálico ($C_2H_2O_4$) en diferentes tratamientos sometidos a ultrasonido y un carbón usado como blanco obtenido del mesocarpio del cacao (*Theobroma cacao L.*).

PARTE EXPERIMENTAL

A) Carbonización de la materia prima

Se pesó aproximadamente 200g del mesocarpio de cacao (masa seca) por cada tratamiento. Luego se trozó en pedazos de un tamaño aproximado de 1cm² y se distribuyó en 04 cápsulas de porcelana de 100mL (aproximadamente 50g por cápsula). Posteriormente se introdujeron en una mufla y se sometieron a temperaturas de destilación de 500°C, 600°C y 700°C durante tiempos de 30, 60 y 90min para cada temperatura. Posteriormente, se dejó enfriar las cápsulas unos minutos dentro de un desecador, se pesó la masa carbonizada y se determinó el rendimiento de la pirolisis (%R) para cada uno de los 9 tratamientos.

B) Selección del carbón vegetal (selección del blanco)

Del proceso de carbonización se obtuvieron 9 tratamientos de carbón vegetal, estos fueron sometidos a molienda y posteriormente fueron clasificados en 2 tipos de fracciones granulométricas en función al diámetro de sus partículas: fina (0,3-0,125 mm) y gruesa (2-0,3 mm). Así, el número de tratamientos aumento a 18 (9x2), debiéndose escoger el prototipo más idóneo para ser usado como blanco para comparar el efecto producido en la adsorción causado por la exposición al ultrasonido.

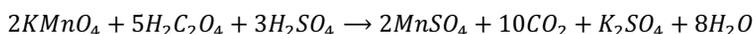
Dicho lo anterior, se evaluó cada uno de los 18 prototipos tomando como criterio la capacidad de adsorción y porcentaje de rendimiento.

B.1) Determinación de la cantidad adsorbida de C₂H₂O₄ y por unidad de masa de carbón vegetal en 2 horas

Se preparó una disolución de ácido oxálico en agua destilada de concentración 0.1N. Luego se tomó una alícuota de 10mL de esta disolución y se mezcló con 40mL de agua destilada en un matraz con tapón, de tal forma que se obtenga una mezcla de ácido oxálico-agua en una proporción de 10:40. De igual manera, se alistó 4 matraces adicionales con sus respectivos tapones y se preparó mezclas en las siguientes proporciones 20:30; 30:20; 40:10 y 50:0, respectivamente. Al final se obtuvieron 5 matraces conteniendo 50 mL de diferentes concentraciones. Posteriormente, se pesó 1.0 ± 0,0015 g de carbón vegetal y se agregó a cada una de las cinco soluciones preparadas. Se taparon y colocaron en un agitador orbital por 2 horas.

Al término de la agitación, se filtró cada solución en un nuevo juego de matraces utilizando embudos y papel filtro N°42. Luego se añadieron 15 mL de ácido sulfúrico 2N a cada matraz y se calentaron por 10 minutos en una cocina a temperatura de 80°C para valorarse con permanganato de potasio al 0.1N. En el punto final de la titulación se identificó por el característico tono de color rosado pálido propio de la reducción del manganeso de +7 a +2. Se determinó la concentración de ácido oxálico en la fase acuosa y las cantidades adsorbidas del mismo en cada uno de los 18 tratamientos a través de las siguientes ecuaciones:

Ecuación global redox:



Concentración de ácido oxálico en la fase acuosa

$$c_e = \frac{N_{KMnO_4} \times V_{KMnO_4}}{V_{sol}}$$

Cantidad de ácido oxálico adsorbido (y)

$$y = \frac{x}{m} = \frac{c_0 - c_e \times 50 \times 126}{1000 \times m_{carbón}}$$

$$y = \frac{x}{m} = \frac{c_0 - c_e \times 6.3}{m_{carbón}}$$

Posteriormente, los resultados obtenidos de las 5 valoraciones se graficaron usando las inversas de las variables Y y C, y se verificó el grado de asociación con la isoterma de adsorción del modelo de Langmuir a través del coeficiente de correlación de Pearson.

Finalmente, con las ecuaciones obtenidas de la regresión lineal simple se hallaron las máximas cantidades adsorbidas de cada uno de los tratamientos para el tiempo de contacto de 2 horas. De esta manera y con los resultados del porcentaje del rendimiento de la pirólisis, se escogió el carbón vegetal óptimo a ser usado como blanco.

C) Tratamiento ultrasónico

Se pesó 20g de carbón vegetal escogido en la etapa anterior (sin lavar) y se transfirió a un vaso de precipitado de 250 mL, este se llenó con un volumen de 200 mL de agua destilada de modo que parte de las impurezas del carbón se solubilizaron en el agua. La sonda ultrasónica se programó a la frecuencia de la onda a 20kHz y se sumergió en la suspensión de carbón vegetal – agua. Este proceso se repitió a 02 amplitudes de onda (20 % y 40 %) durante 3 tiempos diferentes (5', 10' y 20') obteniéndose 6 nuevos tratamientos a evaluar.

D) Evaluación de la cinética química

Para cinética química se procedió a seleccionar al azar 2 tratamientos del total de los carbones sometidos a ultrasonido, debido a que para un mismo sistema (C₂H₂O₄-carbón de caco) las diferencias en el comportamiento del cambio de la cantidad adsorbida por unidad de tiempo son poco significativas. Luego, se procedió a alistar 8 matraces de 200 mL por cada tratamiento, y se colocó aproximadamente 1.0 ± 0,0015 g de carbón ultrasonificado a cada uno. Posteriormente se preparó una disolución de C₂H₂O₄ al 0.5N, y se adicionó a cada matraz 50 mL. Estos fueron tapados y colocados en el agitador orbital a una velocidad de 120rpm por tiempo indefinido. Posteriormente, se evaluó la variación de la concentración del C₂H₂O₄ en función del tiempo, retirando cada cierto tiempo un matraz del agitador, filtrándolo y valorando la solución filtrada por permanganometría.

E) Determinación de la máxima cantidad adsorbida en el equilibrio

Se procedió a preparar un número de 8 disoluciones de ácido oxálico con un rango de 0.0625N a 1N en fioles de 50 mL. Las disoluciones se trasvararon en 8 matraces de 200 mL, los cuales contenían previamente $1.0 \pm 0,0015$ g de carbón ultrasonificado. Luego, fueron tapados y colocados en agitación a una velocidad de 120rpm por 5 días -según los resultados de la cinética química- para que se alcance el equilibrio. Todos los carbones ultrasonificados incluyendo el carbón blanco fueron sometidos a este proceso. Posteriormente se repitió el procedimiento mostrado en el apartado B1.

Se calculó las concentraciones en el equilibrio de ácido oxálico en la fase acuosa y las cantidades adsorbidas en cada uno de los tratamientos. Los valores obtenidos de las titulaciones se graficaron usando las inversas de las variables Y y C_e , y se verificó el grado de asociación con la isoterma de adsorción del modelo de Langmuir a través del coeficiente de correlación de Pearson. Finalmente, con las ecuaciones obtenidas de la regresión lineal simple se hallaron las máximas cantidades adsorbidas de cada uno de los tratamientos en el equilibrio.

F) Estimación de la superficie de adsorción

A partir de la ecuación linealizada de Langmuir (figura 1) se estimó la superficie de adsorción multiplicando la inversa del término independiente por el área trasversal de la molécula de adsorbida ($C_2H_2O_4$), por el número de Avogadro, dividido entre su masa molar.

$$\frac{1}{y} = \frac{1}{y_{max}K} \left(\frac{1}{c} \right) + \frac{1}{y_{max}}$$

$$\text{Área} = \frac{y_{m\acute{a}x} \times N_A \times A_{C_2H_2O_4}}{\mu_{C_2H_2O_4}}$$

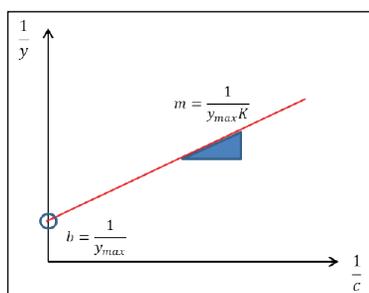


Figura 1. Gráfica de ecuación de Langmuir linealizada
Fuente: Castellan (2004).

G) Secuencia del proceso

A continuación se presenta el diagrama del proceso donde se detallan cada una de las etapas para la obtención y evaluación de la adsorción de carbón proveniente del mesocarpio del cacao.

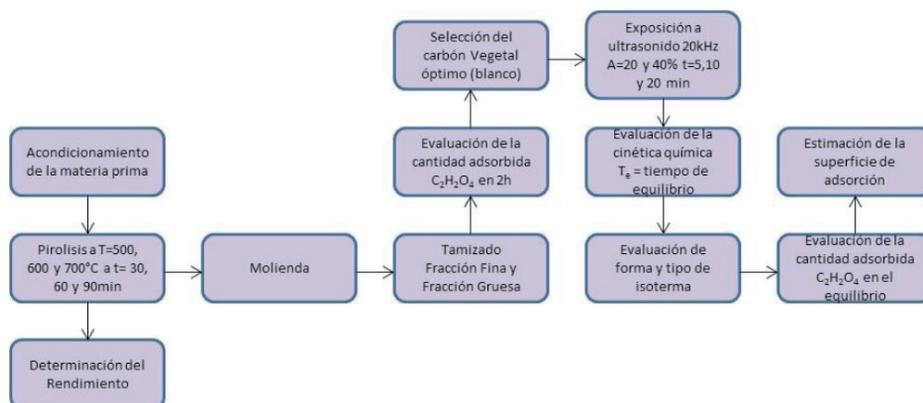


Figura 2. Diagrama del proceso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de carbonización

El material precursor seco fue sometido a diferentes temperaturas y tiempos de carbonización con el objetivo de evaluar el mejor carbón vegetal a usar como blanco para comparar sus capacidades de adsorción antes y después de someterlo a ultrasonido.

Los carbones sometidos a la temperatura de 500°C presentan mayor cantidad de masa residual y por ende mayor rendimiento que los carbones que fueron sometidos a 700°C. Simultáneamente, los carbones sometidos a un mayor tiempo de exposición presentan menor rendimiento. Esto debido a que a mayor temperatura y tiempo de exposición se acentúa la pérdida de material volátil por FAO⁴.

Los valores obtenidos de los rendimientos de pirólisis se presentan en la tabla 1. Asimismo, el rendimiento para los diferentes tratamientos se encuentra en el intervalo de 30 % a 36 %. Estos valores se encuentran dentro del promedio de las materias que se usan como precursores del carbón activado.

Tabla 1. Rendimiento de carbonización (pirólisis).

Ensayo	Masa del precursor (g)	Masa del Residuo Carbonizado (g)	% Rendimiento
500°C30'	53,1161	19,2651	36,27
500°C60'	49,3346	17,6328	35,74
500°C90'	41,2731	14,4429	34,99
600°C30'	54,1612	18,4227	34,01
600°C60'	55,1001	18,4617	33,51
600°C90'	48,3093	15,4332	31,95
700°C30'	45,9801	14,9696	32,56
700°C60'	46,5772	15,0204	32,25
700°C90'	53,0365	16,0147	30,20

Selección del carbón vegetal óptimo (selección del blanco)

El criterio con el que se seleccionó al carbón vegetal óptimo se basó en la mayor capacidad de adsorción y un rendimiento de carbonización medio. Posteriormente, se procedió según el apartado b1 determinándose la concentración final y cantidad adsorbida de $C_2H_2O_4$ para un tiempo de 2 horas. El adsorbato usado fue el $C_2H_2O_4$ debido a que esta molécula es polar y tiene un tamaño relativamente pequeño (área trasversal $25.6A^2$) por Rideal⁵. Además, forma enlaces con facilidad por tratarse de un quelato favoreciendo la fisiorción y quimisorción.

Tabla 2. Comparación de la cantidad adsorbida de $C_2H_2O_4$ (Y) en 2 horas para fracción de diámetro fino (F) y grueso (G).

Ensayo	b	Y	R ²	R
500°C30'F	4,8158	0,2076	0,9954	0,9977
500°C30'G	4,8972	0,2042	0,9953	0,9976
500°C60'F	3,1327	0,3192	0,9938	0,9969
500°C60'G	5,1856	0,1928	0,9991	0,9995
500°C90'F	4,0154	0,2490	0,9881	0,9940
500°C90'G	4,1816	0,2391	0,9786	0,9892
600°C30'F	4,7062	0,2125	0,9989	0,9994
600°C30'G	4,9687	0,2013	0,9989	0,9994
600°C60'F	1,7002	0,5882	0,9991	0,9995
600°C60'G	3,4558	0,2894	0,9925	0,9962
600°C90'F	1,8713	0,5344	0,9932	0,9966
600°C90'G	4,3198	0,2315	0,9956	0,9978
700°C30'F	3,6911	0,2709	0,9873	0,9936
700°C30'G	3,8148	0,2621	0,9891	0,9945
700°C60'F	2,0359	0,4912	0,9980	0,9990
700°C60'G	2,4681	0,4052	0,9943	0,9971
700°C90'F	2,4706	0,4048	0,9872	0,9936
700°C90'G	2,5612	0,3904	0,9922	0,9961

En la tabla 2 se observa que todos los tratamientos poseen un coeficiente de correlación de Pearson cercana a la unidad, esto quiere decir que existe una relación directa entre la inversa de la variable cantidad adsorbida y la inversa de la concentración final, por lo tanto los datos sean confiables y la isoterma es asimilable al modelo de Langmuir.

En la figura 3 se observa la influencia de la temperatura y tiempo de pirólisis en relación a cantidad absorbida de $C_2H_2O_4$. Al aumentar la temperatura de pirólisis se da una contracción volumétrica de las partículas eliminándose la materia volátil y en consecuencia se crea estructuras porosas poco desarrolladas por Gómez *et al*⁶. También muestra que el tratamiento que posee la mejor capacidad de adsorción para el tiempo de agitación de 2 horas es el carbón pirolizado a 600°C por 1 hora de fracción de diámetro fino (600°C60°F). Adicionalmente, este presenta un porcentaje rendimiento de carbonización medio, lo cual hace que cumpla con los criterios para ser usado como blanco.

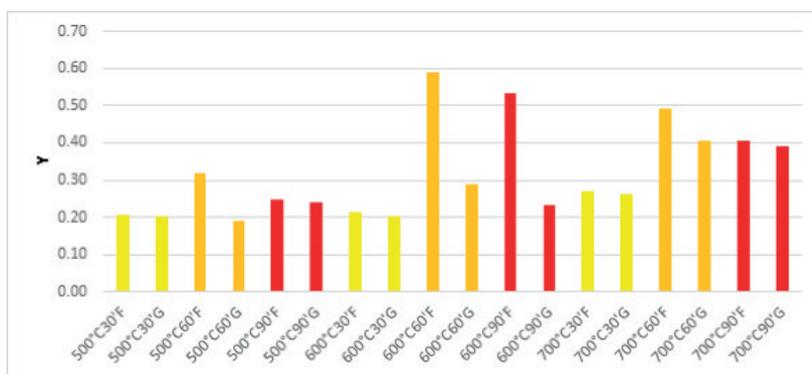


Figura 3. Cantidad adsorbida por unidad de masa de carbón vegetal en gramos.

Posterior a la elección del carbón vegetal óptimo, se sometió al blanco a ondas ultrasónicas de 20kHz a 02 amplitudes de onda de 20 % y 40 % y tiempos de exposición de 5, 10 y 20 min.

Cinética química de los tratamientos

En la tabla 3 se muestra los resultados de la variación de la concentración en función del tiempo para los carbones ultrasonificados a 20kHz a una amplitud de 20 % por 20 min y 40 % por 5 min, los cuales fueron elegidos al azar de los 6 tratamientos expuestos a las ondas ultrasónicas.

Tabla 3. Determinación de la cantidad adsorbida de C₂H₂O₄ en función del tiempo para carbones ultrasonificados a 20kHz una amplitud de 20 % por 20 min y 40 % por 5 min.

Ensayo	20%20'			40%5'		
	Tiempo (h)	Volumen Gastado KMnO ₄ (mL)	Ce concenc. en equilibrio (N)	x cantidad adsorbida (g)	Volumen Gastado KMnO ₄ (mL)	Ce concenc. en equilibrio (N)
0	25	0,5	0,00	25	0,5	0,00
6	20,4	0,408	0,29	19,75	0,395	0,33
9	20,3	0,406	0,30	19,7	0,394	0,33
16	19,85	0,397	0,32	19,2	0,384	0,37
33	19,75	0,395	0,33	18,7	0,374	0,40
46	19,6	0,392	0,34	18,2	0,364	0,43
57	19,15	0,383	0,37	18,05	0,361	0,44
66	19,1	0,382	0,37	17,65	0,353	0,46
81	18,7	0,374	0,40	17,2	0,344	0,49

Las figuras 4 y 5 muestran la cinética química de los carbones ultrasonificados a 20kHz con 20 % de amplitud de onda a 20 minutos de exposición y 40 % de amplitud de onda por 5 minutos de exposición, respectivamente.

Para ambos tratamientos se aprecia que el tiempo que tarda el fenómeno en llegar al equilibrio es aproximadamente superior a las 90 horas. Entonces para determinar la máxima cantidad adsorbida de C₂H₂O₄ por unidad de masa de carbón (Y_{máx}) fue necesario colocar todos los tratamientos ultrasonificados a un tiempo de agitación superior a las 90 horas. En los experimentos posteriores el tiempo de agitación fue de 5 días (120 horas).

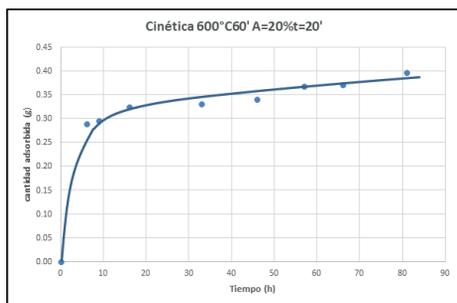


Figura 4. Cinética química del tratamiento CUS(A=20%t=20').

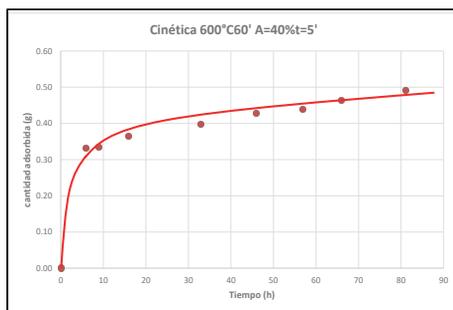


Figura 5. Cinética química del tratamiento CUS(A=40%t=5').

Forma y clasificación de las isotermas en estudio

Se procedió a preparar un número de 8 disoluciones de ácido oxálico en un rango de 0.0625N a 1N. A cada una de las disoluciones se les adicionó $1.0 \pm 0,0015$ g de carbón y se colocaron en agitación por 120 horas. La tabla 4 muestra las cantidades adsorbidas de C₂H₂O₄ correspondiente al carbón vegetal sin ultrasonificar (carbón blanco), mientras la tabla 5 muestra

las cantidades adsorbidas correspondiente a los carbones ultrasonificados a la amplitud de onda de 20 % a tiempos de exposición de 5, 10 y 20 minutos, respectivamente. Asimismo, la tabla 6 muestra las cantidades adsorbidas correspondiente a los carbones ultrasonificados a la amplitud de onda de 40 % a tiempos de exposición de 5, 10 y 20 minutos.

Tabla 4. Determinación de la cantidad adsorbida de $C_2H_2O_4$ en el equilibrio para carbón vegetal 600°C60'.

Co concenc. Inicial (N)	Volumen Gastado $KMnO_4$ (mL)	Ce concenc. en equilibrio (N)	x cantidad adsorbida (g)	x/m = Y cantidad adsorbida / masa de carbón	1/Y	1/Ce
0	0	0	0,0000	0,0000	---	---
0,0625	1,7	0,034	0,0898	0,0898	11,1	29,4
0,125	3,5	0,07	0,1733	0,1733	5,8	14,3
0,1875	5,9	0,118	0,2189	0,2189	4,6	8,5
0,3125	10,9	0,218	0,2977	0,2977	3,4	4,6
0,4375	16,35	0,327	0,3481	0,3481	2,9	3,1
0,8125	32,6	0,652	0,5056	0,5056	2,0	1,5
0,875	35,5	0,71	0,5198	0,5198	1,9	1,4
1	41,6	0,832	0,5292	0,5292	1,9	1,2

Tabla 5. Determinación de la cantidad adsorbida de $C_2H_2O_4$ en el equilibrio para carbón ultrasonificados a 20 % de amplitud de onda.

600°C60'20%5'		600°C60'20%10'		600°C60'20%20'	
Ce concenc. en equilibrio (N)	x cantidad adsorbida (mg/g)	Ce concenc. en equilibrio (N)	x cantidad adsorbida (mg/g)	Ce concenc. en equilibrio (N)	x cantidad adsorbida (mg/g)
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,024	0,121	0,027	0,112	0,002	0,078
0,046	0,249	0,056	0,217	0,004	0,163
0,082	0,332	0,102	0,269	0,005	0,304
0,191	0,383	0,208	0,329	0,007	0,634
0,297	0,443	0,313	0,392	0,008	0,961
0,615	0,622	0,632	0,569	0,011	1,955
0,672	0,639	0,680	0,614	0,012	2,103
0,782	0,687	0,790	0,662	0,013	2,447

Tabla 6. Determinación de la cantidad adsorbida de $C_2H_2O_4$ en el equilibrio para carbón ultrasonificados a 40 % de amplitud de onda.

600°C60'40%5'		600°C60'40%10'		600°C60'40%20'	
Ce concenc. en equilibrio (N)	x cantidad adsorbida (mg/g)	Ce concenc. en equilibrio (N)	x cantidad adsorbida (mg/g)	Ce concenc. en equilibrio (N)	x cantidad adsorbida (mg/g)
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,024	0,121	0,027	0,112	0,027	0,112
0,042	0,261	0,048	0,243	0,052	0,230
0,072	0,364	0,082	0,332	0,084	0,326
0,176	0,430	0,184	0,405	0,186	0,398
0,280	0,496	0,294	0,452	0,292	0,458
0,604	0,657	0,614	0,625	0,619	0,610
0,660	0,677	0,668	0,652	0,676	0,627
0,770	0,725	0,778	0,699	0,784	0,680

La figura 6 y la figura 7 muestran que a bajas concentraciones de equilibrio la cantidad adsorbida se incrementa rápidamente, mientras que a altas concentraciones disminuye. En otras palabras, la pendiente decrece a medida que aumenta la concentración debido a que los sitios de adsorción disponibles. Este comportamiento coincide con lo expuesto por Sparks⁷. Por lo tanto el sistema en estudio coincide con una isoterma tipo L.

Según Lyklema⁸, el tipo de isoterma L (también conocida como tipo de Langmuir) ocurre incluso cuando las premisas de la teoría de Langmuir no están satisfechas y son típicas de superficies heterogéneas. Este tipo de isotermas de alta afinidad se caracterizan por un aumento inicial muy pronunciado, seguido de una pseudo meseta.

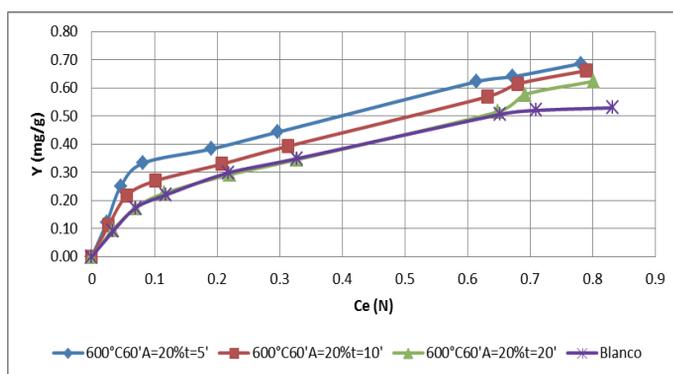


Figura 6. Isotermas de adsorción para carbón blanco y carbones ultrasonificados a una amplitud de 20 % a diferentes tiempos.

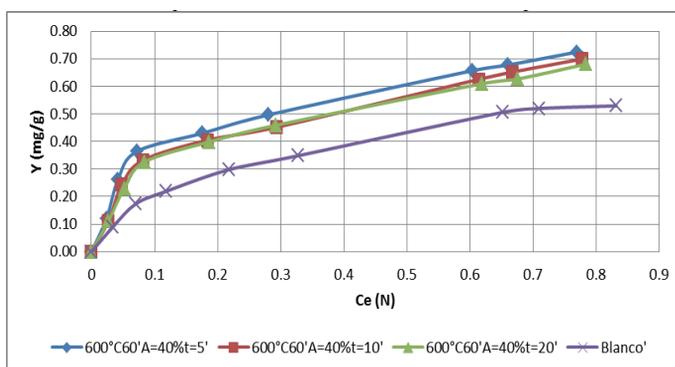


Figura 7. Isotermas de adsorción para carbón blanco y carbones ultrasonificados a una amplitud de 40 % a diferentes tiempos.

Cálculo de las cantidades máximas adsorbidas en el equilibrio

Se determinaron la máxima cantidad de adsorción de cada uno de los tratamientos verificando sus coeficientes de correlación de Pearson con el modelo de Langmuir. Se correlacionó la inversa de las cantidades adsorbidas ($1/y$) con la inversa de las concentraciones en el equilibrio ($1/C_e$) en una representación gráfica, donde la el intercepto en el eje de las ordenadas representa la inversa de la cantidad máxima adsorbida ($1/Y_{\text{máx}}$). La tabla 7 muestra que el grado de asociación existente entre la inversa la variable “ $1/Y$ ” y la variable “ $1/C_e$ ” es cercana a la unidad y por ende existe una correlación perfecta positiva.

Tabla 7. Máximas cantidades adsorbidas y su relación con el coeficiente de correlación lineal para los carbones ultrasonificados (US).

Ensayo	b	Y máx	m	R ²	R
C(US)20%5'	1,3720	0,7289	0,1557	0,9693	0,9845
C(US)20%10'	1,5818	0,6322	0,1959	0,9801	0,9900
C(US)20%20'	1,6030	0,6238	0,3038	0,9898	0,9949
C(US)40%5'	1,1479	0,8712	0,1542	0,9470	0,9731
C(US)40%10'	1,1658	0,8578	0,1920	0,9538	0,9766
C(US)40%20'	1,2007	0,8328	0,1976	0,9772	0,9885
Blanco	1,6282	0,6142	0,3201	0,9935	0,9967

Asimismo en la figura 8 se observa que los carbones sometidos a una amplitud de onda de 20 % exceden ligeramente la cantidad adsorbida por el blanco, mientras que los de 40 % de amplitud se distancian marcadamente de este.

Este comportamiento se debe a que la energía transportada por una onda sonora es directamente proporcional al cuadrado de la amplitud por Giancoli⁹. Los carbones sometidos a amplitudes de onda de 40 % recibieron mayor cantidad de energía por unidad de área trasversal que los carbones sometidos a 20 % de la amplitud para un mismo tiempo. Asimismo, Suslick¹⁰ menciona que una onda ultrasónica de alta intensidad expande una cavidad tan rápidamente durante el ciclo de presión negativa que esta no tendrá oportunidad de encogerse durante el ciclo de presión positiva, mientras que una onda baja intensidad, el tamaño de la cavidad oscila con los ciclos de expansión y compresión. Esto significa que las cavidades en una onda de alta intensidad llegan en menor tiempo a su tamaño crítico que las de baja intensidad, implosionando en la superficie del carbón vegetal a una tasa mayor.

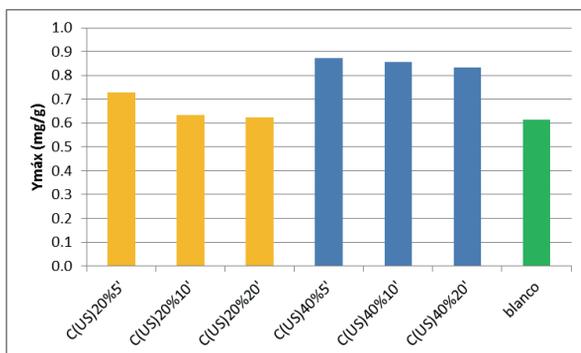


Figura 8. Comparación de la máxima cantidad adsorbida entre el blanco y los carbones sometidos a ultrasonido.

Por otro lado, la capacidad de adsorción disminuye al prolongarse el tiempo de exposición al ultrasonido a una amplitud de onda constante. Esto se debe al efecto secundario de la implosión, el cual genera un calor intenso que aumenta la temperatura del líquido circundante, creando puntos calientes locales por Brennen³. Aunque la temperatura en estos puntos es alta (aprox. 5500°C), las regiones son tan pequeñas que el calor se disipa. En forma neta, la temperatura del fluido se incrementa gradualmente a medida que se prolonga el tiempo de exposición de las ondas (tabla 8). Cuanto mayor sea la temperatura del medio, más vapor habrá dentro de la cavidad y este amortigua la implosión por Suslick¹⁰.

Tabla 8. Temperatura del agua de cada tratamiento expuestas a ultrasonido a diferentes tiempos.

Ensayo	C(US)20%5'	C(US)20%10'	C(US)20%20'	C(US)40%5'	C(US)40%10'	C(US)40%20'
T (C°)	30,2°C	40,1°C	59,5°C	32,3°C	41,2°C	60,2°C

Evaluación de la eficiencia de los carbones ultrasonificados

La tabla 9 muestra el incremento un incremento en la eficiencia de la capacidad adsorción de los carbones sometidos al ultrasonido en relación al carbón blanco. En este, se observa que el carbón sometido a una amplitud de 40 % de la onda a un tiempo de 5 minutos tiene un incremento de la eficiencia de 41,84 %, mientras que el carbón sometido a una amplitud de la onda de 20 % con un tiempo de exposición de 20 minutos presenta el valor más bajo correspondiente al 1,57 %.

Tabla 9. Comparación de la variación eficiencia.

Código	20%5'	20%10'	20%20'	40%5'	40%10'	40%20'
Eficiencia	18,67	2,93	1,57	41,84	39,66	35,60

Cálculo de la superficie de adsorción

En la tabla 10 se observa que el área superficial estimada de los carbones ultrasonificados a la amplitud de 40 % presentan valores por encima de 1000 m², mientras que los carbones ultrasonificados a la amplitud de 20 % muestran valores ligeramente por encima del blanco (753,48 m²). Estos valores están por encima de los encontrados por Tejada *et al.* (287,5 m² y 205,4 m²) para la cascarilla de la semilla del cacao.

Tabla 10. Estimación de la superficie de los diferentes tratamientos expuestos a ultra sonido y el blanco.

Ensayo	Y máx	Nº moles adsorbidas	Nº moléculas adsorbidas	Área (m ²)
C(US)20%5'	0,7289	0,005781	3,48157E+21	894,18
C(US)20%10'	0,6322	0,005015	3,01979E+21	775,58
C(US)20%20'	0,6238	0,004948	2,97986E+21	765,32
C(US)40%5'	0,8712	0,006910	4,16126E+21	1068,75
C(US)40%10'	0,8578	0,006804	4,09737E+21	1052,34
C(US)40%20'	0,8328	0,006606	3,97827E+21	1021,75
Blanco	0,6142	0,004872	2,93374E+21	753,48

CONCLUSIONES

La cinética química demuestra que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio dentro sistema binario específico (ácido oxálico-carbón de mesocarpio de cacao) es aproximadamente 90 horas.

Los datos experimentales de las cantidades adsorbidas de C₂H₂O₄ por unidad de masa de carbón de ultrasonificado demuestran que las isotermas obtenidas son de la forma tipo “L”, además los coeficientes de correlación de Pearson prueban que la isoterma se ajusta al modelo de Langmuir.

Las isotermas muestran que los carbones ultrasonificados poseen una mayor cantidad adsorbida en el equilibrio que el blanco, siendo la serie de 40 % de amplitud onda la que presenta los valores más altos.

En relación al incremento de la eficiencia el carbón sometido a una amplitud de 40 % de la onda a un tiempo de 5 minutos (C(US)40%5') muestra el valor más alto con 41,84 %, mientras que el carbón sometido a una amplitud de la onda de 20 % a un tiempo de 20 minutos (C(US)20%20') presenta el valor más bajo correspondiente al 1,57 %.

El área superficial estimada de los carbones ultrasonificados a una amplitud de 40 % de la onda presentan valores por encima de 1000 m², alcanzando el valor máximo el tratamiento C(US)40%5' con 1068,75 m² mientras que los carbones ultrasonificados a la amplitud de 20 % muestran valores ligeramente por encima del blanco (753,48 m²).

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Química de la Universidad Nacional Agraria La Molina, al Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental (CIQTobia), y en especial a mis mentores Dr. Elvito Villegas, Ph.D. Lisveth Flores del Pino y M.Sc. Juan Carlos Palma.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bastidas M, Buelvas M, Márquez M, Rodríguez K. Producción de Carbón activado a partir de precursores carbonosos. *Inf Tecnol.* 2010; 21(3): 87-96.
2. Sik Y. *Biochar from biomass and waste.* Seoul: Elsevier; 2018.
3. Brennen C. *Cavitation and bubble dynamics.* New York: Oxford University Press; 1995.
4. FAO. *Métodos simples para fabricar carbón vegetal.* Roma: FAO publications; 1983.
5. Rideal E. *An introduction to surface chemistry.* London: Cambridge University Press; 1926.
6. Gómez A, Rincón S, Klose W. *Carbón activado con cuescos de palma: Estudio de termogravimetría y estructura.* Kassel, Alemania: Universidad de Kassel; 2010.
7. Sparks D. *Environmental Soil Chemistry.* Second Edition. Amsterdam: Academic Press; 2003.
8. Lyklema J. *Physical Chemistry and Colloid Science* London: Academic Press; 1995.
9. Giancoli D. *Física para ciencias e ingeniería.* Cuarta edición. Atlacomulco: Pearson Educación; 2008.
10. Suslick KS. The chemical effects of ultrasound. *Sci Am.* 1989; 63(5): 80-86.
11. Tejada C, Almanza D, Villabona A, Colpas F, Granados C. Caracterización de carbón activado sintetizado a baja temperatura a partir de cáscara de cacao (*Teobroma cacao*) para adsorción de amoxicilina. *Ingeniería y Competitividad.* 2017; 19(2): 43-52.

BIOPELÍCULAS PRODUCIDAS CON CÁSCARA DE NARANJA Y REFORZADAS CON CELULOSA BACTERIANA

Evelin Alata Mayhuire^c, Yuri Cuadros Huamaní^c, Luis Miranda Zanardi^b,
Esperanza Medina de Miranda^{*a}

RESUMEN

En este estudio se han elaborado biopelículas a partir de cáscara de naranja, utilizando pectina, en calidad de reticulante y glicerina que hace las veces de plastificante. Asimismo, se ha determinado el efecto de la adición de celulosa bacteriana, obtenida de la fermentación estática de kombucha (*Manchurian fungus*), en tales biopelículas. Es destacable que la cáscara de naranja ha sido sometida previamente a un proceso de extracción por arrastre de vapor para recuperar su aceite esencial.

Experimentalmente, se encontró que una formulación adecuada de biopelículas contiene los porcentajes máxicos siguientes: cáscara de naranja, 15; celulosa bacteriana, 5; pectina, 40; y glicerina, 40. Dicha biopelícula ostentó una resistencia a la tensión de 5,53 N/mm², elongación de 51,60 % y permeabilidad de 0,0273 g.mm/(h.kPa.m²).

El contenido de pectina afectó significativamente las propiedades de las biopelículas, debido a su interacción con el glicerol. La celulosa bacteriana contribuyó a incrementar la resistencia a la tensión de las biopelículas, pero redujo su elongación, y permeabilidad, Por ello se constituye en un agente reforzante efectivo cuya producción es sencilla y segura.

Palabras clave: biopelículas, cáscara de naranja, celulosa bacteriana, propiedades mecánicas y de barrera.

BIODEGRADABLE FILMS PRODUCED WITH ORANGE PEEL AND REINFORCED BY BACTERIAL CELLULOSE

ABSTRACT

This work proposes the formulation of biofilms out of orange peel, using pectin as a crosslinking agent and glycerol as plasticizer. Also, it was determined the impact of the addition of bacterial cellulose obtained from the static fermentation of kombucha (*Manchurian*

^a Facultad de Ingeniería de procesos, Departamento Académico de Ingeniería Química, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Av. Independencia 552, Arequipa, Perú, emedinal@unsa.edu.pe

^b Facultad de Ingeniería de procesos, Departamento Académico de Ingeniería Química, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa

^c Facultad de Ingeniería de procesos, Escuela profesional de Ingeniería Química, Universidad Nacional San Agustín de Arequipa

fungus) in such biofilms. It is noticeable that the orange peel has been subject previously to an extraction process by steam distillation to recover its essential oil.

Experimentally it was determined that an appropriate biofilm formulation has the following mass percentages: orange peel, 15; bacterial cellulose, 5; pectin, 40; and glycerol, 40. Such biofilm showed the following property values: tension stress at break, 5.53 N/mm²; elongation at break, 51.60 %; and, water vapor permeability, 0.0273 g.mm/(h.kPa.m²).

Pectin content affected significantly the properties of the biofilms due to its interaction with glycerol. Bacterial cellulose contributed to increase the tension stress of the biofilm, but it reduced the value of elongation and water vapor permeability, which may be convenient for a diversity of applications. That is why bacterial cellulose constitutes an efficient reinforcing agent, whose production process is simple and safe.

Key words: biodegradable films, orange peel, bacterial cellulose, mechanical and barrier properties.

INTRODUCCIÓN

Las biopelículas aparecen como muy buena alternativa para mitigar la contaminación producida por el plástico, en vista de que se descomponen bajo condiciones ambientales. En tal sentido, la producción competitiva de biopelículas a partir de materias primas disponibles en el Perú, es una tarea que ofrece múltiples posibilidades. El presente estudio selecciona como componentes básicos de las biopelículas la cáscara de naranja, la celulosa bacteriana y el glicerol. La incorporación de la celulosa bacteriana a biopelículas es novedosa, pero muy promisoría porque se produce de modo seguro y a bajo costo. Por esto es de vital importancia evaluar el efecto de la adición de celulosa bacteriana sobre las propiedades de dichas biopelículas. En el presente estudio se produjo la celulosa bacteriana a partir de la fermentación del té negro, y se evaluó su aporte sobre las propiedades de las biopelículas¹. Se podría potenciar la producción de té peruano (*Camellia sinensis*), para la producción de celulosa bacteriana y su posterior aplicación en biopelículas.

Es pertinente tomar como referencia el Análisis del Ciclo de Vida, en la elaboración de biopelículas, pues ofrece una valoración del impacto ambiental y de la economía de los productos. Dicho análisis evalúa el impacto ambiental de los materiales desde su producción, posterior manipulación, uso y disposición final, el que es regulado por la norma ISO 14040 y contribuye en la toma de decisiones sobre materias primas a emplear, modos de producción y especificaciones de los productos.

Entonces, desde la perspectiva del Análisis del Ciclo de Vida, la cáscara de naranja valenciana (*citrus x sinensis*) empleada es un residuo industrial que se obtiene luego de la producción de jugo y aceite esencial (por arrastre de vapor), por ello su costo es sumamente bajo y se le estaría agregando valor y evitando que sea un elemento contaminante. De otro lado, la celulosa bacteriana, que es producida por la fermentación del té negro, es un recurso

obtenido mediante un proceso biológico a bajo costo y con mínimo impacto ambiental. De esta fermentación el té negro es demandado como un agente nutracéutico, contribuyendo con una mayor valoración en el ciclo de vida.

Complementando este enfoque ecológico, se eligió como medio plastificante la glicerina, sustancia que aparece como subproducto de la esterificación en la producción de biodiesel y que se genera en grandes cantidades, constituyendo una amenaza potencial para el medio ambiente si no se encuentran usos rentables².

Arévalo Niño y sus colaboradores³ trabajaron con cáscara de limón, pectina, glicerina, alcohol polivinílico y benzoato de sodio en la formación de películas monocapa y bicapa. Bátori y su grupo⁴, en cambio, reportaron la formación de biopelículas a partir de residuos industriales de naranja, pectina, glicerina, ácido cítrico y antiespumante; tales películas se caracterizan por su alta higroscopia.

La cáscara de naranja puede convertirse en un material esencial para la elaboración de biopelículas debido a su contenido en fibras de celulosa, pectina y aceites esenciales. La composición de la cáscara de naranja varía de acuerdo a la especie y a las condiciones de su cultivo. Dibanda y sus colaboradores⁵ reportaron que la naranja contiene 14,27 por ciento másico de cáscara; a su vez, la cáscara seca contiene 53,27 por ciento másico de carbohidratos. De otro lado, los residuos de naranja⁶ contienen los porcentajes másicos siguientes: pectina, 29,8; celulosa, 18,7; y, hemicelulosa, 20,9. Vale decir que el contenido de celulosa es cercano al veinte por ciento.

La pectina, está presente en frutas y hortalizas y, por tanto, es abundante en los desechos agrícolas. Se conforma por varias unidades de ácido poligalacturónico interrumpido por enlaces cortos de ramnosa. Es altamente soluble en agua y debido a su flexibilidad molecular otorga amplia deformación a las biopelículas, similar a la que se alcanza con algunos polímeros sintéticos⁶, por ejemplo las fibras de nylon y PET presentan valores de elongación entre 10 y 50 por ciento⁷. Asimismo, bajo ciertas condiciones puede gelificar y constituir una barrera apropiada para la permeabilidad de gases⁸. Galus y su equipo de investigación⁹ indicaron que cuando la pectina se combina con otros polisacáridos se obtienen biopelículas continuas, homogéneas y transparentes que poseen un carácter hidrofílico.

El glicerol, también llamado glicerina o propanotriol ($C_3H_8O_3$), es un alcohol con tres grupos hidroxilos ($-OH$), higroscópico, soluble en agua y ebulle a 290 °C. Es el plastificante más popular para la producción de películas biodegradables debido a su alta disponibilidad, bajo costo, presenta compatibilidad con una amplia gama de materiales, ofrece buena elasticidad a las películas sin reducir significativamente la resistencia a la tensión, pero tiene dos inconvenientes: no reduce la permeabilidad al vapor de agua y es higroscópico, afectando el rango de aplicación de las biopelículas¹⁰.

La celulosa bacteriana es similar a la celulosa de frutos como la naranja; sin embargo, es más pura ya que no contiene hemicelulosa, lignina o pectina; asimismo presenta mayor grado de polimerización (entre 4000 a 10000); así como más elevada cristalinidad (de 80 a 90 %) ¹¹, siendo también su capacidad de retención de agua y de rehidratación superiores ¹².

PARTE EXPERIMENTAL

La cáscara de naranja, a la cual se le extrajo su aceite esencial por arrastre de vapor, fue deshidratada, molida y clasificada, aceptando partículas con una granulometría inferior o igual a 140 μm .

La reproducción de la celulosa bacteriana se realiza en un sustrato consistente de una infusión que contiene 5 g de té negro y 70 g de azúcar por litro, la que se agita para disolver el azúcar y oxigenar la bebida. La cepa madre de kombucha (*Manchurian fungus*) se dispone con la parte brillante hacia arriba y su reproducción se realiza a 27 °C por un periodo de 7 a 15 días en un fermentador aireado. Posteriormente, se filtra el contenido del fermentador para retener la celulosa bacteriana y el líquido filtrado se emplea como bebida medicinal. La celulosa es sometida a un proceso de reducción de tamaño en húmedo, luego se deshidrata y se complementa la molienda en seco seleccionando las partículas de +140 μm . La cepa madre de kombucha se ha adquirido del laboratorio del biólogo Tito Vicente Cuadros Pulcha, productor local registrado.

Las biopelículas se elaboraron mediante el método de vaciado en placas (*casting*). Las propiedades mecánicas se evaluaron de acuerdo a norma ASTM D882, correspondiente al método de prueba estándar para propiedades de tracción de láminas de plástico transparente con un espesor inferior a 1,0 mm. La permeabilidad al vapor de agua se determinó utilizando el método estándar propuesto por la norma ASTM E 96-95.

El trabajo experimental fue dividido en dos etapas. En la primera se buscó una formulación apropiada a partir de la cáscara de naranja, la pectina y el glicerol, para ello se evaluaron las siguientes formulaciones.

Tabla 1. Pruebas para definir la formulación adecuada.

Nro. De Experimento	Cáscara de naranja(%p/p)	Pectina (%p/p)	Glicerina (%p/p)	Condiciones
1	30	30	40	Temperatura =
2	25	35	40	50-60 °C
3	20	40	40	Velocidad =
4	15	45	40	600 rpm
5	10	50	40	pH= 6,0

Fuente. Elaboración propia

En la segunda etapa se tomó como base la mejor biopelícula obtenida en la primera fase, que fue la que presentó mayor valor de resistencia a la tensión y porcentaje de elongación. En dicha mejor biopelícula se evaluó la sustitución parcial de cáscara de naranja por celulosa bacteriana.

Tabla 2. Experimentos para evaluar el efecto de la celulosa bacteriana.

Nro. De Experimento	Cáscara de naranja (gr)	Pectina (gr)	Glicerina (gr)	Celulosa B. (gr)
6	0	40	40	20
7	15	40	40	05
8	10	40	40	10
9	5	40	40	15

Fuente. Elaboración propia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se evalúa el efecto de la composición de las biopelículas sobre sus propiedades, vale decir, resistencia a la tensión, elongación y permeabilidad al vapor de agua. Se organiza esta sección en dos etapas: la primera, estudia las películas base que no contienen celulosa bacteriana y; la segunda etapa, determina el efecto de la adición de celulosa bacteriana sobre las biopelículas.

Primera Etapa.- Películas base

A continuación se presentan los resultados correspondientes a las películas elaboradas a partir de cáscara de naranja, pectina y glicerina. Se reitera el hecho de que al aumentar la masa de pectina en la fórmula se reduce en la misma magnitud la cáscara de naranja. Por ejemplo, se tiene la fórmula con los porcentajes máxicos siguientes: pectina =30; cáscara de naranja = 30; y, glicerol = 40. Si se aumenta el contenido de pectina a 40 %; el de cáscara de naranja se reduce al 20 %.

En la figura 1 se observa que las propiedades mecánicas ostentan un comportamiento claramente no lineal. La resistencia a la tensión presenta un valor máximo de 5,92 N/mm², para un contenido de pectina del 35 %; en cambio la elongación de las películas es del 66 % para una composición de 40 % de pectina. La relación entre los valores experimentales máximo y mínimo es de 2,7 veces para la resistencia a la tensión, y de 2,1 veces para la elongación. La figura 1 también presenta la desviación estándar de cada corrida mediante barras verticales de error, apreciándose que los experimentos presentan una precisión significativa.

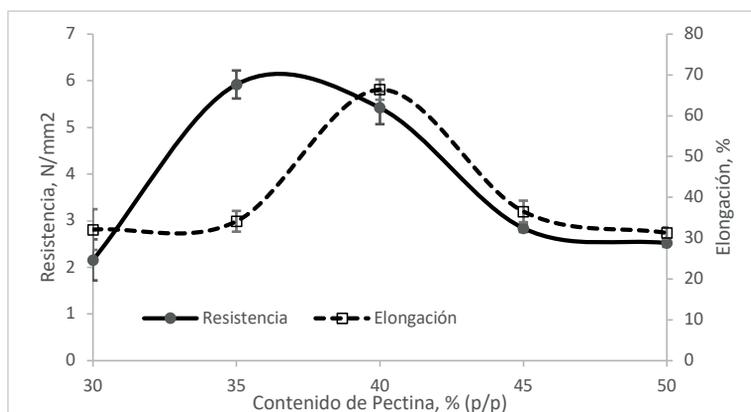


Figura 1. Variación de propiedades mecánicas por efecto de la pectina.

Los resultados anteriores coinciden con aquellos de Sánchez Aldana y colaboradores¹³, quienes evaluaron la formación de películas con extractos pécticos y aceite esencial de limón, empleando como plastificante el glicerol, reportaron que la resistencia a la tensión aumenta por efecto de la adición de glicerina y pectina; pero la permeabilidad al vapor de agua exhibe un comportamiento más complejo, pues aumenta con la concentración mayor de pectina, pero al incrementar la glicerina no siempre favorece el aumento de la permeabilidad.

La figura 2 presenta el perfil de la permeabilidad al vapor de agua de las películas cuando se modifica el contenido de pectina. Como se evidencia, los cambios son moderados, con una diferencia entre el valor máximo y el mínimo de sólo 16 %, registrándose un valor máximo de permeabilidad al vapor de agua de 0,029 g.mm/h.kPa.m² para un contenido de pectina de 37 %, aproximadamente. Las barras de error de la figura 2 indican que la precisión de los resultados es aceptable.

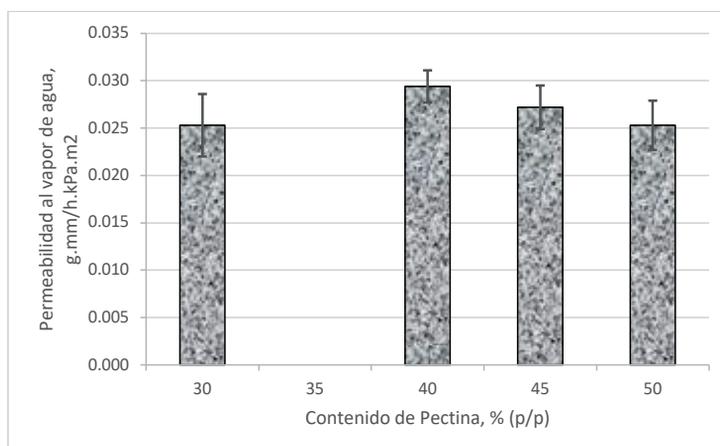


Figura 2. Efecto del contenido de pectina sobre la permeabilidad al vapor de agua.

Para responder a la interrogante sobre cuál será el porcentaje de pectina conveniente en la fórmula para conformar la película, se ha seleccionado el valor de 40 %, basándose en las siguientes consideraciones: se obtuvo un máximo de elasticidad, y se está muy cerca del máximo de resistencia a la tensión; asimismo, se está próximo al máximo de permeabilidad al vapor de agua.

El comportamiento altamente no lineal de las propiedades de las películas por la adición de pectina encuentra sustento en los hallazgos de Fishman y sus colaboradores¹⁴, que evaluaron la interacción entre la pectina y el glicerol en biopelículas de almidón, encontrando que: (a) la presencia de glicerol en películas de pectina genera hasta tres transiciones termodinámicas, debido a la habilidad del glicerol de disociar redes de pectina ligadas por puentes de hidrógeno; y, (b) la microestructura de las cadenas laterales de la pectina cambia significativamente por la presencia del glicerol.

Segunda Etapa.- Incorporación de celulosa bacteriana

Esta segunda etapa toma como base la fórmula que contiene los siguientes porcentajes máxicos excluyendo al agua que actúa como solvente: cáscara de naranja, 20; pectina, 40; y, glicerina, 40. Se evalúa la sustitución de cáscara de naranja por celulosa bacteriana, en los siguientes porcentajes máxicos: 0, 5, 10, 15 y 20. La sumatoria del contenido de cáscara de naranja y celulosa bacteriana es constante e igual al 20 % máxico.

En la figura 3 se representan los resultados correspondientes a las propiedades mecánicas, vale decir, la resistencia a la tensión (N/mm^2) en el punto de ruptura de la biopelícula y el porcentaje de elongación en este punto. Se aprecia que la sustitución de la cáscara de naranja por celulosa bacteriana permite incrementar la resistencia a la tensión de un modo lineal, logrando un aumento del 35 %; en cambio, la elongación se reduce casi hasta la mitad, desde 66 % hasta 35 %.

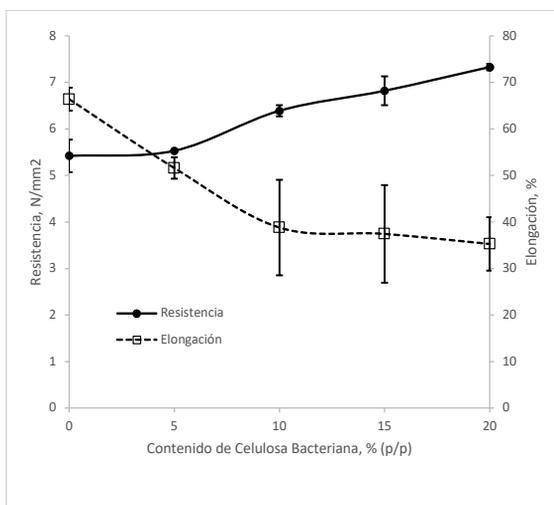


Figura 3. Cambios en las propiedades mecánicas por el contenido de celulosa bacteriana.

La variación de la permeabilidad al vapor de agua por efecto de la adición de celulosa bacteriana se representa en la figura 4. Se aprecia que no se registran cambios significativos en la permeabilidad al vapor de agua por efecto de la adición de celulosa bacteriana, pero se observa un valor mayor en la permeabilidad al vapor de agua cuando el contenido de celulosa bacteriana es del 10 %.

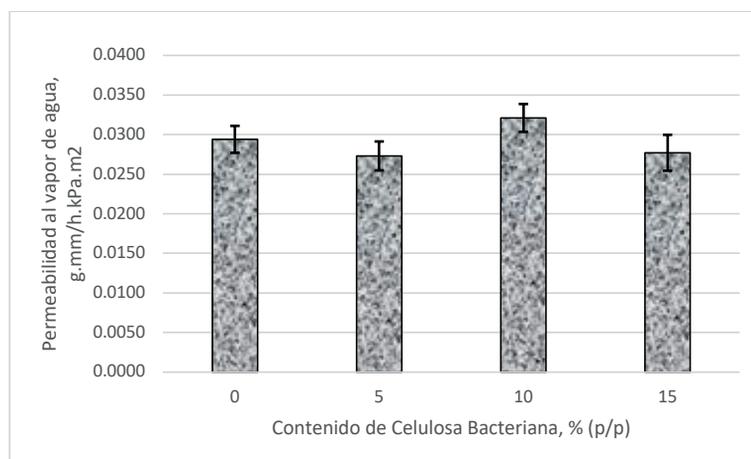


Figura 4. Modificación de la permeabilidad por el contenido de celulosa bacteriana.

Echeverry y sus colaboradores¹⁵ encontraron que el valor de la fuerza de tracción en el punto de rotura de películas de almidón de papa con glicerol, se incrementa en proporción lineal al contenido de microfibrillas de celulosa bacteriana. Nuestros resultados son coincidentes con estos hallazgos.

La adición de microfibras y nanofibras de celulosa en películas biodegradables fue estudiada por Andrade y su grupo¹⁶, destacando que constituyen un material de refuerzo que las propiedades mecánicas y de barrera. Una condición necesaria para una acción eficaz es la adecuada dispersión de estas partículas en la matriz polimérica de las películas. Señalan también que la concentración máxima de nanocristales de celulosa para alcanzar su adecuada dispersión es del 10 % en masa en la matriz polimérica.

El rol de las fibras de celulosa, fue establecido por Müller y sus colaboradores¹⁷, en la formación de películas basadas en almidón, indicando que tales fibras actúan como un material de refuerzo que mejora la cristalinidad de las películas, permite alcanzar mayor resistencia a la tensión y reduce su elongación.

Arroyo Rosas¹⁸ explica que las fibrillas de celulosa ejercen un efecto de agente reforzante de la matriz polimérica debido a la formación de complejos de inclusión, generando un

incremento en la cristalinidad de la matriz, lo que reduce la movilidad de las cadenas amorfas, y el entrecruzamiento de dichas cadenas genera mayor rigidez. Una consecuencia obvia de esta mayor rigidez es la reducción de la elasticidad, el aumento de la fuerza para fracturar el material y el incremento de los valores de permeabilidad. Arroyo también indica que la formación de complejos se ve favorecida por la incorporación de surfactantes.

Complementariamente, Bátori y sus colaboradores⁴ señalan que la fuerza de las fibras de celulosa y la capacidad gelificante de la pectina se combinan para producir películas competitivas con los plásticos comerciales, a partir de residuos de naranja de la industria juguera.

Dado que las propiedades mecánicas presentan una relación lineal con respecto al contenido de celulosa bacteriana, se selecciona como fórmula final aquella que contiene los siguientes porcentajes expresados en términos de masa sobre masa total: celulosa bacteriana, 05; cáscara de naranja, 15; pectina, 40; y, glicerol, 40. Esta selección se basa en que la celulosa bacteriana en proporción de 5 % (p/p) genera una reducción en la permeabilidad al vapor de agua, lo cual es deseable para diversas aplicaciones, como la protección de alimentos. Así, también, dicha celulosa es más costosa que la cáscara de naranja.

CONCLUSIONES

Se logró obtener biopelículas competitivas a partir de la cáscara de naranja a la cual se le ha extraído el aceite esencial, en combinación con pectina y glicerol. Al sustituir parcialmente la cáscara de naranja por celulosa bacteriana, obtenida a partir de la fermentación del té negro, se modificaron favorablemente las propiedades de las biopelículas. Se encuentra como conveniente un porcentaje de adición de celulosa bacteriana del 5 % (p/p), obteniendo una formulación final con los siguientes porcentajes máxicos: cáscara de naranja, 15; celulosa bacteriana, 05; pectina, 40; y, glicerol, 40. Estas películas ostentaron una resistencia a la tensión de 5,53 N/mm², elongación de 51,60 % y permeabilidad al vapor de agua de 0,0273 g.mm/(h.kPa.m²).

Los ensayos de las películas revelaron perfiles no lineales entre el contenido de pectina y la resistencia a la tensión, la elongación o la permeabilidad al vapor de agua; por el contrario, se presentaron relaciones lineales entre la concentración de celulosa bacteriana y el aumento de la resistencia a la tensión, la reducción de la elongación y la permeabilidad al vapor de agua. Por ello, la celulosa bacteriana se constituye en un agente reforzante efectivo cuya producción es sencilla y segura.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad Nacional de San Agustín por el financiamiento de tesis mediante contrato No 0018. Asimismo, los autores expresan su gratitud al Biólogo Tito Vicente Cuadros Pulcha, por su aporte en la adquisición de la cepa madre; y a Helbert Portugal Ochoa por su asistencia en la labor experimental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carreño L, Calcedo L, Martínez C. Técnicas de Fermentación y aplicaciones de celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*. 2012; 8 (16):307-335.
2. Betancourt C, De Mello Prado R, Castellanos L, Campos SW. Características de la glicerina generada en la producción de biodiesel, aplicaciones generales y su uso en el suelo. *CultTrop*. 2016; 37(3): 7-14.
3. Arévalo K, Alemán M E, Rojas M G, Morales LA. Películas biodegradables a partir de residuos de cítricos: propuesta de empaques activos. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algall*. 2010; 1(2):124-134.
4. Bátori V, Jabbari M, Åkesson D, Lennartsson P, Taherzadeh M, Zamani A. Production of Pectin-Cellulose Biofilms: A New Approach for Citrus Waste Recycling. *Int J Polym Sci*. 2017. doi: 10.1155/2017/9732329.
5. Feumba DR, Ashwini RP, Ragu SM. Chemical composition of some selected fruit peels. *Eur J Food Sci Technol*. 2016; 4(4):12-21.
6. Coffin RD, Fishman ML. Viscoelastic properties of pectin-starch blends. *J Agric Food Chem*. 1993; 41 (8):1192-1197.
7. Coreña-Alonso A, Méndez Bautista M. Relación estructura-propiedades de polímeros. *Edu Quim*. 2010; 21(4):291-299.
8. Pérez Espitia P, Wen-Xian Du, Avena-Bustillos R, Ferreira Soares N, McHugh T. Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocoll*. 2014; 35: 287-296.
9. Galus S, Lenart A. Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. *J Food Eng*. 2013; 115 (4): 459-465
10. Domínguez-Courtney MF, Jiménez Murguía MT. Películas comestibles formuladas con Polisacáridos: propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2012; 6 (2): 110-121.
11. Klemm D, Kramer F, Moritz S, Lindström T, Ankerfors M, Gray D, Dorris A. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011; 50(24): 5438-5466.
12. Chawla, Prashant R., Ishwar B. Bajaj, Shrikant A. Survase and Rekha S. Singhal. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technol Biotechnol*. 2009; 47(2): 107-124.
13. Sánchez Aldana D, Contreras-Esquivel JC, Nevárez-Moorillón GV, Aguilar CN. Caracterización de películas comestibles a base de extractos pécticos y aceite esencial de limón mexicano. *CyTA - J Food*. 2015; 13(1):17-25.

14. Fishman ML, Coffin DR, Unruh JJ, Ly T. Pectin/Starch/Glycerol Films: Blends or Composites? *J Macromol Sci A*. 1996; 33(5):639-654.
15. Echeverry N, Montoya U, Zuluaga R, Castro C, Gañan P. Películas de almidón de papa reforzadas con celulosa bacteriana. *ReCiTelA*. 2011. ISSN: 2027-6850.
16. Andrade MM, Tapia DR, Menegalli FC. Películas biodegradables: la incorporación de microfibras y nanofibras de celulosa obtenidas a partir de fuentes vegetales. *Publicaciones e Investigación*. 2011; 5: 11-28.
17. Müller C, Borges J, Yamashita F. Effect of cellulose fibers on the crystallinity and mechanical properties of starch based films at different relative humidity values. *Carbohydr Polym*. 2009; 77 (1): 293-299.
18. Arroyo K. Biocompósitos de almidón termoplástico con microfibras de celulosa. [Tesis para optar el grado de maestro en Tecnología Avanzada]. Altamira, México: Instituto Politécnico Nacional; 2008.

ESTUDIO TEÓRICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE COMPUESTOS AROMÁTICOS CON BASES DE SCHIFF HETEROCÍCLICAS SUSTITUIDOS EN POSICIONES *META Y PARA*

Williams García^a, Hélder Lezama^a, Rodolfo Pumachagua^{a*}

RESUMEN

En el presente estudio se analiza la relación que presenta 11 compuestos aromáticos con bases de *Schiff* heterocíclicas y sustituidos en posición *meta* y *para* con la actividad antioxidante, aplicando el método UB3LYP/6-311G(d,p) dentro de la teoría del funcional de densidad. Determinamos los parámetros: entalpía de disociación de enlace (BDE), potencial de ionización (IP), entalpía de disociación de protones (PDE), afinidad de protones (PA), entalpía de transferencia de electrones (ETE) y energía de estabilización de radicales (RSE), todos en fase gaseosa. Los resultados muestran que los sustituyentes electrodonadores aumentan BDE cuando se encuentran en posición *para*, IP en posición *meta* y *para* y ETE en posición *para*. Además, los electroattractores causan un aumento en PDE y PA en posición *meta* y *para*.

Palabras clave: Bases de *Schiff*, entalpía de disociación de enlace, potencial de ionización, entalpía de transferencia de electrones, afinidad protónica y entalpía de disociación de protón.

THEORETICAL STUDY OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF AROMATIC COMPOUNDS WITH HETEROCYCLIC SCHIFF BASES SUBSTITUTED IN *META* AND *PARA* POSITIONS

ABSTRACT

This study analyzes the relationship that presents 11 aromatic compounds with heterocyclic *Schiff* bases and substituted in position *meta* and *para* with antioxidant activity, using the method UB3LYP/6-311G(d,p) within density functional theory. We determine the parameters: bond dissociation enthalpy (BDE), ionization potential (IP), protons dissociation enthalpy (PDE), affinity of protons (PA), electrons transfer enthalpy (ETE) and radical stabilization energy (RSE), all in gaseous phase. The results show that electrodonors substituents increases BDE when they are in position *para*, IP in position *meta* and *para* and ETE in position *para*. In addition, the electroattractors cause an increase in PDE and PA at position *meta* and *para*.

^a Universidad Nacional Federico Villarreal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Laboratorio de Química Teórica, Jr. Chepén s/n (El Agustino) Perú. * rpumachagua@gmail.com

Key words: *Schiff* bases, bond dissociation enthalpy, ionization potential, electrons transfer enthalpy, proton affinity and proton dissociation enthalpy.

INTRODUCCIÓN

Las bases de *Schiff* constituyen un grupo importante de compuestos orgánicos que tienen un amplio rango de aplicabilidad en diversos campos de la química y biología. La actividad de las bases de Schiff se da en los sistemas biológicos como antioxidantes, antiinflamatorios, analgésicos, antimicrobianos, anticonvulsivos, antituberculosos, anticancerosos y antihelmínticos, además del papel como precursores en la síntesis de diferentes compuestos orgánicos de importancia biológica. Se cree que el átomo de nitrógeno del grupo imina puede estar implicado en la formación de enlaces de hidrógeno con los centros activos de los constituyentes de las células y los efectos en los procesos celulares normales¹. Estos son considerados como “ligandos privilegiados” y son muy utilizados debido a su síntesis versátil y buena solubilidad.²

Los métodos de la teoría del funcional de densidad (DFT), se utilizaron para evaluar las propiedades químicas y dilucidar la relación estructura-actividad (SAR) de compuestos aromáticos con bases de *Schiff* heterocíclicas con posible actividad antioxidante. Además, el estudio de las propiedades electrónicas y moleculares será de gran importancia para comprender el mecanismo de la actividad antioxidante.

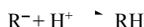
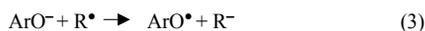
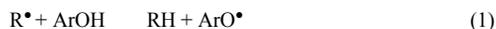
FUNDAMENTO TEÓRICO

Actividad antioxidante

Los antioxidantes presentan la capacidad de ceder sus electrones a los radicales libres estabilizando la estructura de estos e inhibiendo el proceso de oxidación causada y de esta forma neutraliza sus efectos dañinos.³⁻⁴

Los compuestos fenólicos y sus derivados tienen gran potencial antioxidante debido a sus grupos hidroxilo fenólicos que pueden actuar como donantes de hidrógeno o de electrones, eliminando los radicales libres.

Los mecanismos a través de los cuales los antioxidantes pueden neutralizar los radicales libres (esquema 1)⁵ son principalmente: (1) la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), (2) la transferencia de electrones única seguida de transferencia de protones (ET-PT) y (3) la transferencia de electrones seguida de pérdida de protones (SPLET).



Esquema 1. Mecanismos a través de los cuales los antioxidantes neutralizan los radicales libres.

En el mecanismo (1) la reactividad de ArOH se estima calculando BDE de O–H, cuanto menor es su valor, mayor es la actividad esperada. En el mecanismo (2) el primer paso es una reacción de transferencia de electrones, cuyo parámetro de control es IP de ArOH; se espera que las moléculas con valores IP más bajos tengan una actividad más alta. PDE está involucrado en el mecanismo (3), donde ETE de ArO⁻ es otro parámetro de control. Por lo tanto, (BDE)^{6,7}, (IP), (PDE), (PA)⁸ y (ETE) se utilizarán como principales descriptores moleculares para elucidar la actividad de eliminación de radicales en los compuestos.

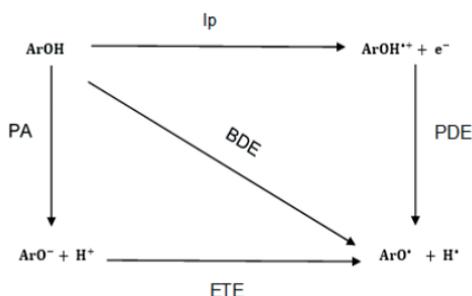


Figura 1. Esquema de los mecanismos antioxidantes y los parámetros que los definen.

Efecto sustituyente

Los grupos sustituyentes ejercen los efectos más importantes que influyen en las propiedades químicas, físicas y biológicas de una especie química, estos se describen con frecuencia mediante varias constantes del sustituyente y están relacionados con sus propiedades electrónicas y del sitio de reacción.⁹⁻¹¹

La ecuación de *Hammett* y sus formas extendidas han sido uno de los medios más utilizados para el estudio e interpretación de reacciones orgánicas y sus mecanismos^{12,13}. *Hammett* propuso la existencia de una relación entre la velocidad de reacción y la constante de equilibrio. Como resultado, se ha encontrado la correlación de la constante de *Hammett* (σ) y los grupos sustituyentes.¹⁴ Los grupos electroattractores tendrán valores positivos de σ y los electrodonadores valores negativos. A medida que sea más alta la magnitud de σ mayor será su capacidad electrónica.¹⁵

ASPECTOS COMPUTACIONALES

Todos los cálculos se realizaron en el programa Gaussian 09. Las estructuras se optimizaron con restricción de simetría utilizando el funcional híbrido UB3LYP y la función base 6-311G(d,p)¹⁶. Se procedió a encontrar los parámetros termodinámicos: BDE, IP, PDE, PA y ETE usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{BDE} = H(\text{I}_m^\bullet) - H(\text{H}^\bullet) + H(\text{I}_m) \quad (4)$$

$$\text{PDE} = H(\text{I}_m^\bullet) + H(\text{H}^+) - H(\text{I}_m^+) \quad (5)$$

$$\text{PI} = H(\text{I}_m^+) - H(\text{I}_m^\bullet) \quad (6)$$

$$\text{PA} = H(\text{I}_m^-) + H(\text{H}^+) - H(\text{I}_m^+) \quad (7)$$

$$\text{ETE} = H(\text{I}_m^\bullet) - H(\text{I}_m^-) \quad (8)$$

$$\text{RSE} = H(\text{I}_m) + H(\text{OH}^\bullet) - H(\text{I}_m^\bullet) - H(\text{H}_2\text{O}) \quad (9)$$

dónde: I_m , I_m^\bullet , I_m^+ , I_m^- , H^\bullet , H^+ , OH^\bullet y H_2O son las entalpías del compuesto aromático con base de *Schiff* heterocíclica: base, radical, catión y anión; radical hidrógeno, protón, radical hidroxilo, y molécula de agua, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

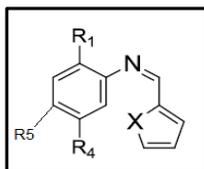


Figura 2. Estructura base aromática con base de *Schiff* heterocíclica.

Tabla 1. Sistemas aromáticos con bases de Schiff heterocíclicas sustituidos.

Sistema	Grupos sustituyentes			
I ₀	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =H	R ₅ =H
I ₁	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =CH ₃	R ₅ =H
I ₂	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =H	R ₅ =CH ₃
I ₄	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =H	R ₅ =CH ₃ O
I ₆	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =H	R ₅ =NO ₂
I ₇	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =CH ₃ CO	R ₅ =H
I ₈	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =H	R ₅ =CH ₃ CO
I ₉	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =NH ₂	R ₅ =H
I ₁₀	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =H	R ₅ =NH ₂
I ₁₁	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =CN	R ₅ =H
I ₁₂	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =H	R ₅ =CN
I ₁₃	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =CF ₃	R ₅ =H
I ₁₄	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =H	R ₅ = CF ₃
I ₁₅	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =F	R ₅ =H
I ₁₆	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =H	R ₅ =F
I ₁₇	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =Cl	R ₅ =H
I ₁₈	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =H	R ₅ =Cl
I ₁₉	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =Br	R ₅ =H
I ₂₀	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =H	R ₅ =Br
I ₂₁	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =OH	R ₅ =H
I ₂₂	X=NH	R ₁ = OH	R ₄ =H	R ₅ =OH

Tabla 2. Valores BDE, ΔBDE y σ_{m,p} en compuestos aromáticos con base de Schiff heterocíclicas meta y para sustituidos.

Sistema	Sustituyente	BDE (kJ/mol)	Δ BDE (kJ/mol)	σ _{m,p} ¹²
		Fase gas	Fase gas	
I ₀		90,7		
I ₉	<i>p</i> -NH ₂	84,5	-6,1	-0,66
I ₂₁	<i>p</i> -OH	88,2	-2,5	-0,37
I ₃	<i>p</i> -CH ₃ O	88,0	-2,6	-0,27
I ₁	<i>p</i> -CH ₃	89,4	-1,3	-0,17
I ₁₀	<i>m</i> -NH ₂	91,9	1,2	-0,16
I ₂	<i>m</i> -CH ₃	91,0	0,3	-0,07
I ₁₅	<i>p</i> -F	90,2	-0,4	0,06
I ₄	<i>m</i> -CH ₃ O	90,9	0,3	0,12
I ₂₂	<i>m</i> -OH	92,2	1,5	0,12
I ₁₇	<i>p</i> -Cl	90,8	0,1	0,23
I ₁₉	<i>p</i> -Br	90,7	0,0	0,23
I ₁₆	<i>m</i> -F	91,8	1,2	0,34
I ₁₈	<i>m</i> -Cl	91,5	0,8	0,37
I ₈	<i>m</i> -CH ₃ CO	91,8	1,1	0,38
I ₂₀	<i>m</i> -Br	91,8	0,3	0,39
I ₁₄	<i>m</i> -CF ₃	92,1	1,5	0,43
I ₇	<i>p</i> -CH ₃ CO	93,5	2,8	0,5
I ₁₃	<i>p</i> -CF ₃	93,5	1,6	0,54
I ₁₂	<i>m</i> -CN	92,3	1,6	0,56
I ₁₁	<i>p</i> -CN	92,5	-0,2	0,66
I ₆	<i>m</i> -NO ₂	92,3	1,6	0,71
I ₅	<i>p</i> -NO ₂	94,6	1,5	0,78

Dependencia de ΔBDE con la constante de Hammett

$$\Delta BDE = BDE(I_X) - BDE(I_0) \quad (10)$$

I_X : sistema sustituido, I_0 : sistema base.

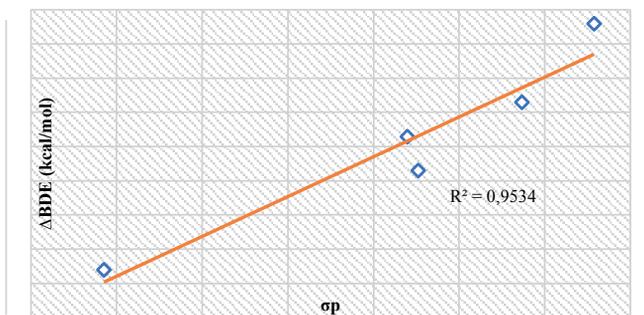


Figura 3. Dependencia de ΔBDE con σ_p .

Los valores calculados BDE y ΔBDE en compuestos aromáticos con base de *Schiff* heterocíclicas *meta* y *para* sustituidos se muestran en la tabla 2. El efecto del sustituyente en la posición *para* es más significativo en los sistemas: I_9 , I_3 , I_1 y I_{21} . Los valores más bajos están relacionados con grupos fuertes donantes de electrones como: $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_3\text{O}$, $-\text{CH}_3$ y $-\text{OH}$ respectivamente. Los valores más altos de BDE están relacionados con grupos fuertes extractores de electrones como $-\text{NO}_2$ en el sistema I_5 .

Los grupos halógenos: $-\text{F}$ y $-\text{Br}$ en los sistemas: I_{15} y I_{19} tienen efectos opuestos sobre la molécula base y el radical. Ellos pueden desestabilizar la molécula base aumentando su energía y estabilizando la fracción radical por efecto de resonancia. Estos dos efectos opuestos dan como resultado valores BDE reducidos en presencia de átomos de halógeno en comparación con otros grupos extractores de electrones.

En la figura 3 se representa la correlación entre la constante de Hammett (σ_p) con valores ΔBDE calculadas. La ecuación de la regresión lineal es la siguiente:

$$\Delta BDE \text{ (kcal/mol)} = 0,1164 \sigma_p + 0,0192 \quad (11)$$

La linealidad es satisfactoria, cuando se realiza para los sistemas: I_1 , I_3 , I_9 , I_{15} , I_{19} y I_{21} .

Dependencia de ΔIP con la constante de Hammett

$$\Delta IP = IP(I_X) - IP(I_0) \quad (12)$$

Tabla 3. Valores IP, Δ IP y $\sigma_{m,p}$ en compuestos aromáticos con base de *Schiff* heterocíclicas *meta* y *para* sustituidos.

Sistema	Sustituyente	IP(kJ/mol) Fase gas	Δ IP(kJ/mol) Fase gas	$\sigma_{m,p}^{12}$
I ₀		169,9		
I ₉	<i>p</i> -NH ₂	155,4	-14,5	-0,66
I ₂₁	<i>p</i> -OH	165,8	-4,1	-0,37
I ₃	<i>p</i> -CH ₃ O	163,6	-6,3	-0,27
I ₁	<i>p</i> -CH ₃	166,5	-3,4	-0,17
I ₁₀	<i>m</i> -NH ₂	153,7	-16,2	-0,16
I ₂	<i>m</i> -CH ₃	166,3	-3,6	-0,07
I ₁₅	<i>p</i> -F	173,8	3,8	0,06
I ₂₂	<i>m</i> -OH	165,9	-4,0	0,12
I ₄	<i>m</i> -CH ₃ O	161,5	-8,4	0,12
I ₁₇	<i>p</i> -Cl	174,2	4,3	0,23
I ₁₉	<i>p</i> -Br	172,4	2,4	0,23
I ₁₆	<i>m</i> -F	174,0	4,1	0,34
I ₁₈	<i>m</i> -Cl	174,1	4,2	0,37
I ₈	<i>m</i> -CH ₃ CO	175,4	5,4	0,38
I ₂₀	<i>m</i> -Br	172,6	2,7	0,39
I ₁₄	<i>m</i> -CF ₃	181,1	11,2	0,43
I ₇	<i>p</i> -CH ₃ CO	174,0	4,0	0,50
I ₁₃	<i>p</i> -CF ₃	180,7	10,8	0,54
I ₁₂	<i>m</i> -CN	179,4	9,5	0,56
I ₁₁	<i>p</i> -CN	179,4	9,5	0,66
I ₆	<i>m</i> -NO ₂	183,6	13,7	0,71
I ₅	<i>p</i> -NO ₂	182,8	12,9	0,78

Los valores IP en compuestos aromáticos con base de *Schiff* heterocíclicas *meta* y *para* sustituidos se presentan en la tabla 3. Observamos que los sistemas: I₁, I₂, I₃, I₄, I₉, I₁₀, I₂₁ y I₂₂ poseen valores IP más bajos respecto al sistema base. Cuanto menor es el valor IP, más fácil será la transferencia de electrones en el mecanismo de transferencia de electrones individuales y mayor será la actividad antioxidante.

El grupo sustituyente *m*-NH₂ el cual es buen donador de electrones permitiría la transferencia del electrón, dando así mayor actividad antioxidante. Por el contrario, con el sustituyente *m*-NO₂, un extractor de electrones, la transferencia del electrón no podría ocurrir, por tanto el valor de IP sería muy alto.

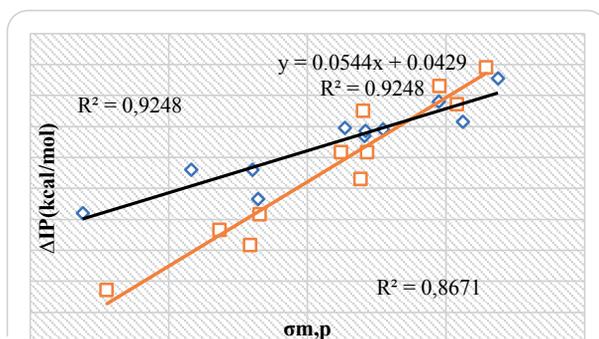


Figura 4. Dependencia de ΔIP con σ_m (línea negra) y σ_p (línea anaranjada).

En la figura 4 se representa la correlación que hay entre las constantes de *Hammett* ($\sigma_{m,p}$) con valores ΔIP calculadas. Las ecuaciones obtenidas son las siguientes:

$$\Delta IP = 0,0544 \sigma_m + 0,0429 \quad (13)$$

$$\Delta IP = 0,0272 \sigma_p + 0,2439 \quad (14)$$

Los coeficientes de correlación, R^2 , alcanzaron valores de 0,92 y 0,87 para los compuestos aromáticos con base de *Schiff* heterocíclicas *meta* y *para* sustituidos, respectivamente. La linealidad es aceptable, y pueden predecir la disminución del IP en compuestos aromáticos con base de *Schiff* heterocíclicas *meta* y *para* sustituidas a partir de sus constantes de Hammett o viceversa.

Dependencia de las ΔPDE con las constantes de *Hammett*

$$\Delta PDE = PDE(I_X) - PDE(I_0) \quad (15)$$

En el mecanismo de transferencia de electrones seguida de protones, el electrón se produce a partir del antioxidante para formar un anión que transfiere un protón. La transferencia del electrón depende de IP, mientras que la del protón se rige por el valor PDE. Cuanto menor sea el valor de PDE, más fácil será la transferencia de protones del catión radical del sistema (I_X^+) y, por tanto, más estable será su radical (I_X^\bullet) formado, siendo mayor la actividad antioxidante.

Tabla 4. Valores PDE, Δ PDE y $\sigma_{m,p}$ en compuestos aromáticos con base de Schiff heterocíclicas *meta* y *para* sustituidos.

Sistema	Sustituyente	PDE (kJ/mol)	Δ PDE (kJ/mol)	$\sigma_{m,p}^{12}$
		Fase gas	Fase gas	
I ₀		234,7		
I ₉	<i>p</i> -NH ₂	243,0	8,3	-0,66
I ₂₁	<i>p</i> -OH	236,3	1,6	-0,37
I ₃	<i>p</i> -CH ₃ O	238,4	3,7	-0,27
I ₁	<i>p</i> -CH ₃	236,9	2,2	-0,17
I ₁₀	<i>m</i> -NH ₂	252,1	17,4	-0,16
I ₂	<i>m</i> -CH ₃	238,6	3,9	-0,07
I ₁₅	<i>p</i> -F	230,4	-4,3	0,06
I ₂₂	<i>m</i> -OH	240,2	5,5	0,12
I ₄	<i>m</i> -CH ₃ O	243,3	8,6	0,12
I ₁₇	<i>p</i> -Cl	230,5	-4,2	0,23
I ₁₉	<i>p</i> -Br	232,2	-2,4	0,23
I ₁₆	<i>m</i> -F	231,8	-2,9	0,34
I ₁₈	<i>m</i> -Cl	231,3	-3,4	0,37
I ₈	<i>m</i> -CH ₃ CO	230,3	-4,3	0,38
I ₂₀	<i>m</i> -Br	233,1	-1,6	0,39
I ₁₄	<i>m</i> -CF ₃	224,9	-9,7	0,43
I ₇	<i>p</i> -CH ₃ CO	233,5	-1,2	0,5
I ₁₃	<i>p</i> -CF ₃	226,7	-7,9	0,54
I ₁₂	<i>m</i> -CN	226,8	-7,9	0,56
I ₁₁	<i>p</i> -CN	227,0	-7,7	0,66
I ₆	<i>m</i> -NO ₂	222,6	-12,1	0,71

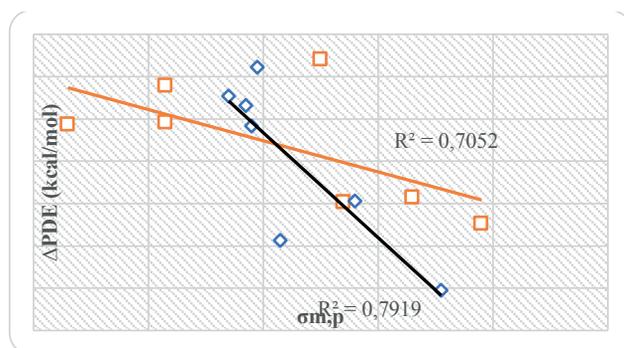


Figura 5. Dependencia de Δ PDE con σ_m (línea negra) y σ_p (línea anaranjada).

En la tabla 4, observamos que los sistemas: $I_5, I_6, I_7, I_8, I_{11}, I_{12}, I_{13}, I_{14}, I_{15}, I_{16}, I_{17}, I_{18}, I_{19}$ y I_{20} tienen valores de PDE más bajos, siendo I_6 el que mejor valor nos dio comparado con el sistema base (I_0), mostrando mayor posibilidad de transferencia de protones (PDE). Entonces si relacionamos los valores PDE de la tabla 2 con los IP de la tabla 3, podemos ver que los sistemas: $I_1, I_2, I_3, I_4, I_9, I_{10}, I_{21}$ y I_{22} mostraron valores de IP muy bajos, no seguirían el mecanismo de transferencia de protones.

En la figura 5 se representa la correlación que hay entre las constantes de Hammett ($\sigma_{m,p}$) con valores Δ PDE calculados. Las ecuaciones obtenidas son las siguientes:

$$\Delta\text{PDE} = -24,811 \sigma_m + 5,2781 \quad (16)$$

$$\Delta\text{PDE} = -7,3636 \sigma_p - 2,0844 \quad (17)$$

Los coeficientes de correlación, R^2 , alcanzaron valores de 0,8 y 0,7 para los compuestos aromáticos con base de Schiff heterocíclicas *meta* y *para* sustituidos, respectivamente.

Dependencia de las Δ PA con las constantes de Hammett

$$\Delta\text{PA} = \text{PA}(I_x) - \text{PA}(I_0) \quad (18)$$

Tabla 5. Valores PA, Δ PA y $\sigma_{m,p}$ en compuestos aromáticos con base de Schiff heterocíclicas *meta* y *para* sustituidos.

Sistema	Sustituyente	PA (kJ/mol) Fase gas	Δ PA (kJ/mol) Fase gas	$\sigma_{m,p}^{12}$
I_0		359	0	
I_9	<i>p</i> -NH ₂	365	6	-0,66
I_{21}	<i>p</i> -OH	361	2	-0,37
I_3	<i>p</i> -CH ₃ O	361	2	-0,27
I_1	<i>p</i> -CH ₃	359	0	-0,17
I_{10}	<i>m</i> -NH ₂	363	4	-0,16
I_2	<i>m</i> -CH ₃	359	0	-0,07
I_{15}	<i>p</i> -F	355	-4	0,06
I_{22}	<i>m</i> -OH	359	0	0,12
I_4	<i>m</i> -CH ₃ O	359	0	0,12
I_{17}	<i>p</i> -Cl	352	-7	0,23
I_{19}	<i>p</i> -Br	352	-7	0,23
I_{16}	<i>m</i> -F	353	-6	0,34
I_{18}	<i>m</i> -Cl	350	-9	0,37
I_8	<i>m</i> -CH ₃ CO	353	-6	0,38
I_{20}	<i>m</i> -Br	351	-8	0,39
I_{14}	<i>m</i> -CF ₃	347	-12	0,43
I_7	<i>p</i> -CH ₃ CO	348	-11	0,5
I_{13}	<i>p</i> -CF ₃	345	-14	0,54
I_{12}	<i>m</i> -CN	347	-12	0,56
I_{11}	<i>p</i> -CN	344	-15	0,66
I_6	<i>m</i> -NO ₂	344	-15	0,71
I_5	<i>p</i> -NO ₂	337	-22	0,78

El parámetro PA mide la facilidad de eliminación del protón en compuestos aromáticos con base de *Schiff* heterocíclicas *meta* y *para* sustituidos (I_x) para formar su forma aniónica (I_x^-). Los sistemas: I_5 , I_6 , I_7 , I_8 , I_{11} , I_{12} , I_{13} , I_{14} , I_{15} , I_{16} , I_{17} , I_{18} , I_{19} y I_{20} tienen un valor PA más bajo que el sistema base (I_0). El sistema I_5 tiene el valor más bajo por tener un sustituyente extractor de electrones, generando así buena actividad antioxidante. Sin embargo, existen algunas excepciones, tal es el caso del sistema I_9 que posee al sustituyente *p*-NH₂, buen donante de electrones cuyo valor PA es más alto que I_0 .

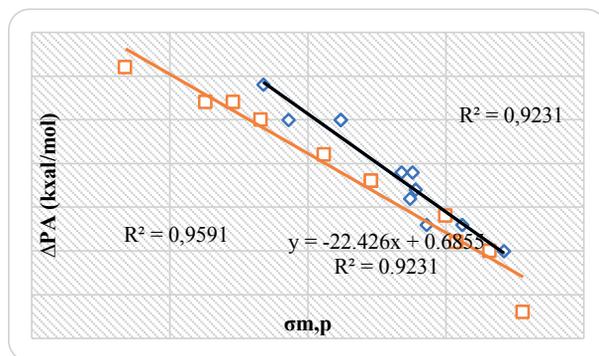


Figura 6. Dependencia de ΔPA con σ_m (línea negra) y σ_p (línea anaranjada).

En la figura 6 se representa la correlación que hay entre las constantes de Hammett ($\sigma_{m,p}$) con valores ΔPA calculadas. Las ecuaciones obtenidas son las siguientes:

$$\Delta PA = -22,426 \sigma_m + 0,6855 \quad (19)$$

$$\Delta PA = -18,124 \sigma_p - 3,8428 \quad (20)$$

Los coeficientes de correlación, R^2 , alcanzan valores de 0,92 y 0,96 para los compuestos aromáticos con base de *Schiff* heterocíclicas *meta* y *para* sustituidos, respectivamente. La linealidad encontrada es satisfactoria y puede predecir la disminución de PA en los sistemas *meta* y *para* sustituidos a partir de sus constantes de Hammett o viceversa.

Dependencia de las ΔETE con la constante de Hammett

$$\Delta ETE = ETE(I_x) - ETE(I_0) \quad (21)$$

En el mecanismo SPLET, los parámetros como PA y ETE juegan un papel importante. Con el fin de eliminar fácilmente el protón de los sistemas *meta* y *para* sustituidos (I_x) para obtener su forma aniónica (I_x^-), la PA debe ser más baja. De forma similar, la transferencia de electrones del sistema aniónico (I_x^-) para obtener su forma radicalaria (I_x^\bullet) será más fácil, cuando tengan el valor ETE más bajo.

A partir de la tabla 6 observamos que los sistemas: **I**₁, **I**₃, **I**₉, **I**₁₀ y **I**₂₁ tienen un valor ETE más bajo respecto al sistema base (**I**₀). Esto significa que la transferencia de electrones será más fácil. Por lo tanto, los sistemas meta y para sustituidos tienen valores más bajos de PA y ETE, lo que indica una mayor posibilidad de someterse al mecanismo SPLET para la eliminación de radicales, mostrando mayor actividad antioxidante, pero si relacionamos los valores ETE de la tabla 6 con PA de la tabla 5, observamos que los sistemas: **I**₅, **I**₆, **I**₇, **I**₈, **I**₁₁, **I**₁₂, **I**₁₃, **I**₁₄, **I**₁₅, **I**₁₆, **I**₁₇, **I**₁₈, **I**₁₉ y **I**₂₀ tienen valores PA muy bajos, no seguirían el mecanismo de transferencia de electrón (ETE).

Tabla 6. Valores de ETE, Δ ETE y $\sigma_{m,p}$ en compuestos aromáticos con base de Schiff heterocíclicas y con sustituyentes en posiciones *meta* y *para*.

Sistema	Sustituyente	ETE(kcal/mol)	Δ ETE(kcal/mol)	$\sigma_{m,p}^{12}$
		Fase gas	Fase gas	
I ₀		45,5	0	
I ₉	<i>p</i> -NH ₂	33,9	-11,7	-0,66
I ₃	<i>p</i> -CH ₃ O	40,8	-4,8	-0,27
I ₂₁	<i>p</i> -OH	41,4	-4,1	-0,37
I ₁	<i>p</i> -CH ₃	44,0	-1,5	-0,17
I ₁₀	<i>m</i> -NH ₂	42,4	-3,1	-0,16
I ₂	<i>m</i> -CH ₃	45,6	0,0	-0,07
I ₁₅	<i>p</i> -F	48,9	3,4	0,06
I ₂₂	<i>m</i> -OH	47,5	2,0	0,12
I ₄	<i>m</i> -CH ₃ O	46,2	0,7	0,12
I ₁₇	<i>p</i> -Cl	52,9	7,4	0,23
I ₁₉	<i>p</i> -Br	52,1	6,6	0,23
I ₁₆	<i>m</i> -F	52,8	7,3	0,34
I ₁₈	<i>m</i> -Cl	55,1	9,6	0,37
I ₈	<i>m</i> -CH ₃ CO	52,9	7,4	0,38
I ₂₀	<i>m</i> -Br	54,6	9,1	0,39
I ₁₄	<i>m</i> -CF ₃	59,0	13,5	0,43
I ₇	<i>p</i> -CH ₃ CO	59,2	13,7	0,5
I ₁₃	<i>p</i> -CF ₃	62,0	16,6	0,54
I ₁₂	<i>m</i> -CN	59,2	13,7	0,56
I ₁₁	<i>p</i> -CN	62,3	16,8	0,66
I ₆	<i>m</i> -NO ₂	61,9	16,4	0,71
I ₅	<i>p</i> -NO ₂	71,2	25,7	0,78

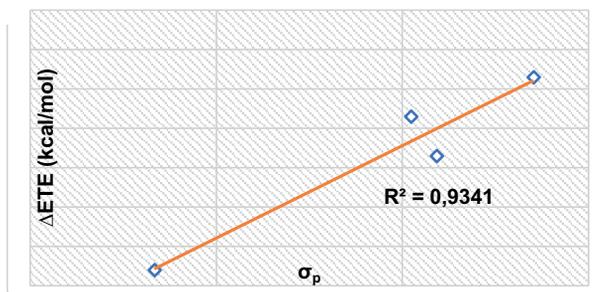


Figura 7. Dependencia de las ΔETE con la σ_p .

En la figura 7 se representa la correlación que hay entre la constante de *Hammett* (σ_p) con valores ΔETE calculadas.

La ecuación obtenida es la siguiente:

$$\Delta ETE = 0,047 \sigma_p - 0,1093 \quad (22)$$

El coeficiente de correlación, R^2 , alcanzó el valor de 0,93 para los compuestos aromáticos con base de *Schiff* heterocíclicas *para* sustituidos. La linealidad es satisfactoria para 4 sistemas: I_1 , I_3 , I_9 , y I_{21} .

Relación de RSE en compuestos aromáticos con bases de *Schiff* heterocíclicas sustituidos en posición *meta* y *para* con valores BDE, ETE y PDE.

Tabla 7. Valores RSE, BDE, ETE y PDE compuestos aromáticos con bases de Schiff heterocíclicas y con sustituyentes en posiciones *meta* y *para*.

Sistema	Sustituyente	BDE(kcal/mol)	ETE(kcal/mol)	PDE(kcal/mol)	RSE(kcal/mol)
		Fase gas	Fase gas	Fase gas	Fase gas
I₀		90,7	45,5	234,7	15,8
I₉	<i>p</i> -NH ₂	84,5	33,9	243,0	22,0
I₃	<i>p</i> -CH ₃ O	88,0	40,8	238,4	18,4
I₁	<i>p</i> -CH ₃	89,4	44,0	236,9	17,1
I₁₀	<i>m</i> -NH ₂	91,9	42,4	252,1	14,6
I₁₅	<i>p</i> -F	90,2	48,9	230,4	16,2
I₂	<i>m</i> -CH ₃	91,0	45,6	238,6	15,5
I₄	<i>m</i> -CH ₃ O	90,9	46,2	243,3	15,5
I₁₇	<i>p</i> -Cl	90,8	52,9	230,5	15,7
I₁₉	<i>p</i> -Br	90,7	52,1	232,2	15,8
I₁₆	<i>m</i> -F	91,8	52,8	231,8	14,6
I₈	<i>m</i> -CH ₃ CO	91,8	52,9	230,3	14,7
I₁₈	<i>m</i> -Cl	91,5	55,1	231,3	15,0
I₂₀	<i>m</i> -Br	91,8	54,6	233,1	14,7
I₁₄	<i>m</i> -CF ₃	92,1	59,0	224,9	14,3
I₇	<i>p</i> -CH ₃ CO	93,5	59,2	233,5	13,0
I₁₃	<i>p</i> -CF ₃	93,5	62,0	226,7	13,0
I₁₂	<i>m</i> -CN	92,3	59,2	226,8	14,2
I₁₁	<i>p</i> -CN	92,5	62,3	227,0	14,0
I₆	<i>m</i> -NO ₂	92,3	61,9	222,6	14,2
I₅	<i>p</i> -NO ₂	94,6	71,2	225,7	11,9
I₂₂	<i>m</i> -OH	92,2	47,5	240,2	14,3
I₂₁	<i>p</i> -OH	88,2	41,4	236,3	18,3

La energía de estabilización de radicales (RSE) es el parámetro que indica la estabilidad del compuesto aromático con base heterocíclica y sustituido (I_x) formada como radical. Cuanto mayor sea el valor RSE, más estable será la imina radicalaria y mayor será la actividad antioxidante. A partir de la tabla 7 se deduce: los sistemas: **I₉**, **I₃**, **I₁** y **I₂₁**, al transferir el átomo de hidrógeno y convertirse a su forma radicalaria, cuando se mide esta pérdida a través del parámetro de BDE y ETE, estas serán más estables que el sistema base por poseer RSE más alto. El sistema **I₁₅** también cumple con este comportamiento.

CONCLUSIONES

En la actividad antioxidante de los compuestos aromáticos con bases de *Schiff* heterocíclicas se comprueba para el parámetro:

1. BDE, el mecanismo de transferencia de un átomo de hidrógeno es mayor cuando están sustituidos con grupos dadores de electrones- π en posición *para*.
2. IP, el mecanismo de transferencia de un electrón es mayor cuando están sustituidos con grupos dadores de electrones- π en posición *para* y *meta*.
3. PDE, el mecanismo secuencial de transferencia de un electrón y protón es mayor cuando están sustituidos con grupos sustractores de electrones- π en posición *para* y *meta*.
4. PA, el mecanismo de transferencia de un protón es mayor cuando están sustituidos con grupos sustractores de electrones- π en posición *para* y *meta*.
5. ETE, el mecanismo secuencial de transferencia de un protón y electrón es mayor cuando están sustituidos con grupos dadores de electrones- π en posición *para*.

Finalmente, los compuestos aromáticos con bases de *Schiff* heterocíclicas y sustituidos con grupos: $-\text{NH}_2$, $-\text{CH}_3\text{O}$, $-\text{CH}_3$ y $-\text{OH}$, todos en posición *para*, fueron más estables y con alto potencial antioxidante, cuando se considera el mecanismo de transferencia del átomo de hidrógeno o la transferencia secuencial de un protón seguida de un electrón. Esto también ocurre con el grupo *p*-F.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pandey A, Rajavel R, Chandraker S, Dash D. Synthesis of Schiff bases of 2-amino-5-aryl-1,3,4-thiadiazole and its anasgesic, anti-inflammatory and anti-bacterial activity. E-J Chem. 2012; 9: 2524-2531.
2. Rafi UM, Mahendiran D, Haleel AK, Nankar RP, Doble M, Rahiman AK. New pyridazine-based binuclear nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes as prospective anticancer agents. New J Chem. 2016; 40: 2451-2465.
3. Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure-activity relationship. J Agric Food Chem. 2002; 50: 468-472.
4. Zapata Cuartas JC. Obtención de una nueva serie de compuestos pirrlicos y estudio teórico de su potencial actividad antioxidante. [Tesis de maestría]. Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 2012.
5. Lu L, Zhu S, Zhang H, Zhang S. Improvement of antioxidative activity of resveratrol by elongating conjugated chain: A DFT theoretical study. Comput Theor Chem. 2013; 1019: 39-47.
6. Wright JS, Johnson ER, DiLabio GA. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. J Am Chem Soc. 2001; 123: 1173-1183.

7. Cotes S, Cotuá J, Muñoz A. Calculated antioxidant activity of selected phenolic compounds. *Can J Chem*. 2018; 96: 345-350.
8. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys*. 1993; 98: 5648-5652.
9. Sengar RS, Nemykin VN, Basu P. Electronic properties of para-substituted thiophenols and disulfides from ¹³C NMR spectroscopy and ab initio calculations: relations to the Hammett parameters and atomic charges. *New J Chem*. 2003; 27: 1115- 1123.
10. Chandra AK, Uchimaru T. The O-H bond dissociation energies of substituted phenols and proton affinities of substituted phenoxide ions: A DFT study. *Int J Mol Sci*. 2002; 3: 407-422.
11. Krygowski TM, Stępién BT. Sigma- and pi-electron delocalization: Focus on substituent effects. *Chem Rev*. 2005; 105: 3482-3512.
12. Hansch C, Leo A, Taft RW. A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters. *Chem Rev*. 1991; 91: 165-195.
13. Exner O, Böhm S. Background of the Hammett equation as observed for isolated molecules: Meta- and para-substituted benzoic acids. *J Org Chem*. 2002; 67: 6320-6327.
14. McDaniel H, Brown HC. An extended table of Hammett substituent constants based on the ionization of substituted benzoic acids. *J Org Chem*. 1957; 23: 420-427.
15. La Macchia G, Gagliardi L, Carlson GS, Jay AN, Davis E, Cramer CJ. Theoretical prediction of linear free energy relationships using proton nucleomers. *J Phys Org Chem*. 2008; 21: 136-145.
16. Klein E, Lukeš V, Cibulková Z, Polovková J. Study of N-H, O-H, and S-H bond dissociation enthalpies and ionization potentials of substituted anilines, phenols, and thiophenols. *J Mol Struct-THEOCHEM*. 2006; 758: 149-159.

EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA CÁSCARA DE SANKY (*Corryocactus brevistylus*)

Tatiana Rojas^a, María E. Fuentes Campos^{b*}, Eliana Contreras-López^c,
Susana Gómez^a, Ana María Muñoz-Jáuregui^d

RESUMEN

La extracción por ultrasonido permite recuperar sustancias bioactivas de los residuos agroindustriales, además es una técnica rápida, limpia y amigable con el medio ambiente. Se realizó la extracción de componentes fenólicos por ultrasonido a las cáscaras del fruto del sanky (*Corryocactus brevistylus*). Esta planta es una cactácea que crece en los Andes del Perú y su fruto es consumido por las comunidades. La cáscara de sanky reportó: humedad 10,74 %; proteína 9,19 %; cenizas 14,75 %; grasa 2,68 %; fibra 16,39 % y extracto libre de nitrógeno 46,25 %. En las semillas, se encontró 207,81 ppm de calcio, 39,36 ppm de hierro y 9,4 ppm de zinc. Para la extracción se evaluaron tres factores y cada uno en tres niveles: concentración del solvente etanol (40, 50 y 60 %), tiempo (20, 30 y 40 minutos) y temperatura (25, 35 y 45 °C). Se empleó el diseño de Box Behnken, reportando 15 ensayos experimentales. Se evaluó los polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteau. El tratamiento M11 (50 % v/v de etanol, 40 minutos y 25 °C) reportó 43,9 mg ácido gálico/g muestra seca y fue el más eficiente. Los siguientes tres tratamientos M3 (60%v/v, 40 minutos, 35 °C); M6 (40%v/v, 30 minutos, 45 °C) y M9 (50%v/v, 20 minutos, 25 °C) reportaron valores de 31,5; 32,9 y 32,6 mg ácido gálico/g muestra seca, respectivamente, y no tuvieron diferencias significativas. La variable más importante fue el tiempo de extracción, luego la concentración del solvente. El objetivo fue determinar las variables de concentración de solvente, tiempo y temperatura en la extracción asistida por ultrasonido para recuperar los componentes fenólicos de la cáscara de sanky.

Palabras claves: ultrasonido, compuestos fenólicos, sanky, sustancias bioactivas.

^a Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina. Av. La Molina s/n, La Molina. Lima, Perú.

^{b*} Facultad de Química e Ing. Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Av. Universitaria /Calle Germán Amézaga 375. Edificio Jorge Basadre Ciudad Universitaria, Lima, Perú, elifuentesc@gmail.com.

^c E.P. Ciencia de los Alimentos. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Jr Puno 1002, Lima, Perú.

^d Vicerrectorado de Investigación, Universidad San Ignacio de Loyola. Av. La Fontana 550, La Molina. Lima, Perú.

ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF THE PEEL OF SANKY (*Corryocactus brevistylus*)

ABSTRACT

The ultrasound-assisted extraction allows to recover bioactive substances in the agro-industrial waste, besides, is a fast, clean and friendly with the environment technique. The extraction of total phenolic components by ultrasound was carried out on the peel of the fruit of the sanky (*Corryocactus brevistylus*). This plant is a cactus that grows in the Andes of Peru and its fruit is used by the communities. The sanky peel reported: humidity 10,74 %; protein 9,19 %; ashes 14,75 %; 2,68 % fat; fiber 16,39 % and nitrogen-free extract 46,25 %. The sanky seeds reported 207,81 ppm of calcium, 39,36 ppm of iron and 9,4 ppm of zinc. For the extraction, three factors and each one in three levels were evaluated: solvent concentration (40 %, 50 % and 60 %), time (20, 30 and 40 minutes) and temperature (25, 35 and 45 °C). The design of Box Behnken was used, reporting 15 experimental trials. The total polyphenols was evaluated by the Folin Ciocalteu method. The M11 (50 % v/v ethanol, 40 minutes and 25 °C) treatment reported 43,9 mg galic acid/g dry sample, and was the most efficient. The following three treatments: M3 (60 % v/v, 40 minutes, 35 °C); M6 (40 % v/v, 30 minutes, 45 °C) and M9 (50 % v/v, 20 minutes, 25 °C) did not show significant differences, reporting values of 31,5; 32,9 and 32,6 mg galic acid/g dry sample, respectively. The most important variable was the extraction time, then the concentration of solvent. The objective was to determine the variables of solvent concentration, time and temperature during the ultrasound-assisted extraction to recover the phenolic components of the peel of sanky.

Key words: ultrasound, sanky, polyphenols, bioactive substances.

INTRODUCCIÓN

La extracción de componentes bioactivos por ultrasonido es un método limpio, sencillo, rápido y verde en comparación con los métodos convencionales. Además de su alta reproducibilidad en corto tiempo, de fácil manipulación y disminución en el uso de solventes frente a otros métodos¹. Las ondas de ultrasonido causan la ruptura mecánica de la pared celular liberando los componentes bioactivos, a su vez el calentamiento local del solvente aumenta la difusión del extracto, mejorando así la transferencia de masa a través de la interfase sólido-líquido. Los efectos mecánicos de la sonicación inducen a una mayor disolución del solvente en las paredes y membranas celulares, facilitando la liberación del contenido de las células y mejorando la transferencia de masa².

El sanky (*Corryocactus brevistylus*) es una cactácea nativa de los Andes peruanos, de tallo carnoso que crece entre los 2500 a 3500 msnm, sus frutos son unas bayas de forma redondas, de color verde-amarillo, con espinas. Ayuda en el tratamiento para la prostatitis, problemas

del riñón y por su aporte de calcio podría ayudar a combatir la osteoporosis. Su fruto presenta propiedades funcionales y terapéuticas, se suele utilizar para la producción de jaleas, néctares, jugos, ensaladas y otros³. Este fruto, es conocido, por los lugareños, como el “quitahambre” y suelen consumirlo para largas jornadas de trabajo. Sin embargo, la cáscara del fruto es poco valorada, por la falta de información y podría considerarse como una fuente de sustancias bioactivas.

Al respecto, Matos *et al.*⁴ realizaron la extracción de componentes fenólicos de la pulpa de sanky empleando el método convencional a una temperatura de 70 °C; relación materia prima: solvente de 1:10 (p/v) y etanol al 90 %. La capacidad antioxidante de estos componentes fenólicos por el método de DPPH reportó 439,11 µgTrolox/g muestra. Zou *et al.*⁵ optimizaron la extracción asistida por ultrasonido de los fenoles y flavonoides de hojas de mango (*Mangifera indica* L.), las variables evaluadas fueron temperatura, tiempo de extracción y concentración de alcohol en el solvente. La temperatura y el tiempo de extracción fueron los dos factores más importantes.

Existen pocas investigaciones sobre la cáscara de sanky, considerando que podría utilizarse como ingrediente y/o insumo en el procesamiento de alimentos. Al respecto, Lipe⁶ reportó la presencia de un hidrocoloide en el zumo de sanky que tendría un efecto protector para el hígado y la mucosa gástrica.

Dentro de los residuos agroindustriales, el grupo de alimentos con mayor porcentaje de pérdidas y desperdicios es el de frutas y verduras (55 %), seguido de raíces y tubérculos (40 %). Los residuos provenientes del procesamiento de frutas, son poco valorados al desconocer su composición, cantidad y calidad de sus componentes⁷. Los polifenoles son compuestos que se encuentran en diferentes partes de las plantas y también en los residuos, presentan un efecto protector contra los radicales libres, además retardan el avance de algunas enfermedades crónicas. Estos compuestos han demostrado una intensa actividad biológica, como antioxidantes, antibacterianos e incluso antitumorales⁸. En las cáscaras de varios frutos, se reporta una mayor concentración de sustancias bioactivas que en la misma pulpa de la fruta, en el caso de las cáscaras de plátano, sandía y uva reportaron 24,42; 26,73 y 113,40 mg ácido gálico/g de muestra, respectivamente⁷; así como la cáscara de mandarina común y de toronja que, según Ordóñez-Gómez *et al.*⁹, presentaron 3,22 y 3,08 mg ácido gálico/g muestra, respectivamente. Respecto a la cáscara del fruto del sanky, a la fecha no hay información sobre su composición y/o aplicaciones en algún tipo de industria.

Al eliminar estos residuos también se estaría eliminando una posible fuente de sustancias biológicamente activas que podrían generar un valor agregado a estos residuos y podrían ser utilizados como ingredientes en la industria de alimentos, farmacéutica, cosméticos y también nutracéutica. Según el reporte de Waste Atlas 2013¹⁰, en el Perú se producen 54,8 % de desechos orgánicos. Asimismo, se estaría tratando los residuos sólidos orgánicos de una manera sostenible y amigable con el cuidado del medio ambiente. De allí la importancia de evaluar los componentes fenólicos presentes en la cáscara de sanky aplicando una extracción asistida por ultrasonido.

El objetivo de la investigación fue aplicar la extracción asistida por ultrasonido para recuperar los componentes fenólicos de la cáscara de sanky utilizando como variables la concentración de solvente, tiempo y temperatura de extracción.

PARTE EXPERIMENTAL

Materia prima y reactivos

Se eliminaron aquellos frutos de sanky con daños físicos, luego se lavaron con agua destilada, se secaron con papel toalla y se pelaron manualmente. Las cáscaras fueron secadas en estufa a 35 °C, luego fueron molidas y almacenadas en empaques herméticos y asépticos. El etanol (99 %), ácido sulfúrico (99 %), hidróxido de sodio y el hexano fueron adquiridos de Sigma (USA).

Métodos de análisis

Determinación de la composición química: Se determinó humedad, proteínas, grasas, fibra total, cenizas y el extracto libre de nitrógeno se determinó por diferencia. Se utilizó los métodos estándar que recomienda la AOAC, 2005¹¹.

Determinación del contenido de calcio, hierro y zinc: Se utilizó el método de la Unión Europea Norma UNE-EN 14082, determinación de elementos traza utilizando espectroscopia de absorción atómica, tras la obtención de cenizas secas.

Determinación de compuestos fenólicos mediante espectroscopia: Después de la extracción por ultrasonido, los extractos acuosos fueron centrifugados y se recogió el sobrenadante. El contenido de compuestos fenólicos totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu¹². Se trató 40 µL de extracto con 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 mL de carbonato sódico al 20 % (p/v) y se llevó a 10 mL. Transcurrida media hora se efectuó la lectura de absorbancia a 760 nm, se utilizó como estándar al ácido gálico (GAL) y los resultados se expresaron como miligramos de ácido gálico (mg GAL) /g materia prima seca.

Metodología experimental

Obtención de los extractos por extracción separación asistida por ultrasonido

Se trabajó con 1,0 g de cáscara de sanky seca y molida, luego se adicionó 50 mL del solvente y se procedió a los diferentes tratamientos de extracción en un generador ultrasónico. El equipo es el modelo NO VC 505 de marca Sonics & Materials, INC., U.S.A. que trabajó a 20 KHz y 130 W, con tiempos de sonicación (sonda en contacto con el extracto acuoso) de 45 segundos con intervalos de descanso de 60 segundos. Esto se repitió y fue constante en todos los tratamientos.

Diseño experimental y análisis estadístico

Extracción asistida por ultrasonido de los componentes fenólicos

Durante la extracción se evaluó la influencia de las variables independientes: concentración de etanol (40,50 y 60 %v/v), tiempo (20, 30 y 40 min) y temperatura (25, 35 y 45 °C). Cada

variable independiente (factor) fue evaluada a tres niveles. Se utilizó el diseño Box Behnken (DBB), el cual reportó un total de 15 tratamientos, las corridas fueron evaluadas de forma independiente para cada extracción, tal como se describe en la tabla 1. La respuesta medida fue la cantidad de componentes fenólicos totales (mgGAL/g de muestra). Todas las corridas se realizaron por triplicado y en forma aleatoria.

Tabla 1. Tratamientos para la extracción de los compuestos fenólicos por ultrasonido de la cáscara de sanky seca.

Tratamientos	Concentración de etanol (%v/v)	Tiempo de extracción (min)	Temperatura de extracción (°C)
M1	40	20	35
M2	40	40	35
M3	60	40	35
M4	60	20	35
M5	40	30	25
M6	40	30	45
M7	60	30	25
M8	60	30	45
M9	50	20	25
M10	50	20	45
M11	50	40	25
M12	50	40	45
M13	50	30	35
M14	40	30	35
M15	60	30	35

Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron evaluados usando un análisis de variancia (ANOVA) y la prueba de Tukey, en ambos casos se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los análisis se realizaron con el software STATGRAPHICS CENTURION XV. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la cáscara de sanky

La cáscara de sanky seca y molida reportó una humedad promedio de 10,74 %, es un valor bajo comparado con cáscaras de otras frutas como mandarina 80,14 % y naranja agria 78,60 %¹⁵. Esto indica que los solutos de la cáscara se encuentran concentrados, por tanto, la concentración de los polifenoles de la cáscara también es alta comparada con otros residuos. En la tabla 2, se aprecia la composición proximal de la cáscara de sanky seca. El extracto libre de nitrógeno fue 46,25 %, esto implica la presencia de hidrocoloides y/o compuestos solubles en agua, tal como lo reporta Lipe⁶ al encontrar 38,24 % de un hidrocoloide en la pulpa del sanky. También podría poseer hemicelulosa. Asimismo, se hallaron 16,39 % y 14,75 % de fibra y cenizas en la cáscara, respectivamente. La fibra o fracción insoluble es casi la tercera parte de la fracción soluble, así que ambas partes (representan casi el 62,64 %) aportarían a mejorar el tránsito intestinal y como protector de la mucosa gástrica, por ende, serían de gran aporte para mejorar el proceso digestivo.

Tabla 2. Composición química de la cáscara de sanky seca (gramos/100gmuestra).

Determinación	Porcentaje (*)
Humedad	10,74
Proteínas	9,19
Cenizas	14,75
Grasa	2,68
Fibra	16,39
E.L.N.	46,25

(*) Son valores promedios de tres repeticiones

Respecto al contenido de cenizas podría incluirse la presencia de calcio y potasio, que según Nolzco y Guevara³ encontraron 249 ppm de calcio y 417 ppm de potasio en el néctar de sanky. Por otra parte, en las semillas de sanky, también se encontraron minerales como calcio, hierro y zinc, en concentraciones de 207,81; 39,36 y 9,4 ppm, respectivamente, como se muestra en la tabla 3. Esto permite deducir que también en la cáscara del fruto se encuentran altas concentraciones de estos micronutrientes, especialmente calcio que podría ser utilizado en la elaboración de otros productos.

Tabla 2. Composición química de la cáscara de sanky seca (gramos/100gmuestra).

Metales	Contenido en ppm (*)
Calcio	207,81
Hierro	39,36
Zinc	9,4

(*) Se reporta el promedio de dos repeticiones

En general, las frutas y sus derivados no son fuentes de proteínas, ni grasas, es así que la cáscara contiene 9,19 % de proteínas y 2,68 % de grasas, según se reportó en la tabla 2.

Estos resultados muestran que la cáscara de sanky seca y molida presenta componentes que ayudarían a mejorar el tránsito intestinal y a proteger la mucosa gástrica y por su contenido de cenizas es una buena fuente de minerales como calcio, hierro y zinc. Se podría utilizar como ingrediente para elaborar alimentos funcionales y/o otros productos en la industria cosmética y farmacéutica.

Extracción por ultrasonido de los componentes fenólicos de la cáscara de sanky

En la mayoría de los tratamientos, los polifenoles totales presentaron mayores valores que los reportados por Alanoca¹³ quien utilizó el método tradicional de maceración con etanol para la extracción de los compuestos fenólicos.

Según los datos de la figura 1, el extracto M11, con 50 %v/v de etanol, 40 minutos de tiempo de extracción y 25 °C, fue la que presentó el mayor rendimiento de extracción reflejada en la mayor cantidad de polifenoles totales, reportó 43,9 mg GAL/g de cáscara seca, mostrando un amplio margen muy superior al resto de tratamientos. Los extractos M3 (60 % etanol, 40 minutos y 35 °C), M6 (40 % etanol, 30 minutos y 45 °C) y M9 (50 % etanol, 20 minutos y 25 °C) mostraron valores muy similares, 31,5; 32,9 y 32,6 mg GAL/g de materia seca, respectivamente. Entre estos tres tratamientos no hubo diferencias significativas en el contenido de fenoles totales, por tanto, también presentarían actividad antioxidante muy similar. De este grupo, el extracto M9, sería el más recomendable para extraer los polifenoles a un menor tiempo (20 minutos) y menor temperatura (25 °C), la temperatura es un factor que afecta en forma desfavorable la estabilidad de los fenoles. El extracto M4 (60 % de etanol, 20 minutos y 35 °C) reportó el menor contenido de polifenoles, 14,2 mg GAL/g de materia seca, esto se puede deber a la mayor concentración del etanol, ya que la solubilidad de los fenólicos tiende a disminuir, además el tiempo de extracción fue de apenas 20 minutos. La solubilidad de estas sustancias disminuye en solventes menos polares como metanol y etanol, se recomienda utilizar mezclas con agua, para incrementar la polaridad como acetona:agua y/o etanol:agua para mejorar la extracción de polifenoles⁵.

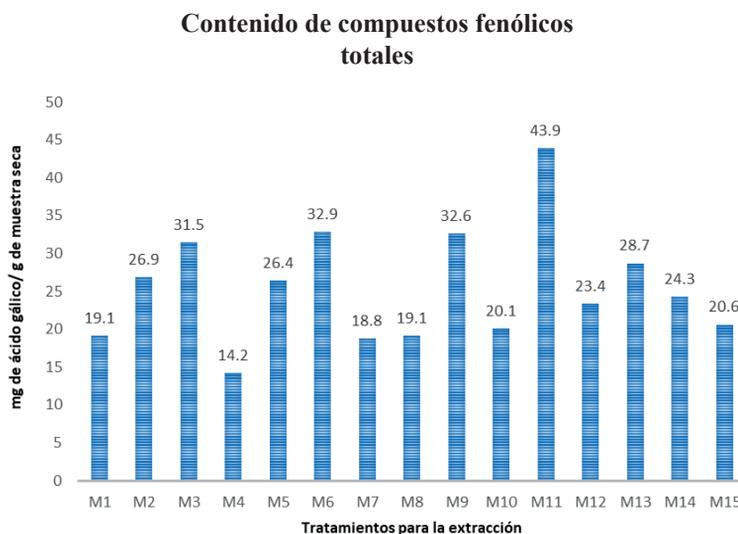


Figura 1. Contenido de compuestos fenólicos totales en las cáscaras de sanky seca y molida en los diferentes tratamientos.

Dado que los extractos M11 (50 % etanol, 40 minutos y 25 °C) y M9 (50 % etanol, 20 minutos y 25 °C) fueron los de mayor contenido de fenoles totales, se deduce que el tiempo de extracción es la variable independiente de mayor influencia seguido de la concentración del solvente. En las cáscaras de varios frutos, se reporta presencia de sustancias bioactivas en mayor concentración que en la misma pulpa, en el caso de las cáscaras de plátano, sandía y uva se reportaron valores de polifenoles como ácido gálico equivalente (AGE) de 24,42; 26,73 y 113,40 mg AGE/ g de muestra, respectivamente⁷ así como la cáscara de mandarina común y de toronja que según Ordóñez *et al.*⁹, presentaron 3,22 y 3,08 mg AGE/ g muestra, respectivamente. En todos los casos, los extractos de cáscara de sanky presentaron mayor contenido de polifenoles que las cáscaras de frutas antes mencionadas. En las cáscaras de frutas cítricas el contenido es mucho menor aún. Esto podría deberse a que la planta de sanky, por ser una cactácea requiere de poca agua para su adaptación y crecimiento, es así que los solutos se encuentran altamente concentrados en comparación con otros residuos frutales. El contenido de fenoles en el sanky puede variar debido a las características del suelo, a la época de siembra y/o condiciones de post cosecha. En el extracto de cáscara de granada se reportó 165,4 mg de GAL/g de extracto en peso seco¹⁴, valor bastante superior al encontrado en la cáscara de sanky. Sin embargo, estos polifenoles en las plantas pueden estar en forma simple, polimerizados o incluso pueden estar ligados a proteínas o carbohidratos, lo cual implica que lograr un sistema de extracción para estructuras tan distintas resulta ser muy complejo.

Al respecto Balasundram *et al.*⁸ mencionan que los compuestos fenólicos extraídos de extractos vegetales tienen correlación positiva con la actividad antioxidante y podrían actuar como agentes que previenen la oxidación a nivel celular. Por tanto, todos los extractos obtenidos por ultrasonido también tendrían actividad antioxidante.

CONCLUSIONES

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) para recuperar los componentes fenólicos de la cáscara de sanky, utilizando el diseño de Box Behnken, reportó la mejor eficiencia utilizando 50,0 %v/v de etanol, con un tiempo de extracción de 40 minutos y una temperatura de 25 °C, mostrando una diferencia significativa, muy superior al resto de tratamientos. En esta metodología, el tiempo de extracción fue el factor más importante, seguido de la concentración del solvente (etanol).

AGRADECIMIENTO

Al Departamento Académico de Química, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina por su apoyo con el equipo de extracción por ultrasonido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chen W, Wang W, Zhang H. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. *Carbohydr Polym.* 2012; 87: 614-619.
2. Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy.* 2017;7(3): 47
3. Nolzaco D, Guevara A. Estudio de las principales características fisicoquímicas y comportamiento del néctar de sanky (*Corryocactus brevistylus* subsp. puquiensis (Rauh & Backeberg) Ostolaza) en almacenamiento. *Anales Científicos UNALM.* 2009; 70 (4):1-11.
4. Matos R, Paredes J, Gonzales L. Determinación de la Capacidad Antioxidante de los Compuestos Fenólicos del Sancayo (*Corryocactus brevistylus*). *Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos.* 2010;1(1):66-71
5. Zou T, Xia E, He T, Huang M, Jia Q, Li H. Ultrasound-assisted extraction of Mangiferin from Mango (*Mangifera indica* L.) leaves using response surface methodology. *Molecules.* 2014;19(2):1411-21.
6. Lipe C. Efecto hepatoprotector del zumo de fruto de *Corryocactus brevistylus* (sanky) en ratones con daño hepático inducido por etanol. [Tesis para licenciada en Nutrición]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016.
7. Hurtado R, Ortiz L. Componentes Fitoquímicos y Capacidad Antioxidante de cáscaras de frutas de mayor consumo en el Perú. [Tesis para licenciada en Nutrición y Dietética]. Lima, Perú: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas; 2018.
8. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potencial uses. *Food Chem.* 2006; 99: 191-203

9. Ordóñez-Gómez E, Reátegui-Díaz D, Villanueva-Tiburcio J. Total polyphenols and antioxidant capacity of peel and leaves in twelve citrus. *Scientia Agropecuaria*. 2018; 9(1):113 – 121.
10. International Solid Waste Association. Waste Atlas 2013 Report. [Internet]. International Solid Waste Association [citado 7 feb 2019]. Disponible en: https://www.iswa.org/fileadmin/galleries/News/WASTE_ATLAS_2013_REPORT.pdf [Accessed 7 February 2019].
11. AOAC. Official Methods of Analysis. 18th. Edition. Gaithersburg, Maryland, USA: Association of Official Analytical Chemists; 2005.
12. Waterhouse A. Determination of total phenolics. *Curr Prot Food Anal Chem*. 2002; 6(1):I1.1.1-I1.1.8
13. Alanoca S. Evaluación del contenido de ácido ascórbico y polifenoles totales del sancayo (*Corryocactus brevistylus*) y determinación de su actividad antioxidante y genotoxicidad en linfocitos de sangre periférica [Tesis Ingeniera en Biotecnología]. Arequipa, Perú: Universidad Católica de Santa María; 2014.
14. Rodríguez J, López M. Extracción por ultrasonido de los polifenoles de la fruta *Punica granatum* (granada). *Rev Cubana de Farm*. 2014; 48(2):469-476.
15. Escobar Blanco M. Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México. [Tesis para optar el Título de Maestra en Ciencia de Alimentos]. México DF, México: Escuela de posgrado del Instituto Politécnico Nacional; 2010.

**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE Y DEL EFECTO FUNGISTÁTICO SOBRE
Candida albicans DEL ACEITE ESENCIAL DE
Piper aduncum L. “MATICO”**

Sharon Ingaroca^a, Américo Castro^a, Norma Ramos^a

RESUMEN

El aceite esencial se obtuvo de las hojas de *Piper aduncum* L. procedentes del Departamento de Loreto, mediante destilación por arrastre de vapor de agua con un rendimiento de 1,1 % v/p. La composición química se determinó mediante Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM), identificándose 35 componentes químicos, de los cuales ocho representan el 76,53 % del área total. Los principales compuestos fueron fenilpropanoides (1, 2, 4-trimetoxi-5-(1-propenil)- benceno (39,32 %) y metileugenol (12,85 %)), hidrocarburos sesquiterpenoides (germacreno D (7,52 %), biciclogermacreno (5,88 %), β -cariofileno (2,82 %) y δ - cadineno (2,81 %)), un hidrocarburo monoterpenoide (β -ocimeno (2,34 %) y un monoterpenoide oxigenado (4,7,7-trimetilbicyclo [2.2.1] heptan-3-ona (2,99 %)). La actividad antioxidante fue evaluada mediante los métodos de captación de los radicales DPPH[•] y ABTS^{•+}. La capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC- DPPH) (TEAC-ABTS) fue de 1,839 y 17,79 μ g Trolox/mg del aceite esencial, respectivamente. El efecto fungistático fue evaluado mediante el método de microdilución colorimétrica en caldo, mostrando actividad con un MIC de 1,24 mg/mL. Los resultados demuestran que a pesar de que la actividad antioxidante y el efecto fungistático del aceite esencial fueron limitados; el alto contenido de fenilpropanoides lo hace un candidato prometedor para futuras investigaciones.

Palabras clave: *Piper aduncum* L., antioxidante, fungistático, *Candida albicans*.

^a Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú. sharoningarocatejedafyb@gmail.com

CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND FUNGISTATIC EFFECT AGAINST *Candida albicans* OF THE ESSENTIAL OIL OF *Piper aduncum* L. "MATICO"

ABSTRACT

The essential oil was obtained from leaves of *Piper aduncum* L. "matico" from in Department of Loreto by steam distillation with a yield of 1.1% v/w. The chemical composition has determined by chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Thirty-five chemical components were identified, of which eight represent 76,53 % of the total area. The main volatile compounds are phenylpropanoids (1, 2, 4-trimethoxy-5- (1-propenyl) -benzene (39,32%) and methyleugenol (12,85%)), sesquiterpenoid hydrocarbons (germacrene D (7,52%), bicyclogermacrene (5,88%), β -caryophyllene (2,82%) and δ -cadinene (2,81%)), a monoterpenoid hydrocarbon (β -ocimene (2,34%)) and an oxygenated monoterpenoid (4,7,7-trimethylbicyclo [2.2.1] heptan-3-one (2,99%)). The antioxidant activity was evaluated by DPPH \cdot and ABTS \cdot^+ radical scavenging methods. The antioxidant capacity equivalent to Trolox (TEAC-DPPH) (TEAC-ABTS) was 1.839 and 17.79 μ g Trolox/mg of the essential oil, respectively. The fungistatic effect was evaluated by colorimetric broth microdilution method, showing activity with a MIC of 1.24 mg/ mL. The results show that although the antioxidant activity and the fungistatic effect of the essential oil of *Piper aduncum* L. were limited, however, the high content of phenylpropanoids makes it a promising candidate for future research.

Key words: *Piper aduncum* L., antioxidant, fungistatic, *Candida albicans*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe una constante preocupación por la seguridad de los antioxidantes sintéticos utilizados para mantener la calidad de los productos alimenticios, lo que ha motivado a la industria alimentaria a buscar alternativas naturales¹.

Por otro lado, la candidiasis en la actualidad representa la tercera a cuarta infección nosocomial más frecuente en hospitales en todo el mundo, lo que la ha convertido en un problema de salud pública². Simultáneamente, la resistencia a fármacos antifúngicos también ha aumentado considerablemente en los últimos años³. Por lo tanto, se necesitan nuevos compuestos con propiedades antifúngicas para hacer frente al desafío de las micosis invasivas.

Las plantas medicinales constituyen un reservorio de compuestos químicos estructuralmente diversos (compuestos bioactivos), por lo que pueden ser una fuente para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos y antifúngicos. Los aceites esenciales, son objeto de interés científico en las últimas décadas, con un análisis exhaustivo que indica que muchos de estos y sus componentes aislados poseen diversas actividades⁴.

En este contexto, la Amazonía peruana, como región fitogeográfica y biodiversa, es una fuente de especies de plantas. Así, la familia Piperaceae, es reconocida en el Perú, por presentar tres géneros y 830 especies, de los cuales el más abundante es el género *Piper*⁵. *Piper aduncum* L se usa en la medicina tradicional como antiséptico, antidiarreico, antirreumático, astringente y tónico⁶. Los yaneshas, comunidad nativa de la Amazonía peruana, preparan tés y baños de vapor de las hojas contra infecciones generales y fiebre⁷. Sin embargo, no hay suficientes datos relacionados a sus actividades terapéuticas que validen sus usos tradicionales. En este sentido, el propósito del estudio fue evaluar la composición química, la actividad antioxidante y el efecto fungistático del aceite esencial de *Piper aduncum* L “matico” frente a *Candida albicans*.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Las hojas de *Piper aduncum* L. “matico” fueron colectadas en el Departamento de Loreto, provincia de Maynas, distrito de Napo. Las hojas fueron separadas de los tallos y almacenadas a temperatura ambiente, bajo luz difusa. El peso promedio del material fresco de la planta fue de 5 kg. La clasificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Obtención del aceite esencial

El aceite esencial se extrajo en un sistema de destilación por arrastre de vapor de agua hasta su recuperación total. El volumen de aceite esencial obtenido fue deshidratado con sulfato de sodio anhidro, luego fue transferido a un vial ámbar y posteriormente almacenado bajo refrigeración (4°C) y protegido de la luz, hasta su uso.

Productos químicos

Todos los componentes usados en este trabajo fueron de grado analítico. Los reactivos y estándares (DPPH, ABTS y Trolox®) para la evaluación de la actividad antioxidante fueron comprados de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El estándar ketoconazol para la evaluación del efecto fungistático fue suministrado por Laboratorios Induquímica. Los medios de cultivo RPMI 1640 con glutamina sin bicarbonato y agar dextrosa Sabouraud al 4 % fueron adquiridos también por Sigma-Aldrich Chemical Co. y EMD Millipore Co. (Billerica, MA 01821, USA). Los solventes metanol y dimetilsulfoxido (DMSO) fueron también obtenidos de EMD Millipore Co. (Billerica, MA 01821, USA). Otros productos químicos como etanol 96° y sulfato de sodio anhidro, así como polisorbato 20 (Tween 20) y resazurina fueron proporcionados por el Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” y por el Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo”, respectivamente. Agua bidestilada fue usada a lo largo de este trabajo.

Microorganismo y condiciones de crecimiento

Candida albicans ATCC 10231 es un cultivo estándar de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y fue suministrado por el Instituto Investigaciones Estomatológicas de la Facultad de Odontología de la UNMSM. La cepa fue cultivada de stock congelados y conservados en placas con agar dextrosa Sabouraud al 4 % en condiciones aeróbicas a 37 °C durante 48 horas.

Cromatografía de gases / espectrometría de masas (CG/EM)

El análisis del aceite esencial fue realizado mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG/EM) usando un Agilent Technologies 7890 y un Agilent Technologies 5975C, respectivamente, equipado con una columna capilar de silica gel J&W 122-1545.67659 DB- 5ms, 325 °C: 60 m x 250 µm x 0,25 µm. Las condiciones operativas fueron las siguientes: la programación de la temperatura de la columna para CG empezó en 80°C, luego se incrementó a 10° C/min hasta 180°C, seguida de 2,5 °C/min hasta 200°C por 5 min, 2,5°C/min hasta 240°C y finalmente 5°C/min hasta 300°C manteniéndose por 2 minutos. El gas portador fue helio con una tasa de flujo de 1.0 mL/min; la temperatura de inyección fue de 300 °C; el volumen de inyección de la muestra fue de 1 µL (20 µL de aceite en 1 mL de diclorometano) y la proporción de división fue de 20:1. El tiempo de corrida fue de 54 minutos. Las condiciones de espectrometría de masas fueron las siguientes: la energía de ionización fue de 70 eV y la temperatura de detección fue de 250 °C.

Los componentes fueron identificados por análisis comparativo de los espectros de masa frente a la base de datos del sistema GC/MS (Nist 08.lib y Flavor 02) junto con los índices de retención (RI) relativos, obtenidos de la inyección de una mezcla de n-alcanos usando la ecuación de Van Den Dool y Kratz.

El contenido relativo de todos los componentes identificados fue estimado por comparación de su área con las áreas totales.

Actividad antioxidante

El aceite esencial fue analizado mediante dos ensayos. La actividad de captación del radical DPPH se realizó siguiendo el método de Brand- Williams *et al.*⁸ y la actividad de captación del radical ABTS se realizó según el método de Re *et al.*⁹. La muestra fue diluida con etanol de 96°. El estándar de referencia fue Trolox®. Ambos ensayos fueron realizados por triplicado y en un espectrofotómetro UV-VIS (Thermo Scientific TM GENESYS 10S), a 25° C. Los resultados se expresaron como concentración inhibitoria media (IC50) y como unidades de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).

Efecto fungistático

El efecto fungistático del aceite esencial fue evaluado mediante el método de microdilución en placas de 96 pocillos, de acuerdo protocolo M27-A3¹⁰ del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI) y las modificaciones de Liu M. *et al.*¹¹. La lectura de los resultados se hizo visualmente y se expresaron como concentración mínima inhibitoria (MIC), que se define como la concentración más baja de la muestra a la que no se produce el cambio de color¹¹. El promedio de tres valores se reportó como MIC.

Análisis estadístico

Los datos recolectados de la actividad antioxidante fueron analizados por análisis de varianza de un factor (ANOVA) usando el software SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). La medición de la diferencia se determinó de acuerdo con la prueba de rango múltiple de Tuckey. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE). Los valores de CI50 se calcularon usando análisis regresión lineal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química y cuantificación del aceite esencial

El rendimiento (v/p de hojas) fue 1,1 % v/p. La composición química del aceite esencial de *P. aduncum* L. se muestra en la tabla 1. Los datos de GC-MS revelaron 35 componentes, de los cuales ocho representan el 76,53 % del área total del pico en el cromatograma. Los principales componentes fueron 1,2,4-trimetoxi-5-(1-propenil)-benceno (39,32%), metileugenol (12,85%), germacreno D (7,52%), biciclogermacreno (5,88%), 4,7,7-trimetilbicyclo [2.2.1] heptan-3-ona (2,99 %) y β -cariofileno (2,82 %), δ -cadineno (2,81%) y β -ocimeno (2,34%).

Para esta especie se han informado diferentes perfiles químicos. El principal componente en Bolivia fue el monoterpenoide oxigenado 1,8-cineol (40,5%). Panamá fue abundante en sesquiterpenoides como β -cariofileno (17,4%) y aromadendreno (13,4%). En Cuba, fueron monoterpenoides oxigenados como 4,7,7-trimetilbicyclo [2.2.1] heptan-3-ona (17,1-18,1%), viridiflorol (14,5%) y piperitona (23,7%). Un quimiotipo encontrado con frecuencia en Brasil, Ecuador oriental, sur de Asia oriental y Oceanía fue dillapiol (30-90%)¹². Los resultados de este estudio no solo confirman la amplia variabilidad en la composición química de *Piper aduncum* L. sino también evidencian de manera preliminar un perfil diferente. La existencia de estas variaciones puede atribuirse a las complejas interacciones entre los factores genéticos (variedades, subespecies y quimiotipo), las condiciones ambientales, tiempo de recolección y los métodos de extracción. Así, por ejemplo, el alto contenido de fenilpropanoides, podría estar asociado con una mayor expresión de los genes de la enzima chalcona sintasa en comparación con la enzima terpeno sintasa, productora de monoterpenoides y sesquiterpenoides¹³.

Tabla 1. Composición química del aceite esencial de *Piper aduncum* L. realizado por CG/EM.

Número	Componente ^a	t _R ^b (min)	% en la muestra ^c
1	β-mirceno	7,23	0,32
2	β-pineno	7,32	1,30
3	3-careno	7,64	0,19
4	β-trans-ocimeno	7,80	0,92
5	D-limoneno	7,89	0,42
6	β-ocimeno	7,96	2,34
7	Terpinoleno	8,64	1,06
8	Linalol	8,70	0,53
9	4,7,7-trimetilbicyclo [2.2.1] heptan-3-ona (alcanfor)	9,68	2,99
10	Isoborneol	9,91	0,83
11	p-cimen-8-ol	10,06	0,31
12	Elixeno	12,32	0,54
13	α-cubebeno	12,54	0,28
14	α-copaeno	13,11	1,49
15	Metileugenol	13,20	12,85
16	8-Isopropenil-1,5-dimetil-ciclo-deca-1,5-dieno	13,26	0,87
17	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄)	13,32	0,72
18	β-cariofileno	14,00	2,82
19	β-cubebeno	14,12	0,41
20	Aromadendreno	14,33	0,77
21	α-cariofileno	14,66	1,55
22	L-alloaromadendreno	14,75	0,56
23	Pentadecano	14,91	3,62
24	Germacreno D	15,12	7,52
25	α-muroleno	15,30	1,11
26	Biciclogermacreno	15,40	5,88
27	δ-cadineno	15,67	2,81
28	Desconocido (C ₁₅ H ₂₆ O)	15,75	1,57
29	Elemicina	15,88	0,78
30	1,2,4-trimetoxi-5-(1-propenil)-benceno (asarona)	16,36	39,32
31	Germacreno D-4-ol	17,12	0,56
32	Espatuleno	17,18	1,41
33	Óxido de cariofilleno	17,37	0,56
34	α-cadinol	18,90	0,31
35	Apiol	19,04	0,48
	Total		100

Componentes listados en orden de elución de una columna J&W 122-1545.67659 DB-5ms.

^b t_R, Índices de retención (min) calculados en la columna J&W 122-1545.67659 DB-5ms relativa a C8-C28 n-alcános.^c Porcentaje del área relativa (área de pico relativa al área del pico total en el cromatograma).

Estos componentes pertenecen a seis familias químicas: fenilpropanoides, hidrocarburos sesquiterpenoides, sesquiterpenoides oxigenados, hidrocarburos monoterpenoides, monoterpenoides oxigenados y compuestos alifáticos. Los fenilpropanoides fueron los más abundantes (53,43%) con 1,2,4-trimetoxi-5-(1-propenil)-benceno y metileugenol como los componentes principales de este grupo de compuestos químicos. Los terpenoides (40,66%) representan el segundo grupo. El contenido de hidrocarburos sesquiterpenoides (26,61%) fue más alto que los sesquiterpenoides oxigenados (2,84%), mientras que la cantidad de hidrocarburos monoterpenoides (6,55%) fue similar al de monoterpenoides oxigenados (4,66%) (figura 1).

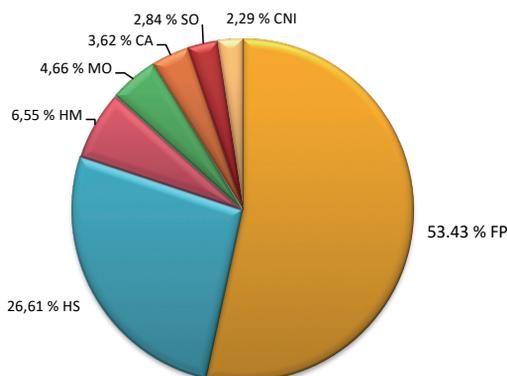


Figura 1. Distribución de los diferentes grupos químicos de los componentes del aceite esencial de *P. aduncum* L. FP: fenilpropanoides; MO: monoterpenoides oxigenados; HM: hidrocarburos monoterpenoides; SO: sesquiterpenoides oxigenados; HS: hidrocarburos sesquiterpenoides; CA: compuestos alifáticos; CNI: compuestos no identificados.

Actividad antioxidante del aceite esencial

Los resultados se expresaron mediante valores de IC_{50} y en unidades TEAC en las tablas 2 y 3, respectivamente. La actividad antioxidante por ambos métodos fue baja en comparación con el estándar polifenólico Trolox[®], análogo soluble de la vitamina E. Esta diferencia puede ser el resultado de diferentes mecanismos relacionados con sus diversas estructuras. En el caso de los polifenoles, está claramente relacionada con los grupos hidroxilos, unidos a un anillo de benceno, mientras que, para los isoprenoides, está relacionada con la presencia de dobles enlaces conjugados¹⁴. Por lo tanto, esta baja actividad del aceite esencial de *Piper aduncum* L se atribuiría a la presencia de 4,7,7-trimetilbicyclo [2.2.1] heptan-3-ona, β -cariofileno, bicyclgermacreno, germacreno D, y β -ocimeno, así como a los efectos sinérgicos y antagónicos entre ellos^{14,15}.

Tabla 2. Actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper aduncum* L. expresada como concentración inhibitoria media (IC₅₀).

Muestra	IC ₅₀ (µg/mL)	
	DPPH•	ABTS ^{•+}
Aceite esencial de <i>Piper aduncum</i> L.	1087,359	147,832
Trolox [®] ^a	2,0	2,68

^a Estándar de referencia**Tabla 3.** Actividad antioxidante del aceite esencial de *Piper aduncum* L. expresada como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).

Ensayo	TEAC		
	µg Trolox/mg	mg Trolox/mL	µmol Trolox/mL
DPPH•	1,839	1,824	7,286
ABTS ^{•+}	17,79	17,64	70,509

Las figuras 2 y 3 muestran el comportamiento del aceite esencial de *Piper aduncum* L. como captador de radicales DPPH y ABTS, respectivamente. Las concentraciones del aceite esencial se ajustaron linealmente con los valores de % inhibición y los coeficientes de determinación (R²) fueron mayores a 0,9. Estos valores demuestran que la concentración de aceite esencial y el porcentaje de inhibición presentan una correlación lineal significativa.

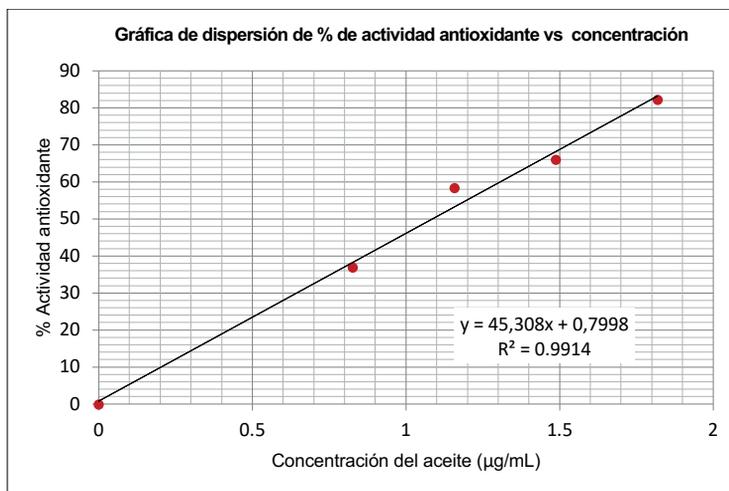


Figura 2. Curva de captación del radical DPPH del aceite esencial de *Piper aduncum* L.

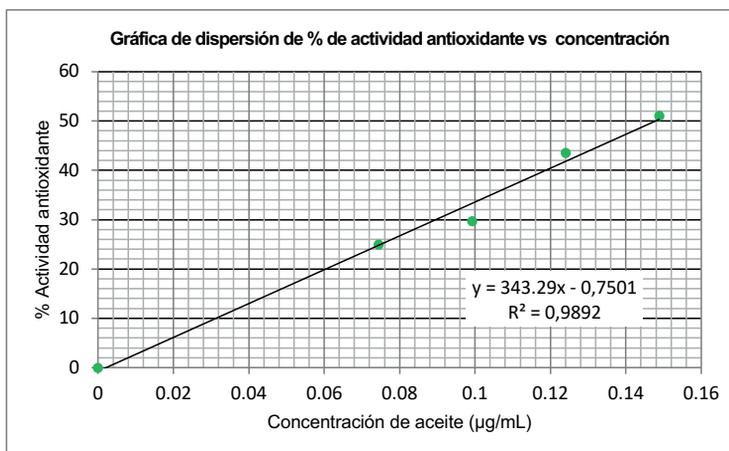


Figura 3. Curva de captación del radical ABTS del aceite esencial de *Piper aduncum* L.

Efecto fungistático del aceite esencial

El resultado muestra que la susceptibilidad de *C. albicans* frente al aceite esencial de *Piper aduncum* L. fue baja en comparación con el ketoconazol (tabla 4). La diferencia puede deberse a los diferentes mecanismos relacionados con sus estructuras. Esta facultad en aceite esencial de *Piper aduncum* L. se atribuiría a los componentes minoritarios, como germacreno D, biciclogermacreno, β -cariofileno, β -ocimeno y alcanfor^{16,17}. Su efecto fungistático puede explicarse por las propiedades lipofílicas de estos metabolitos, que les permite interrumpir la membrana celular de ergosterol o destruir la mitocondria fúngica¹⁷.

Tabla 3. Efecto fungistático del aceite esencial de *Piper aduncum* L., expresado como concentración mínima inhibitoria (MIC).

Muestra	Actividad inhibitoria frente a cepa fúngica <i>Candida albicans</i>
	MIC (mg/mL)
<i>Piper aduncum</i> L.	1,24
Ketoconazol ^a	0,08 ^b

^a Estándar de referencia

^b Unidad en $\mu\text{g/mL}$

Por otro lado, no hay suficientes estudios sobre las actividades antioxidante y fungistática de 1,2,4-trimetoxi-5-(1-propenil)-benceno y metileugenol. Las investigaciones de estos compuestos están principalmente dirigidos a evaluar su actividad antiparasitaria, antiprotozoaria y antitumoral⁴.

CONCLUSIONES

Un total de 35 componentes fueron identificados en el aceite esencial de *Piper aduncum* L. “matico”, de los cuales ocho representan el 76,53 % del contenido total. Los principales componentes fueron: 1,2,4-trimetoxi-5-(1-propenil)-benceno, metileugenol, germacreno D, biciclogermacreno, 4,7,7-trimetilbicyclo [2.2.1] heptan-3-ona, β -cariofileno, δ -cadineno y β -ocimeno. El aceite esencial de *Piper aduncum* L. “matico” mostró limitada actividad antioxidante como captador de radicales DPPH y ABTS comparado con el antioxidante de referencia. En cuanto al efecto fungistático el aceite esencial de *Piper aduncum* L. “matico” también fue limitado frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Sin embargo, el alto contenido de fenilpropanoides lo hace un candidato prometedor para futuras investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado por el financiamiento para la realización del trabajo, al Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” y al Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; en la culminación del presente estudio,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brewer M. Natural Antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2011; 10(4):221-247.
2. Prasad R. *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology.* 2nd ed. Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG; 2017.
3. Laxminarayan R, Matsoso P, Pant S, Brower C, Røttingen JA, Klugman K, *et al.* Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge, *Lancet.* 2016; 387(10014):168–75.
4. Di Liberto M, Svetaz L, Castelli M, Rai M, Derita M. Role of Essential Oils for the Cure of Human Pathogenic Fungal Infections. In: Rai M, Zacchino S, Derita M, editors. *Essential Oils and Nanotechnology for Treatment of Microbial Diseases.* Boca Raton, Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2018. p.128-38.
5. León B. Piperaceae endémicas del Perú. *Rev Perú Biol.* 2006; 13(2):492-563.
6. Kloucek P, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 99(2): 309-12.
7. Valadeau C, Pabon A, Deharo E, Albán-Castillo J, Yannick E, Lores FA, *et al.* Medicinal plants from the Yanasha (Perú): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *J Ethnopharmacol.* 2009; 123(3): 413-22.
8. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol.* 1995; 28(1): 25-30.
9. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26(9-10):1231-7.
10. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard – 3rd ed. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
11. Liu M, Seidel V, Katerere DR, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods.* 2007; 42(4):325-9.
12. Durant-Archibold A, Santana A, Gupta M, Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus Piper in Panama: A Review. *J Ethnopharmacol.* 2018; 10(217): 63-82.
13. Schmidt E. Production of Essential Oils. In: Baser CKH, Buchbauer G, editors. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications.* Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2010. p. 83-118.

14. Zaluski D, Cielsa L, Janeczko Z. The Structure–Activity Relationships of Plant Secondary Metabolites with Antimicrobial, Free Radical Scavenging and Inhibitory Activity toward Selected Enzymes. In: Atta-ur-Rahman FRS, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2015; 45:217-49. doi: 10.1016/B978-0-444-63473-3.00007-1.
15. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(2): 446-75.
16. Da Silva J, Pinto L, Burbano R, Montenegro R, Guimarães E, Andrade E, et al. Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*. 2014; 58: 55-60.
17. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, De Feo V. Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals* 2017; 10(4): 86.

INFORMACIONES

Con motivo de conmemorarse este año el 86° Aniversario de fundación de la Sociedad Química del Perú, hemos organizado el SIMPOSIO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS a realizarse los días 11, 12 y 13 de octubre del presente, en el horario de 9.00 am a 6.00 pm, en el Auditorio de Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Temario:

Agroquímicos

- Enmiendas húmicas de Leonardita para el restablecimiento de suelos agrícolas
- Aporte de enmiendas orgánicas para el equilibrio de fertilización en suelos agrícolas.
- Micro elementos quelatados en la cadena nutricional y su provisión en fertilización en riegos tecnificados.

Análisis y Procesamiento de Alimentos

- Cromatografía gaseosa y líquida
- Extracción por fluidos súper críticos
- Secado por atomización
- Liofilización

Procesos de conservación de alimentos

- Tratamiento térmico de alimentos
- Atmósferas protectoras
- Péptidos bioactivos

Nuevos procesos tecnológicos

- Elaboración de pan con Huella Hídrica Reducida
- Uso de polímeros para la elaboración de películas y su aplicación en la conservación de alimentos.
- Caracterización reológica de almidón de dos variedades de papas andinas.

Inversión:

- Profesionales 300 soles
- Estudiantes 200 soles

* Si realiza su inscripción hasta el 15 de agosto inclusive, obtendrá un descuento del 10%.

Mayor información en el correo sqperu@gmail.com.

Obituario

Cumplimos con comunicar el fallecimiento de nuestra socia, **Mg. Pilar Caso Caballero**,
Nuestras más sentidas condolencias para sus familiares.



**SIMPOSIO DE TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS**
Del 11 al 13 de Octubre, 2019